

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

LARA CANEVER

**ÁCIDO FÓLICO MATERNO COMO FATOR PROTETOR
PARA O DESENVOLVIMENTO DE ESQUIZOFRENIA NA
PROLE ADULTA DE RATAS WISTAR**

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

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra
Ioppi Zugno

CRICIÚMA, 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C221a Canever, Lara.

Ácido fólico materno como fator protetor para o desenvolvimento de esquizofrenia na prole adulta de ratas wistar / Lara Canever. – 2017.

153 p. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2017.

Orientação: Alexandra Loppi Zugno.

1. Ácido fólico – Efeitos colaterais. 2. Nutrição na gestação. 3. Suplementação de folato na gestação. 4. Cetamina. 5. Esquizofrenia. I. Título.

CDD. 22ª ed. 615.1

Folha informativa

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada de forma tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratórios de Neurociências (Neurolab) e de Neurotoxicologia (Neurotox), ambos vinculados ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense.

A minha mãe Artília e irmã Leila, verdadeiras amigas, grandes incentivadoras e apoiadoras em todos os momentos da minha vida. Vocês são meu bem maior. Juntas somos três corações em um. Obrigada por tudo! Amo-as infinitamente!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, criador de tudo. Obrigada por mais uma etapa! Sei que tudo acontece no seu tempo e conforme a sua vontade, então que assim seja. Amém!

Ao meu esposo Diego, companheiro de todos os dias, confiante de tantos desabafos e parceiro dos meus melhores momentos. Obrigada por sua paciência e compreensão quando estive ausente e distante, pelo seu amor incondicional, sua dedicação e por me fazer feliz a cada dia. Temos um ao outro e, por isso, somos mais fortes e felizes. Te amo “Di”!

Aos meus pais, Antônio e Artília, por não medirem esforços para ajudar e fazer o melhor por mim e meus irmãos, Leila e Jader. Obrigada por abdicarem muitas vezes dos seus sonhos para que pudessem realizar os nossos sonhos. Minha eterna gratidão. Amo-os!

Em especial, à minha mãe! Obrigada “mamys” por ser meu alicerce nos piores ou melhores momentos e por estar sempre de braços abertos para me receber, acariciar, aconselhar, enxugar minhas lágrimas e me fazer sorrir novamente. Sou o que sou porque tive e tenho seus exemplos, ensinamentos, sua presença e os valores. Te amo além do infinito!

A melhor e mais maravilhosa irmã “do mundo”, a “minha” Leila. Obrigada pela presença constante em minha vida. Apesar de distantes fisicamente, sei que estamos mais próximas do que nunca: estás “aqui” em mim e eu estou “ai” em você, por isso permanecemos unidas eternamente. Obrigada por toda preocupação e dedicação para comigo, pelo incentivo e apoio em todos os momentos, pelas palavras sábias e orientações constantes e por ser minha confidente e verdadeira amiga. Como sempre digo, você foi o melhor presente que nossos pais me permitiram ter na vida. Amo-te infinitamente mana!

Ao meu irmão e cunhada Angela e aos meus cunhados Xande e Pri. Obrigada por me permitirem viver umas das melhores experiências da minha vida a partir de 2015: ser madrinha, “dinda”. Sou imensamente feliz por ter suas preciosas filhas, Alice e Laura, como minhas afilhadas e amo-as de todo meu coração. Nossas meninas! Obrigada queridos (as) por compartilharmos tantos momentos bons juntos e por sermos uma família.

À eterna tia e madrinha IVA que “partiu” em 2016. Por sua preocupação constante, seu incentivo, carinho e ajuda quando precisei. Obrigada. Te amarei para sempre, saudade!

A professora Dr^a Alexandra I. Zugno, minha orientadora “Cuca”, pela confiança e oportunidades de crescimento pessoal e profissional, pelos ensinamentos compartilhados, pelas nossas conversas e por termos vivido momentos bons e difíceis junto. Obrigada “Cuquinha”. Foram 4 anos de convivência constante e fico muito feliz por termos construído uma amizade, muito além da relação aluno e orientador. Sentirei saudade!

Aos participantes do “grupo esquizofrenia”, alunos de graduação ou pós-graduação, bolsistas ou voluntários, não importa. Cada um colaborou de alguma forma para a realização deste trabalho. Agradeço a todos pela parceira durante manhãs, tardes ou finais de semana. Foram tantos momentos: dias de experimentos, seminários; dias de seriedade, outros mais descontraídos; muitas conversas, alguns “estresses”, mas em geral dias gostosos. Obrigada queridos (as): Patricia Wessler, Sullivan Citadin, Luiz Antônio de Lucca, Julia Polla, Alice Nagel, Felipe Pacheco, Kátia Gress, Carolina Michels, Geórgia S. Machado, Isadora Fachim, Sarah Tasso, Amanda Godoi, Isabela Hubbe, Jadne Estrela, Maurício Lopes, Arlindo e, aos demais alunos (as) que ajudaram, mas sem querer, esqueci de mencioná-los.

Em especial, a Louyse Damázio, Gustavo Mastella, Alexandra S. A. Heylmann e Mariana B. de Oliveira, alunos (as) que me acolheram carinhosamente quando cheguei ao “Lab” para o doutorado, me deram todo suporte, apoio nos últimos 4 anos e estiveram ao meu lado sempre. Vocês são uns amores e os levarei eternamente em meu coração. Muito obrigada!

Aos alunos do Laboratório de Neurotoxicologia, Roger B. Varela, Fernanda Gava, Bruna Peterle e, em especial, à professora Samira Valvassori, pela colaboração nos experimentos que fazem parte desta tese e seus ensinamentos sempre que precisei. Obrigada!

À professora Josiane Budni por me amparar enquanto a “Cuca” estava de licença maternidade e por me ouvir quando precisei, além de contribuir com seus ensinamentos;

À companheira amada Amandinha Stercket, parceira da minha primeira viagem internacional, de boas conversas, co-orientadora do meu estágio docente e colaboradora na leitura e correções da minha tese. Muito obrigada por “tudo” amore;

Às parceiras de convívio diário e almoço esporádico do Laboratório de Neurociências: Francielle Mina, Michelle Garcez e Tatiani Bellettini pelo companheirismo, troca de experiências e apoio em tantas situações. Obrigada meninas pelas conversas sérias, risadas e

brincadeiras. Foi muito bom conviver com vocês durante anos. Sentirei saudade.

