

**FELIPE DAMÁZIO PACHECO**

**MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA NA INFÂNCIA COM  
O USO DA CETAMINA EM RATOS WISTAR MACHOS E  
FÊMEAS: ALTERAÇÕES NO COMPORTAMENTO, NO  
METABOLISMO ENERGÉTICO E DIFERENÇAS DE GÊNERO**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade  
do Extremo Sul Catarinense para  
obtenção do título de Doutor em  
Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Alexandra  
Ioppi Zugno

**CRICIÚMA  
2016**





UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

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

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

## PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pelo candidato **Felipe Damazio Pacheco** sob o título “**Modelo animal de esquizofrenia na infância com o uso da cetamina em ratos Wistar machos e fêmeas: alterações no comportamento, no metabolismo energético e diferenças de gênero**”, para obtenção do grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

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

Criciúma, SC, 19 de dezembro de 2016.

**Prof.ª Dra. JOSIANE BUDNI**  
Membro Relator – UNESC

**Prof. Dr. FELIPE DAL PIZZOL**  
Membro Interno – UNESC

**Prof. Dr. ADAIR ROBERTO SOARES DOS SANTOS**  
Membro Externo - UFSC

**Prof.ª Dra. MANUELLA PINTO KASTER**  
Membro Externo - UFSC

**Prof.ª Dra. Alexandra Ioppi Zugno**  
Orientadora

**Prof.ª Dra. Josiane Budni**  
Coordenadora Adjunta do PPGCS



## FOLHA INFORMATIVA

Esta tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências e do Laboratório de Fisiopatologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.



Este trabalho será dedicado a  
Eloide Borges Pacheco (*in memoriam*)





## AGRADECIMENTOS

Confesso que nunca pensei que fazer os agradecimentos fosse tão difícil! Entre agradecer de forma geral e agradecer por nomes, é uma escolha muito difícil. Vou escolher a segunda, com o risco de ser deselegante.

O meu primeiro agradecimento vai o meu pai e a minha mãe, o José Airtton e a Maria. Afinal, neste período quem que fiz mestrado e doutorado, nós voltamos a viver juntos. Esses 6 anos valeram por uma vida, em que as minhas irmãs Cristina e Letícia cresceram, em que nós lutamos por elas fomos vitoriosos. Neste período, de várias formas, em termos materiais e emocionais, este trabalho seria impossível sem vocês. Muito obrigado!

O presente trabalho foi precedido por um trabalho anterior, que veio a não fazer parte do doutorado mas que me ensinou muitas coisas, e talvez este trabalho não teria acontecido se eu não tivesse aprendido tantas coisas com este experimento anterior. Vocês não estão mais no laboratório mas merecem meu agradecimento. Obrigado Ana Volpato e Adalberto (pós docs), obrigado alunas Graziela e Witória.

Agradeço à Prof Alexandra que me deu a oportunidade e a acolhida. Foram anos difíceis tanto para ti quanto para mim, mas superamos toda sorte de obstáculos e o resultado está aqui.

Este trabalho teve a colaboração de muitas pessoas, e cada minuto de cada experimento, cada conversa foi um ganho, foi uma experiência inesquecível. Muito obrigado Lara, Alexandra Stephanie, Gustavo, Louyse, Julia Polla, Patrícia, Kátia, Sarah, Isadora, Carol, Geórgia, Isabela, Amanda, Jadne, Júlia, Maurício... e talvez alguém tenha feito alguma coisa e eu não esteja lembrando...

Muito obrigado para a Lara Mezari, ao Laboratório de Fisiopatologia (Prof. Emílio), pois esta parceria deu certo, este trabalho não teria sido possível sem a competência desta equipe!

Muito obrigado Prof Samira Valvassori e Fernanda Gava, o laboratório está de parabéns pela grande contribuição dada a este trabalho!

Além disso, em muitos momentos tive a companhia e acolhida da Prof. Gislaíne, com quem fiz o estágio de docência e foi maravilhoso!

Novamente, as contribuições da Prof. Josiane Budni lá no mestrado foram fundamentais para resultar no presente trabalho, isso sem falar da agradável convivência conosco no laboratório, que não tem preço. Agradeço ainda ao Prof. João Quevedo que mesmo à distância nos deu



contribuições cruciais para este desenho experimental. Ao colega de laboratório, o doutorando Arlindo, obrigado pela companhia! Além disso a convência com os colegas Ederbal e Leonardo teve momentos hilários e inesquecíveis.

Agora o meu agradecimento vai para estes amigos que não são da UNESC, estão um pouco distantes fisicamente mas que tenho certeza que sempre torceram por mim: Fábio, Priscila e Éverton.

Muito obrigado ao Júnior, Karllos, Diogo e ao Tiago. Como numa espécie de “roveamento”, cada um de vocês me “suportou” por um período desde o mestrado até hoje. Agora vocês podem dizer: missão cumprida!

Muito obrigado aos meus amigos e amigas reais e virtuais, meus irmãos por escolha, com quem mesmo à distância chego a conversar quase todos os dias. Vocês são minha força a cada passo na caminhada! Muito obrigado Relve, Cibele, Ricardo, Michel, Rubian e Deyvid. Obrigado Anderson: vamos fazer 20 ANOS de amizade, e parece que foi ontem!

Obrigado Cristiane Moreira, Dr Celso Moreira (*in memoriam*) Márcio Arruda (e família), e Ringo Bez. O tema deste trabalho tem a ver com partes da história de vocês, e espero que vocês gostem. Obrigado Dr Marcos Drehmer! Além de terapeuta, és um grande exemplo para minha própria vida profissional. E ainda, entre os médicos, o Carlos (que espero que em breve seja meu colega), o Leonardo, a Dânia C., Dânia R., o Ramon, a Fernanda e diversos outros colegas sensacionais que conheci na Fundação Mário Martins. Dedico ainda à Dra Mirella (*in memoriam*), onde quer que ela esteja!

Ainda, um agradecimento um tanto estranho, mas que acredito que em breve será usual neste tipo de experimento. Obrigado aos Animais, seres sencientes que deram a vida por este experimento! Espero que a evolução da ciência traga benefícios também para os animais, e que em breve não seja mais necessária a utilização dos mesmos como fazemos hoje, mas que os métodos alternativos façam com que a maior parte dos experimentos dispensem o uso de animais. Por fim, meu agradecimento ao “Universo”, popularmente conhecido como Deus. Eu ainda estou à procura de respostas para os vossos desígnios, para os quais, eu confesso, muitas vezes me deixam inconformado. Mas somos mamíferos que sobreviveram porque acreditaram. Não há outra saída a não ser acreditar. E as obras que foram feitas na minha vida, de tão grandes, só tenha a agradecer. Muito obrigado!



*Há uma necessidade  
crescente de validar  
modelos animais para os  
dois sexos e usar  
procedimentos padronizados  
entre os diferentes  
laboratórios  
(Kokras e Dalla, 2014)*



## RESUMO

A Esquizofrenia na Infância é rara e pouco estudada. O modelo animal da cetamina está bem estudado em ratos Wistar machos adultos, mas não em animais prepúberes. Foi administrado cetamina ou salina 1x/dia intraperitoneal nas doses de 5 mg/kg, 15 mg/kg (doses de efeito antidepressivo em estudos anteriores), 25 mg/kg e 50 mg/kg (doses de efeito alucinógeno) em ratos *Wistar* machos e fêmeas com idade de 23 dias (12 por grupo) durante 7 dias. Aos 30º, 31º e 32º dias de vida, os animais foram submetidos a Atividade Locomotora, Interação Social, Inibição do Sobressalto por Prepulso (PPI) e Esquiva Inibitória. As estruturas cerebrais – Córtex Pré-Frontal, hipocampo e estriado foram dissecadas para análises bioquímicas: atividade dos complexos mitocondrial da cadeia respiratória (Complexo I, II, II-III e IV), atividade da Creatina Cinase (CK), Succinato Desidrogenase (SDH) e Citrato Sintase, e dosagem dos níveis de Hidroxinonenal (HNE), 8-Isoprostano (8-ISSO) e Glutaciona total. A cetamina 5 mg/kg alterou somente nas fêmeas a interação social sem efeito em machos. A cetamina 15mg/kg afetou as fêmeas na Atividade Locomotora, PPI e Esquiva Inibitória, sem afetar os machos. Cetamina na dose 25 mg/kg alterou em machos e fêmeas a Atividade Locomotora, mas somente nas fêmeas o Contato Social, PPI e a Esquiva Inibitória. Na dose de cetamina 50 mg/kg houve alteração tanto nos machos como nas fêmeas na Atividade Locomotora e na PPI, mas somente em fêmeas na Esquiva Inibitória. Em ratos machos, cetamina 5mg/kg aumentou a atividade dos Complexo IV e diminuiu a atividade da Citrato Sintase no Córtex Prefrontal, e aumentou o Complexo II-III no hipocampo. Cetamina 15 mg/kg aumentou a atividade dos Complexos II, II-III, IV, CK e SDH no hipocampo. Cetamina 25 mg/kg aumentou a atividade do Complexo I no estriado, Complexo II-III no hipocampo e CK no Córtex Prefrontal. Cetamina 50 mg/kg aumentou a atividade do Complexo I no estriado e Complexo II-III no hipocampo. Em fêmeas, cetamina 5 mg/kg aumentou a atividade do Complexo II no hipocampo, e Complexo IV e SDH no estriado. Cetamina 25 mg/kg aumentou, em fêmeas, a atividade do Complexo IV e SDH no estriado, e diminuiu no Complexo II-III no Córtex Prefrontal. Cetamina 15mg/kg aumentou Complexo II-III e SDH no estriado. Cetamina 50mg/kg reduziu, no Córtex Prefrontal, os complexos I, II, II-III e IV. HNE esteve aumentado nas doses de 25 mg/kg e 50mg/kg em machos e fêmeas, e aumentado na dose de 15mg/kg em fêmeas. 8-ISSO aumentou na dose de 50mg/kg no estriado em machos, sendo que em fêmeas, houve aumento com 15, 25 e





50mg/kg e queda com 5mg/kg. Todas as doses alteraram o metabolismo energético em machos e fêmeas. As doses de cetamina 5mg/kg e 15mg/kg produziram alterações comportamentais e estresse oxidativo em fêmeas, mas não em machos. As doses de 25mg/kg e 50mg/kg produziram alterações semelhantes à esquizofrenia em ratos Wistar prepúberes machos e fêmeas. Conclui-se que a cetamina na dose de 25mg/kg e 50mg/kg pode ser utilizada em futuros estudos em ratos Wistar machos e fêmeas sobre esquizofrenia na infância.

Palavras-chave: Esquizofrenia de início da infância, cetamina, modelo animal, gênero, mitocôndria, Creatina, Ciclo de Krebs



## ABSTRACT

Childhood Onset Schizophrenia is rare and poorly studied. The animal model of ketamine is well studied in adult male Wistar rats, but not in prepubertal animals. Ketamine (an anesthetic, NMDA receptor antagonist) was administered intraperitoneally, daily, or saline at doses of 5 mg /kg, 15 mg /kg (doses of antidepressant effect in previous studies), 25 mg/kg and 50 mg/kg (doses of hallucinogenic effect) in male and female Wistar rats aged 23 days (12 per group) for 7 days. At the 30th, 31st and 32nd days of life, the animals were submitted to: Locomotion Activity, Social Interaction, Prepulse Inhibition (PPI) and Inhibitory Avoidance. Brain structures - Prefrontal cortex, hippocampus and striatum were dissected for biochemical analysis: mitochondrial complexes of the respiratory chain (Complex I, II, II-III and IV), Creatine Kinase (CK), Succinate Dehydrogenase (SDH) And Citrate Synthase, and levels of Hydroxynonenal (HNE), 8-Isoprostane (8-ISSO) and total Glutathione. Ketamine 5 mg/kg altered only the social interaction without effect in males. Ketamine 15mg/kg affected females in Locomotion, PPI and Inhibitory Avoidance, but not males. Ketamine 25 mg/kg changed the Locomotion in males and females, but, only in females, Social Contact, PPI and Inhibitory Avoidance. At dose of ketamine 50 mg/kg there was alteration in both males and females in Locomotion and PPI, but only in females in Inhibitory Avoidance. In male rats, ketamine 5 mg/kg increased the activity of Complex IV and decreased the activity of Citrate Synthase in the Prefrontal Cortex, and increased Complex II-III in the hippocampus. Ketamine 15 mg / kg increased the activity of Complex II, II-III, IV, CK and SDH in the hippocampus. Ketamine 25 mg / kg increased the activity of Complex I in the striatum, Complex II-III in the hippocampus and CK in the Prefrontal Cortex. Ketamine 50 mg/kg increased the activity of Complex I in the striatum and Complex II-III in the hippocampus. In females, ketamine 5 mg/kg increased Complex II activity in the hippocampus, and Complex IV and SDH in the striatum. Ketamine 25 mg /kg increased the activity of Complex IV and SDH in the striatum in females and decreased in Complex II-III in Prefrontal Cortex. Ketamine 15mg/kg increased Complex II-III and SDH in the striatum. Ketamine 50mg/kg reduced the complexes I, II, II-III and IV in the Prefrontal Cortex. HNE was increased in doses of 25mg/kg and 50mg in males and females, and increased in the dose of 15mg / kg in females. 8-ISSO increased at a dose of 50mg/kg in the striatum in males, and in females,



there was an increase with 15, 25 and 50mg /kg and a decrease of 5mg/kg. All the doses altered mitochondrial metabolism in males and females. Doses of 5mg/kg and 15mg/kg produced behavioral alterations and oxidative stress in females, but not males. Doses of 25mg/kg and 50mg/kg produced schizophrenia-like alterations in both male and female prepubertal Wistar rats. Conclusion: ketamine 25mg/kg and 50mg/kg may be used in future studies in male and female Wistar rats on Childhood Onset Schizophrenia.

**Keywords:** Childhood Onset Schizophrenia, ketamine, animal model, gender, mitochondria, Creatine, Krebs Cycle



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Alterações na formação das sinapses na esquizofrenia.....	40
<b>Figura 2</b> - Neurodesenvolvimento e evolução do número de sinapses..	41
<b>Figura 3</b> - Efeitos da cetamina em ratos Wistar machos, adultos jovens.....	49
<b>Figura 4</b> - Resultados para Distância Percorrida (machos e fêmeas)....	59
<b>Figura 5</b> - Resultados para Movimentos Estereotipados (machos e fêmeas).....	60
<b>Figura 6</b> - Resultados para Tempo no Centro (machos e fêmeas).....	61
<b>Figura 7</b> - Resultados para Tempo nas Bordas (machos e fêmeas).....	61
<b>Figura 8</b> - Resultados para Latência para Primeiro Contato na Interação Social (machos e fêmeas).....	62
<b>Figura 9</b> - Resultados para Número Total de Contatos na Interação Social (machos e fêmeas).....	63
<b>Figura 10</b> - Resultados para Tempo Total de Contatos na Interação Social (machos e fêmeas).....	63
<b>Figura 11</b> - Resultados para PPI em ratos machos, intensidades de 65dB, 70 dB e 75 dB.....	64
<b>Figura 12</b> - Resultados para Resultados para PPI em ratas fêmeas, intensidades de 65dB, 70 dB e 75 dB.....	65
<b>Figura 13</b> - Resultados para Esquiva Inibitória (machos).....	66
<b>Figura 14</b> - Resultados para Esquiva Inibitória (fêmeas).....	67
<b>Figura 15</b> - Resultados para Atividade do Complexo I (machos e fêmeas).....	68
<b>Figura 16</b> - Resultados para Atividade do Complexo II (machos e fêmeas).....	69
<b>Figura 17</b> - Resultados para Atividade do Complexo II-III (machos e fêmeas).....	70
<b>Figura 18</b> - Resultados para Atividade do Complexo IV (machos e fêmeas).....	72
<b>Figura 19</b> - Resultados para Atividade da CK (machos e fêmeas).....	73
<b>Figura 20</b> - Resultados para Atividade da SDH (machos e fêmeas)....	74
<b>Figura 21</b> - Resultados para Atividade da Citrato Sintase (machos e fêmeas).....	75
<b>Figura 22</b> - Resultados para Peso dos animais (machos e fêmeas).....	76
<b>Figura 23</b> - Resultados para Dosagem de HNE (machos e fêmeas).....	77
<b>Figura 24</b> - Resultados para Dosagem de 8-ISSO (machos e fêmeas)...	78
<b>Figura 25</b> - Resultados para Dosagem de Glutaciona Total (machos e fêmeas).....	79





## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> -Esquizofrenia na Infância: proporção entre gênero nos estudos.....	38
<b>Tabela 02</b> - Desenho Experimental (experimento 01).....	52
<b>Tabela 03</b> - Desenho Experimental (experimento 02).....	52



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - Trifosfato de Adenosina  
CK - Creatina Cinase  
CID-10 - Décima Classificação Internacional de Doenças da Organização Mundial de Saúde  
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal  
Cdc-42- proteína controladora da divisão celular.  
DISC1- (do inglês: *Disrupted in Schizophrenia*)  
DSM-V – Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais  
ErbB4- proteína do receptor tirosina-cinase ligada ao gene ErbB4.  
EROS - Espécies Reativas de Oxigênio  
ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio  
HNE- Hidroxinonenal  
PPI– Inibição por Pré-Pulso (do inglês *Pre-Pulse Inhibition* – PPI)  
NADH - Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo  
NMDA - N-Metil D-Aspartato  
NRG1- Neurorregulina 1.  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
PPI - Inibição por Pré-Pulso  
PSD-95- proteína de membrana associada à guanilato cinase.  
QI - Quociente de Inteligência  
Rac- receptor ligado à proteína G codificado pelo gene RAC1.  
SDH - Succinato Desidrogenase  
SNC - Sistema Nervoso Central  
TDAH - Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade  
8-ISSO- 8-Isoprostano



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>35</b>
1.1 ESQUIZOFRENIA: EPIDEMIOLOGIA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO.....	35
1.2 ESQUIZOFRENIA NA INFÂNCIA.....	37
1.2.1 Diferenças Sexuais e Etárias na Esquizofrenia.....	37
1.2.2 Fisiopatologia da esquizofrenia antes e após a puberdade.....	39
1.2.3 Dificuldades no diagnóstico diferencial.....	42
1.3 DISFUNÇÃO DO METABOLISMO ENERGÉTICO NA ESQUIZOFRENIA.....	43
1.3.1 Disfunção Mitocondrial e do Estresse Oxidativo.....	43
1.3.2 Disfunção mitocondrial e Esquizofrenia.....	44
1.3.3 Creatina Cinase e Esquizofrenia.....	43
1.3.4 Ciclo de Krebs e Esquizofrenia.....	45
1.4 MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA.....	46
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>50</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	50
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS, TAMANHO DA AMOSTRA E ASPECTOS ÉTICOS.....	51
3.1.2 Modelo animal de esquizofrenia na infância.....	51
3.2 TESTES COMPORTAMENTAIS .....	53
3.2.1 Atividade Locomotora.....	53
3.2.2 Interação social.....	53
3.2.3 Inibição por Prepulso (PPI).....	54
3.2.4 Esquiva inibitória.....	55
3.3 ANÁLISES MOLECULARES.....	55
3.3.1 Preparação das amostras.....	55
3.3.2 Atividade da Creatina Cinase (CK).....	55
3.3.3 Atividade da Citrato Sintase.....	56
3.3.4 Atividade da Succinato Desidrogenase (SDH).....	56
3.3.5 Atividade do Complexo I.....	56
3.3.6 Atividade do Complexo II.....	56
3.3.7 Atividade dos complexos II-III.....	57
3.3.8 Atividade do Complexo IV.....	57
3.3.9 Dosagem de Hidroxinonenal (HNE), 8-Isoprostanos (8-ISSO) e Glutationa Total.....	57



<b>3.3.9 Determinação de proteínas.....</b>	<b>57</b>
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
4.1 RESULTADOS DOS TESTES COMPORTAMENTAIS.....	59
<b>4.1.1 Atividade Locomotora.....</b>	<b>59</b>
4.1.1.1 Distância Percorrida.....	59
4.1.1.2 Estereotipia.....	60
4.1.1.3 Tempo no Centro.....	61
4.1.1.4 Tempo nas Bordas.....	61
<b>4.1.2 Interação Social.....</b>	<b>62</b>
4.1.2.1 Tempo de Latência para primeiro contato.....	62
4.1.2.2 Número de Contatos.....	63
4.1.2.3 Tempo Total de Contatos.....	63
<b>4.1.3 Inibição da Resposta de Sobressalto por Prepulso (PPI).....</b>	<b>64</b>
4.1.3.1 PPI-Machos.....	64
4.1.3.2 PPI-Fêmeas.....	65
<b>4.1.4 Esquiva Inibitória.....</b>	<b>66</b>
4.1.4.1 Esquiva Inibitória- Machos.....	66
4.1.4.2 Esquiva Inibitória – Fêmeas.....	67
<b>4.1.5 Teste <i>post hoc</i> da ANOVA de Duas Vias (controles).....</b>	<b>67</b>
4.2 RESULTADOS DOS TESTES BIOQUÍMICOS (CADEIA MITOCONDRIAL).....	68
<b>4.2.1 Atividade do Complexo I.....</b>	<b>68</b>
4.2.1.1 Resultados para Atividade do Complexo I no Córtex Prefrontal.....	68
4.2.1.2 Resultados para Atividade do Complexo I no Hipocampo.....	69
4.2.1.3 Resultados para Atividade do Complexo I no Estriado.....	69
<b>4.2.2 Atividade do Complexo II.....</b>	<b>69</b>
4.2.2.1 Resultados para Atividade do Complexo II no Córtex Prefrontal.....	69
4.2.2.2 Resultados para Atividade do Complexo II no Hipocampo.....	70
4.2.2.3 Resultados para Atividade do Complexo II no Estriado.....	70
<b>4.2.3 Atividade do Complexo II-III.....</b>	<b>70</b>
4.2.3.1 Resultados para Atividade do Complexo II-III no Córtex Prefrontal.....	70
4.2.3.2 Resultados para Atividade do Complexo II-III no Hipocampo.....	71





4.2.3.3 Resultados para Atividade do Complexo II-III no Estriado.....	71
<b>4.2.4 Atividade do Complexo IV.....</b>	<b>72</b>
4.2.4.1 Atividade do Complexo IV no Córtex Prefrontal.....	72
4.2.4.2 Resultados para Atividade do Complexo IV no Hipocampo.....	72
4.2.4.3 Resultados para Atividade do Complexo IV no Estriado.....	72
<b>4.2.5 Resultados para Atividade da CK.....</b>	<b>73</b>
4.2.5.1 Resultados para a Atividade da CK no Córtex Prefrontal.....	73
4.2.5.2 Resultados para Atividade da CK no Hipocampo.....	73
4.2.5.3 Resultados para Atividade da CK no Estriado.....	73
<b>4.2.6 Resultados para Atividade da SDH.....</b>	<b>74</b>
4.2.6.1 Atividade da SDH no Córtex Prefrontal.....	74
4.2.6.2 Resultados para Atividade da SDH no Hipocampo.....	74
4.2.6.3 Resultados para Atividade da SDH no Estriado.....	74
<b>4.2.7 Resultados para Atividade da Citrato Sintase.....</b>	<b>75</b>
4.2.7.1 Resultados para a Citrato Sintase no Córtex Prefrontal.....	75
4.2.7.2 Resultados para Atividade da Citrato Sintase no Hipocampo....	75
4.2.7.3 Resultados para Atividade da Citrato Sintase no Estriado.....	75
<b>4.2.8 Resultado para o Peso dos animais.....</b>	<b>76</b>
4.3 RESULTADOS DOS TESTES BIOQUÍMICOS (ESTRESSE OXIDATIVO).....	77
<b>4.3.1 Resultados para Dosagem de HNE.....</b>	<b>77</b>
4.3.1.1 Resultados para a Dosagem de HNE no Hipocampo.....	77
4.3.1.2 Resultados para a Dosagem de HNE no Estriado.....	77
<b>4.3.2 Resultados para Dosagem de 8-ISSO.....</b>	<b>78</b>
4.3.2.1 Resultados para Dosagem de 8-ISSO no Hipocampo.....	78
4.3.2.2 Resultados para Dosagem de 8-ISSO no Estriado.....	78
<b>4.3.3 Resultados para Dosagem de Glutationa Total.....</b>	<b>79</b>
4.3.3.1 Resultados para Dosagem de Glutationa Total no Hipocampo..	79
4.3.3.2 Resultados para Dosagem de Glutationa Total no Estriado.....	79
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>90</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>106</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ESQUIZOFRENIA: EPIDEMIOLOGIA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

A esquizofrenia é um transtorno mental crônico e incapacitante que acomete cerca de 1% da população; normalmente, a idade de início está entre 15 e 30 anos de idade (McGrath et al., 2008). A prevalência é maior no sexo masculino, mas também é relevante no sexo feminino. Estudo de Thorup et al. (2007) mostrou prevalência de 1,59% entre homens e 1,17% entre mulheres. Ao longo do século XX, inúmeros relatos de caso e estudos epidemiológicos em alguns países mostraram que o transtorno existe também em crianças, em ambos os sexos (Bailly et al., 2004). Apesar de as estatísticas ainda serem escassas na maioria dos países, um estudo estimou a incidência de esquizofrenia na infância em torno de 2,1 em cada 1.000.000 de crianças (Tiffin e Kitchen, 2015).