Às queridas colegas, amigas da UNESC: Gislaine Réus, por seus conhecimentos, ideias, incentivo e oportunidades únicas; Talita Tuon, por me permitir ir além da esquizofrenia, fazendo-me estudar mais e “falar” sobre nutrição e envelhecimento em novas e inesquecíveis experiências; ao Diogo Domingui, pela ajuda na “bendita estatística” da esquiva inibitória; e às meninas, Paula Tonin, Amanda Maciel, Bruna Pescador, Lutiana Simões, Jaqueline Generoso, Ana Carolina Falchetti, Cenita Borges, pelas conversas, risadas, desabafos e troca de ideias e vivências. Muito bom ter convivido com vocês, obrigada!

Aos órgãos de fomento (FAPESC e UNESC) pelo apoio financeiro e também a todos que tornaram este estudo possível e contribuíram de alguma forma. Minha gratidão!

*“Deus está aqui nesse momento.
Sua presença é real em meu viver.
Entregue a sua vida e seus problemas.
Fale com Deus, Ele vai ajudar você.
É Ele o autor da fé, do princípio ao fim.
Em todos teus momentos.
E ainda se vier noites traiçoeiras.
Se a cruz pesada for, Cristo estará contigo.
E o mundo pode até fazer você chorar.
Mas Deus te quer sorrindo”*
Simone Telesforo
(Trecho da música "Noites Traicoeiras")

Resumo

A deficiência materna de ácido fólico (AF) pode comprometer a função e o desenvolvimento do cérebro e contribuir para a susceptibilidade a doenças, como a esquizofrenia, na vida tardia da prole. Diante disso, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de ambas as dietas deficiente e suplementadas com AF em diferentes doses durante a fase gestacional, nos parâmetros comportamentais, marcadores de estresse oxidativo e epigenético na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia. Ratas Wistar foram separadas em grupos maternos para receber dois tipos de ração (dieta) – dieta AIN 93, denominada dieta controle, e dieta deficiente em AF. As ratas expostas à dieta controle foram subdivididas em três grupos para receberem além da ração, a suplementação oral com AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação. Na idade adulta (60 dias), a prole de machos foi agrupada conforme a dieta materna para a indução do modelo de esquizofrenia através da administração de cetamina (25 mg/kg) durante sete dias. Após a última administração, os animais foram submetidos aos testes comportamentais: atividade locomotora (monitor de atividade), interação social (campo aberto), inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto (IPP) e esQUIVA inibitória e, posteriormente, decapitados. As estruturas cerebrais, córtex frontal, hipocampo e estriado, foram dissecadas para análises bioquímicas – marcadores de estresse oxidativo (hidroperóxido de lipídeos: LPO; 4-hidroxinonal: 4-HNE; 8-isoprostano: 8-ISO; conteúdo de grupos carbonila; 3-nitrotirosina: 3-NT; superóxido dismutase: SOD e catalase: CAT) e marcador epigenético (atividade da enzima metiltransferase). Os achados indicam que a cetamina reproduziu o modelo de esquizofrenia, ao induzir hiperlocomoção, comprometimento social, prejuízo no perfil sensorio-motor e danos na memória aversiva dos animais adultos, além de aumentar a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas, bem como a atividade da SOD e CAT, em especial no córtex frontal, diminuindo ainda a atividade da metiltransferase no estriado da prole adulta. A deficiência materna de AF, associada à salina ou cetamina na prole, foi capaz de causar hiperatividade locomotora, déficits na interação social entre os animais e aumentar os níveis de LPO, 4-HNE, 8-ISO e o conteúdo de grupos carbonila no córtex frontal, bem como a atividade das enzimas antioxidantes, em ambas as estruturas cerebrais. Em adição, a dieta deficiente em AF associada à cetamina na prole adulta, foi capaz de reduzir a atividade da metiltransferase no estriado dos animais. O AF suplementado nas mães durante a fase gestacional,

particularmente nas doses mais elevadas (10 e 50 mg/kg), causou um efeito protetor persistente na prole adulta submetida ao modelo de esquizofrenia, ao preservar a função cognitiva e prevenir o dano lipídico e proteico no córtex frontal, contribuindo também para o aumento da atividade da metiltransferase, uma enzima implicada nas reações de metilação do DNA. Estes resultados confirmam a importância da nutrição materna adequada em AF para o bom desenvolvimento do cérebro na vida tardia da prole. Em conjunto, os achados suportam que a deficiência pré-natal de AF pode estar envolvida na fisiopatologia da esquizofrenia, uma vez que a dieta materna deficiente em AF demonstrou um efeito duradouro nos animais adultos, alterando parâmetros bioquímicos cerebrais, o que possivelmente foi capaz de influenciar a saúde mental na prole via alteração comportamental.

Palavras-chave: Ácido fólico; fase gestacional; prole adulta; modelo animal de esquizofrenia; cetamina; parâmetros comportamentais e bioquímicos