O diagnóstico da esquizofrenia é baseado essencialmente na descrição dos sintomas, não havendo até o momento parâmetros fisiopatológicos com sensibilidade e especificidade suficientes (Bagdy e Juhasz, 2013). A esquizofrenia é caracterizada por delírios, alucinações, discurso e comportamentos desorganizados, além de grave déficit nas funções mentais, expressão das emoções e comportamento. De acordo com o DSM-V (Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais), os sintomas devem estar presentes durante seis meses e incluir pelo menos um mês de sintomas ativos para se firmar o diagnóstico (APA, 2013). Já a Organização Mundial da Saúde (OMS) através da CID-10 (Décima Classificação Internacional de Doenças da Organização Mundial de Saúde), classifica os sintomas como: sintomas positivos (alucinações, delírios, agitação psicomotora e desconfiança exagerada), negativos (embotamento afetivo, isolamento social, falta de iniciativa, falta de prazer, discurso empobrecido) e sintomas desorganizados, tais como expressão inapropriada das emoções e fala incompreensível (WHO, 2004).

As alucinações consistem em alterações da sensopercepção, estímulos internos que o paciente vê como parte da realidade. Já as ideias delirantes devem ser julgadas de forma criteriosa, pois a rotulação de uma determinada convicção como “delirante” depende do contexto cultural em quem ambos, paciente e examinador, estão inseridos (APA, 2013). Em geral, o paciente esquizofrênico se distingue nas suas ideias delirantes pelo seu caráter bizarro e dissociado das normas culturais do seu meio social, e na sua duração, com prognóstico em longo prazo pior

do que outros transtornos com manifestações psicóticas (Craddock e Owen, 2010).

As ideias delirantes mais recorrentes são as de conteúdo persecutório, podendo ou não ser acompanhadas alucinações auditivas (e mais raramente visuais). Na primeira crise a cognição está relativamente preservada, havendo comprometimento progressivo conforme a idade e com a repetição dos surtos (em especial se não houver tratamento adequado) (Craddock e Owen, 2010; Brown, 2011). Uma hipótese sobre a gênese das alucinações diz respeito à produção de estímulos internamente pelo cérebro, sendo estes percebidos como externos. Outra possibilidade seria a interpretação errônea de estímulos externos, podendo explicar tanto as alucinações por si mesmas, quanto às ideias delirantes que delas resultam (Plaze et al., 2011). Os estudos de neuroimagem funcional e em modelos animais mostram que os pacientes esquizofrênicos têm importantes déficits no processamento das informações do mundo externo fornecidas pelos seus sentidos, sejam eles a visão (Kim et al., 2015) ou a audição (Junghöfer et al., 2015).

O primeiro surto psicótico (muitas vezes necessitando de internação) ocorre tipicamente no final da adolescência e início da idade adulta. No entanto, déficits cognitivos e sociais sutis podem estar presentes desde a infância (Golembo-Smith et al., 2012). Na maioria dos pacientes o início do transtorno é caracterizado por uma mudança no perfil social e afetivo, caracterizando-se por uma mudança abrupta após a primeira crise (Craddock e Owen, 2010; APA, 2013).

Assim como outros transtornos mentais, a esquizofrenia não tem cura conhecida, com o agravante de a vasta maioria dos pacientes não alcançar sua independência financeira ou muitas vezes serem dependentes de familiares ou instituições para o autocuidado (Thornicroft et al., 2004; McGrath et al., 2008). É a 14<sup>a</sup> causa de incapacidade em todo o mundo, com 16,7 milhões de pacientes “moderada e severamente” incapacitados (WHO, 2004; Rössler et al., 2005), e além disso, um estudo revelou elevada taxa de suicídio, em torno de 4,9%, muito maior do que na população em geral (Palmer et al., 2005).

Até o século XX, os pacientes esquizofrênicos viviam, em sua maioria, separados da sociedade (fossem nas clínicas psiquiátricas ou isolados por suas famílias do convívio social). Sem tratamento, os pacientes eram inicialmente violentos durante os primeiros surtos psicóticos (devido principalmente às ideias delirantes de perseguição), necessitando de contenção física quase contínua (Turner, 1989). Após a

terceira década de vida, no entanto, os déficits intelectuais se tornavam tão graves e incapacitantes que o transtorno passou a ser considerado um tipo de “demência precoce” (Kraepelin, 1921; Craddock e Owen, 2010). Nas primeiras décadas do século XX, o único tratamento biológico efetivo era a eletroconvulsoterapia (a qual permanece como alternativa) e outros tratamentos para os quais o risco-benefício se revelou inaceitável, como a indução de febre e convulsões farmacologicamente induzidas (Sakel, 1994). Esta situação só se modificou com o surgimento da clorpromazina nos anos 60, que se mostrou o primeiro tratamento medicamentoso eficaz para conter os surtos psicóticos. (Lehmann e Ban, 1997; Baumeister, 2013). Descobriu-se que a ação da clorpromazina e do haloperidol consistia no bloqueio de receptores dopaminérgicos no Sistema Nervoso Central. Os mesmos bloqueiam os receptores de dopamina na via mesocortical, suprimindo as alucinações e pensamentos delirantes (Laruelle, 2003).

Nos anos 70 e 80 foram sintetizadas novas substâncias com o objetivo de diminuir os efeitos colaterais motores e melhorar os sintomas ‘negativos’, como a clozapina, a risperidona e a quetiapina. Estes compostos são chamados “antipsicóticos atípicos” por agirem em menor grau sobre a dopamina e alterar a transmissão da serotonina e outros transmissores. Os efeitos colaterais motores são bem menos freqüentes com esses fármacos e também induzem menos sedação e piora dos sintomas negativos (Suttajit et al., 2013). No entanto, o único antipsicótico que se revelou superior aos demais foi a clozapina (Wahlbeck et al., 2000), cujo uso deve ser criterioso, pois tem efeitos colaterais hematológicos, podendo levar a agranulocitose (reversível com retirada) numa porcentagem em torno de 2% dos pacientes (Ip e Uetrecht, 2006). Apesar de ter sido eficaz para controle dos estados psicóticos, o tratamento baseado nos atuais antipsicóticos não restaura as funções cognitivas e a perda da volição nestes pacientes em longo prazo (Torgalsbøen e Rund, 1998).

## 1.2 ESQUIZOFRENIA NA INFÂNCIA

### 1.2.1 Diferenças Sexuais e Etárias na Esquizofrenia

A esquizofrenia na infância corresponde a menos de 1% de todos os casos, e parece ser mais associada a alterações genéticas, e incidência familiar, que em outras faixas etárias (Nicolson e Rapaport, 1999). Hoje existe o consenso de que os critérios diagnósticos em crianças são os mesmos que no transtorno em adultos (NICE, 2013; Bartlett, 2014). A

esquizofrenia, em geral, é conhecida por ter incidência maior no sexo masculino e por ter menor gravidade dos sintomas no sexo feminino que no masculino. Já na infância, devido à rara incidência, dados epidemiológicos são escassos (tabela 1), alguns mostrando incidência maior em meninos (Mazaeva et al., 2012) e outros mostrando incidência semelhante entre os sexos (Eggers e Bunk, 1997). É possível que o diagnóstico mais frequente em meninos em alguns estudos tenha sido devido à inclusão de crianças com Transtorno do Espectro Autista, pois este também tem predominância no sexo masculino (Eggers e Bunk, 1997).

**Tabela 1: Esquizofrenia na Infância: proporção entre gênero nos estudos**

Estudo	Proporção entre gêneros (Masculino/Feminino)
Mazaeva et al., 2012	45/13
O'Neill et al., 2004	7/4
Frazier et al., 1997	14/14
Eggers et al., 2000	6/5
Eggers e Bunk, 1997	26/31
Weisinger et al., 2013	57/47
Bakalar et al., 2009	26/23
Eggers et al., 1999	19/25

Tabela elaborada pelo autor.

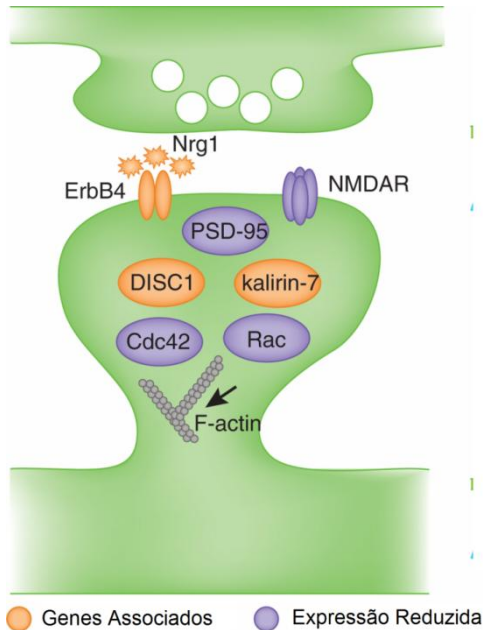
Sabe-se que a incidência em mulheres, ao longo da vida, é menor na faixa etária de adultos jovens, e a evolução é mais favorável, com menos sintomas negativos e maior probabilidade de ter uma vida independente, verificada em países desenvolvidos (Häfner, 2003). Outro fato notável é o aumento de casos entre mulheres de início tardio, inclusive após a menopausa, e diminuição da incidência entre mulheres com puberdade mais precoce, o que gerou a hipótese de um efeito protetor dos hormônios estrógenos (Häfner, 2003; Begemann et al., 2012). Alguns estudos em animais investigam uma possível ação protetora da administração exógena de estrógenos em fêmeas (Gogos et al., 2012). Já existem, inclusive, resultados de ensaios clínicos que mostraram benefício na suplementação de estrógenos em mulheres esquizofrênicas em idade reprodutiva (Akhondzadeh et al., 2003). A hipótese da proteção por estrógenos, no entanto, parece não se aplicar aos casos que se iniciam antes da puberdade, devido à proporção de casos em meninas

(Eggers e Bunk, 1997). Sabemos que as diferenças sexuais no cérebro humano, assim como nos demais mamíferos, iniciam-se ainda intra-útero quando a produção de testosterona no feto interfere na formação de sinapses no Sistema Nervoso Central (Lombardo et al., 2012). Além disso, as alterações genéticas parecem agir de forma diferente entre os sexos, sugerindo diferenças na fisiopatologia (Goldstein et al., 2013). No autismo, apesar do indiscutível predomínio desta condição em meninos, as causas da ligação entre o sexo masculino e a fisiopatologia deste transtorno ainda são desconhecidas (Hines et al., 2015). Sendo todas essas condições incuráveis até o momento, busca-se através do estudo das causas dessas diferenças sexuais algum indício que possa levar à elucidação da sua fisiopatologia (Wischhof et al., 2015).

Quanto às diferenças de gênero na esquizofrenia, estas são muito menos pronunciadas do que na esquizofrenia na idade adulta, o que é explicado pela ausência da proteção dos hormônios estrógenos, em meninas com esquizofrenia com início antes da puberdade (Maydell et al., 2009). De fato, devido ao número reduzido de casos, ainda há dúvidas sobre quais seriam as diferenças entre os gêneros na fisiopatologia da Esquizofrenia na Infância (Weisinger et al., 2013)..

### **1.2.2 Fisiopatologia da esquizofrenia antes e após a puberdade**

A esquizofrenia é considerada atualmente uma condição neurodesenvolvimental, ou seja, devida à interação de fatores genéticos e ambientais ao longo do desenvolvimento (Bora, 2015). Assim, foram implicadas como predisponentes à esquizofrenia os genes das proteínas DISC-1, neurorregulina e disbindina (Figura 1), entre outros (O'Donnel, 2011). Outro tipo de vulnerabilidade genética se refere a alterações metabólicas, em especial a vulnerabilidade ao estresse oxidativo, ou seja, o balanço entre as espécies reativas provenientes da respiração mitocondrial e seus fatores de defesa (antioxidantes). Por exemplo, foi documentado que algumas populações de esquizofrênicos têm menor produção de glutathione (Kordi-Tamandani et al., 2014), que é a principal defesa antioxidante dos neurônios (Dringen et al., 2000).



**Figura 1:** Alterações na formação das sinapses na Esquizofrenia. Os genes das proteínas DISC1, Kalirin-7 e para o receptor ErbB4, além dos genes para a produção da Neuroregulina estão alterados na Esquizofrenia (Penzes et al., 2011). DISC1: Disrupted in Schizophrenia. NRG1: Neuroregulina 1. ErbB4: proteína do receptor tirosina-cinase ligada ao gene ErbB4. NMDA: receptor de glutamato N-Metil-D-Aspartato. PSD-95: proteína de membrana associada à guanilato cinase. Cdc-42: proteína controladora da divisão celular. Rac: receptor ligado à proteína G codificado pelo gene RAC1. F-actin: actina, proteína componente do citoesqueleto.

Após os fatores genéticos, temos os fatores intrauterinos a predispor ao transtorno. Foi documentado que deficiência de ácido fólico, desnutrição materna (Gunawardana et al., 2011), e infecções perinatais (Brown, 2011) aumentam significativamente a incidência de esquizofrenia na prole. Além disso, o estresse materno também pode estar implicado, por exemplo, no caso de gestações não-desejadas (David, 2006). Nos primeiros anos de vida, também são fatores de risco o estresse emocional, abandono materno entre outros fatores sócio-ambientais (Brown, 2011).

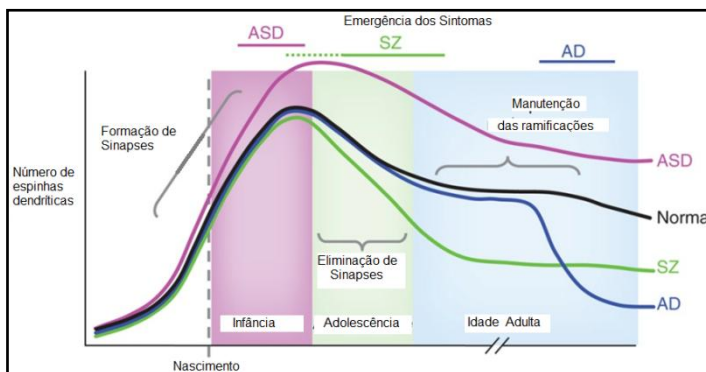
Durante a infância e adolescência, o estresse emocional e o uso de drogas, como a *Cannabis*, também são fatores que aumentam a



incidência de surtos no final da adolescência (Henquet et al., 2005). Todos esses fatores de risco contribuem para alterações metabólicas e mau funcionamento dos interneurônios, porém nenhum fator isolado, seja genético ou ambiental, é suficiente para causar por si mesmo o transtorno, assim como em pacientes diferentes, causas diversas podem ter contribuído para a emergência do transtorno (Keshavan et al., 2011).

No entanto, a interação entre esses fatores leva a uma alteração na arborização neuronal que já ocorre desde a vida intrauterina, mas que fica mais evidente no final da adolescência. Assim, durante a adolescência temos uma eliminação de sinapses que faz parte do neurodesenvolvimento normal (figura 2), mas que ocorre de forma mais acentuada na esquizofrenia (Penzes et al., 2011).

Quanto à Esquizofrenia na Infância, os estudos parecem apontar que os fatores de risco são os mesmos, mas ocorrem com maior intensidade, e há indícios de maior contribuição genética nos casos com início na infância (Nicolson e Rapaport, 1999). Na esquizofrenia em adultos, ocorre perda de sinapses na adolescência, no início semelhante ao normal, mas que se intensifica próximo à idade adulta. Já na Esquizofrenia em Crianças, muito mais rara, esta ocorre já na infância, de forma extremamente anormal (Figura 2).



**Figura 2:** Neurodesenvolvimento e evolução do número de sinapses (Penzes et al., 2011). Na figura acima, observamos diferenças no número de ramificações nos dendritos entre as condições neuropsiquiátricas. Nos Transtornos do Espectro Autista (ASD) costuma haver número de ramificações maior que o normal. Já na Esquizofrenia (SZ) um número ligeiramente menor que o normal, e em geral nas demências, como a Doença de Alzheimer (AD) há uma perda grave das ramificações.

### 1.2.3 Dificuldades no diagnóstico diferencial

Durante grande parte do século XX, o diagnóstico de esquizofrenia na infância foi eclipsado pelo diagnóstico de transtorno do espectro autista, muitas vezes não se diferenciando as duas condições, já que se considerava que o primeiro surto de esquizofrenia ocorreria apenas no final da adolescência (Craddock e Owen, 2010; NICE, 2013). Mesmo aplicando-se critérios diagnósticos mais rigorosos, ainda há considerável sobreposição entre transtorno do espectro autista, esquizofrenia, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e transtorno de conduta. A importância na diferenciação entre essas categorias diagnósticas é importante não apenas na questão dos tratamentos farmacológicos ou biológicos, mas tem sérias implicações prognósticas: mudará a visão que paciente receberá dos pais e educadores, podendo ser um alívio para sua ansiedade ou, ao contrário, despertar um estigma que deverá ser enfrentado (NICE, 2013; Zuckerman et al., 2014). Mudará, também, a abordagem psicossocial, que deverá ser diferente para cada um desses diagnósticos (Garcia et al., 2013). O transtorno do espectro autista se caracteriza por déficits variáveis na interação social e na aquisição da linguagem, iniciando muitas vezes já no segundo ano de vida (Bal et al., 2015). De forma interessante, estudos em animais e humanos sugerem que os autistas possuam um excesso de ramificação neuronal (figura 2), o que seria uma alteração oposta à verificada na esquizofrenia (Penzes et al., 2011). O TDAH é diagnosticado primariamente em crianças com perfil menos deficitário, em geral em torno dos 7 anos de idade, quando a criança não consegue se adequar à rotina escolar (Lin et al., 2015). O TDAH pode ser diagnosticado em crianças com baixo Quociente de Inteligência (QI), mas também com QI normal ou acima da média (De Zeeuw et al., 2012). No entanto, o diagnóstico do TDAH é extremamente questionado por abranger características normais da infância e até variações normais do comportamento adulto. Segundo a hipótese dopaminérgica, o TDAH teria em comum com a esquizofrenia uma alteração na transmissão do neurotransmissor dopamina (Jeong et al., 2015).

Já o transtorno de conduta é caracterizado por repetida desobediência às regras sociais e agressividade, é diagnosticado em crianças e tem alterações inespecíficas no SNC. Pode estar associado a outros transtornos mentais diagnosticáveis, interagindo com causas eminentemente sociais e familiares (Haney-Caron et al., 2014). A importância do diagnóstico do transtorno de conduta é que este pode levar ao transtorno de personalidade antissocial na idade adulta,

condição de difícil manejo já que o paciente não reconhece a sua condição, não sente arrependimento e em geral procura os serviços de saúde apenas para obter vantagens pessoais (APA, 2013). Todos esses transtornos podem se exteriorizar através de *comportamentos violentos* desde a infância, porém a abordagem será totalmente diferente (Gomes et al., 2004; Hodgins et al., 2005; Tarver et al., 2014). É preciso salientar, ainda, que muitas crianças poderão ter características de mais de um destes transtornos, incluindo retardo mental de origem orgânica ou idiopática (Sagar et al., 2013).

### 1.3 DISFUNÇÃO DO METABOLISMO ENERGÉTICO NA ESQUIZOFRENIA

#### 1.3.1 Disfunção Mitocondrial e Estresse Oxidativo

Assim como em diversas doenças crônicas, observa-se nos pacientes esquizofrênicos alto nível de estresse oxidativo no SNC e periféricamente (Khan et al., 2002; Dietrich-Muszalska e Kontek, 2010). Observa-se, também, que crianças com doenças hereditárias da função mitocondrial podem apresentar sintomas psicóticos (Hughes e Hanna, 1999; Anglin et al., 2012). Outra observação bem estabelecida são as alterações na enzima creatina cinase (CK), seja na sua atividade ou seja na quantidade, no SNC e periféricamente (Aksenova et al., 1991, 1999; Burbaeva et al., 2003). A principal conseqüência da disfunção mitocondrial é o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (Enos), comprometendo a função celular e em muitos casos levando à sua morte por apoptose, ou seja, uma autodestruição programada (Kordi-Tamandani et al., 2014). Todos esses achados sugerem que a disfunção mitocondrial está envolvida na fisiopatologia da esquizofrenia (Bitanirwe e Woo, 2011). Postula-se que a hipótese de que a atividade mitocondrial esteja em geral aumentada nos períodos de psicose e diminuída após vários anos de doença (Dror et al., 2002; Akarsu et al., 2014).