Abstract

A deficiency of maternal folic acid (FA) can compromise the function and development of the brain, and may produce a susceptibility to diseases such as schizophrenia (SZ) in the later life of offspring. Based on this, the aim of this study was to evaluate the effects of both FA deficient and FA supplemented diets at different doses (5, 10 and 50 mg/kg) during the gestational phase on behavioural parameters, the markers of oxidative stress and epigenetic in adult offspring which had been subjected to an animal model of SZ. Wistar rats were separated into five maternal groups, which began receiving a special diet (food) consisting of the AIN-93 diet, also called control diet, or an FA deficient diet. Female rats in the control diet group were further subdivided into three groups to receive supplementation with FA (5, 10 and 50 mg/kg) during the periods of pregnancy and lactation. In adulthood (60 days), male offspring were grouped according to maternal diet for induction of the animal model of SZ through the administration of ketamine (25 mg/kg) during seven days. After the last administration of the drug, the animals were subjected to the behavioral tests: locomotor activity (activity monitor); social interaction (open field); pre-pulse inhibition of the startle reflex (PPI); inhibitory avoidance and were then euthanized. The brain structures, frontal cortex, hippocampus and striatum were dissected for biochemical analysis: parameters of oxidative stress (lipid hydroperoxide: LPO; 4-hydroxynonenal: 4-HNE; 8-isoprostane: 8-ISO; groups carbonyl content; 3-nitrotyrosine: 3-NT; superoxide dismutase: SOD and catalase: CAT) and epigenetic marker (activity of methyltransferase enzyme). The findings indicate that ketamine reproduced the model of SZ, by inducing hyperlocomotion, social impairment, deficit in the sensory-motor profile and memory damage in the adult animals, as well as increased lipid peroxidation, carbonylation of proteins, the activity of SOD and CAT, especially in the frontal cortex, and also decreasing activity of methyltransferase within the striatum of adult offspring. The deficiency of maternal FA associated with saline or ketamine in the offspring, was able to induce locomotor hyperactivity, deficits in the social behavior of the animals and increased the levels of LPO, 4-HNE, 8-ISO, groups carbonyl within the frontal cortex and also increased activity of antioxidant enzymes in both of the brain structures. In addition, the FA deficient diet associated with ketamine in adult offspring was able to reduce the activity of methyltransferase within the striatum of animals. Maternal supplementation with FA during the gestational phase, particularly at

higher doses (10 and 50 mg/kg), indicated a persistent protective effect in adult offspring subjected to the model of SZ, by preserving cognitive function and preventing lipid and protein damage within the frontal cortex and also contributing to the increase of methyltransferase, an enzyme directly implicated in DNA methylation reactions. These results confirm the importance of adequate maternal nutrition in FA for the good development of the brain in the adulthood of offspring. Taken together, the data supports that prenatal deficiency of FA may be involved in the pathophysiology of SZ, since this deficiency has demonstrated a lasting effect on adult animals by altering biochemical parameters in the brain, possibly influencing the offspring's mental health through behavioral change.

Keywords: Folic acid; gestational phase; adult offspring; animal model of schizophrenia; ketamine; behavioural and biochemical parameters.

LISTA DE ABREVIATURAS

- 1C – metabolismo de um carbono
3-NT – 3-nitrotirosina
4-HNE – 4-hidroxinonenal
5,10-MTHF – 5,10-metilenotetrahidrofolato
5-formil-THF – 5-formiltetrahidrofolato ou ácido folínico
5mC – 5-metilcitosina
5hmC – 5-hidroximetilcitosina
5-MTHF – 5-metiltetrahidrofolato
8-ISO – 8-isoprostano
AF – ácido fólico
AIN 93 – do inglês, American Institute of Nutrition
AMPA - ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (do inglês α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)
ANOVA - análise de variância (do inglês analyses of variance)
APGs – antipsicóticos de primeira geração
ASGs – antipsicóticos de segunda geração
ATV – área tegumentar ventral
BH4 – tetrahidrobiopterina
BHE – barreira hemato-encefálica
BHQT – butil hidroquinona terciária
C – base nitrogenada citosina
Ca²⁺ – cálcio
CAT – catalase
CBS – cistationina- β -sintetase
CEUA – Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais
CH₃ – radicais ou grupos metil ou metila
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DHA – ácido docosaheptaenóico
DHF – dihidrofolato
DHFR – dihidrofolato redutase
DNA – ácido desoxirribonucleico
DNMTs – DNA metiltransferases
DNMT-1 – DNA-metil-transferase-1
DSM-V – Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais
DTNs – defeitos do tubo neural
E.P.M – erro padrão da média
ER – espécies reativas

ERO – espécies reativas de oxigênio
ERN – espécies reativas de nitrogênio
Fe²⁺ – ferro
G - base nitrogenada guanina
GABA – ácido gama-aminobutírico, do inglês gamma-aminobutyric acid
GCS – cistationina γ liase
GTP – guanosina trifosfato
GTPCH – guanosina trifosfato-hidrolase
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
Hcy – homocisteína
HDACs – histonas deacetilase
HHcy – hiperhomociteinemia
I.p. – injeções intraperitoneais
CpG – região promotora rica em citosina e guanina
IPP – inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto
LPO – hidroperóxidos de lipídeo
LTP – potenciação de longa duração
MDA – malondialdeído
Mg²⁺ – magnésio
MK-801 – dizocilpina: antagonista não competitivo de receptores NMDA
MS – metionina sintase
MTHFR – metilenotetrahidrofolato redutase
NeuroLab – Laboratório de Neurociências
Neurotox – Laboratório de Neurotoxicologia
NMDAR – receptor de glutamato tipo N-metil-D-aspartato, do inglês ionotropic glutamatergic n-methyl-d-aspartate receptor
NR1 - subunidade de receptor NMDA do tipo 1
O₂ – oxigênio
O₂⁻ – radicais superóxido
OH⁻ – radicais hidroxila
Ômega-6 – ácido araquidônico
ON – óxido nítrico
ONOO⁻ – peroxinitrito
P – pulso sozinho
PP – pré-pulso
PUFAs - ácidos graxos polinsaturados, do inglês polyunsaturated fatty acids
r – resposta ao pulso diminuída
R – resposta ao pulso

RFU – Unidade Relativa de Fluorescencia
RNA – ácido ribonucleico
SAH – S-adenosil-homocisteína
SAM – S-adenosil metionina
SNC – sistema nervoso central
SOD – superóxido dismutase
SPSS – do inglês Statistical Package for the Social Science
THF – tetraidrofolato
UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense
V.i. – via intraperitoneal
V.o. – via oral
Vitamina B6 – piridoxina
Vitamina B9 – ácido fólico
Vitamina B12 – cobalamina

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Compostos ativos formados a partir do ácido fólico (AF) ...	39
Figura 2: Metabolismo de um carbono (1C) do AF no cérebro.	42
Figura 3: Modelo farmacológico de esquizofrenia (cetamina)	55
Figura 4: Desenho experimental.	66
Figura 5: Equipamento monitor de atividade locomotora.....	67
Figura 6: Representação do equipamento do teste de interação social	69
Figura 7: Esquema simplificado do mecanismo de inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto (IPP).	70
Figura 8: Representação da IPP	71
Figura 9: Equipamento esQUIVA inibitória.	73
Figura 10: Análise da atividade locomotora na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia induzido pela administração de cetamina	77
Figura 11: Parâmetros de interação social na prole adulta.....	79
Figura 12: Avaliação da função sensório-motora na prole adulta.....	80
Figura 13: Avaliação da memória aversiva dos animais.....	81
Figura 14: Parâmetros de peroxidação lipídica nas estruturas cerebrais da prole adulta.	84
Figura 15: Parâmetros de dano proteico nas estruturas cerebrais da prole adulta.....	86
Figura 16: Atividade das enzimas antioxidantes nas estruturas cerebrais da prole.....	87
Figura 17: Atividade da enzima metiltransferase nas estruturas cerebrais da prole adulta.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais maternos: fêmeas durante a fase de gestação e lactação.	61
Tabela 2: Composição das dietas controle (AIN 93) e dieta deficiente em ácido fólico.	62
Tabela 3: Divisão da prole em grupos experimentais: machos adultos	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	37
1.1 ÁCIDO FÓLICO, HOMOCISTEÍNA E METABOLISMO DE UM CARBONO	37
1.2 ESQUIZOFRENIA: EPIDEMIOLOGIA, SINAIS CLÍNICOS, FATORES ETIOLÓGICOS, TRATAMENTO E FISIOPATOLOGIA	43
1.2.1 Nutrição Materna, Epigenética e Esquizofrenia	47
1.2.2 Estresse Oxidativo e Esquizofrenia	51
1.3 MODELOS ANIMAIS DE ESQUIZOFRENIA.....	53
1.4 JUSTIFICATIVA	56
2 OBJETIVOS	58
2.1 OBJETIVO GERAL	58
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
3 MATERIAIS E MÉTODOS	60
3.1 RATAS <i>WISTAR</i> DUANTE A FASE DE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO	60
3.2 COMPOSIÇÃO DAS DIETAS (RAÇÕES) ESPECIAIS OFERECIDAS ÀS RATAS <i>WISTAR</i>	61
3.3 SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO PARA AS RATAS <i>WISTAR</i>	63
3.4 PROLE ADULTA DE RATAS <i>WISTAR</i> MÃES: MACHOS	65
3.5 ADMINISTRAÇÃO DE CETAMINA PARA INDUZIR O MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA.....	65
3.6 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS	67
3.6.1 Atividade locomotora	67
3.6.2 Interação social	68
3.6.3 Inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto (IPP)	69
3.6.1 Esquiva inibitória	72
3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	73
3.7.1 Preparo das amostras cerebrais	73
3.7.2 Parâmetros de estresse oxidativo	73
3.8 PARÂMETROS EPIGENÉTICOS	74
3.8.1 Extração nuclear	74
3.8.2 Atividade de metiltransferases no núcleo	75
3.9 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	75
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	75
4. RESULTADO	77
4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS	77
4.1.1 Atividade locomotora	77
4.1.2 Interação social	78

4.1.3 Inibição por pré-pulso do reflexo de sobresalto (IPP)	79
4.1.4 Esquiva inibitória.....	80
4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	81
4.2.1 Parâmetros de peroxidação lipídica	81
4.2.2 Parâmetros de dano oxidativo a proteínas.....	84
4.2.3 Atividade das enzimas antioxidantes.....	86
4.3 PARÂMETROS EPIGENÉTICOS	87
4.3.1 Atividade da enzima metiltransferase	87
5 DISCUSSÃO	90
6 CONCLUSÃO	111
7 PERSPECTIVAS	112
REFÊRENCIAS.....	113
ANEXO.....	147

1. INTRODUÇÃO

1.1 ÁCIDO FÓLICO, HOMOCISTEÍNA E METABOLISMO DE UM CARBONO

O nome folato surgiu do Latim folium que significa folha, pois foi isolado pela primeira vez a partir de folhas verdes, como o espinafre (Melo, 2004). O ácido fólico (AF) ou folato é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B (vitamina B9) obtida a partir da dieta ou suplementação. Geralmente os termos "AF" e "Folato" são usados como sinônimos, entretanto, folato é a forma obtida a partir dos alimentos (forma desprotonada do AF, poliglutamato), enquanto o AF é a forma sintética do folato (forma totalmente oxidada do AF, ácido pteroilmonoglutâmico) utilizada para fortificar alimentos e suplementos nutricionais (Djukic, 2007; Miller, 2008). Esta vitamina não pode ser sintetizada por mamíferos sendo, portanto, considerada um nutriente essencial que deve ser ingerido através dos alimentos ou suplementos.

As principais fontes alimentares são: vegetais folhosos verde escuros (espinafre, couve, brócolis); vísceras (fígado e rim); leguminosas (feijões, lentilha, grão de bico), cereais integrais, frutas cítricas e frutas secas (Mattson e Shea, 2003; Miller, 2008). Além destas, diversos produtos comerciais são enriquecidos com AF, especialmente as farinhas de trigo e milho (Finglas et al., 2003). É sabido que a quantidade de AF absorvida varia conforme o indivíduo, dependendo da biodisponibilidade da vitamina ingerida, da taxa de perda pela urina, fezes e catabolismo, podendo ainda ser influenciada por condições patológicas como a má absorção e presença de doenças; ou fisiológicas, como gravidez, lactação e crescimento (Wagner, 1995). Além disso, no organismo o AF é altamente absorvido (85-95%), enquanto a absorção do folato ocorre em menor grau (50%), particularmente devido a influência de diversos compostos (caféina, antiácidos, laxantes, antibióticos, anticoncepcionais, nicotina, álcool) que interferem na absorção desta vitamina (Miller et al., 2009).