Além do estresse oxidativo, está bem documentado um estado proinflamatório crônico no SNC de pacientes esquizofrênicos, o qual contribui de forma cíclica para a disfunção mitocondrial e estresse oxidativo. A hipótese inflamatória é corroborada ainda pelo alto índice de infecção perinatal entre os esquizofrênicos (Brown, 2011). Entre os indicadores de dano à membrana celular, foram dosados o Hidroxinonenal (HNE) e o 8-Isoprostano (8-ISSO). O 8-ISSO tem estrutura química semelhante às prostaglandinas, as quais são

mediadores inflamatórios (Morrow et al., 1990). Além disso, foram dosados os níveis de Glutathione total, para avaliar a capacidade antioxidante do tecido analisado, baseado nos achados de falta de glutathione reduzida e de outros fatores antioxidantes em tecidos de pacientes esquizofrênicos (Bitanihirwe e Woo, 2011).

### **1.3.2 Disfunção mitocondrial e Esquizofrenia**

Os neurônios estão entre os tipos celulares mais dependentes de Trifosfato de Adenosina (ATP), e mais sensíveis à diminuição na sua produção (Yadava e Nichols, 2007). O cálcio intracelular, regulado pelas mitocôndrias, é muito importante para a geração de potenciais de ação em processos de sinalização, transmissão sináptica, dinâmica do citoesqueleto e regulação da expressão gênica. Existe uma relação estreita entre os níveis de cálcio intracelular, a atividade da mitocôndria e o receptor NMDA (Calabresi et al., 2001). A disfunção mitocondrial está envolvida no processo fisiopatológico que leva à desconectividade na esquizofrenia (Ben-Shachar e Laifenfeld, 2004) e em crianças com transtorno do espectro autista e outros transtornos do desenvolvimento (Valenti et al., 2014). Em estudos em pacientes esquizofrênicos, observaram-se alterações da atividade das cadeias mitocondriais dependentes do estado da doença, tais como aumento da atividade do complexo I em plaquetas de esquizofrênicos durante o surto, com normalização após a remissão da crise (Dror et al., 2002). Além disso, estudos *post mortem* revelaram diversas alterações na atividade dos complexos em estruturas que compõem o estriado, o qual, por sua vez, é considerado como uma das partes do SNC mais envolvida nos sintomas da esquizofrenia (Cavalier et al., 1995; Prince et al., 1999; Prince et al., 2000). Em modelos animais, estudos demonstraram que os antipsicóticos por si mesmos alteram a função mitocondrial (Streck et al., 2007) e que a administração de antagonistas de receptores NMDA altera a função mitocondrial (De Oliveira et al., 2011; Zugno et al., 2015).

### **1.3.3 Creatina Cinase e Esquizofrenia**

A enzima Creatina Cinase (CK) tem função de regular o estoque de ATP celular, associando reversivelmente um grupo fosfato à creatina. Há indícios de que a atividade desta enzima esteja alterada em diversas patologias (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000). Presente em todo o organismo, é dosada rotineiramente no sangue para buscar indícios de

lesão muscular, e o subtipo CK-MB é específico para o músculo cardíaco (Cohen et al., 2015). Em pacientes esquizofrênicos, notou-se que os níveis desta enzima no sangue estão aumentados em um grande número de pacientes, mas as causas desse aumento, e se têm relação com a fisiopatologia do transtorno, permanecem obscuras (Masi et al., 2014). Causas comuns de aumento são agitação psicomotora, contusões musculares, repetição de injeções intramusculares, e em especial a síndrome neuroléptica maligna, uma grave doença causada pelo bloqueio dos receptores dopaminérgicos, e que deve ser sempre suspeitada em usuários de antipsicóticos que apresentam febre alta (Nisijima, 2012). No entanto, diversos estudos comprovaram que o aumento da CK periférico (proveniente de células musculares) pode ocorrer independente dos fatores acima mencionados, tanto em adultos quanto em adolescentes (Blumensohn et al., 1998; Hermesh et al., 2002). Em pacientes crônicos, foi encontrada queda da atividade e da produção desta enzima tanto em tecido cerebral quanto em tecidos de diversos órgãos (Aksenova et al., 1991; Burbaeva et al., 2003). Esses achados foram corroborados por Du et al., (2014) que verificou que em imagens funcionais de pacientes esquizofrênicos, o metabolismo energético está diminuído. Estudos em animais mostraram que antagonistas NMDA podem aumentar a atividade da CK no SNC (Canever et al., 2010), porém uma dose aguda em ratos que sofreram privação materna reduz a sua atividade no hipocampo (Zugno et al., 2015). A Atividade da CK também tende a diminuir com o envelhecimento, com o acúmulo de moléculas inativas (Aksenova et al., 1999).

### **1.3.4 Ciclo de Krebs e Esquizofrenia**

O ciclo de Krebs é um conjunto supramolecular de 8 enzimas, e a inativação de uma destas enzimas pode prejudicar a bioenergética mitocondrial (Lyubarev e Kurganov, 1989). Consistente com isso, Bubber et al. (2011) mostrou que em cérebro *post-mortem* de pacientes esquizofrênicos houve redução da atividade das enzimas da primeira metade do ciclo de Krebs (aconitase,  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, succinato tiocinase) e aumento na atividade das enzimas da segunda metade desta rota metabólica (SDH e malato desidrogenase), porém não houve alterações na atividade da piruvato desidrogenase, citrato sintase, isocitrato sintase e fumarase. Outro estudo (Zugno et al., 2015) também sugere que as alterações no ciclo de Krebs na esquizofrenia sejam uma compensação por um estado de hipoatividade metabólica. Este estado

corresponderia, assim, ao paciente esquizofrênico com vários anos de doença (Aksenova et al., 1999). Além disso, o uso de antipsicóticos pode ser um fator a alterar o ciclo de Krebs (Streck et al., 2007). Há indícios de que pacientes esquizofrênicos possam ter anormalidades no metabolismo da glicose (Zhang et al., 2015).

#### 1.4 MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA

Os primeiros tratamentos farmacológicos para a Esquizofrenia, e para transtornos psiquiátricos em geral, foram descobertos praticamente ao acaso. Posteriormente, o próprio mecanismo de ação dos medicamentos é que serviu de base para a investigação da fisiopatologia, e não o contrário (Baumeister, 2013).

As pesquisas pré-clínicas em transtornos mentais visam reproduzir um conjunto de alterações no comportamento e na bioquímica do SNC em animais, que demonstrem semelhanças com o transtorno em humanos (Oliveira et al., 2009; Nagai et al., 2011). Os estudos podem servir para testar novos tratamentos, estudar os efeitos dos tratamentos existentes ou elucidar a fisiopatologia, gerando hipóteses que possam ser posteriormente aplicadas a seres humanos (Ram et al., 2013). Não existe um único modelo para cada transtorno mental, e em especial para a esquizofrenia a produção de um modelo fidedigno tem sido um problema (Dunlop e Brandon, 2015). Os modelos animais de esquizofrenia podem lidar com a indução de fatores de risco na gestação ou primeiros dias de vida, como infecção gestacional (Piontkewitz et al., 2009; Nagai et al., 2011), privação materna (Ellenbroek et al., 2005; Zugno et al., 2013;2015) e privação de nutrientes (Butler et al., 1994). Podem-se reproduzir as alterações da esquizofrenia com animais manipulados geneticamente (Jones et al. 2011; Robertson e Feng, 2011).

No presente estudo, estudamos as estruturas cerebrais córtex prefrontal (planejamento), hipocampo (formação da memória) e estriado (parte do sistema límbico, processamento de emoções), as quais estão sabidamente envolvidas na esquizofrenia (Laruelle, 2003). Estudos em seres humanos com esquizofrenia mostram alterações metabólicas em estruturas específicas, tanto *in vivo* quanto *post mortem* (Du et al., 2014; Burbueva et al., 2003). Portanto, analisamos alterações bioquímicas no córtex, hipocampo e estriado dos animais submetidos à cetamina, com o objetivo de produzir alterações semelhantes às que foram detectadas nessas estruturas em seres humanos.

A Esquizofrenia, assim como qualquer transtorno psiquiátrico, é uma condição eminentemente multifatorial. Embora existam diversos genes

implicados, o transtorno surge através de uma complexa interação com fatores ambientais, iniciando ainda na gestação (Nagai et al., 2011; Brown, 2011). Portanto, futuramente os modelos animais de Esquizofrenia deverão ter diversos fatores interagindo em um mesmo modelo animal, para reproduzir condições mais próximas à do ser humano, e assim poder testar com mais fidedignidade novos tratamentos ou ações preventivas (Ram et al., 2013). Existem, ainda, os modelos farmacológicos que induzem os sintomas com substâncias que induzem os sintomas do transtorno em humanos.

Este é o caso do presente trabalho, que utilizou o anestésico inibidor não-competitivo do receptor NMDA, a cetamina. Em um número grande de pacientes com esquizofrenia, ocorre diminuição da expressão gênica de proteínas responsáveis pela formação dos dendritos e pelo receptor NMDA (Figura 1). Portanto, no presente modelo, a administração da cetamina bloqueia parcialmente o receptor NMDA, simulando uma das alterações deste transtorno.

A cetamina é utilizada em animais e humanos, predominantemente em cirurgia pediátrica (Amr et al., 2013). Tem efeitos antidepressivos em curto prazo (Garcia et al., 2009) e em alguns países é amplamente utilizada como droga de abuso, podendo os seus usuários crônicos desenvolver déficits cognitivos e sintomas de abstinência que se relacionam com os sintomas negativos da esquizofrenia (Xu et al., 2015). Produz efeitos semelhantes à esquizofrenia em voluntários saudáveis (Malhotra et al., 1996). Validando a possível relação da cetamina com esquizofrenia em crianças, Amr et al., (2013) constatou que o haloperidol foi eficaz em prevenir o *delirium* pós-operatório em crianças que receberam cetamina como anestésico.

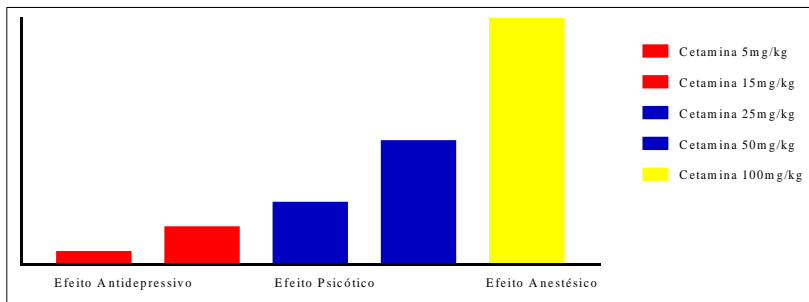
Diversos trabalhos anteriores demonstraram a validade da cetamina em modelos animais com roedores, tanto sozinha quanto em associação com outros procedimentos (De Oliveira et al., 2009; Ram et al., 2013, Zugno et al., 2013). O modelo da cetamina tem limitações importantes que devem ser lembradas. O efeito é extremamente variável conforme a dose e a espécie animal (figura 3). Assim, foi demonstrado que em ratos Wistar adultos a dose de 15mg/kg tem efeito antidepressivo (Garcia et al., 2009). A dose de 25mg/kg repetida por 7 dias causa sintomas semelhantes à esquizofrenia (Zugno et al., 2014a; Zugno et al., 2014b). No entanto, muitos desses efeitos desaparecem horas ou dias após a última injeção (Zugno et al., 2014a). Chatterjee et al., (2011) utilizou a dose de 100mg/kg em camundongos (sendo que nesta dose já existe indução de anestesia) para produzir sintomas negativos, os quais permaneceram até 10 dias após a última injeção, e são revertidos com a

administração de antipsicóticos. Assim, para analisar os resultados dos testes comportamentais no presente estudo, devemos considerar os efeitos de diferentes doses e tempo após a injeção em que o teste foi realizado. Apesar disso o modelo dos antagonistas NMDA constitui um método de rastreamento de novos tratamentos, pois seus efeitos são revertidos por antipsicóticos de forma consistente, tanto em humanos quanto animais (Chatterjee et al., 2011, Amr et al., 2013). Um estudo mostrou que as concentrações plasmáticas da cetamina chegam a reduzir-se em mais de 10 vezes após 4 horas de uma única administração intraperitoneal (Veilleux-Lemieux et al., 2013). Portanto, conforme o tempo após a administração, podemos saber se os efeitos foram devidos à ação direta do antagonismo NMDA ou se são efeitos tardios, devido à ação crônica com modificação da sinalização celular e dos receptores no SNC.

Em geral, o efeito psicótico é aferido minutos ou horas após a injeção intraperitoneal de cetamina (Canever et al., 2010), enquanto que efeitos como perda da socialização, déficits cognitivos e depressão (sintomas negativos) são aferidos até vários dias após o tratamento com cetamina (Chatterjee et al., 2011).

Estudos em animais mostram que existem diferenças sexuais na formação dos receptores NMDA durante o desenvolvimento (Damborsky et al., 2012). Em ratas wistar adultas, foram encontradas nos efeitos da cetamina em relação aos machos, porém elas estão condicionadas à fase do ciclo estral (Borella et al., 2016). Logo, a proposta de fazer este estudo anterior à puberdade tem a vantagem adicional de não haver, nesta fase, a influência do ciclo estral. Ainda um estudo com administração de cetamina neonatal mostrando diferenças sexuais (Kekesi et al. 2015) mas não há até o momento nenhum estudo abordando a Esquizofrenia na Infância em ratos Wistar prepúberes. Os ratos entre 23 e 30 dias correspondem, aproximadamente, à faixa etária entre 7 a 14 anos de vida em humanos (Sengupta, 2013).





**Figura 03:** Efeitos da cetamina em ratos Wistar machos , adultos jovens (60 dias de vida). Fontes: Zugno et al. (2013; 2014a;b; 2015); Réus et al. (2015). Compare com os efeitos em ratos prepúberes no presente trabalho, evidenciando diferenças de idade e de gênero nos efeitos da cetamina, entre diferentes doses.

O presente trabalho visa, portanto, preencher as lacunas do conhecimento quanto aos modelos animais de esquizofrenia, aplicando-os em animais antes da puberdade, objetivando assim reproduzir alterações comportamentais e bioquímicas da esquizofrenia na infância. Trabalha-se com a hipótese de que a cetamina 25mg/kg e 50mg/kg cause alterações tipo-esquizofrenia enquanto que as doses 5mg/kg e 15mg/kg não causem alterações nos animais (figura 3).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Testar a Validade de Face (alterações comportamentais) e Validade de Constructo (alterações bioquímicas no SNC) de um modelo de Esquizofrenia na Infância em ratos Wistar machos e fêmeas, entre 23 e 30 dias de idade.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar o modelo animal de esquizofrenia na infância com a administração de cetamina, nas doses de 5mg/kg, 15mg/kg, 25mg/kg e 50mg/kg (ou salina) entre os dias 23 e 30 de idade, em ratos e ratas Wistar.

Avaliar a atividade locomotora (através de registro eletrônico), na qual foram monitorados os seguintes parâmetros por meio eletrônico: distância percorrida, movimentos estereotipados, tempo nas bordas e tempo no centro da arena.

Avaliar interação social testes animais, através do registro manual dos seguintes parâmetros: tempo de latência para primeiro contato, tempo total de contatos e número total de contatos.

Avaliar a inibição da reação ao sobressalto por prepulso (PPI) nestes animais.

Realizar em estruturas cerebrais destes animais (córtex prefrontal, hipocampo e estriado) as seguintes dosagens bioquímicas:

Atividade dos complexos da cadeia mitocondrial (Complexos I, II, II-III e IV).

Atividade da CK.

Atividade das enzimas do Ciclo de Krebs Succinato Desidrogenase (SDH) e Citrato Sintase.

Realizar, em um grupo distinto de animais, o mesmo modelo da cetamina para realização do Teste da Esquiva Inibitória.

Realizar, em estruturas cerebrais destes animais (hipocampo e estriado) as seguintes dosagens bioquímicas:

Dosagem de 5-Hidroxinonal, dosagem de isoprostano, e dosagem de glutatona Total.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS, TAMANHO DA AMOSTRA E ASPECTOS ÉTICOS**

120 ratos e 120 ratas Wistar foram usados, aos 23 dias de idade, peso médio de 80 a 130g, sendo a eutanásia aos 31 dias de vida. Os animais foram obtidos no biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e mantidos em gaiolas em ciclo claro / escuro de 12 horas, com comida e água disponíveis, à temperatura de  $22 \pm 1$  ° C. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o resolução de CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal) de 2013. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação animal da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) com números de protocolo 008/2015-2 e 052-2015-02.

Sendo o número de indivíduos em cada tratamento de 24 animais, para os testes comportamentais estes grupos de 24 foram subdivididos em 2 subgrupos de “n”=12, sendo que em um deles foram realizadas atividade locomotora, interação social e a PPI (tabela 02), e em outro subgrupo, a Esquiva Inibitória (tabela 03). Para as análises moleculares, estes grupos de 24 animais foram subdivididos em 4 subgrupos com número de 6 indivíduos cada, para realização de maior número de testes bioquímicos.

##### **3.1.2 Modelo animal de esquizofrenia na infância**

Após o desmame (21 dias) os animais foram alojados em caixas com 4 animais cada. Entre 23 e 31 dias de idade, um modelo animal de esquizofrenia foi realizado por injeções de cetamina por via intraperitoneal, uma vez ao dia, horário aproximadamente às 9h. As dosagens variaram de zero (solução salina 1 ml / kg) até 5 mg/kg, 15 mg/kg, 25 mg/kg e 50 mg/kg. Aos 30 dias, os testes comportamentais foram realizados (atividade de locomoção no campo aberto e interação social) e aos 31 dias, foi realizado o teste de resposta de sobressalto ao estímulo sonoro (Inibição por Prepulso, PPI) (60 do sexo masculino e 60 do sexo feminino, 5 grupos de tratamento n = 12). A PPI foi realizada um dia após os testes de locomoção e de interação social, pois ambos os testes de locomoção e PPI devem ser feitos 30 minutos após a injeção de cetamina. A Interação Social foi realizada 6h após a última injeção de cetamina (tabela 2). Outro grupo de animais (60 machos e 60 fêmeas, 5 grupos de tratamento n = 12) foi submetido ao teste de Esquiva Inibitória, tendo recebido 7 dias de cetamina (tabela 3). Outro grupo de

animais foi necessário porque a natureza traumática dos choques elétricos e da PPI impede que ambos sejam realizados no mesmo animal. A Esquiva Inibitória foi realizada 24h e 48h após a última injeção.

**Tabela 2: Desenho Experimental (experimento 01)**

Dia 07 (30min após a 7 <sup>a</sup> injeção)	Dia 07 (6h após a 7 <sup>a</sup> injeção)	Dia 08 (30min após a última (8 <sup>a</sup> ) injeção)	Dia 08 (6h após a última (8 <sup>a</sup> ) injeção)	Análises Moleculares
Atividade Locomotora	Interação Social	Prepulso	Dissecção das Estruturas Cerebrais (Prefrontal, hipocampo e estriado)	Complexos I,II,II-III e IV, CK, SDH, Citrato Sintase

Tabela elaborada pelo autor

**Tabela 3: Desenho Experimental (experimento 02)**

Dia 08 (24h após a última (7 <sup>a</sup> ) injeção)	Dia 09 (48h após a última (7 <sup>a</sup> ) injeção)	Dia 09 (48h após a última (7 <sup>a</sup> ) injeção)	Análises Moleculares
Esquiva Inibitória: treino (com choque) memória imediata (5s após o choque) e de curto prazo (1:30h após o choque)	Esquiva Inibitória: memória de longo prazo (24h após o choque)	Dissecção das Estruturas Cerebrais (hipocampo e estriado)	Dosagens de HNE, 8-ISSO e Glutaciona Total

Tabela elaborada pelo autor.

## 3.2 TESTES COMPORTAMENTAIS

### 3.2.1 Atividade Locomotora

O teste de campo aberto foi realizado numa caixa de 50 x 25 x 50 cm dimensões. Os animais foram colocados individualmente em uma caixa para a atividade exploratória durante o período de 15 minutos e a atividade locomotora foi medida automaticamente, usando uma caixa de atividade locomotora com sensores *laser* acoplado a um computador (Insight®, Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil). Este equipamento monitoriza a atividade locomotora do animal, sendo o tempo de avaliação total (15 minutos) dividido em blocos de 5 minutos (de Oliveira et al., 2009). O dispositivo é capaz de registrar vários parâmetros da atividade locomotora, e os seguintes foram registrados no presente trabalho: distância percorrida, movimentos estereotipados, o tempo no centro do campo e o tempo nas bordas da arena. A distância percorrida e a estereotipia são medidas padrão dos efeitos alucinógenos da cetamina, bem como os sintomas da esquizofrenia (De Oliveira et al., 2009), e o tempo no centro e tempo na fronteira são parâmetros de ansiedade e defesa conhecida, uma vez que os roedores tendem a evitar o centro de um campo, temente na presença de um predador (Lapiz et al., 2000). No entanto, uma quantidade de tempo na praça central é normal, sinalizando atividade exploratória do roedor (Avila-Martin et al., 2015).

### 3.2.2 Interação social

A interação social prejudicada é uma característica comportamental de modelos animais com desordens de espectro de autismo e esquizofrenia (Schneider e Przewlocki, 2005). A interação social foi avaliada em ratos submetidos a doses sub-anestésicas de cetamina. Os animais foram testados em ambiente claro/escuro e pouco conhecido em campo aberto. No dia do experimento os animais ficaram isolados socialmente em caixa de material de plástico mensurando 43 x 28 x 15 cm por três horas e trinta minutos antes do experimento. A tarefa consistiu em colocar dois animais do mesmo grupo (mas de caixas diferentes) em gaiolas durante 15 minutos.

O comportamento social foi avaliado de par em par e não individualmente. O tempo de latência para a primeira interação, o número de contatos sociais e o tempo total de contato foram mensurados

(Niesink e Van Ree, 1989; Schneider e Przewlocki, 2005). Os parâmetros avaliados foram: latência para iniciar o primeiro contato, tempo total de contato e número de contatos. Como o ambiente do teste é desconhecido, a tendência normal é haver alguns minutos de atividade exploratória junto com as interações sociais, e como o experimento é realizado durante ao dia, os animais controles usualmente estão dormindo juntos ao final do teste. A latência indica o grau de ansiedade, visto que o animal está no mesmo ambiente que um animal desconhecido, já o tempo total e o número de contatos quantificam a preferência do animal pelo contato com o animal desconhecido, ao invés de explorar o ambiente (Canever et al., 2010).

### **3.2.3 Inibição por Prepulso (PPI)**

O teste da PPI (inibição da resposta de sobressalto por prepulso) pode ser realizado tanto em humanos quanto animais e é um parâmetro de controle sensorial dos estímulos auditivos (Zugno et al., 2014). A PPI está prejudicada em condições psiquiátricas, como a Esquizofrenia em adultos e crianças, no transtorno de personalidade esquizotípica, tem mostrado um valor prognóstico em crianças com alto risco de psicose (Ziermans et al., 2012). A quantificação da inibição promovida por um prepulso da resposta de sobressalto induzida por pulso foi realizada com base no protocolo descrito por Shiling et al (2006). Foram utilizadas caixas de medida de sobressalto com vedação sonora (Insight® - EP 175), nas quais a amplitude do sobressalto é quantificada após a apresentação de um estímulo sonoro, sendo que durante todo o tempo é produzido um barulho de fundo de 65 dB. Os animais permaneceram por um período de habituação de 5 minutos nessas caixas. Durante a sessão, foram apresentados 3 tipos de estímulo por 10 vezes e distribuídos randomicamente em intervalos médios de 20 segundos: 1) pulsos de 120 dB por 40 ms (capaz de produzir uma resposta de sobressalto); 2) pré-pulsos de 65, 70 ou 75 dB por 20 ms apresentados 80 ms antes do pulso; 3) ausência de estímulo. No início de cada sessão, 10 pulsos foram apresentados para a habituação dos animais (essa série não é levada em conta para os cálculos). A média da amplitude de sobressalto após as sessões de pulso (P) bem como a média da amplitude da resposta de sobressalto após as sessões de pré-pulso - pulso (PP) foram calculadas para cada animal. A porcentagem da inibição promovida pelo pré-pulso da resposta de sobressalto induzida por pulso é calculada de acordo com a seguinte equação: inibição por pré-pulso (%) =  $100 - [(PP / P) \times 100]$ .

Assim, 0% corresponde à ausência de diferença entre a amplitude de sobressalto após as sessões de pulso e pré-pulso - pulso e, conseqüentemente, à ausência de inibição da resposta de sobressalto. Porcentagem negativa de prepulso significa aumento da resposta de sobressalto após as sessões de pulso e pré-pulso.

### **3.2.4 Esquiva inibitória**

Esta avaliação é realizada em uma caixa de acrílico, onde o piso é constituído de barras paralelas de metal, com uma plataforma junto à parede esquerda do aparelho (Quevedo et al., 1997; Roesler et al., 2003). O teste comportamental é dividido em 4 sessões, a primeira, chamada de treino, onde os animais serão colocados sobre a plataforma, e o tempo que o animal leva para descer com as quatro patas nas barras de metal é anotado (latência). Após a descida do animal, este recebe um choque de 0,4 mA por 2 segundos. Nas demais sessões, o animal não recebe choque, e se anota o tempo em segundos para o mesmo descer da plataforma. Após 5 segundos o animal é colocado novamente na plataforma, a fim de se aferir a memória de trabalho (imediata). Depois de 1 hora e 30 minutos, o roedor é submetido à terceira sessão, para medir memória de curta duração (Izquierdo et al., 1998; Bevilaqua et al., 2003), e 24 horas depois o animal será submetido à uma quarta sessão, que avalia a memória de longa duração (Bevilaqua et al., 2003). A memória será considerada preservada se o animal tiver um tempo de latência nos testes estatisticamente maior que o tempo do treino.

## **3.3 ANÁLISES MOLECULARES**

### **3.3.1 Preparação das amostras**

Os animais foram mortos por decapitação ao final dos protocolos experimentais (tabelas 2 e 3), sendo as suas estruturas cerebrais (córtex prefrontal, hipocampo e estriado) rapidamente dissecadas e armazenadas a -80° C.

### **3.3.2 Atividade da Creatina Cinase (CK)**

As estruturas cerebrais foram homogeneizadas em solução salina (1:10, p/v), o homogeneizado será centrifugado a 800 x g por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para determinação da atividade da creatina cinase total. As frações mitocondriais foram separadas por

centrifugação e dosadas da mesma forma. O meio de incubação é composto por fosfocreatina, ADP e glutatona reduzida. A formação de creatina é utilizada para medir a atividade enzimática (Hughes, 1962).

### **3.3.3 Atividade da Citrato Sintase**

A atividade Citrato Sintase foi testada de acordo com o método descrito por Shepherd e Garland (1969). A mistura de reação continha 100 mM de tampão Tris, pH 8,0 e 0,1 mM de acetil-CoA, além de 0,1 mM de 5,50-di-tiobis- (ácido 2-nitrobenzóico). proteína de triton X-100 e 2 a 4 nanogramas de mitocôndrias sobrenadantes a 0,1%, e foram iniciados com 100 oxaloacetato-IM e monitorizada a 412 nm, durante 3 min a 25° C.

### **3.3.4 Atividade da SDH**

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

### **3.3.5 Atividade do Complexo I**

Atividade da NADH desidrogenase (complexo I) foi avaliada de acordo com Cassina e Radi (1996) através da determinação da taxa de redução do ferricianeto dependente de NADH a  $k = 420$  nm.

### **3.3.6 Atividade do Complexo II**

A atividade da succinato-2,6-dicloroindofenol (DCIP) - oxidorreductase (complexo II) foi determinada usando o método descrito por Fischer e colaboradores (1985). A atividade do complexo II foi medida seguindo o decréscimo na absorbância em função da redução de 2,6-DCIP a  $k = 600$  nm.



### 3.3.7 Atividade dos complexos II-III

A Atividade da succinato: C citocromo oxidoreductase (complexo III) foi determinado utilizando o método descrito por Fischer e colegas (1985). A Atividade dos complexo II-III foi medida pela redução do citocromo C utilizando succinato como substrato, a  $k = 550$  nm.

### 3.3.8 Atividade do Complexo IV

A atividade da Citocromo C oxidase (complexo IV) foi mensurada de acordo com o método descrito por Rustin e colaboradores (1994) e medida seguindo o decréscimo na absorvância devida à oxidação do citocromo c previamente reduzido (preparado por redução do citocromo com  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{HCl}$ ) a  $k = 550$  nm com  $580$  nm como o comprimento de onda de referência ( $\epsilon = 19,1 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). As actividades dos complexos de cadeia respiratória mitocondrial foram calculados como nmol min por mg de proteína.

### 3.3.9 Dosagem de Hidroxinonenal (HNE), 8-Isoprastano (8-ISSO) e Glutathiona Total

4-HNE (Cell Biolabs STA-838), 8-ISSO (Cell Biolabs STA-337) e Glutathiona Total (Cell Biolabs STA-312) foram realizadas utilizando-se um kit comercial para ensaio imunoenzimático (ELISA) conforme instruções do fabricante.

### 3.3.9 Determinação de proteínas

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

## 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após os testes de normalidade, os dados paramétricos (locomção, interação social, PPI, peso) foram analisados utilizando ANOVA de Uma Via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey, entre os animais do mesmo sexo. Para comparar os animais machos com as fêmeas, foi feita ANOVA de Duas Vias, e quando significativa, o teste *post hoc* de Tukey foi executado novamente, entre todos os grupos masculinos e femininos. Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  Erro Padrão da Média ( $p < 0,05$ ). Os dados não-paramétricos da Esquiva

Inibitória foram apresentados como a mediana em segundos (s) mais ou menos intervalo interquartil dos tempos de latência de descida do animal. As diferenças entre as latências da sessão de treino e das sessões de teste dentro de cada grupo foram determinadas usando o teste Freedman (um valor de  $p < 0,0167$  foi considerado estatisticamente significativo) com teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunn ( $p < 0,05$ ). O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado às diferenças do mesmo teste entre os diferentes grupos de tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os dados foram calculados pelo software GraphPadPrism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA).

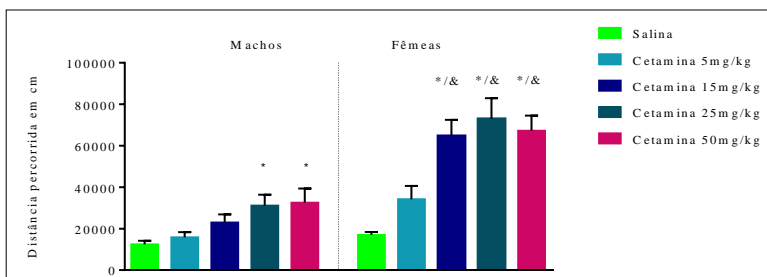
## 4 RESULTADOS

### 4.1 RESULTADOS DOS TESTES COMPORTAMENTAIS

#### 4.1.1 Atividade Locomotora

No teste de Atividade Locomotora, houve diferenças nas alterações induzidas pela cetamina dentro dos grupos masculino e feminino *per se* (ANOVA de uma via), além disso, diferença significativa de gênero foi detectada na distância total (ANOVA de duas vias), com as fêmeas correndo distâncias mais longas, sob efeito da cetamina, comparados com grupos de machos nas mesmas doses. Em relação à estereotipia, houve diferença nos efeitos da cetamina dentro dos grupos masculino e feminino, *per se*, mas as diferenças atribuíveis ao gênero não foram significativas.

##### 4.1.1.1 Distância Percorrida

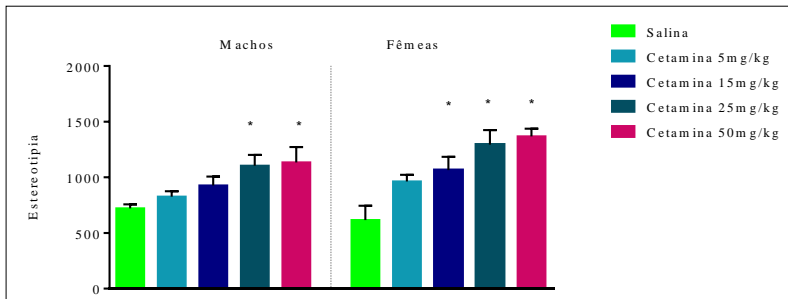


**Figura 04:** Resultados para Distância Percorrida em Campo Aberto (machos e fêmeas). \* diferente do respectivo grupo salina (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey). & diferente do grupo de mesma dose de cetamina (ou salina) mas de gênero oposto (ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* de Tukey). Resultados expressos em Média +/- Erro Padrão da Média (n = 10 a 12).

A Figura 04 mostra ANOVA de uma via para os parâmetros de atividade de locomoção, durante 15 minutos, iniciada 30 minutos após a última injeção, em ratos machos e fêmeas. Para distância percorrida, as fêmeas tiveram um aumento (em relação aos machos da mesma dose) estatisticamente significativo de 106% na dose de 50mg/kg, 134% vezes na dose de 25mg/kg e 182% na dose de 15mg/kg, portanto, mais do que dobrando a distância percorrida nessas doses.

ANOVA de duas vias revelou, para distância percorrida, efeito significativo do gênero [F (1,104) = 57,55 p <0,01]; assim como da cetamina [F (4,104) = 15,55 p <0,01] e interação entre estes fatores [F (4,104) = 3,846 p <0,05].

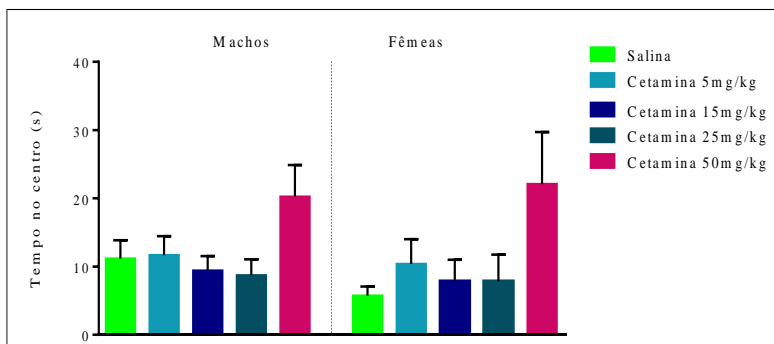
#### 4.1.1.2 Estereotipia



**Figura 05:** Resultados para Movimentos Estereotipados em Campo Aberto (machos e fêmeas). \* diferente do respectivo grupo salina (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey). Resultados expressos em Média +/- Erro Padrão da Média (n = 10 a 12).

Quanto às diferenças de gênero, ANOVA de duas vias revelou para os movimentos estereotipados nenhum efeito principal do gênero [F (1,104) = 3,75 p >0,05]; mas com efeito principal do cetamina [F (4, 104) = 11,9 p <0,0001] e nenhuma interação entre estes fatores [F (4, 104) = 0,9239 p > 0,05].

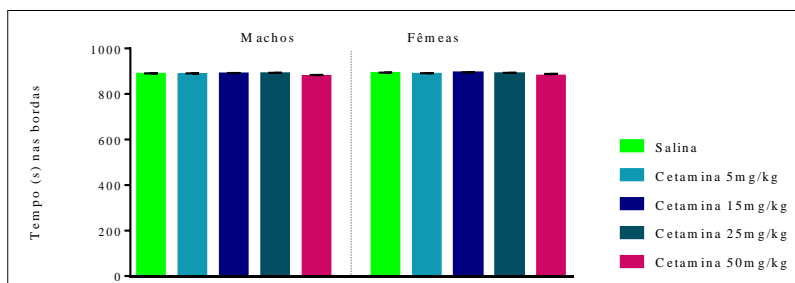
### 4.1.1.3 Tempo no Centro



**Figura 06:** Resultados para Tempo no Centro em Campo Aberto(machos e fêmeas). Resultados expressos em Média +/- Erro Padrão da Média (n = 10 a 12).

ANOVA de duas vias revelou, para o tempo no centro, nenhum efeito do gênero [F (1, 104) = 0,3864 P > 0,05]; porém houve efeito principal da cetamina [F (4, 104) = 4,272 p=0,0031] e nenhuma interação entre estes fatores [F (4, 104) = 0,2376 p>0,05].

### 4.1.1.4 Tempo nas Bordas



**Figura 07:**Resultados para Tempo nas Bordas em Campo Aberto (machos e fêmeas). Resultados expressos em Média +/- Erro Padrão da Média (n = 10 a 12).

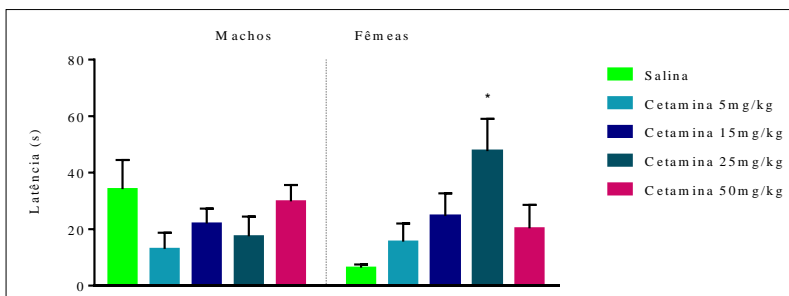
Para tempo nas bordas, ANOVA de duas vias não revelou nenhum efeito do gênero [F (1, 104) = 0,2056 p >0,05], mas efeito significativo da cetamina [F (4, 104) = 2,9 p<0,05] sem interação entre esses dois

fatores [F (4, 104) = 0,1959 p>0,05].

#### 4.1.2 Interação Social

Em relação à interação social, houve diferença nos efeitos da cetamina dentro dos grupos masculino e feminino *per se* (ANOVA de uma via), mas as diferenças atribuíveis ao gênero não foram significativas (ANOVA de duas vias), com exceção da Latência para o primeiro contato, que teve interação significativa. As figuras 08, 09 e 10 mostram os resultados para a interação social, em ratos machos e fêmeas, em três testes: latência para primeiro contato, tempo total de contatos e número de contatos.

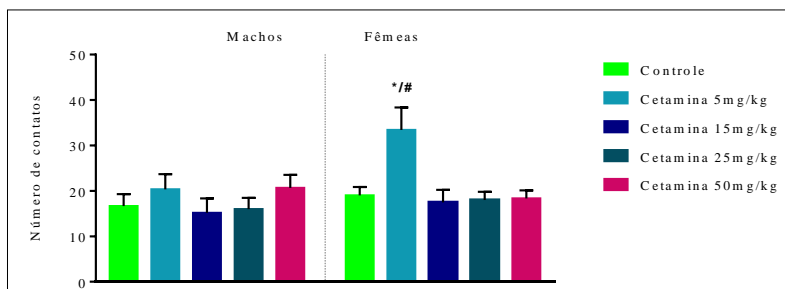
##### 4.1.2.1 Tempo de Latência para primeiro contato



**Figura 08:** Resultados para Latência para Primeiro Contato na Interação Social (machos e fêmeas). \* diferente do respectivo grupo salina (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey). Resultados expressos em Média +/- Erro Padrão da Média (n = 4 a 6 pares).

A respeito das diferenças de gênero para a latência (ANOVA de duas vias), não houve efeito deste [F (1, 45) = 0,006258 p> 0,05] e nem da cetamina [F (4, 45) = 1,548 p>0,05], mas houve significativa interação entre os fatores gênero e cetamina [F (4, 45) = 3,858 p <0,01].

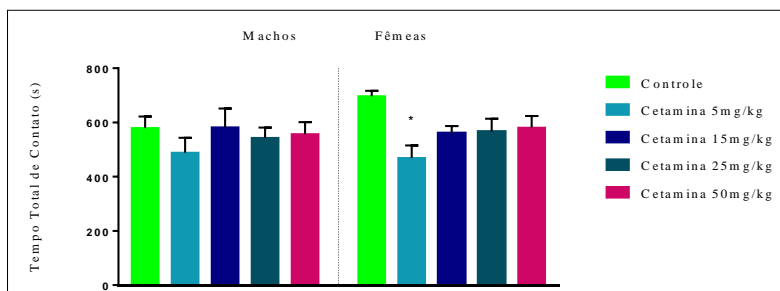
#### 4.1.2.2 Número de Contatos



**Figura 09:** Resultados para Número Total de Contatos na Interação Social (machos e fêmeas). \* diferente do respectivo grupo salina (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey) # diferente de todos os outros grupos cetamina, além do grupo salina (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey). Resultados expressos em Média +/- Erro Padrão da Média (n = 4 a 6 pares).

Para Número Total de contatos, não houve efeito do gênero [F (1, 45) = 3,489 p > 0,05], mas a cetamina produziu efeito principal [F (4, 45) = 4,227 p < 0,01], mas não houve interação significativa [F (4, 45) = 1,884 p > 0,05].

#### 4.1.2.3 Tempo Total de Contatos



**Figura 10:** Resultados para Tempo Total de Contatos na Interação Social (machos e fêmeas). \* diferente do respectivo grupo salina (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey). Resultados expressos em Média +/- Erro Padrão da Média (n = 4 a 6 pares).

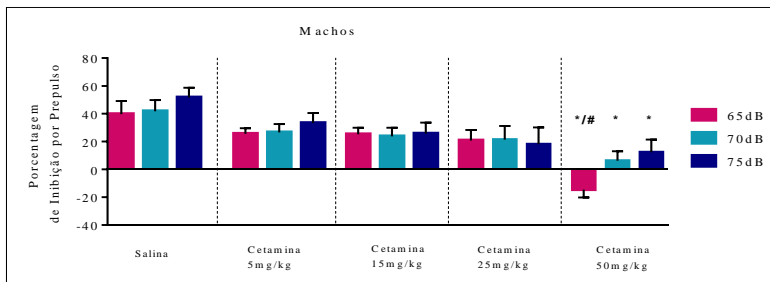
Quanto às diferenças de gênero para Tempo Total de Contato, não

houve efeito do sexo [ $F(1, 45) = 0,697$   $p > 0,05$ ], mas a cetamina produziu efeito principal [ $F(4, 45) = 2,879$   $p < 0,05$ ], no entanto sem nenhuma interação significativa entre esses fatores [ $F(4, 45) = 0,7121$   $p > 0,05$ ].

### 4.1.3 Inibição da Resposta de Sobressalto por Prepulso (PPI)

No teste da PPI, houve diferenças nas alterações induzidas pela cetamina dentro dos grupos masculino e feminino, *per se* (ANOVA de uma via), mas a diferença entre os gêneros não foi estatisticamente significativa (ANOVA de duas vias).

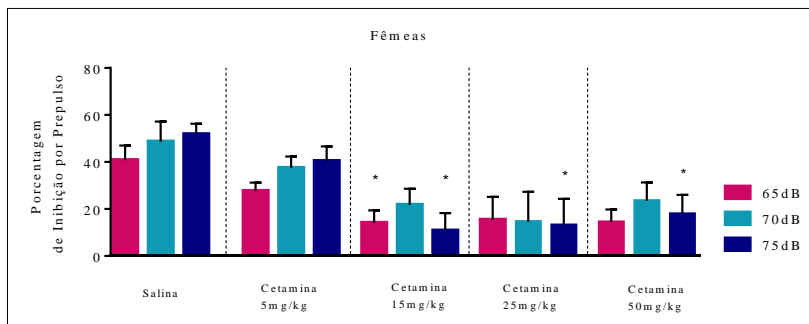
#### 4.1.3.1 PPI – Animais Machos



**Figura 11:** Resultados para PPI em ratos machos, intensidades de 65dB, 70 dB e 75 dB. \* diferente do respectivo grupo salina (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey) # diferente de todos os outros grupos cetamina, além do grupo salina (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey). Resultados expressos em Média +/- Erro Padrão da Média (n = 9 a 10).



## 4.1.3.2 PPI-fêmeas



**Figura 12:** Resultados para Resultados para PPI em ratas fêmeas, intensidades de 65dB, 70 dB e 75 dB. \* diferente do respectivo grupo salina (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey). Resultados expressos em Média +/- Erro Padrão da Média (n = 8 a 11).

Para diferenças de gênero na PPI (65dB), ANOVA de duas vias não revelou diferenças [F (1,89) = 0,5549 p > 0,05], com efeito principal da cetamina [F (4,89) = 3,61 p < 0,01], mas nenhuma interação [F (4,89) = 0,2654 p > 0,05].

Para PPI (70dB), ANOVA de duas vias não revelou diferença entre gêneros [F (1,89) = 1,044 p > 0,05], porém houve efeito principal da cetamina [F (4,89) = 4,63 p < 0,01], mas nenhuma interação entre esses fatores [F (4,89) = 0,7243 p > 0,05].

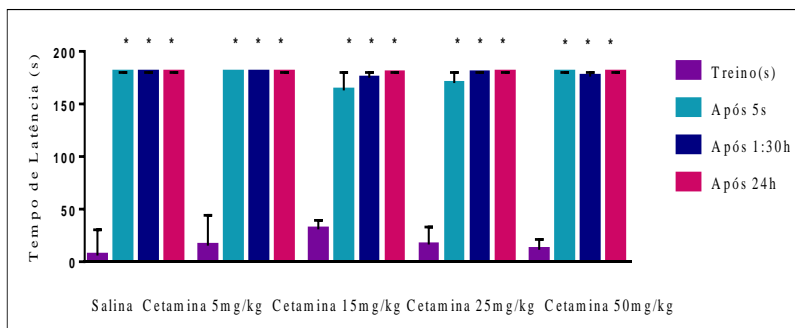
Para influência do gênero na PPI (75dB), ANOVA de duas vias não revelou diferenças [F (1,89) = 0,07402 p > 0,05], porém com efeito principal da cetamina [F (4,89) = 7,231 p < 0,0001], mas nenhuma interação [F (4,89) = 0,5455 p > 0,05].