Muitas reações bioquímicas são necessárias para converter o folato da dieta ou o AF sintético na sua forma biologicamente ativa (Figura 1 – Fig. 1). Assim, o folato refere-se a vários compostos relacionados ao AF, incluindo o tetraidrofolato (THF), forma ativa co-enzimaticamente e que desempenha um importante papel na transferência de carbonos no organismo, recebendo os radicais ou grupos metil ou metila (CH₃) e doando-os durante várias reações, denominadas metabolismo ou ciclo de

um carbono (1C), inclusive para a síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA) (Miller, 2008; Lamers, 2011; Mann e Truswell, 2012). Após entrar na célula, o AF é convertido em dihidrofolato (DHF) e posteriormente a THF pela enzima dihidrofolato redutase (DHFR) (Melo, 2004). Em seguida, o THF pode ser convertido a 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-MTHF), o qual é importante para síntese de nucleotídeos (Ho et al., 2013). A enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) catalisa a conversão de 5,10-MTHF em 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), forma predominante na circulação e nos tecidos e que atravessa a barreira hemato-encefálica (BHE), chegando ao cérebro (Mattson e Shea, 2003; Ramaekers e Blau, 2004; Miller, 2008) (Fig. 1). O composto 5-MTHF pode também ser obtido pela conversão do ácido folínico (5-formiltetrahidrofolato – 5-formil-THF), um metabólito ativo do AF. Todavia, em função de não ocorrer síntese de novo do AF no sistema nervoso central (SNC), a manutenção dos níveis adequados desta vitamina no cérebro depende do transporte adequado de AF através da BHE (Ramaekers e Blau, 2004).

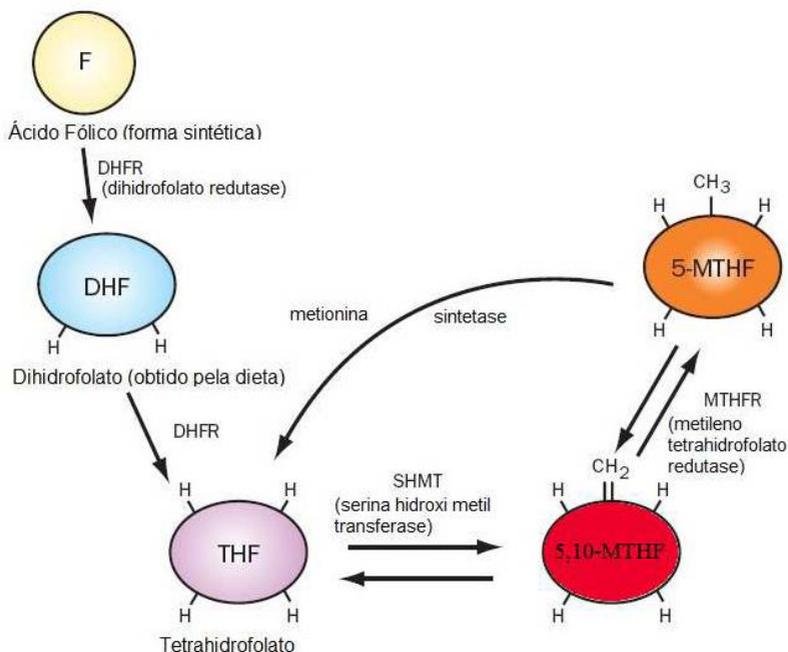


Figura 1: Formação do composto 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF) a partir do ácido fólico (AF) (forma sintética) ou folato (dihidrofolato - DHF, obtido da dieta). Ambos sofrem ação da dihidrofolato redutase (DHFR) para ser convertido à forma ativa do AF, tetrahydrofolato (THF). O THF pela ação da serina hidroximetiltransferase forma o 5,10-metilenotetrahydrofolato (5,10-MTHF), e através da enzima metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR), origina o 5-MTHF, forma predominantemente encontrada na circulação e que pode atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE) e agir o cérebro. 5-MTHF pode também ser re-convertido a THF por ação da enzima metionina sintase (MS). Fonte: Miller, 2008; Budni, 2012.

O 5-MTHF, em conjunto com a vitamina B12 (cobalamina), atua como doador de grupos CH₃ na conversão da homocisteína (Hcy) em metionina, em reação catalisada pela metionina sintase (MS). A metionina é metabolizada a S-adenosil metionina (SAM), principal composto das reações de transmetilação (síntese de DNA, fosfolipídios e neurotransmissores) e age como doador universal de grupos CH₃ em todas as células (Bottiglieri, 2005; Larsson et al., 2006; Lamers, 2011). A Hcy é um aminoácido sulfurado produzido exclusivamente no ciclo de metilação e em concentrações elevadas torna-se citotóxico. A doação de grupo CH₃ pela SAM gera a S-adenosil-homocisteína (SAH). Em

condições fisiológicas normais, este ciclo permite a rápida remoção de Hcy e os seus níveis permanecem relativamente baixos na célula, uma vez que a SAH é convertida à Hcy pela SAH-hidrolase. No entanto, quando os níveis intracelulares deste aminoácido aumentam, a SAH-hidrolase produz SAH em excesso, aumentando seus níveis celulares. Desse modo, a SAH destaca-se como um potente inibidor das reações de metilação dependentes de SAM, uma vez que alterações na taxa de SAM e SAH podem resultar na diminuição da atividade de metiltransferases, com implicações nestas reações, envolvendo DNA, proteínas, fosfolipídios e neurotransmissores (Bottiglieri, 2005).

Outra via metabólica da Hcy é a de transulfuração. A Hcy pode ser convertida em cistationina pela enzima cistationina- β -sintase (CBS) e em cisteína via enzima cistationina γ liase (CGL), ambas na presença da vitamina B6 (piridoxina). Esta via resulta no aumento dos níveis de glutathiona, principal antioxidante intracelular, possivelmente devido a um mecanismo compensatório que neutraliza os potenciais efeitos oxidativos da Hcy em condições normais (Mattson e Shea, 2003). Níveis elevados de Hcy e diminuição da glutathiona têm sido implicados na Doença de Alzheimer e Parkinson, podendo apontar para uma interrupção da via de transulfuração como um possível fator subjacente em doenças neuropsiquiátricas (Bharath et al., 2002; Isobe et al., 2005). Este efeito poder ser reforçado pela elevação da Hcy em virtude da deficiência de vitaminas do complexo B (B6, B9 e B12) (Fig. 2) (Mattson e Shea, 2003).