ANOVA de medidas repetidas dentro de cada grupo de tratamento (com as intensidades 65dB, 70dB e 75dB) não revelou diferenças nem entre machos nem entre fêmeas (p > 0,05 para todos os grupos).

#### 4.1.4 Esquiva Inibitória

Em relação à Esquiva Inibitória, houve diferença nos efeitos da cetamina dentro dos grupos do sexo feminino *per se* (mas não do sexo masculino), mas as diferenças atribuíveis ao gênero não foram significativas. As Figuras 13 e 14 mostram os resultados para Esquiva Inibitória, iniciado 24h após a última injeção, em ratos machos (figura 13) e fêmeas (figura 14).

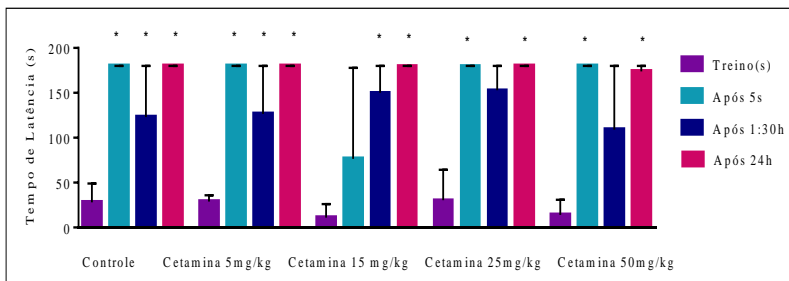
##### 4.1.4.1 Esquiva Inibitória- machos



**Figura 13:** Resultados para Esquiva Inibitória (machos). \* diferente do treino (ANOVA de medidas repetidas seguidas de teste de Dunn). Resultados expressos em Mediana +/- Amplitude Interquartis (n = 9 a 12).

Todos os grupos do sexo masculino mostraram ter aprendido a tarefa, com o tempo de latência aumentando significativamente entre os grupos nos testes de Friedman de ANOVA de uma via (teste não paramétrico), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn ( $p < 0,01$  para todos os grupos). Teste de Kruskal-Wallis entre os grupos não apresentou diferenças ( $p > 0,05$  para treinamento; após 5 segundos, 1 hora e meia e 24 horas). Assim, não houve efeitos induzidos pela cetamina na aquisição de memória aversiva de ratos machos, prepúberes, no presente estudo.

#### 4.1.4.2 Esquiva Inibitória- fêmeas



**Figura 14:** Resultados para Esquiva Inibitória (fêmeas). \* diferente do treino (ANOVA de medidas repetidas seguidas de teste de Dunn). Resultados expressos em Mediana +/- Amplitude Interquartis (n = 11 a 12).

Em relação à tarefa da Esquiva Inibitória em ratas fêmeas, todos os grupos mostraram ter aprendido a tarefa após 24h, como o tempo de latência aumentado significativamente entre os grupos nos testes de Friedman de ANOVA de uma via (teste não-paramétrico), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, 24h após o treinamento ( $p < 0.01$  para todas as doses). Portanto, a memória de longo prazo esteve intacta em ratas fêmeas. No entanto, de acordo com o teste de comparações múltiplas de Dunn ( $p < 0,05$ ), a memória de trabalho foi prejudicada, após 5 segundos, com cetamina 15mg/kg, e a memória de curto prazo (após 1:30h) foi prejudicada com cetamina 25mg/kg e 50 mg/kg (latência estatisticamente igual ao tempo de treinamento). Teste de Kruskal-Wallis entre os grupos não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$  para treinamento, após 5 segundos, após 1:30 horas e 24 horas). Também não houve diferença significativa entre grupos de gêneros diferentes no teste de Kruskal-Wallis.

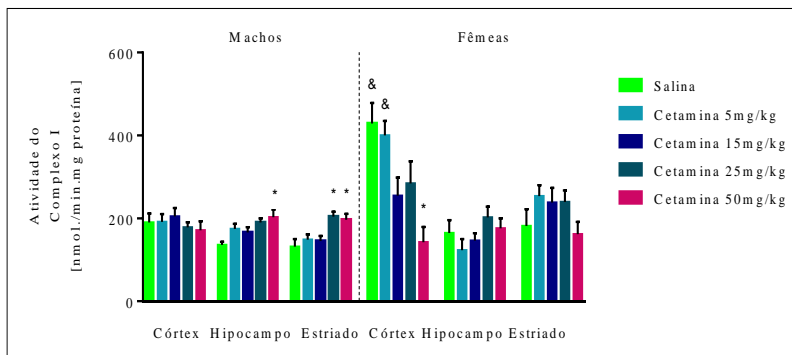
#### 4.1.5 Teste *post hoc* da ANOVA de Duas Vias (para os controles)

Finalmente, foi realizada, após ANOVA de duas vias, um novo teste de Tukey *post hoc*. Teste de Tukey *post hoc* mostrou que os grupos controle de machos e fêmeas foram iguais em todos os testes paramétricos ( $p > 0,9$  PPI em todas as intensidades,  $p > 0,1$  para latência,  $p > 0,9$  para número de contatos,  $p > 0,5$  para tempo total de contatos,  $p > 0,9$  distância percorrida, estereotipia, tempo no centro e nas bordas).

## 4.2 RESULTADOS DOS TESTES BIOQUÍMICOS (CADEIA MITOCONDRIAL)

Diferente dos resultados no comportamento, houve diferenças significativas entre os controles (salina) machos e fêmeas nos parâmetros do metabolismo energético. Além disso, os efeitos da cetamina também foram significativamente diferentes entre machos e fêmeas. Não houve, no entanto, uma correspondência consistente entre as alterações comportamentais e as alterações do metabolismo energético, entre as doses de cetamina.

### 4.2.1 Atividade do Complexo I



**Figura 15:** Resultados para Atividade do Complexo I (machos e fêmeas). \* diferente do respectivo grupo salina (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey) & diferente do grupo de mesma dose de cetamina (ou salina) mas de gênero oposto (ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* de Tukey). Resultados expressos em Média +/- Erro Padrão da Média (machos: n = 5 a 10; fêmeas: n = 4 a 7).

#### 4.2.1.1 Resultados para Atividade do Complexo I no Córtex Prefrontal

Nesta estrutura, a cetamina 50mg/kg causou uma queda de 66% na atividade desta enzima em relação ao controle, entre as fêmeas. Para Atividade do Complexo I no Córtex Prefrontal, ANOVA de Duas Vias revelou efeito principal da cetamina [  $F(4,58) = 11.23$   $p < 0.0001$ ] assim como do gênero [  $F(1,58) = 47.7$   $p < 0.0001$ ] e interação entre efeitos da cetamina e do gênero [  $F(4,58) = 9.468$   $p < 0.0001$ ].

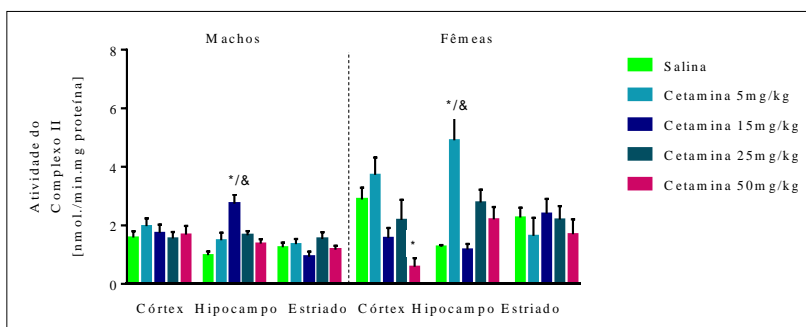
#### 4.2.1.2 Resultados para Atividade do Complexo I no Hipocampo

Para Atividade do Complexo I no Hipocampo, ANOVA de Duas Vias revelou efeito principal da cetamina [F (4,56) = 2,721 p< 0.05] mas não do gênero [F(1,56) = 0.8388 p>0.05], tampouco interação entre efeitos da cetamina e do gênero [F (4,56) = 1.334 p>0.05].

#### 4.2.1.3 Resultados para Atividade do Complexo I no Estriado

Para Atividade do Complexo I no Estriado, ANOVA de Duas Vias não revelou efeito da cetamina [F (4,57) = 2,092 p> 0,05] porém houve efeito do gênero [F(1,57) = 10,83 p<0,01] e ainda interação entre os efeitos da cetamina e do gênero [F (4,57) = 2,716 p<0,05].

### 4.2.2 Atividade do Complexo II



**Figura 16:** Resultados para Atividade do Complexo II (machos e fêmeas). \* diferente do respectivo grupo salina (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey). & diferente do grupo de mesma dose de cetamina (ou salina) mas de gênero oposto (ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* de Tukey). Resultados expressos em Média +/- Erro Padrão da Média (machos: n = 6 a 9; fêmeas: n = 3 a 7).

#### 4.2.2.1 Resultados para Atividade do Complexo II no Córtex Prefrontal

Para Atividade do Complexo II no Córtex Prefrontal, ANOVA de Duas Vias revelou efeito principal da cetamina [F (4,50) = 5,528 p< 0,001] mas não do gênero [F(1,50) = 3,929 p>0,05] porém, havendo interação entre efeitos da cetamina e do gênero [F (4,50) = 4,394 p<0,05].

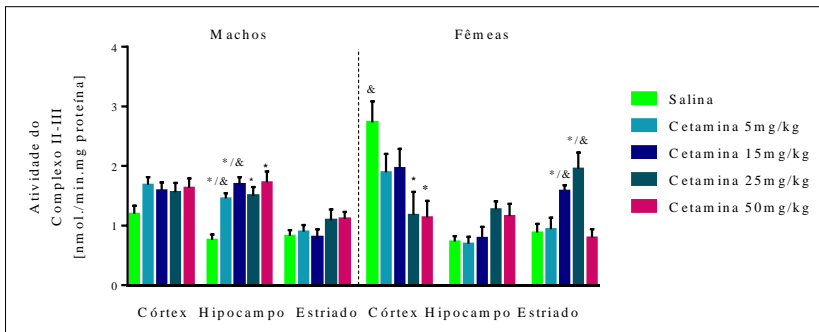
#### 4.2.2.2 Resultados para Atividade do Complexo II no Hipocampo

Para Atividade do Complexo II no Hipocampo, ANOVA de Duas Vias revelou efeito principal da cetamina [F (4,53)= 12,99 p< 0.0001] assim como do gênero [F(1,53 )=19,1 p<0,0001] e interação entre efeitos da cetamina e do gênero [F (4,53 )=18,26 p<0,0001].

#### 4.2.2.3 Resultados para Atividade do Complexo II no Estriado

Para Atividade do Complexo II no Córtex Estriado, ANOVA de duas vias revelou que não houve efeito significativo da cetamina [F (4,57)=0,55595 p>0,05], porém houve efeito referente ao gênero [F(1,57)= 13,77 p<0,001] se interação significativa entre efeitos da cetamina e do gênero [F (4,57)= 0,9496 p>0.05].

### 4.2.3 Atividade do Complexo II-III



**Figura 17:** Resultados para Atividade do Complexo II-III (machos e fêmeas). \* diferente do respectivo grupo salina (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey). & diferente do grupo de mesma dose de cetamina (ou salina) mas de gênero oposto (ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* de Tukey). Resultados expressos em Média +/- Erro Padrão da Média (machos: n = 6 a 10; fêmeas: n= 4 a 7).

#### 4.2.3.1 Resultados para Atividade do Complexo II-III no Córtex Prefrontal

Nesta estrutura a cetamina 50mg/kg causou, nas fêmeas, uma queda de 58% da atividade em relação ao controle. Para Atividade do Complexo II-III no Córtex Prefrontal, ANOVA de duas vias revelou

efeito principal da cetamina [F (4,57)= 3,015 p<0,05] mas não do gênero [F(1,57)= 3,291 p>0,05], com interação significativa entre efeitos da cetamina e do gênero [ F(4,57)= 7 p<0001].

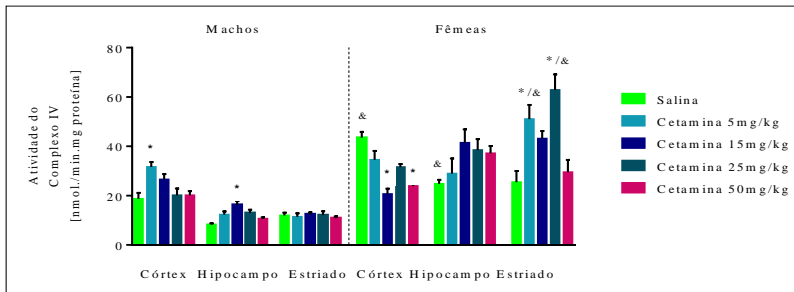
#### 4.2.3.2 Resultados para Atividade do Complexo II-III no Hipocampo

Para Atividade do Complexo II-III no Córtex Hipocampo, ANOVA de duas vias revelou efeito principal da cetamina [F(4,60)= 7,607 p< 0,0001] assim como do gênero [F(1,60)= 29,94 p<0,0001] e interação entre efeitos da cetamina e do gênero [F (4,60) = 3,252 p< 0,05].

#### 4.2.3.3 Resultados para Atividade do Complexo II-III no Estriado

Para Atividade do Complexo II-III no Estriado, ANOVA de duas vias revelou efeito principal da cetamina [ F(4,60 )= 5,88 p<0,001] assim como do gênero [F(1,60)= 8,42 p<0,01] e interação entre efeitos da cetamina e do gênero [F (4,60)= 5,339 p=0,001].

#### 4.2.4 Atividade do Complexo IV



**Figura 18:** Resultados para Atividade do Complexo IV (machos e fêmeas). \* diferente do respectivo grupo salina (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey). & diferente do grupo de mesma dose de cetamina (ou salina) mas de gênero oposto (ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* de Tukey). Resultados expressos em Média +/- Erro Padrão da Média (machos: n = 5 a 8; fêmeas: n = 4 a 6).

##### 4.2.4.1 Atividade do Complexo IV no CórteX Prefrontal

Nesta estrutura, a cetamina 50mg/kg causou uma queda de 45% na atividade desta enzima em relação ao controle, entre as fêmeas. Para Atividade do Complexo IV no CórteX Prefrontal, ANOVA de duas vias revelou efeito principal da cetamina [F (4,45)= 6,492 p<0,001] e do gênero [F(1,45)= 19,47 p<0,0001], com interação significativa entre efeitos da cetamina e do gênero [ F(4,45)= 9,391 p<0001].

##### 4.2.4.2 Resultados para Atividade do Complexo IV no Hipocampo

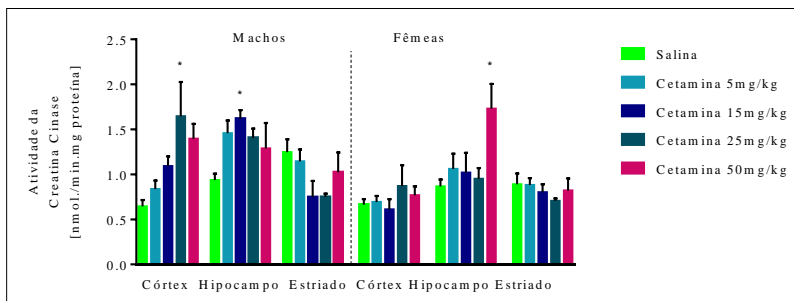
Para Atividade do Complexo IV no Hipocampo, ANOVA de duas vias revelou efeito principal da cetamina [F(4,47)= 5,32 ,p< 0,01] assim como do gênero [F(1,47)= 144,2 , p<0,0001] porém não houve interação entre efeitos da cetamina e do gênero [F (4,47) = 1,511 ,p> 0,05].

##### 4.2.4.3 Resultados para Atividade do Complexo IV no Estriado

Para Atividade do Complexo IV no Estriado, ANOVA de duas vias revelou efeito principal da cetamina [F(4,46) = 10,81 p<0,0001] assim como do gênero [F(1,46)= 209,6 p<0,0001] e interação entre efeitos da cetamina e do gênero [F (4,46)= 10,31 p=0,0001].



## 4.2.5 Resultados para Atividade da CK



**Figura 19:** Resultados para Atividade da CK (machos e fêmeas). \* diferente do respectivo grupo salina (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey) . & diferente do grupo de mesma dose de cetamina (ou salina) mas de gênero oposto (ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* de Tukey). Resultados expressos em Média +/- Erro Padrão da Média (machos: n=7 a 11; fêmeas: n= 5 a 7).

### 4.2.5.1 Resultados para a Atividade da CK no Córtex Prefrontal

Para Atividade da CK no Córtex Prefrontal, ANOVA de duas vias revelou efeito principal da cetamina [ $F(4,59)= 3,478$   $p<0,05$ ] e do gênero [ $F(1,59)=11,75$   $p<0,01$ ], porém não houve interação significativa entre efeitos da cetamina e do gênero [ $F(4,59)= 1,605$   $p>0,05$ ].

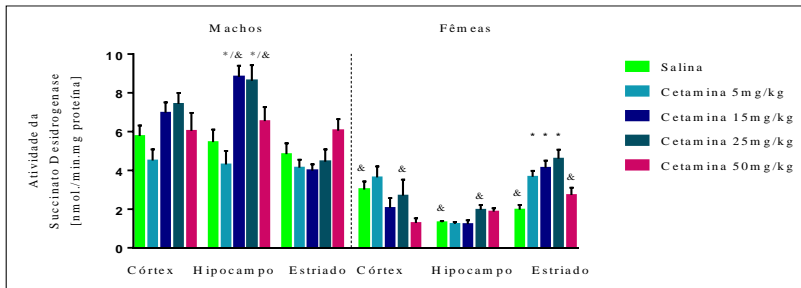
### 4.2.5.2 Resultados para Atividade da CK no Hipocampo

Para Atividade da CK no Hipocampo, ANOVA de duas vias revelou efeito principal da cetamina [ $F(4,64)= 3,691$   $p<0,01$ ] assim como do gênero [ $F(1,64)= 4,39$   $p<0,05$ ] e interação entre efeitos da cetamina e do gênero [ $F(4,64)= 3,234$   $p<0,05$ ].

### 4.2.5.3 Resultados para Atividade da CK no Estriado

Para Atividade da CK no Estriado, ANOVA de duas vias não revelou nenhum efeito da cetamina [ $F(4,60)= 1,812$   $p>0,05$ ] tampouco do gênero [ $F(1,60)= 2,739$   $p>0,05$ ] nem interação entre efeitos da cetamina e do gênero [ $F(4,60)= 0,5752$   $p>0,05$ ].

## 4.2.6 Resultados para Atividade da SDH



**Figura 20:** Resultados para Atividade da SDH (machos e fêmeas). \* diferente do respectivo grupo salina (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey). & diferente do grupo de mesma dose de cetamina (ou salina) mas de gênero oposto (ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* de Tukey). Resultados expressos em Média +/- Erro Padrão da Média (machos: n = 6 a 10; fêmeas: n = 5 a 7).

### 4.2.6.1 Atividade da SDH no Córtex Prefrontal

Para Atividade da SDH no Córtex Prefrontal, ANOVA de duas vias não revelou efeito da cetamina [ $F(4,56) = 1,491$   $p > 0,05$ ] mas sim do gênero [ $F(1,56) = 89,12$   $p < 0,0001$ ], e com interação significativa entre efeitos da cetamina e do gênero [ $F(4,56) = 4,286$   $p < 0,01$ ].

### 4.2.6.2 Resultados para Atividade da SDH no Hipocampo

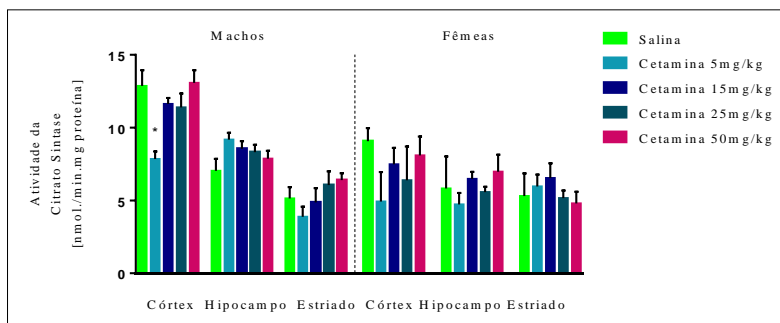
No hipocampo, a atividade da SDH esteve 337% maior entre machos na dose de 25mg/kg e 617% maior na dose de 15mg/kg, em relação às fêmeas.

Para Atividade da SDH no Hipocampo, ANOVA de duas vias revelou efeito principal da cetamina [ $F(4,64) = 6,02$  ,  $p < 0,001$ ] assim como do gênero [ $F(1,64) = 180,6$   $p < 0,0001$ ] e interação entre efeitos da cetamina e do gênero [ $F(4,64) = 4,552$   $p < 0,01$ ].

### 4.2.6.3 Resultados para Atividade da SDH no Estriado

Para Atividade do Complexo SDH no Estriado, ANOVA de duas vias não revelou efeito principal da cetamina [ $F(4,58) = 1,879$   $p > 0,05$ ] porém houve efeito do gênero [ $F(1,58) = 19,55$   $p < 0,0001$ ] e interação entre efeitos da cetamina e do gênero [ $F(4,58) = 6,946$   $p = 0,0001$ ].

## 4.2.7 Resultados para Atividade da Citrato Sintase



**Figura 21:** Resultados para Atividade da Citrato Sintase (machos e fêmeas). \* diferente do respectivo grupo salina (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey). Resultados expressos em Média +/- Erro Padrão da Média (machos: n = 3 a 4; fêmeas: n= 4 a 5).

### 4.2.7.1 Resultados para a Citrato Sintase no Córtex Prefrontal

ANOVA de duas vias não teve efeito da cetamina [ $F(4,32) = 2,059$   $p > 0,05$ ] mas houve importante efeito do gênero [ $F(1,32) = 17,65$   $p < 0,001$ ], sem interação significativa entre efeitos da cetamina e do gênero [ $F(4,32) = 0,4318$   $p > 0,05$ ].

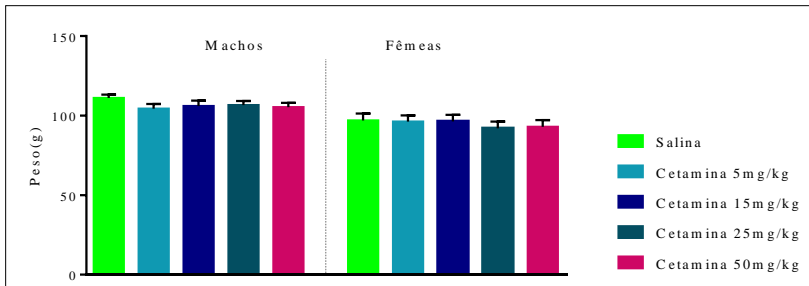
### 4.2.7.2 Resultados para Atividade da Citrato Sintase no Hipocampo

Para Atividade do Citrato Sintase no Hipocampo, ANOVA de duas vias mostrou que não houve efeito da cetamina [ $F(4,35) = 0,3636$   $p > 0,05$ ], mas apenas efeito do gênero [ $F(1,35) = 12,29$   $p < 0,01$ ], contudo sem interação entre efeitos da cetamina e do gênero [ $F(4,35) = 0,9514$   $p > 0,05$ ].