Em geral, o AF age como um cofator de enzimas que participam da transferência de grupos CH₃ (Mattson e Shea, 2003; Ho et al., 2013; Parletta et al., 2013), desempenhando inúmeras funções: 1) remetila a Hcy em metionina, a qual pode ser convertida em SAM, composto responsável pela transferência de grupos CH₃ às reações bioquímicas (Coppen e Bolander-Gouaille, 2005; Kronenberg et al., 2009); 2) atua na biossíntese de nucleotídeos como DNA, ácido ribonucleico (RNA) e aminoácidos; 3) regula a expressão gênica (Miller, 2008); 4) previne defeitos no tubo neural (DTNs) durante o desenvolvimento do SNC (Mattson e Shea, 2003; Coppen e Boulander-Gouaille, 2005); 5) aumenta a biossíntese de tetrahydrobiopterina (BH₄), a qual é coenzima das hidroxilases, enzimas fundamentais para a síntese de monoaminas e serotonina (Stahl, 2007); 6) possivelmente apresenta efeito neuroprotetor em danos ao SNC por promover reparo e crescimento neuronal (Iskandar et al., 2004; Budni et al., 2011); 7) exerce propriedades antioxidantes, visto que esta vitamina pode atuar sobre os mecanismos oxidativos envolvidos no SNC, inclusive, na manutenção

dos níveis normais de Hcy (Sarna et al., 2012; Zhao et al., 2014) (Fig. 2). Em síntese, o metabolismo de 1C é dependente do equilíbrio nutricional (vitaminas do complexo B), influenciando a atividade sináptica, além de impactar na regulação da expressão gênica (Mattson e Shea, 2003), características que conferem a este ciclo, uma importante posição ao integrar mudanças ambientais, desenvolvimento do indivíduo e plasticidade neuronal (Bottiglieri et al., 2005; Ramaekers et al., 2016).

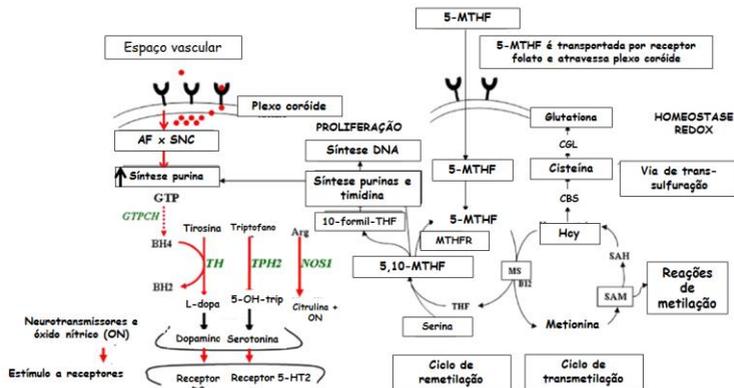


Figura 2: Vias metabólicas do ácido fólico (AF) no cérebro – O composto 5-metilтетраhidrofolato (5-MTHF) através de receptores do AF (FR- α) atravessa o plexo coróide atingindo o fluido cérebro-espinhal (CSF) e é distribuído no cérebro. Dentro dos neurônios, uma pequena proporção de 5-MTHF participa do metabolismo ativo. O 5-MTHF transfere grupos metil (CH₃) à homocisteína (Hcy) convertendo-a em metionina pela ação da enzima metionina sintase (MS), a qual é dependente de vitamina B12. No ciclo de transmetilação, a Hcy é metilada a metionina para a posterior síntese de S-adenosil-metionina (SAM), composto responsável pela transferência de grupos CH₃ nas reações de metilação. Alterações na taxa de SAM e S-adenosil homocisteína (SAH) podem resultar na diminuição da atividade de metiltransferases, por exemplo, das DNA metiltransferases (DNMTs), uma vez que a SAH atua como um inibidor das reações de metilação dependentes de SAM. No ciclo de remetilação, o tetrahidrofolato (THF) recebe um grupo mono-carbono a partir de serina e é convertido em 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-MTHF). Parte do 5,10-MTHF é reduzido a 5-MTHF via enzima metileno tetrahidrofolato redutase (MTHFR), enquanto outra porção é convertida em 10-formil-THF, necessário para a síntese de purina e timidina. O metabolito da purina, guanosina trifosfato (GTP), serve como substrato para a GTP-hidrolase (GTPCH), a fim de produzir a tetrahidrobiopterina (BH₄), a qual é coenzima da tirosina hidroxilase, enzima necessária para a hidroxilação da tirosina e formação da dopamina e noradrenalina, bem como da triptofano hidroxilase importante para a síntese de serotonina, além da arginina, que é convertida em óxido nítrico (ON). A via de transulfuração é um mecanismo compensatório que neutraliza os potenciais efeitos oxidativos da Hcy em condições normais ou de estresse oxidativo. A Hcy é convertida em cisteína pela enzima cistationina- β -sintetase (CBS). A cisteína, pela clivagem da glicina via enzima cistationina γ liase (CGL), é finalmente convertida em glutetiona, um importante antioxidante endógeno. Desta forma, o AF exerce um papel neuroprotetor por promover reparo e crescimento neuronal, prevenindo danos ao SNC. Fonte: Adaptado de Ramaekers et al., 2016.

Diante das importantes funções do AF, qualquer anormalidade que ocorra no metabolismo desta vitamina pode afetar o SNC. Esta hipótese é suportada por evidências que têm associado a deficiência de AF aos transtornos neurodesenvolvimentais, como a esquizofrenia (Krebs et al., 2009; Ramaekers et al., 2016). Assim, deficiências maternas graves de AF ou vitamina B12 causam anemia megaloblástica, acompanhada de diversas manifestações neurológicas (Baumgartner, 2013). Ademais, a deficiência pré-natal de AF, entre o 21º e 27º dia pós-concepção, aumenta consideravelmente o risco de malformações graves como os DTNs, o que justifica a suplementação obrigatória de AF no período periconcepcional e o enriquecimento desta vitamina em alimentos industrializados no Brasil desde 2004 (Marchioni et al., 2013). Também tem sido descrito que crianças concebidas em um curto intervalo entre as gestações apresentam níveis diminuídos de AF, o que pode ser explicado pela depleção da reserva materna de AF, quando o estoque desta vitamina ainda está sendo recuperado pela mãe (Dogan et al., 2009). Estes achados suportam que a deficiência materna de AF pode afetar o neurodesenvolvimento fetal e contribuir como um importante fator de risco para a esquizofrenia na vida tardia dos filhos (Gunawardana et al., 2011).

1.2 ESQUIZOFRENIA: EPIDEMIOLOGIA, SINAIS CLÍNICOS, FATORES ETIOLÓGICOS, TRATAMENTO E FISIOPATOLOGIA

A conceituação moderna da esquizofrenia é geralmente creditada aos pesquisadores Kraepelin e Bleuler. O psiquiatra Emil Kraepelin descreveu a esquizofrenia e a denominou originalmente como demência precoce, uma vez que os sintomas surgiam no início da vida levando a problemas psíquicos futuros. Entretanto, alguns anos depois, o psiquiatra suíço Eugene Bleuler introduziu o termo esquizofrenia (esquizo = divisão, phrenia = mente), indicando a existência de uma separação entre pensamento, emoção e comportamento (Silva, 2006).

A esquizofrenia caracteriza-se como um transtorno psiquiátrico crônico e debilitante que afeta cerca de 1% da população mundial, sendo marcado por perturbações nas funções cognitivas, sociais e comportamentais (Monte et al., 2013). Sua incidência é discretamente maior entre os homens (razão homens / mulheres = 1,4) (McGrath, 2005). Este transtorno corresponde a 14ª causa de incapacidade em todo o mundo, com 16,7 milhões de pacientes, moderada e severamente, incapacitados (Javitt, 2010). Além de comprometer gravemente a vida dos pacientes e seus familiares, representa um grande custo para a

sociedade e o sistema público, tanto em termos de perda da produtividade, como pelo tratamento contínuo com antipsicóticos (Koyama et al., 2008; Chien et al., 2008). Associado a isso, a expectativa de vida na esquizofrenia é aproximadamente 20% menor que a da população em geral. O transtorno está relacionado a um significativo risco de suicídio, em que a baixa qualidade de vida e a elevada presença de comorbidades contribuem para altas taxas de mortalidade nestes indivíduos (Palmer et al., 2005). O número de mortes está aumentando de 1,6 a 3 vezes, sendo o suicídio a principal causa de morte prematura em pessoas com esquizofrenia. Quase 50% dos pacientes esquizofrênicos tentam suicídio, uma taxa pelo menos 10 vezes maior que da população em geral (Hor e Taylor, 2010).

O diagnóstico da esquizofrenia é baseado essencialmente na descrição dos sinais e sintomas, não havendo até o momento parâmetros fisiopatológicos com sensibilidade e especificidade suficiente (Bagdy e Juhasz, 2013). De acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (DSM-V), os sinais devem estar presentes durante seis meses e incluir pelo menos um mês de sintomas ativos para se firmar o diagnóstico (Apa –American Psychiatric Association, 1994; 2013). Os sintomas manifestam-se entre o final da adolescência ou início da vida adulta, em que se observa uma mudança abrupta no perfil social e afetivo do indivíduo (Apa, 1994; Marsman et al., 2013). Em geral, o início da esquizofrenia é precedido por uma fase prodromica, caracterizada por sintomas psicóticos subliminares, alta probabilidade de um histórico familiar de esquizofrenia e um declínio nas tarefas do cotidiano (De La Fuente-Sandoval et al., 2011).

Os sintomas do transtorno são classificados em três classes: positivos, representados pelas alucinações, delírios, episódios psicóticos, pensamento e fala desordenada e desconfianças que levam o paciente à fuga da realidade; negativos, que referem-se ao embotamento afetivo, isolamento social, avolição, anedonia e discurso empobrecido; e déficits cognitivos, caracterizados pelo prejuízo na memória, aprendizagem, desorganização de pensamento, desorientação e falta de atenção (Larson et al., 2010; Shamsi et al., 2011). Atualmente existe um crescente interesse nos sintomas negativos e cognitivos, uma vez que os antipsicóticos disponíveis para o tratamento da esquizofrenia mostram uma eficácia clínica limitada sobre esses sintomas (Meyer et al., 2011). Por ser um transtorno altamente debilitante, de desenvolvimento neurológico grave e afetar o indivíduo em um período crítico da vida, geralmente na fase jovem, a prevenção e o diagnóstico precoce para a

esquizofrenia tem sido uma das metas para melhorar os resultados a longo prazo (Amminger et al., 2010).

A origem da esquizofrenia é multifatorial e o histórico familiar é o fator de risco mais significativo (Brown, 2011). Diversos fatores, em especial genéticos e ambientais, representam um grande impacto na etiologia do transtorno (Shorter e Miller, 2015). Todavia, a falta de achados consistentes apontando um fator genético específico na patogênese da esquizofrenia levou pesquisadores a estudarem a influência dos fatores ambientais (Rapoport et al., 2012; Matrisciano et al., 2013). É sabido que alterações epigenéticas podem estar envolvidas em distúrbios neurocomportamentais, inclusive na esquizofrenia. Assim, a regulação da expressão gênica é particularmente susceptível aos efeitos ambientais ocorridos durante o período pré e pós-natal (Jirtle e Skinner, 2007).

Evidências sugerem que perturbações no desenvolvimento cerebral durante a vida fetal desempenham um importante papel na etiologia da esquizofrenia (Brown et al., 2007), classificando-a como um transtorno neurodesenvolvimental (Rapoport et al., 2005). Diferentes fatores, conhecidos por produzir danos no desenvolvimento do SNC durante a fase gestacional, têm sido implicados na esquizofrenia e incluem o sofrimento pré-natal e / ou perinatal (Baguelin-Pinaud et al., 2010) como a exposição materna ao estresse (Lee et al., 2007); presença de infecção e / ou ativação do sistema imunológico (Clarke et al., 2009); uso de drogas (Baguelin-Pinaud et al., 2010); deficiências nutricionais materna (AF, vitamina B12, ômega-3) e / ou altos níveis de Hcy (Krebs et al., 2009); complicações obstétricas (Haukvik et al., 2009) e estresse oxidativo (Bitanhirwe e Woo, 2011). Estas situações estressoras podem desencadear o aparecimento de sintomas característicos do transtorno, tais como diminuição da interação social e / ou reconhecimento de objetos e déficit no sistema sensório-motor em modelos animais (Le Pen e Moreau, 2002), além de anormalidades na estrutura cortical, baixo peso ao nascer e alterações nos sistemas de neurotransmissores, dopaminérgico e glutamatérgico, em humanos (Weinstock, 2001).