### 4.2.7.3 Resultados para Atividade da Citrato Sintase no Estriado

Para Atividade do Citrato Sintase no Estriado ANOVA de duas vias mostrou efeito nulo da cetamina [ $F(4,32) = 0,2651$   $p > 0,05$ ], tampouco do gênero [ $F(1,32) = 0,2431$   $p > 0,05$ ] nem mesmo interação entre efeitos da cetamina e do gênero [ $F(4,32) = 1,517$   $p = 0,2208$ ].

#### 4.2.8 Resultado para o Peso dos animais

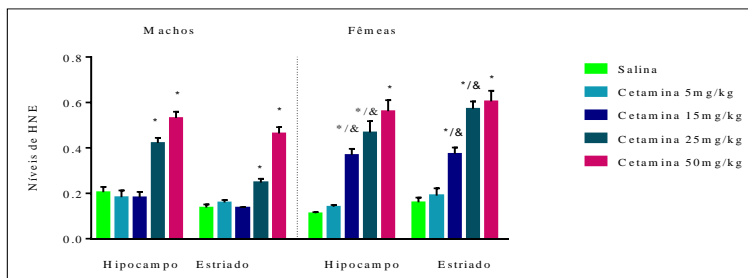


**Figura 22:** Resultados para Peso dos animais (machos e fêmeas). Resultados expressos em Média +/- Erro Padrão da Média (machos: n= 23 a 25; fêmeas: n= 22 a 24).

Quanto ao peso dos animais, demonstramos que houve uma diferença pequena, mas significativa, atribuível ao gênero [ $F(1,227)= 27,62$   $p<0,0001$ ] porém nenhum efeito da cetamina [ $F(4,227)= 0,6197$   $p>0,05$ ] tampouco interação entre esses fatores [ $F(4,227)= 0,3128$   $p>0,05$ ]. Por estes resultados, vemos que um importante parâmetro da saúde física destes animais está preservado e sem influência da cetamina, descartando um eventual viés a influenciar o seu comportamento.

## 4.3 RESULTADOS DOS TESTES BIOQUÍMICOS (ESTRESSE OXIDATIVO)

### 4.3.1 Resultados para Dosagem de HNE



**Figura 23:** Resultados para Dosagem de HNE (machos e fêmeas). \* diferente do respectivo grupo salina (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey) . & diferente do grupo de mesma dose de cetamina (ou salina) mas de gênero oposto (ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* de Tukey). Resultados expressos em Média +/- Erro Padrão da Média (machos: n = 5 a 7; fêmeas: n = 5 a 7).

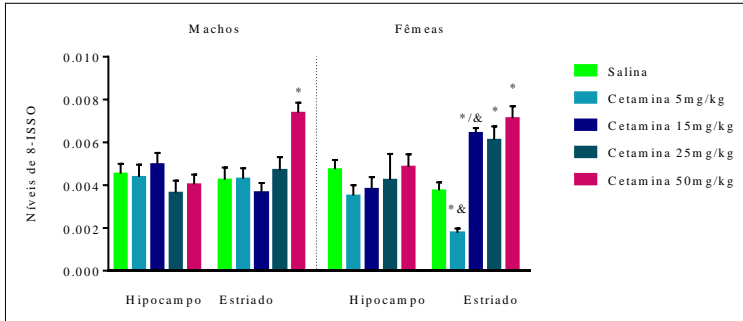
#### 4.3.1.1 Resultados para a Dosagem de HNE no Hipocampo

No hipocampo, a cetamina aumentou os níveis de HNE em fêmeas 35% acima dos machos da mesma dose (25mg/kg), e 104% a mais que os machos na dose de 15mg/kg. ANOVA de Duas Vias revelou efeito principal da cetamina [ $F(4,48) = 72,65$   $p < 0,0001$ ]; efeito significativo do gênero [ $F(1,48) = 16,15$   $p < 0,001$ ] e interação significativa entre esses fatores [ $F(4,48) = 5,373$   $p < 0,01$ ]. O teste *post hoc* da ANOVA de Duas vias mostrou, ainda, que os grupos de fêmeas com cetamina 15mg/kg e 25mg/kg tiveram aumento do HNE em relação aos grupos de mesma dose nos machos.

#### 4.3.1.2 Resultados para a Dosagem de HNE no Estriado

No Estriado, a cetamina causou um aumento nas fêmeas, 89% maior que os machos na dose de 25mg/kg e 172% maior na dose de 15mg/kg. ANOVA de Duas Vias revelou efeito principal da cetamina [ $F(4,51) = 76,29$   $p < 0,0001$ ]; efeito significativo do gênero [ $F(1,51) = 42,42$   $p < 0,0001$ ] e interação significativa entre esses fatores [ $F(4,51) = 12,95$   $p < 0,0001$ ].

### 4.3.2 Resultados para Dosagem de 8-ISSO



**Figura 24:** Resultados para Dosagem de 8-ISSO (machos e fêmeas). \* diferente do respectivo grupo salina (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey). & diferente do grupo de mesma dose de cetamina (ou salina) mas de gênero oposto (ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* de Tukey). Resultados expressos em Média +/- Erro Padrão da Média (machos: n = 5 a 7; fêmeas: n = 5 a 7).

#### 4.3.2.1 Resultados para Dosagem de 8-ISSO no Hipocampo

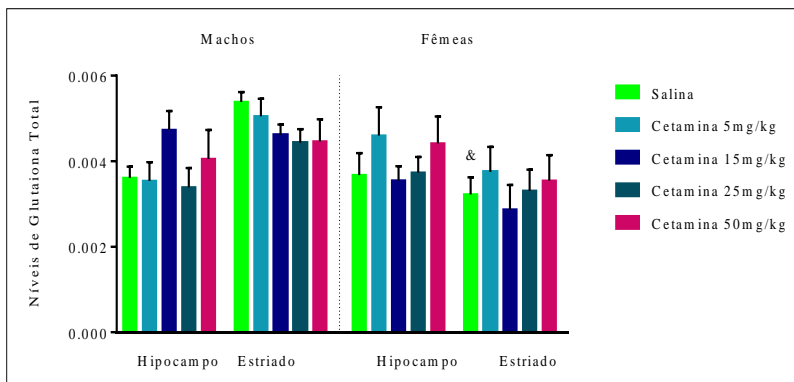
Para Dosagem de 8-ISSO no Hipocampo, ANOVA de Duas vias mostrou que não houve efeito da cetamina [ $F(4,47) = 0,5429$   $p > 0,5$ ], tampouco efeito do gênero [ $F(1,47) = 0,04284$   $p > 0,5$ ] nem mesmo interação entre os fatores [ $F(4,47) = 1,09$   $p > 0,1$ ].

#### 4.3.2.2 Resultados para Dosagem de 8-ISSO no Estriado

Na dose de 15mg/kg, a cetamina causou um aumento de 76% dos níveis nas fêmeas em relação aos machos nesta dose, enquanto que na dose de 5mg/kg, os machos tiveram um aumento de 143% em relação às fêmeas.

ANOVA de Duas vias revelou que efeito significativo da cetamina [ $F(4,51) = 18,33$   $p < 0,0001$ ] porém sem efeito do gênero [ $F(1,51) = 0,4377$   $p > 0,5$ ]. Houve, no entanto, interação significativa entre cetamina e gênero [ $F(4,51) = 8,884$   $p < 0,0001$ ].

### 4.3.3 Resultados para Dosagem de Glutaciona Total



**Figura 25:** Resultados para Dosagem de 8-ISSO (machos e fêmeas). & diferente do grupo de mesma dose de cetamina (ou salina) mas de gênero oposto (ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* de Tukey). Resultados expressos em Média +/- Erro Padrão da Média (machos: n = 5 a 7; fêmeas: n = 5 a 7).

#### 4.3.3.1 Resultados para Dosagem de Glutaciona Total no Hipocampo

Para Dosagem de Glutaciona no Hipocampo, ANOVA de Duas Vias revelou que não houve efeito da cetamina [ $F(4,48) = 0,8112$   $p > 0,5$ ], tampouco efeito do gênero [ $F(1,48) = 0,1821$   $p > 0,5$ ] nem interação entre esses fatores [ $F(4,48) = 1,458$   $p > 0,1$ ].

#### 4.3.3.2 Resultados para Dosagem de Glutaciona Total no Estriado

Para Dosagem de Glutaciona no Estriado, ANOVA de Duas Vias mostrou que não houve efeito da cetamina [ $F(4,51) = 0,7754$   $p > 0,5$ ] porém houve efeito significativo do gênero [ $F(1,51) = 25,78$   $p < 0,0001$ ] sem haver contudo interação entre os fatores [ $F(4,51) = 0,619$   $p > 0,5$ ].

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo visou testar a validade de face e de constructo de um modelo animal de esquizofrenia na infância, através administração repetida de cetamina em cinco diferentes doses em ratos Wistar machos e fêmeas, e realização de testes comportamentais que comprovem a produção de alterações semelhantes à Esquizofrenia em seres humanos. Foram administradas as doses de 5mg/kg e 15mg/kg, as quais, em estudos anteriores em machos adultos jovens, não causaram alterações comportamentais e tiveram efeito antidepressivo (figura 3). Já as doses de 25mg/kg e 50mg/kg produziram, em estudos anteriores com ratos adultos jovens, efeitos semelhantes à esquizofrenia (figura 3)

O presente estudo visou testar as diferenças entre os gêneros e confrontá-las com as diferenças que ocorrem entre crianças com esquizofrenia, as quais são menos evidentes que as que ocorrem no transtorno em adultos e adolescentes (Ordóñez et al., 2016). Portanto, tinha-se a hipótese de que a cetamina nas doses de 25mg/kg e 50mg/kg causasse alterações tipo-esquizofrenia enquanto que as doses 5mg/kg e 15mg/kg não causassem alterações. Porém, as doses de 5mg/kg e 15mg/kg causaram alterações comportamentais e bioquímicas em fêmeas, sugerindo que estas doses não podem ser usadas em estudos com a cetamina em ratas prepúberes como antidepressivo. Já as doses de 25mg/kg e 50mg/kg produziram diversas alterações comportamentais e bioquímicas semelhantes à esquizofrenia em ambos os sexos.

Os resultados mais relevantes foram locomoção (figura 4) e níveis de HNE e 8-ISSO (figura 23). Para distância percorrida (figura 4), as fêmeas tiveram um aumento (em relação aos machos da mesma dose) estatisticamente significativo de 106% na dose de 50mg/kg, 134% na dose de 25mg/kg e 182% na dose de 15mg/kg, portanto, mais do que dobrando a distância percorrida nessas doses. Este achado comportamental mostra uma diferença significativa na reação à cetamina, tendo machos e fêmeas diferentes curvas dose-resposta para um mesmo medicamento (figura 4). Além disso, em um outro grupo de animais (cuja morte ocorreu 48h após a última injeção, ver tabelas 2 e 3) foi demonstrado aumentos de grande monta dos marcadores HNE e 8-ISSO (figuras 23 e 24). Portanto, estes dados bioquímicos demonstram que a cetamina, nas doses e protocolos utilizados produziu dano oxidativo duradouro nas estruturas cerebrais analisadas, em concordância com os achados em seres humanos com esquizofrenia.

Em geral, a cetamina reproduziu, em ratos machos prepúberes, os efeitos na PPI (figuras 11 e 12) e na locomoção (figuras 4, 5, 6 e 7) que



representam os sintomas "positivos" da Esquizofrenia, isto é, a psicose e a agitação (Malhotra et al., 1996, APA, 2013). No entanto, na interação social (figuras 8, 9 e 10) e na Esquiva Inibitória (figuras 13 e 14), que representam os sintomas "negativos" (anedonia, depressão) de Esquizofrenia, as alterações não foram reproduzidas, em desacordo com estudos anteriores em ratos adultos jovens (Canever et al., 2010). No presente estudo, a PPI foi diminuída pela cetamina 50mg/kg, em todas as intensidades. Este achado concorda com um estudo anterior (Zugno et al., 2014b), o qual concluiu que cetamina 25mg/kg é capaz de diminuir a PPI em ratos adultos. O presente estudo mostra que, em ratos Wistar prepúberes, cetamina 25mg/kg e cetamina 50mg/kg aumentaram a distância percorrida em campo aberto, assim como os movimentos estereotipados, concordando com estudos anteriores em ratos machos adultos jovens (Zugno et al., 2013). Em relação à interação social (figuras 8, 9 e 10), os presentes resultados em ratos jovens do sexo masculino estão em desacordo com Canever et al. (2010), que constatou que ratos adultos que receberam cetamina em dose aguda tiveram sua interação social prejudicada. O presente estudo também diverge Zugno et al. (2013) que mostrou que uma dose aguda de cetamina 25 mg/kg e privação materna (180 minutos nos dias 1 a 10 pós-natal) aumentou a latência para iniciar o contato social. O presente estudo em ratos jovens do sexo masculino não revelou alterações na Esquiva Inibitória (figura 13), 24h e 48h após a última injeção. Os presentes resultados divergem do estudo anterior de Zugno et al (2014a) que mostrou que os ratos machos adultos submetidos a cetamina 25 mg/kg durante 7 dias tiveram perda de memória na esquiva inibitória, iniciada 24 horas após a última injeção. Portanto, o presente estudo sugere que ratos Wistar machos prepúberes podem ser mais resistentes aos efeitos da cetamina para os sintomas "negativos", tais como Esquiva Inibitória e Interação Social, do que ratos adultos jovens.

As doses de cetamina de 5 mg/kg e 15 mg/kg têm sido utilizados em modelos terapêuticos de tratamento de depressão, uma vez que doses muito baixas de cetamina demonstraram efeitos antidepressivos em animais e seres humanos (Réus et al., 2015). Estas doses demonstraram nenhum efeito prejudicial e reverteram modelos de depressão em ratos Wistar machos adultos. Os resultados deste estudo nos machos prepúberes confirmam estes resultados, mas nas fêmeas, estas mesmas doses baixas modificaram parâmetros comportamentais. A cetamina 5mg/kg alterou a interação social (figuras 8, 9 e 10) e cetamina 15 mg/kg alterou a distância (figura 4), a estereotípi (figura 5), a esquiva inibitória (figura 14) e a PPI (figura 12). Assim, futuros estudos em

ratos Wistar prepúberes com a cetamina como um antidepressivo terão que levar em conta possíveis efeitos nocivos, e da mesma forma, ensaios clínicos em crianças com depressão deverão considerar possíveis diferenças de gênero (Francescheli et al., 2015; Donoghue et al., 2015).

Comparando-se os presentes resultados com a condição em seres humanos, verifica-se que as poucas alterações na interação social (e apenas em fêmeas) estão em desacordo com a apresentação da esquizofrenia em adultos e crianças. Na esquizofrenia, as dificuldades de interação social são evidentes, na maioria dos casos, mesmo antes da apresentação do primeiro surto psicótico, caracterizando a “personalidade pré-mórbida” (APA, 2013). Além disso, a memória de longo prazo (24h) para um evento estressor (choque elétrico) na esQUIVA inibitória esteve preservada em todos os animais, havendo dano somente nas fêmeas, na memória imediata e de curto prazo. Sabemos que pacientes esquizofrênicos com décadas de doença apresentam déficits de memória que se aproximam de um quadro demencial (Kraepelin, 1921; Craddock e Owen, 2010). No entanto, no início da doença, uma parte importante da memória está preservada, em especial a memória emocional (Dieleman et al., 2015). Os déficits apresentados pelas fêmeas podem corresponder, na verdade, à ansiedade e a déficits na função executiva (Shields et al., 2016), e não à perda de memória. De qualquer forma, a ausência de déficit de memória de longo prazo para evento estressor não invalida o presente modelo, no que se refere à Esquizofrenia na Infância.

Quanto aos efeitos da cetamina, existe razoável similaridade entre as alterações induzidas em humanos e em animais, corroborando seu uso em modelos animais de psicose (Ram et al., 2013). Sabe-se que os efeitos psicóticos da cetamina costumam ser menos frequentes em crianças do que em adultos, o que é corroborado pela maior parte dos resultados deste estudo (em comparação com resultados anteriores em ratos machos adultos). Os efeitos psicóticos da cetamina nas crianças são de menor intensidade, de maneira tal que tornam possível seu uso em cirurgias como anestésico, e seus efeitos podem ainda ser prevenidos com uso prévio de haloperidol (Amr et al., 2013). Em roedores, o efeito psicótico dos antagonistas NMDAr também é maior na faixa etária de adultos jovens, validando a correlação do modelo animal com a psicose em humanos (Farber et al., 1995).

Outra constatação importante do presente trabalho foi a de que o gênero feminino foi um fator significativo no aumento da distância total em campo aberto (Figura 4), provando que, de acordo com esse parâmetro, ratas prepúberes foram mais sensíveis ao efeito da cetamina

que os machos (mas não havia quaisquer diferenças entre os grupos salina feminino e masculino). Este achado corrobora vários estudos em animais (Zhao et al., 2013) e seres humanos (Xu et al., 2015) mostrando que os efeitos dos antagonistas dos receptores NMDA mudam conforme o gênero. Uma vez que os animais do estudo foram testados antes da puberdade, é razoável especular que estas diferenças surgiram devido a particularidades na sinalização NMDA, as quais poderiam ter sido geradas no período prenatal (Hsu et al., 2001). Em animais, existem muitas evidências de que diferenças normais no comportamento entre machos e fêmeas são determinadas no período gestacional, pela diferença nos níveis de estrógenos (Hines et al., 2015). Foram encontradas diferenças de gênero em adultos com Esquizofrenia, com muito poucos estudos na Esquizofrenia na Infância sobre este tema (O'Neill et al, 2004;. Kim et al, 2010;. Goldstein et al, 2013). Um estudo mostrou que a perda de massa cinzenta no SNC que ocorre na Esquizofrenia na Infância é igual em meninos e meninas com essa condição (Weisinger et al., 2013).

A hipótese da hipofunção do receptor NMDA postula que vários fatores de risco interagem com alterações genéticas no período de pré-natal, que por sua vez alteram a função de receptores glutamatérgicos em todo o cérebro e, em seguida, predispõem a condições psiquiátricas, incluindo a esquizofrenia tardiamente (Zugno et al., 2013;. Wang et al, 2015). Postula-se que, na esquizofrenia, os receptores glutamatérgicos estejam alterados por fatores de risco ambientais e genéticos, mas não se sabe se meninos e meninas com Esquizofrenia têm as mesmas alterações que os adultos (Kim et al., 2010).

A maior sensibilidade de ratas prepúberes a um antagonista do receptor NMDA no presente estudo apoia a hipótese de que as meninas em alto risco de psicose são mais vulneráveis a alguns dos sintomas esquizofrenia, o que foi revelado em alguns estudos (Weintraub et al., 1978; Gutt et al, 2008;. Maydell et al, 2009). Uma hipótese alternativa é a de que o gênero não é importante como fator de risco para Esquizofrenia na Infância, apesar da ação dos hormônios andrógenos na vida prenatal sobre receptores glutamatérgicos (Röpcke e Eggers, 2005; Weisinger et al, 2013). Sendo uma condição rara, existe entre os estudos sobre Esquizofrenia na Infância uma grande variabilidade nos sintomas reportados e na proporção entre pacientes do gênero masculino e feminino (tabela 1). Quanto aos efeitos da cetamina, um estudo mostrou que as mulheres usuárias recreacionais de cetamina reportaram mais sintomas cognitivos que os homens (Chen et al., 2014). Assim, a maior vulnerabilidade dos animais do gênero feminino no presente estudo é

corroborada por uma maior vulnerabilidade aos efeitos da cetamina no gênero feminino também entre seres humanos.

É possível que, ao menos em parte, as diferenças de gênero nas alterações comportamentais induzidas pela cetamina tenham relação com diferenças no metabolismo energético. Os resultados do presente estudo em relação às alterações no metabolismo energético mostram que cada dose de cetamina afetou pelo menos uma enzima em pelo menos um dos gêneros. Os efeitos da cetamina foram altamente variáveis de acordo com a dose.

Os resultados deste estudo mostraram que a cetamina alterou a atividade das enzimas mitocondriais em todas as doses, principalmente aumentando a atividade (figuras 15, 16, 17 e 18).

Quanto aos resultados da atividade de CK, observou-se aumento em diferentes estruturas, tanto em machos quanto em fêmeas (figura 19). Este aumento está de acordo com estudo prévio com cetamina aguda em ratos adultos (Canever et al., 2010) e com diversos estudos em soro de pacientes esquizofrênicos, tanto de início adulto quanto de início precoce (Blumensohn et al., 1998; Hermesh et al., 2002). Além disso, os resultados do presente estudo mostraram predomínio de aumento nos machos, o que também é corroborado por um estudo em adolescentes (humanos) com Esquizofrenia (Hermesh et al., 2002). O aumento verificado no presente estudo se opõe à queda da atividade na CK observada em cérebros *post mortem* de pacientes com longo período de doença (Burbaeva et al., 2003). Logo, os presentes resultados na CK corroboram a hipótese de que o presente modelo é representativo da Esquizofrenia nos primeiros estágios da doença, quando há aumento da atividade metabólica.

Quanto à atividade dos complexos da cadeia mitocondrial, no complexo I, houve aumento da atividade entre animais machos, no hipocampo e no estriado (figura 15). Estes resultados estão de acordo com Dror et al. (2002) que mostrou aumento do complexo I em plaquetas de pacientes esquizofrênicos, durante os surtos psicóticos. No estriado, não houve alteração nos demais complexos em machos (figuras 16, 17 e 18), em desacordo com estudos em pacientes esquizofrênicos (Prince et al., 1999; Prince et al., 2000). Os resultados em machos estão também em divergência com um estudo anterior de Oliveira et al. (2011) em ratos adultos com cetamina 25mg/kg por 7 dias, o qual obteve aumento da atividade do complexo I no córtex prefrontal, uma hora após a injeção. Também chama a atenção que os animais machos, no hipocampo, tiveram aumento da atividade dos complexos mitocondriais (figuras 15 a 18), da CK (figura 19) e da SDH (figura 20) na dose de

15mg/kg. Nesta dose, estudos anteriores em ratos adultos jovens mostraram ter efeito antidepressivo (Réus et al., 2015) e não alterar a função mitocondrial (Zugno et al., 2015). Estudos adicionais serão necessários para compreender o papel da idade nas diferenças no metabolismo mitocondrial, e como este é afetado pela cetamina.

Os animais machos apresentaram aumento da atividade dos complexos e a da enzima do ciclo de Krebs SDH também em outras doses no hipocampo, o que pode corresponder ao aumento da atividade do hipocampo em pacientes esquizofrênicos, verificado em alguns estudos (Heckers et al., 2015). Este aumento, no entanto, é patológico no sentido em que leva a uma atrofia hipocampal em longo prazo (Prestia et al., 2015). Os ratos machos apresentaram, ainda, diminuição da atividade da Citrato Sintase no prefrontal com cetamina 5mg/kg (figura 21). Este achado contradiz o resultado em cérebro de pacientes *post mortem* obtido por Bubber et al. (2011) que não mostrou alteração da atividade desta enzima (mas mostrou aumento da SDH). De forma intrigante, a queda na Citrato Sintase foi encontrada também em um modelo animal de mania (Freitas et al., 2010). As diferenças dos nossos resultados para aqueles em seres humanos provavelmente são causadas pelo fato de que esses estudos foram feitos em cérebro *post mortem*, de pacientes com muitos anos de doença e em uso de antipsicóticos. Por isso, não é de se surpreender se muitos dos nossos achados forem, na verdade, o oposto daqueles encontrados em estudos *post mortem*. Um exemplo bem evidente é a atividade da CK, a qual esteve aumentada em nosso estudo, sendo que em estudos *post mortem* ela está abaixo dos níveis dos controles (Aksenova et al., 1999; Burbaeva et al., 2003). Por conseguinte, considerando a maior parte dos nossos achados, pode-se especular que o presente trabalho tenha produzido alterações congruentes para os sintomas positivos de esquizofrenia, e numa fase precoce da doença.

Os resultados do presente estudo das enzimas mitocondriais mostraram importantes diferenças entre ratos machos e fêmeas (figuras de 15 a 19). Essas diferenças ocorreram não só pela ação da cetamina, como verificamos diferenças entre os machos e fêmeas controles, ou seja, diferenças inerentes ao gênero. Estão bem documentadas na literatura diferenças importantes no metabolismo energético entre homens e mulheres, e entre machos e fêmeas em modelos animais (Demarest e McCarthy, 2014). Um exemplo clássico foram estudos em homens e mulheres sobreviventes da fome durante a Segunda Guerra Mundial. Nesses estudos, verificou-se uma tendência entre os homens de perda de proteínas e entre as mulheres, de perda de gordura,

refletindo diferentes preferências dos seus organismos na obtenção de ATP em caso de inanição. Devido a este mecanismo, as mulheres acabam sendo mais resistentes que os homens à desnutrição, e estudos em animais corroboram esta diferença entre os sexos (Widdowson, 1976).

É bem conhecido o papel dos hormônios estrógenos na função mitocondrial. Estudos em ratos mostraram que as fêmeas têm menores níveis de estresse oxidativo no SNC e maior atividade das enzimas mitocondriais (Demarest e McCarthy, 2015). Algumas destas características dependem da ação direta dos estrógenos, outras permanecem durante a vida. Podem desaparecer durante o envelhecimento (Gaignard et al., 2015) ou, dependendo do parâmetro medido, resultar em maior acúmulo de radicais livres nos machos (Guevara et al., 2011). Em geral, os estrógenos promovem um aumento da capacidade energética cerebral através do favorecimento da glicólise aeróbica. (Brinton, 2008). No entanto, como o presente estudo foi realizado no período anterior à puberdade, inferimos que as diferenças entre ratos machos e fêmeas nos nossos resultados devam ser devido a diferenças hormonais de origem intrauterina (Hsu et al., 2001).

Assim, os resultados no prefrontal sugerem que as fêmeas têm um nível de atividade mitocondrial maior do que os machos (figuras 15, 17 e 18). Nesta estrutura, a cetamina na dose de 50mg/kg reduziu a atividade de todos os complexos. Esta alteração é sugestiva de uma característica de pacientes esquizofrênicos, que é a diminuição do metabolismo da glicose no lobo frontal, conhecida como “hipofrontalidade” (Weinberger e Berman, 1988). Postula-se que a perda da atividade nesta estrutura cerebral (figura 02) comprometa o controle dos impulsos emocionais e sensoriais que ocorrem no restante do cérebro, predispondo à psicose e aos sintomas negativos (Desco et al., 2003). Além disso, as ratas fêmeas apresentaram aumento da atividade nos complexos II-III e IV no estriado (sob efeito da cetamina), o que pode corresponder, também, a uma alteração presente em pacientes psicóticos tanto crônica quanto agudamente, que é o aumento da atividade nesta estrutura, devido ao excesso de atividade dos receptores de dopamina (Kegeles et al., 2010). Apesar de as alterações no metabolismo energético (em fêmeas) no presente trabalho serem sugestivas de ter semelhança com a esquizofrenia, é importante enfatizar que não é possível provar apenas pelos presentes métodos esta hipótese. Além disso, essas alterações foram predominantes nas fêmeas no presente estudo, o que não é validado pelos estudos em crianças com Esquizofrenia (Weisinger et al., 2013).

As alterações mitocondriais na esquizofrenia levam, em última análise, ao desequilíbrio entre produção e metabolismo de EROS, levando à condição de dano chamada estresse oxidativo (Bitanirwe e Woo, 2011). Portanto avaliamos parâmetros de dano oxidativo (Figuras 23, 24 e 25) com o objetivo de verificar as alterações em longo prazo induzidas pela cetamina, as quais estão bem documentadas em modelos com ratos machos adultos jovens. A permanência das alterações induzidas pela cetamina por um período de vários dias após a última injeção é considerada uma validação deste modelo, uma vez que as alterações bioquímicas nos transtornos psiquiátricos costumam ser duradouras (Chatterjee et al., 2011). Além disso, avaliamos a memória aversiva destes animais (Tabela 3; Figuras 13 e 14), 24 e 48 horas após a última injeção, seguindo esta mesma lógica de que um modelo válido deve induzir alterações duradouras, neste caso, a perda de memória que ocorre em pacientes com vários anos de doença (Torgalsbøen e Rund; 1998). O aumento dos níveis de HNE (figura 23) é um indicativo de peroxidação lipídica, um dos parâmetros de detecção do estresse oxidativo, ou seja, um aumento da produção de radicais livres sem compensação adequada das defesas antioxidantes (Bitanirwe e Woo; 2011). No presente estudo, as doses de 25 e 50mg/kg induziram aumento do HNE em machos e fêmeas, sendo que, em fêmeas, também a dose de 15mg/kg induziu aumento, no hipocampo e no estriado. Ainda no estriado, as fêmeas tiveram aumento dos níveis de 8-ISSO com as doses de 15, 25 e 50mg/kg, e uma queda com 5mg/kg. O 8-ISSO é proveniente da degradação da membrana lipídica das células e, além disso, tem ação ele próprio no aumento da atividade inflamatória (Morrow et al., 1990). O aumento do HNE e do 8-ISSO no estriado de ratos machos e fêmeas neste estudo sugere que a cetamina, administrada cronicamente, é capaz de induzir não apenas dano oxidativo, mas um estado de inflamação crônica no SNC, semelhante ao que ocorre na Esquizofrenia (Nagai et al., 2011; Brown, 2011). Não houve alterações significativas devido à cetamina nos níveis de glutatona total (figura 25) sugerindo que a cetamina não interfere de forma importante neste importante sistema antioxidante. Encontramos, no entanto, diferença entre os animais controles no estriado, sendo que as fêmeas têm inerentemente menores níveis de glutatona que os machos nesta estrutura.

Além disso, no presente estudo as ratas prepúberes tiveram aumento do HNE e do 8-ISSO com a dose de 15mg/kg, a qual, em ratos machos adultos, tem efeito antidepressivo (Réus et al., 2015). Este resultado é

mais um indício de que a cetamina em baixas doses, como antidepressivo, tem efeitos diferentes entre os sexos, devendo-se ter cuidado em futuros experimentos tanto em animais como em humanos, documentando-se as alterações em indivíduos de ambos os sexos (Carrier e Kabbaj, 2013).

A relação entre estresse oxidativo e esquizofrenia é bem estabelecida (Bitanhirwe e Woo, 2011)., mas faltam estudos correlacionando o dano oxidativo com outros fatores, entre os quais o gênero. Um estudo mostrou que o dano oxidativo em pacientes esquizofrênicos este maior em pacientes habitantes de áreas urbanas e rurais, porém não encontrou diferenças significativas entre os gêneros (Reyazuddin et al., 2014). Ainda quanto à Esquizofrenia na Infância, os poucos estudos existentes sugerem que as alterações orgânicas têm gravidade semelhante entre meninos e meninas (Weinsinger et al., 2013). Embora o estresse oxidativo possa ocorrer em níveis semelhantes entre os gêneros, é possível que os mecanismos de proteção sejam diferentes, pois os efeitos das diferenças hormonais iniciam desde a gestação. Nossos resultados, tendo sido obtidos em animais antes da puberdade, evidenciam que há diferenças entre os gêneros nos efeitos pró-oxidantes da cetamina.

O presente trabalho encontrou importantes diferenças entre os gêneros, tanto nas alterações comportamentais quanto bioquímicas. É importante enfatizar que os achados sobre a maior vulnerabilidade do gênero feminino aos efeitos da cetamina em si já estão amplamente corroborados por pesquisas em humanos e animais (Carrier e Kabbaj, 2013; Chen et al., 2014), porém esta diferença não existe na mesma proporção entre crianças com Esquizofrenia (Weinsinger et al., 2013). Segundo os resultados de Ordóñez et al. (2016), as poucas diferenças encontradas na amostra do seu estudo refletiriam apenas as diferenças encontradas entre meninos e meninas na população geral. Ainda assim, há estudos apontando diferenças de gênero entre crianças e adolescentes com risco para Esquizofrenia (Gutt et al., 2008). Os presentes resultados lançam, então, uma importante questão: é possível que eles estejam apontando para uma possível vulnerabilidade de meninas à esquizofrenia na infância, que ainda não foi percebida nos estudos clínicos, com pacientes e com populações vulneráveis. Alternativamente, é possível que os nossos resultados apontem, na verdade, para uma falha no modelo da cetamina como indutor de esquizofrenia, e que, em crianças com risco de esquizofrenia, outros fatores além da hipofunção do receptor NMDA sejam mais relevantes (figura 1). Estes fatores, então, levariam a uma incidência e a um quadro



fisiopatológico semelhante entre os sexos nesta faixa etária.

Além disso, o presente trabalho corrobora com estudos em ratos, mostrando que a dose antidepressiva é menor em ratas fêmeas que em ratos machos (Franceschelli et al., 2015). O presente estudo concorda com os achados anteriores em animais e humanos mostrando que há diferença entre os sexos na distribuição dos receptores NMDA cerebrais (Gray et al., 2015). Essas diferenças podem estar envolvidas na maior predisposição às mulheres à depressão, mas também à maior sensibilidade aos antagonistas NMDA.

As diferenças nas alterações comportamentais e bioquímicas do presente modelo indicam que, em futuros estudos, tornar-se-á mandatório utilizar machos e fêmeas, pois o uso apenas de animais machos certamente traria um resultado diferente do que o ocorre, de fato, na fisiopatologia da Esquizofrenia em crianças, a qual atinge de forma numericamente semelhante a ambos os sexos.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo visou avaliar a validade de face e de constructo para um modelo animal de esquizofrenia na infância, em ratos e ratas Wistar prepúberes, com a administração de cetamina entre 23 e 30 dias de idade, nas doses de 5mg/kg, 15mg/kg, 25mg/kg e 50mg/kg.

Todas as doses alteraram o metabolismo energético em machos e fêmeas. As doses de cetamina 5mg/kg e 15mg/kg produziram alterações comportamentais e estresse oxidativo em fêmeas, mas não em machos.

As doses 5mg/kg e 15mg/kg demonstraram efeito antidepressivo em estudos anteriores com ratos machos adultos, logo, os presentes resultados terão relevância em futuros estudos em ratos Wistar prepúberes sobre os efeitos antidepressivos da cetamina.

As doses de 25mg/kg e 50mg/kg de cetamina produziram alterações semelhantes à esquizofrenia em ratos Wistar prepúberes machos e fêmeas, portanto, as mesmas poderão ser utilizadas em futuros estudos com modelos animais de esquizofrenia na infância.

## REFERÊNCIAS

- 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.
- Akhondzadeh S, Nejatisafa AA, Amini H, Mohammadi MR, Larijani B, Kashani L, Raisi F, Kamalipour A. Adjunctive estrogen treatment in women with chronic schizophrenia: a double-blind, randomized, and placebo-controlled trial. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003; 27(6):1007-12.
- 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. [artigo em russo, abstract em inglês].
- 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.
- Amr MA, Shams T, Al-Wadani H. Does haloperidol prophylaxis reduce ketamine- induced emergence delirium in children? *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2013; 13(2):256-62.
- APA. American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th Edition)*. Arlington, VA: American Psychitric Publishing.
- Avila-Martin G, Galan-Arriero I, Ferrer-Donato A, Busquets X, Gomez-Soriano J, Escribá PV, Taylor J. Oral 2-hydroxyoleic acid inhibits reflex hypersensitivity and open-field-induced anxiety after spared nerve injury. *Eur J Pain*. 2015 Jan;19(1):111-22.
- 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.
- Bagdy G, Juhasz G. Biomarkers for personalised treatment in psychiatric diseases. *Expert Opin Med Diagn*. 2013; 7(5):417-22.
- Bakalar JL, Greenstein DK, Clasen L, Tossell JW, Miller R, Evans AC, Mattai AA, Rapoport JL, Gogtay N. General absence of abnormal cortical asymmetry in childhood-onset schizophrenia: a longitudinal study. *Schizophr Res*. 2009;115(1):12-6.

- Bailly D, de Chouly de Lenclave MB. [A rare and not very studied disorder: childhood-onset schizophrenia. A case report]. *Encephale*. 2004; 30(6):540-7.
- Bal VH, Kim SH, Cheong D, Lord C. Daily living skills in individuals with autism spectrum disorder from 2 to 21 years of age. *Autism*. 2015; 19(7):774-84.
- Bartlett J. Childhood-onset schizophrenia: what do we really know? *Health Psychol Behav Med*. 2014; 2(1):735-747.
- Baumeister AA. The chlorpromazine enigma. *Hist Neurosci*. 2013; 22(1):14-29.
- Begemann MJ, Dekker CF, van Lunenburg M, Sommer IE. Estrogen augmentation in schizophrenia: a quantitative review of current evidence. *Schizophr Res*. 2012; 141(2-3):179-84.
- Ben-Shachar, D., Laifenfeld, D. Mitochondria, synaptic plasticity, and schizophrenia. *Int. Rev. Neurobiol*. 2004; 59 273-296.
- 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: A FDG-PET study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007; 31(4):807-13.
- Bevilaqua LR, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an IA task. *Eur J Neurosci*. 2003;17(4):897-902.
- Bitanhirwe BK, Woo TU. Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011; 35(3):878-93.
- Blumensohn R, Yoran-Hegesh R, Golubchik P, Mester R, Fluhr H, Hermesh H, Weizman A. Elevated serum creatine kinase activity in adolescent psychiatric inpatients on admission. *Int Clin Psychopharmacol*. 1998; 13(6):269-72.
- Bora E. Neurodevelopmental origin of cognitive impairment in schizophrenia. *Psychol Med*. 2015;45(1):1-9.
- Borella, CMV, Seeman MV, Cordeiro CR, Vieira dos Santo J, Souza RMM, Fernandes NSE, Santos Monte AS, Vasconcelos SMM, Quinn JP, de Lucena DF, Carvalho AF, Macêdo D. Gender and estrous cycle influences on behavioral and neurochemical alterations in adult rats neonatally administered ketamine. *Dev Neurobiol*. 2016;76(5):519-32.
- Brinton RD. Estrogen regulation of glucose metabolism and mitochondrial function: therapeutic implications for prevention of Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008; 60(13-14):1504-11.
- Brown AS. The environment and susceptibility to schizophrenia. *Prog Neurobiol*. 2011; 93(1):23-58.

- Brown JA, Ramikie TS, Schmidt MJ, Báldi R, Garbett K, Everheart MG, Warren LE, Gellért L, Horváth S, Patel S, Mirnics K. Inhibition of parvalbumin-expressing interneurons results in complex behavioral changes. *Mol Psychiatry*. 2015; 20(12):1499-507.
- Bubber P, Hartounian V, Gibson GE, Blass JP. Abnormalities in the tricarboxylic acid (TCA) cycle in the brains of schizophrenia patients. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2011; 21(3):254-60.
- Burbaeva GSh, Savushkina OK, Boksha IS. Creatine kinase BB in brain in schizophrenia. *World J Biol Psychiatry*. 2003; 4(4):177-83.
- Butler PD, Susser ES, Brown AS, Kaufmann CA, Gorman JM. Prenatal nutritional deprivation as a risk factor in schizophrenia: preclinical evidence *Neuropsychopharmacology*. 1994; 11(4):227-35.
- 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
- Carrier N, Kabbaj M. Sex differences in the antidepressant-like effects of ketamine. *Neuropharmacology*. 2013; 70:27-34.
- Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. 1996 ;328(2):309-16.
- Cavalier L, Jazin EE, Erikson 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.
- Chatterjee M, Ganguly S, Srivastava M, Palit G. Effect of 'chronic' versus 'acute' cetaminaamine administration and its 'withdrawal' effect on behavioural alterations in mice: implications for experimental psychosis. *Behav Brain Res*. 2011; 216(1):247-54.
- Chen WY, Huang MC, Lin SK. Gender differences in subjective discontinuation symptoms associated with ketamine use. *Subst Abuse Treat Prev Policy*. 2014; 9:39.
- Cohen R, Lysenko A, Mallet T, Mirrer B, Gale M, Loarte P, McCue R. A Case of Clozapine-Induced Myocarditis in a Young Patient with Bipolar Disorder. *Case Rep Cardiol*. 2015; 2015:283156.

- Craddock N, Owen MJ. The kraepelinian dichotomy - going, going... But still not gone. *Br J Psychiatry* . 2010; 196:92-5.
- Damborsky JC, Winzer-Serhan UH. Effects of sex and chronic neonatal nicotine treatment on  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  co-transporter 1,  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  co-transporter 2, brain-derived neurotrophic factor, NMDA receptor subunit 2A and NMDA receptor subunit 2B mRNA expression in the postnatal rat hippocampus. *Neuroscience*. 2012; 225:105-17.
- David HP. Born unwanted, 35 years later: the Prague study. *Reprod Health Matters*. 2006; 14(27):181-90.
- De Zeeuw P, Schnack HG, van Belle J, Weusten J, van Dijk S, Langen M, Brouwer RM, van Engeland H, Durston S. Differential brain development with low and high IQ in attention-deficit/hyperactivity disorder. *PLoS One*. 2012; 7(4):e35770.
- De Oliveira L1, 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 Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009; 33(6):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 cetaminaamine. *Metab Brain Dis*. 2011; 26(1):69-77.
- Demarest TG, McCarthy MM. Sex differences in mitochondrial (dys)function: Implications for neuroprotection. *J Bioenerg Biomembr*. 2015; 47(1-2):173-88.
- Desco M, Gispert JD, Reig S, Sanz J, Pascau J, Sarramea F, Benito C, Santos A, Palomo T, Molina V. Cerebral metabolic patterns in chronic and recent-onset schizophrenia. *Psychiatry Res*. 2003; 122(2):125-35.
- Dieleman S, van der Veen F, van Beveren N, Röder C. Preserved emotional memory modulation in first episode psychosis. *Psychiatry Res*. 2015; 226(1):301-7.
- Dietrich-Muszalska A, Kontek B. Lipid peroxidation in patients with schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2010; 64(5): 469-75.
- Donoghue AC, Roback MG, Cullen KR. Remission From Behavioral Dysregulation in a Child With PTSD After Receiving Procedural Ketamine. *Pediatrics*. 2015;136(3):e694-6.
- Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem*. 2000; 267(16):4912-6.
- 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(9):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 <sup>31</sup>P magnetization transfer spectroscopy. *JAMA Psychiatry*. 2014; 71(1):19-27.
- Dunlop J, Brandon NJ. Schizophrenia drug discovery and development in an evolving era: are new drug targets fulfilling expectations? *J Psychopharmacol*. 2015; 29(2):230-8
- Eggers C, Bunk D. The long-term course of childhood-onset schizophrenia: a 42-year follow up. *Schizophr Bull*. 1997; 23(1):105-17.
- Eggers C, Bunk D, Volberg G, Röpcke B. The ESSEN study of childhood-onset schizophrenia: selected results. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 1999; 8 Suppl 1:121-8.
- Eggers C, Bunk D, Krause D. Schizophrenia with onset before the age of eleven: clinical characteristics of onset and course. *J Autism Dev Disord*. 2000; 30(1):29-38.
- Ellenbroek BA, Derks N, Park HJ. Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats. *Stress*. 2005; 8(4):247-57.
- Farber NB, Wozniak DF, Price MT, Labruyere J, Huss J, St Peter H, Olney JW. Age-specific neurotoxicity in the rat associated with NMDA receptor blockade: potential relevance to schizophrenia? *Biol Psychiatry*. 1995; 38(12):788-96.
- Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta*. 1985; 153(1):23-36.
- Franceschelli A, Sens J, Herchick S, Thelen C, Pitychoutis PM. Sex differences in the rapid and the sustained antidepressant-like effects of cetaminaamine in stress-naïve and "depressed" mice exposed to chronic mild stress. *Neuroscience*. 2015; 290:49-60.
- Frazier JA, Alagband-Rad J, Jacobsen L, Lenane MC, Hamburger S, Albus K, Smith A, McKenna K, Rapoport JL. Pubertal development and onset of psychosis in childhood onset schizophrenia. *Psychiatry Res*. 1997; 70(1):1-7
- Freitas TP, Rezin GT, Gonçalves CL, Jeremias GC, Gomes LM, Scaini G, Teodorak BP, Valvassori SS, Quevedo J, Streck EL. Evaluation of citrate synthase activity in brain of rats submitted to an animal model of mania induced by ouabain. *Mol Cell Biochem*. 2010; 341(1-2):245-9.

- Garcia LS, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Stertz L, Kapczinski F, Gavioli EC, Quevedo J. Cetaminaamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009; 30;33(3):450-5.
- Garcia D, Anckarsäter H, Lundström S. Self-directedness and cooperativeness, psychosocial dysfunction and suffering in ESSENCE. *Scientific World Journal*. 2013; 2013:416981.
- Goldstein JM, Cherkerzian S, Tsuang MT, Petryshen TL. Sex differences in the genetic risk for schizophrenia: history of the evidence for sex-specific and sex-dependent effects. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2013; 162B(7):698-710.
- Golembo-Smith S, Schiffman J, Kline E, Sørensen HJ, Mortensen EL, Stapleton L, Hayashi K, Michelsen NM, Ekstrøm M, Mednick S. Premorbid multivariate markers of neurodevelopmental instability in the prediction of adult schizophrenia-spectrum disorder: a high-risk prospective investigation. *Schizophr Res*. 2012 ;139(1-3):129-35.
- Gogos A, Kwek P, van den Buuse M. The role of estrogen and testosterone in female rats in behavioral models of relevance to schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012; 219(1):213-24.
- Gomes E, Rotta NT, Pedroso FS, Sleifer P, Danesi MC. Auditory hypersensitivity in children and teenagers with autistic spectrum disorder. *Arq Neuropsiquiatr*. 2004; 62(3B):797-801.
- Guevara R, Gianotti M, Oliver J, Roca P. Age and sex-related changes in rat brain mitochondrial oxidative status. *Exp Gerontol*. 2011 Nov; 46(11):923-8.
- Gaignard P, Savouroux S, Liere P, Pianos A, Thérond P, Schumacher M, Slama A, Guennoun R. Effect of Sex Differences on Brain Mitochondrial Function and Its Suppression by Ovariectomy and in Aged Mice. *Endocrinology*. 2015; 156(8):2893-904.
- Gunawardana L, Smith GD, Zammit S, Whitley E, Gunnell D, Lewis S, Rasmussen F. Pre-conception inter-pregnancy interval and risk of schizophrenia. *Br J Psychiatry*. 2011; 199: 338-9.
- Gutt EK, Petresco S, Krelling R, Busatto GF, Bordin IA, Lotufo-Neto F. Gender differences in aggressiveness in children and adolescents at risk for schizophrenia. *Rev Bras Psiquiatr*. 2008; 30(2):110-7.
- Häfner H. Gender differences in schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology*. 2003; 2:17-54.
- Haney-Caron E, Caprihan A, Stevens MC. DTI-measured white matter abnormalities in adolescents with Conduct Disorder. *J Psychiatr Res*. 2014; 48(1):111-20.



- Henquet C, Murray R, Linszen D, van Os J. The environment and schizophrenia: the role of cannabis use. *Schizophr Bull.* 2005; 31(3):608-12.
- Hermesh H, Stein D, Manor I, Shechtman T, Blumensohn R, Meged S, Shiloh R, Benjamini Y, Weizman A. Serum creatine kinase levels in untreated hospitalized adolescents during acute psychosis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2002; 41(9):1045-53.
- Hines M, Constantinescu M, Spencer D. Early androgen exposure and human gender development. *Biol Sex Differ.* 2015; 26;6:3.
- Hodgins S, Tiihonen J, Ross D. The consequences of Conduct Disorder for males who develop schizophrenia: associations with criminality, aggressive behavior, substance use, and psychiatric services. *Schizophr Res.* 2005; 78(2-3):323-35.
- Hughes JAM, Hanna MG. Mitochondrial encephalomyopathies: the enigma of genotype versus phenotype. *Biochem Biophys Acta.* 1999; 1410 : 125-45.
- Heckers S, Konradi C. GABAergic mechanisms of hippocampal hyperactivity in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2015; 167(1-3):4-11.
- Hsu HK, Yang RC, Shih HC, Hsieh YL, Chen UY, Hsu C. Prenatal exposure of testosterone prevents SDN-POA neurons of postnatal male rats from apoptosis through NMDA receptor. *J Neurophysiol.* 2001;86(5):2374-80.
- Ip, J, Uetrecht JP. In vitro and animal models of drug-induced blood dyscrasias. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2006; 21:135-40.
- Izquierdo I, Izquierdo LA, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Quevedo J, Rodrigues C, Sant'Anna MK, Madruga M, Medina Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. *BehavPharmacol.* 1998;9(5-6):421-7.
- Jeong SH, Choi KS, Lee KY, Kim EJ, Kim YS, Joo EJ. Association between the dopamine transporter gene (DAT1) and attention deficit hyperactivity disorder-related traits in healthy adults. *Psychiatr Genet.* 2015; 25(3):119-26.
- Jones CA, Watson DJ, Fone KC. Animal models of schizophrenia. *Br J Pharmacol.* 2011; 164(4):1162-94.
- Junghöfer M, Bröckelmann AK, Küppers K, Ohrmann P, Pedersen A. Abnormal, affect-specific modulatory effects on early auditory processing in schizophrenia: magnetoencephalographic evidence. *Schizophr Res.* 2015; 161(2-3):308-13.

Kegeles LS, Abi-Dargham A, Frankle WG, Gil R, Cooper TB, Slifstein M, Hwang DR, Huang Y, Haber SN, Laruelle M. Increased synaptic dopamine function in associative regions of the striatum in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2010; 67(3):231-9.

Keshavan MS, Nasrallah HA, Tandon R. Moving Ahead with the Schizophrenia Concept: From the Elephant to the Mouse. *Schizophr Res*. 127(1-3): 3–13.

Kekesi G, Petrovszki Z, Benedek G, Horvath G. Sex-specific alterations in behavioral and cognitive functions in a "three hit" animal model of schizophrenia. *Behav Brain Res*. 2015;284:85-93.

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

Kim DW, Shim M, Song MJ, Im CH, Lee SH. Early visual processing deficits in patients with schizophrenia during spatial frequency-dependent facial affect processing. *Schizophr Res*. 2015; 161(2-3):314-21.

Kokras N, Dalla C. Sex differences in animal models of psychiatric disorders. *Br J Pharmacol*. 2014; 171(20):4595-619.

Kordi-Tamandani DM, Mojahed A, Sahranavard R, Najafi M. Association of glutathione s-transferase gene methylation with risk of schizophrenia in an Iranian population. *Pharmacology*. 2014; 94(3-4):179-82.

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

Lapiz MD, Mateo Y, Parker T, Marsden C. Effects of noradrenaline depletion in the brain on response on novelty in isolation-reared rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000 ;152(3):312-20.

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

Lehmann HE, Ban TA. The History of the Psychopharmacology of Schizophrenia. *J Psychiatry* 1997; 42:152–62.

Lin YJ, Lo KW, Yang LK, Gau SS. Validation of DSM-5 age-of-onset criterion of attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) in adults: Comparison of life quality, functional impairment, and family function. *Res Dev Disabil*. 2015; 47:48-60.

- Lombardo MV, Ashwin E, Auyeung B, Chakrabarti B, Taylor K, Haccetaminat G, Bullmore ET, Baron-Cohen S. Fetal testosterone influences sexually dimorphic gray matter in the human brain. *J Neurosci*. 2012; 32(2):674-80.
- Lyubarev AE, Kurganov BI. Supramolecular organization of tricarboxylic acid cycle enzymes. *Biosystems*. 1989; 22(2):91-102.
- Malhotra AK, Pinals DA, Weingartner H, Sirocco K, Missar CD, Pickar D, Breier A. NMDA receptor function and human cognition: the effects of ketamine in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology*. 1996; 14(5):301-7.
- Masi G, Milone A, Viglione V, Mancini A, Pisano S. Massive asymptomatic creatine kinase elevation in youth during antipsychotic drug treatment: case reports and critical review of the literature. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2014; 24(10):536-42.
- Matsuo J, Ota M, Hori H, Hidese S, Teraishi T, Ishida I, Hiraishi M, Kunugi H. A large single ethnicity study of prepulse inhibition in schizophrenia: Separate analysis by sex focusing on effect of symptoms. *J Psychiatr Res*. 2016; 82:155-62.
- Maydell RJ, van der Walt C, Roos JL, Scribante L, Ladikos A. Clinical characteristics and premorbid variables in childhood-onset schizophrenia: a descriptive study of twelve cases from a schizophrenia founder population. *Afr J Psychiatry (Johannesbg)*. 2009; 12(2):144-8.
- Mazaeva NA, Shmakova OP, Andreeva OO. [The follow-up study of childhood-onset schizophrenia: clinical and social aspects]. [Artigo em Russo, abstract em Inglês] *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2012; 112(7):20-7.
- McGrath J, Saha S, Chant D, Welham J. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev*. 2008; 30:67-76.
- Morrow JD, Harris TM, Roberts LJ. Non-cyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal Biochem*. 1990; 184(1):1-10.
- Nagai T, Kitahara Y, Ibi D, Nabeshima T, Sawa A, Yamada K. Effects of antipsychotics on the behavioral deficits in human dominant-negative DISC1 transgenic mice with neonatal polyI:C treatment. *Behav Brain Res*. 2011; 225(1):305-10.
- NICE-National Collaborating Centre for Mental Health (UK). *Psychosis and Schizophrenia in Children and Young People: Recognition and Management*. National Collaborating Centre for Mental Health (UK). Leicester (UK): British Psychological Society; 2013.

- Nice R, Rapoport JL. Childhood-onset schizophrenia: rare but worth studying. *Biol Psychiatry*. 1999; 46(10):1418-28.
- Niesink RJ, Van Ree JM. Involvement of opioid and dopaminergic systems in isolation-induced pinning and social grooming of young rats. *Neuropharmacology*. 1989;28(4):411-8.
- Nisijima K. Elevated creatine kinase does not necessarily correspond temporally with onset of muscle rigidity in neuroleptic malignant syndrome: a report of two cases. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2012; 8:615-8.
- O'Donnell P. Adolescent Onset of Cortical Disinhibition in Schizophrenia: Insights From Animal Models. *Schizophr Bull*. 37(3): 484–92.
- O'Neill J, Levitt J, Caplan R, Asarnow R, McCracken JT, Toga AW, Alger JR. 1H MRSI evidence of metabolic abnormalities in childhood-onset schizophrenia. *Neuroimage*. 2004; 21(4):1781-9.
- Ordóñez AE, Loeb FF, Zhou X, Shora L, Berman RA, Broadnax DD, Gochman P, Liu S, Rapoport JL. Lack of Gender-Related Differences in Childhood-Onset Schizophrenia. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2016; 55(9):792-9.
- Palmer BA, Pankratz VS, Bostwick JM. The lifetime risk of suicide in schizophrenia: a reexamination. *Arch Gen Psychiatry*. 2005; 62 (3): 247-53.
- Penzes P, Cahill ME, Jones KA, Van Leeuwen J-E, Woolfrey KM. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature neuroscience* 2011; 14(3):285-93.
- Piontkewitz Y, Assaf Y, Weiner I. Clozapine administration in adolescence prevents postpubertal emergence of brain structural pathology in an animal model of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2009; 66(11):1038-46.
- Plaze M, Paillère-Martinot ML, Penttilä J, Januel D, de Beaurepaire R, Bellivier F, Andoh J, Galinowski A, Gallarda T, Artiges E, Olié JP, Mangin JF, Martinot JL, Cachia A. "Where do auditory hallucinations come from?" - a brain morphometry study of schizophrenia patients with inner or outer space hallucinations. *Schizophrenia Bulletin*. 2011; 37(1):212-21.
- 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.
- Prestia A, Cavedo E, Boccardi M, Muscio C, Adorni A, Geroldi C, Bonetti M, Thompson PM, Frisoni GB. Hippocampal and amygdalar local structural differences in elderly patients with schizophrenia. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2015; 23(1):47-58.
- Quevedo J, Moretto A, Colvero M, Roesler R, Ferreira MB. The N-methyl-D-aspartate receptor blocker MK-801 prevents the facilitatory effects of naloxone and epinephrine on retention of IA task in rats. *BehavPharmacol*. 1997;8(5):471-4.
- Ram E, Raphaeli S, Avital A. Prepubertal chronic stress and ketamine administration to rats as a neurodevelopmental model of schizophrenia symptomatology. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013; 16(10):2307-14.
- Réus GZ, Carlessi AS, Titus SE, Abelaira HM, Ignácio ZM, da Luz JR, Matias BI, Bruchchen L, Florentino D, Vieira A, Petronilho F, Quevedo J. A single dose of S-ketamine induces long-term antidepressant effects and decreases oxidative stress in adulthood rats following maternal deprivation. *DevNeurobiol*. 2015; 75(11):1268-81.
- Reyazuddin M, Azmi SA, Islam N, Rizvi A. Oxidative stress and level of antioxidant enzymes in drug-naive schizophrenics. *Indian J Psychiatry*. 2014;56(4):344-9.
- Robertson HR, Feng G. Annual Research Review: Transgenic mouse models of childhood-onset psychiatric disorders. *J Child Psychol Psychiatry*. 2011; 52(4):442-75.
- Röpecke B, Eggers C. Early-onset schizophrenia: a 15-year follow-up. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2005;14(6):341-50.
- Roesler R, Schröder N, Vianna MR, Quevedo J, Bromberg E, Kapczinski F, Ferreira MB. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of Inhibitory Avoidance memory in rats. *Brain Res*. 2003;975(1-2):207-13.
- Rössler W, Salize HJ, van Os J, Riecher-Rössler A. Size of burden of schizophrenia and psychotic disorders. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2005; 15(4):399-409.
- Rustin P, Lebissois J, Chretien D, Bourgeron T, Piechaud JF, Rötig A, Munnich A, Sidi D. Endomyocardial biopsies for early detection of mitochondrial disorders in hypertrophic cardiomyopathies. *J Pediatr*. 1994 ;124(2):224-8.
- Sagar A, Bishop JR, Tessman DC, Guter S, Martin CL, Cook EH. Co-occurrence of autism, childhood psychosis, and intellectual disability associated with a de novo 3q29 microdeletion. *Am J Med Genet A*. 2013; 161A(4):845-9.

- Sakel, M. The methodical use of hypoglycemia in the treatment of psychoses. Reproduced in: *Am J Psychiatry* 1994; 151(6 Suppl): 240-47.
- Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med.* 2013;4(6):624-30.
- Shilling PD, Kinkead B, Murray T, Melendez G, Nemeroff CB, Feifel D. Upregulation of striatal dopamine-2 receptors in Brattleboro rats with prepulse inhibition deficits. *Biol Psychiatry.* 2006;60(11):1278-81.
- Schneider T, Przewlocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacol;* 2005; 30:80-89.
- Shepherd D, Garland PB. The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem J.* 1969 ;114(3):597-610.
- Suttajit S, Srisurapanont M, Xia J, Suttajit S, Maneeton B, Maneeton N. Quetiapine versus typical antipsychotic medications for schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013; 5:CD007815.
- Shields GS, Moons WG, Tewell CA, Yonelinas AP. The effect of negative affect on cognition: Anxiety, not anger, impairs executive function. *Emotion.* 2016; 16(6):792-7.
- 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.
- Tarver J, Daley D, Sayal K. Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): an updated review of the essential facts. *Child Care Health Dev.* 2014; 40(6):762-74.
- Thorncroft G, Tansella M, Becker T, Knapp M, Leese M, Schene A, Vazquez-Barquero JL; EPSILON Study Group. The personal impact of schizophrenia in Europe. *Schizophr Res.* 2004; 69(2-3):125-32.
- Thorup A, Waltoft BL, Pedersen CB, Mortensen PB, Nordentoft M. Young males have a higher risk of developing schizophrenia: a Danish register study. *Psychol Med.* 2007; 37(4):479-84
- Tiffin PA, Kitchen CE. Incidence and 12-month outcome of childhood non-affective psychoses: British national surveillance study. *Br J Psychiatry.* 2015; 206(6):517-8.
- Torgalsbøen AK, Rund BR. "Full recovery" from schizophrenia in the long term: a ten-year follow-up of eight former schizophrenic patients. *Psychiatry.* 1998 Spring;61(1):20-34.

- Turner T. Rich and mad in Victorian England. *Psychol Med.* 1989; 19(1):29-44.
- Valenti D, de Bari L, De Filippis B, Henrion-Caude A, Vacca RA. Mitochondrial dysfunction as a central actor in intellectual disability-related diseases: an overview of Down syndrome, autism, Fragile X and Rett syndrome. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014; 46 2:202-17.
- Veilleux-Lemieux D, Castel A, Carrier D, Beaudry F, Vachon P. Pharmacokinetics of ketamine and xylazine in young and old Sprague-Dawley rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2013;52(5):567-70.
- Wahlbeck K, Cheine M, Essali MA. Clozapine versus typical neuroleptic medication for schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000; (2):CD000059.
- Weisinger B, Greenstein D, Mattai A, Clasen L, Lalonde F, Feldman S, Miller R, Tossell JW, Vyas NS, Stidd R, David C, Gogtay N. Lack of gender influence on cortical and subcortical gray matter development in childhood-onset schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2013; 39(1):52-8.
- Wang Y, Ma Y, Hu J, Cheng W, Jiang H, Zhang X, Li M, Ren J, Li X. Prenatal chronic mild stress induces depression-like behavior and sex-specific changes in regional glutamate receptor expression patterns in adult rats. *Neuroscience.* 2015; 20;301:363-74.
- Weinberger DR, Berman KF. Speculation on the meaning of cerebral metabolic hypofrontality in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 1988; 14(2):157-68.
- Weintraub S, Prinz RJ, Neale JM. Peer evaluations of the competence of children vulnerable to psychopathology. *J Abnorm Child Psychol.* 1978;6(4):461-73.
- Widdowson EM. The response of the sexes to nutritional stress. *Proc Nutr Soc.* 1976; 35(2):175-80.
- Wischhof L, Irrsack E, Osorio C, Koch M. Prenatal LPS-exposure - a neurodevelopmental rat model of schizophrenia - differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2015; 57:17-30.
- WHO. World Health Organization. International classification of diseases and related health problems. 10th revision. Geneva: World Health Organization; 1992.
- World Health Organization (WHO). The global burden of disease: 2004 update. Geneva, 2004. Disponível em [www.who.int](http://www.who.int). Acessado em 26/08/2016.

- Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev.* 2000; 80:1107-213.
- Xu K, Krystal JH, Ning Y, Chen da C, He H, Wang D, Ke X, Zhang X, Ding Y, Liu Y, Gueorguieva R, Wang Z, Limoncelli D, Pietrzak RH, Petrakis IL, Zhang X, Fan N. Preliminary analysis of positive and negative syndrome scale in cetamine-associated psychosis in comparison with schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2015; 61:64-72.
- 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.
- Zhang XY, Chen DC, Tan YL, An HM, Zunta-Soares GB, Huang XF, Soares JC. Glucose disturbances in first-episode drug-naïve schizophrenia: Relationship to psychopathology. *Psychoneuroendocrinology.* 2015; 62:376-80.
- Zhao YY, Li JT, Wang XD, Li YH, Huang RH, Su YA, Si TM. Neonatal MK-801 treatment differentially alters the effect of adolescent or adult MK-801 challenge on locomotion and PPI in male and female rats. *J Psychopharmacol.* 2013;27(9):845-53.
- Ziermans TB, Schothorst PF, Sprong M, Magnée MJ, van Engeland H, Kemner C. Reduced prepulse inhibition as an early vulnerability marker of the psychosis prodrome in adolescence. *Schizophr Res.* 2012;134(1):105.
- Zuckerman KE, Sinche B, Mejia A, Cobian M, Becker T, Nicolaidis C. Latino parents' perspectives on barriers to autism diagnosis. *Acad Pediatr.* 2014; 14(3):301-8.
- Zugno AI, de Miranda IM, Budni J, Volpato AM, Luca RD, Deroza PF, de Oliveira MB, Heylmann AS, da Rosa Silveira F, Wessler P, Antunes Mastella G, Cipriano AL, Quevedo J. Effect of maternal deprivation on acetylcholinesterase activity and behavioral changes on the ketamine-induced animal model of schizophrenia. *Neuroscience.* 2013; 248:252-60.
- Zugno AI, Matos MP, Canevar L, Fraga DB, De Luca RD, Ghedim FV, Deroza PF, de Oliveira MB, Pacheco FD, Valvassori SS, Volpato AM, Budni J, Quevedo J. Evaluation of acetylcholinesterase activity and behavioural alterations induced by ketamine in an animal model of schizophrenia. *Acta Neuropsychiatr.* 2014a;26(1):43-50.
- 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*. 2014b;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 (4):1043-53.

## ANEXO A – APROVAÇÕES DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



**Universidade do Extremo Sul Catarinense**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais**

### **CERTIFICADO**

*Certificamos que o projeto intitulado “Modelo animal de esquizofrenia na infância em Ratas Wistar, com cetamina: parâmetros comportamentais e bioquímicos”, Protocolo nº 052/2015-2 sob a responsabilidade de Alexandra Zugno, equipe: Josiane Budni, Patrícia Fernanda Schuck, Samira Valvassori e Vanessa Moraes de Andrade, Lara Canever, Felipe Damázio Pacheco, Alexandra Stephanie Almeida Heylmann, Gustavo Mastella e Louyse Sulzbach Damázio, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESCO – Universidade do Extremo Sul Catarinense.*

Vigência do Projeto	15/03/2016 a 15/12/2016
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico Wistar
Nº. De animais	120
Peso/Idade	80 a 130g / 23 dias
Sexo	M/F
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESCO

*The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:*

**Protocol number: 052/2015-2**

**Principal Investigator:** Josiane Budni

**Researchers:** Josiane Budni, Patrícia Fernanda Schuck, Samira Valvassori e Vanessa Moraes de Andrade, Lara Canever, Felipe Damázio Pacheco, Alexandra Stephanie Almeida Heylmann, Gustavo Mastella e Louyse Sulzbach Damázio.

**Project title:** “An animal model of childhood onset schizophrenia in female Wistar rats, with ketamine: behavioral and biochemical parameters”.

*The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).*

Criciúma, 03 de dezembro de 2015.

  
**JAIRO JOSÉ ZOCHE**  
 Coordenador da CEUA



**Universidade do Extremo Sul Catarinense  
Comissão de Ética no Uso de Animais**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado **“Modelo animal de esquizofrenia na infância em Ratos Wistar machos e fêmeas, com cetamina: parâmetros comportamentais e bioquímicos”** **Protocolo nº 008/2015-2** sob a responsabilidade de **Alexandra Ioppi Zugno** e equipe: Josiane Budni, Patrícia Fernanda Schuck, Samira Valvassori, Vanessa Moraes de Andrade, Lara Canever, Felipe Damázio Pacheco, Alexandra Stephanie Almeida Heylmann, Gustavo Mastella, Louyse Sulzbach Damázio, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense, em reunião de: 11/08/2015.

Vigência do Projeto	30/08/2015 à 15/12/2016
Espécie/linhagem	Rattus norvegicus (Wistar)
Nº. De animais	120
Peso/Idade	80 a 130 g / 23 dias
Sexo	M
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

**Protocol number: 008/2015-2**


**Principal Investigator:** Alexandra Ioppi Zugno

**Researchers:** Josiane Budni, Patrícia Fernanda Schuck, Samira Valvassori, Vanessa Moraes de Andrade, Lara Canever, Felipe Damázio Pacheco, Alexandra Stephanie Almeida Heylmann, Gustavo Mastella, Louyse Sulzbach Damázio

**Project title: An animal model of childhood onset schizophrenia in male Wistar rats males and females, with ketamine: behavioral and biochemical parameters**

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma, 12 de agosto de 2015.

  
**JAIRO JOSÉ ZOCHE**  
 Coordenador da CEUA