O tratamento da esquizofrenia é caracterizado pelo uso de antipsicóticos, sendo que com os de primeira geração (APGs) ou típicos, os pacientes apresentavam sérios efeitos colaterais e, portanto, baixa adesão ao tratamento (Kane e Corell, 2010; Leucht et al., 2011). Posteriormente, a introdução de antipsicóticos de segunda geração (ASGs) ou atípicos ofereciam vantagens como melhora dos sintomas negativos, déficit cognitivo, melhora do grau dos sintomas extrapiramidais e discinesia tardia, quando comparado aos típicos.

Contudo, outros efeitos adversos relacionados à síndrome metabólica foram relatados, indicando que a adesão ao tratamento com ASGs permaneceu abaixo do esperado (Tajima et al., 2009; Leucht et al., 2011). Tendo em vista que os fármacos atualmente utilizados no tratamento deste transtorno permanecem distante do ideal, a prevenção desde a fase pré-natal, bem como o desenvolvimento de terapias alternativas é claramente justificável.

Apesar do crescente consenso de que a esquizofrenia é um transtorno mental, sua fisiopatologia ainda não foi completamente desvendada (Meyer e Feldon, 2010). Entretanto, não há dúvidas da existência de alterações anatômicas e bioquímicas cerebrais em sua gênese (Keshavan et al., 2011), nas quais encontram-se as disfunções nos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico, além dos sistemas GABAérgico e colinérgico (Miyamoto et al., 2003; Harrison e Weinberger, 2005), resultando em irregularidades no funcionamento de regiões córtico-basais, levando aos sintomas do transtorno (Tost e Meyer-Lindenberg, 2011). A teoria mais conhecida e primeiramente estudada foi a “hipótese dopaminérgica”, que correlaciona os sintomas da esquizofrenia com uma desregulação na neurotransmissão de dopamina no cérebro (Lodge e Grace, 2011). Tal hipótese é baseada na evidência de que os medicamentos antipsicóticos usados na terapêutica atuam como antagonistas dos receptores de dopamina, mais especificamente receptores do tipo D2, e que fármacos como as anfetaminas aumentam a dopamina cerebral causando episódios psicóticos em indivíduos normais (Meyer et al., 2011).

Deste modo, o aumento na liberação de dopamina está intrinsicamente relacionado à psicose, sendo a hipótese dopaminérgica, predominantemente associada à fisiopatologia da esquizofrenia (Snyder, 1976). Tem sido proposto que os sintomas negativos do transtorno são decorrentes de um déficit da atividade dopaminérgica mesocortical (receptores D1), tendo início na área tegumentar ventral (ATV) seguindo até o córtex pré-frontal, contrapondo-se a hiperatividade da transmissão dopaminérgica via receptores D2 na região mesolímbica, compreendida entre a ATV e o núcleo accumbens, a qual levaria aos sintomas psicóticos (Ross et al., 2006; 2007). Porém, a teoria dopaminérgica sozinha não explica completamente a fisiopatologia da esquizofrenia, uma vez que não é capaz de desvendar as razões subjacentes ao início dos sintomas na fase jovem-adulta, as alterações cognitivas e em estruturas cerebrais e o fato dos antipsicóticos não serem igualmente eficazes sobre os sintomas negativos (Johnstone et al., 1976).

Está bem descrito que o sistema dopaminérgico pode ser modulado pelo glutamatérgico, sendo este último envolvido em importantes funções cognitivas (memória e aprendizagem). Assim, foi postulada a hipótese glutamatérgica da esquizofrenia (Javitt, 2010; Goff, 2015), a qual foi reforçada pelo fato do tratamento com drogas, como a fenciclidina e cetamina, ambas antagonistas dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), exacerbarem os sintomas psicóticos em pacientes esquizofrênicos e induzirem sintomas positivos e negativos em indivíduos saudáveis, ao contrário da anfetamina, que gera somente sintomas positivos. A partir desta observação, tal hipótese defende que uma hipofunção nos receptores NMDA está diretamente relacionada à fisiopatologia da esquizofrenia (Bressan e Pilowsky, 2003).

Além disso, estudos supõem que a excitotoxicidade neural devido ao excesso de glutamato tem um importante papel na esquizofrenia contribuindo para um possível processo neurodegenerativo do transtorno (Moghaddam et al., 1997; Moghaddam e Krystal, 2012). É sabido que esta hipótese se concentra em alterações nas vias glutamatérgicas cerebral e na deficiência da sinalização dos receptores de glutamato (Poels et al., 2014). Ademais, dentre os antagonistas dos receptores NMDA, a cetamina tem recebido atenção em uma série de trabalhos científicos e vem sendo utilizada como um bom modelo animal para induzir a esquizofrenia, uma vez que é capaz de alterar parâmetros comportamentais e bioquímicos nos animais, os quais se assemelham às alterações do transtorno em pacientes humanos (Hunt et al, 2006; De Oliveira et al., 2009; Canever et al., 2010; Gama et al., 2012; Zugno et al., 2016).

1.2.1 Nutrição Materna, Epigenética e Esquizofrenia

O desenvolvimento e crescimento adequado da placenta durante a gravidez é determinado pela condição nutricional materna e têm um efeito crucial na saúde do feto, uma vez que a placenta representa o elo entre as circulações materno-fetais, sendo fundamental para a nutrição e oxigenação fetal (Dhobale, 2014). A gravidez representa um período de maior exigência metabólica e a ingestão de micronutrientes nesta fase é de suma importância, porém, muitas vezes inadequada. Durante a gestação, a rápida taxa de proliferação celular materna e fetal está associada a maior necessidade de micronutrientes, em particular de AF (Bailey e Ayling, 2009). Por este motivo, no período gestacional, algumas mulheres tornam-se susceptíveis a deficiência de AF, devido à necessidade em fornecer um aporte nutricional adequado para o bebê, o

que pode impactar sobre a sua saúde e, de modo especial, sobre o próprio feto (Haider et al., 2011). Conforme já mencionado, para reduzir a incidência de DTNs, a fortificação de AF em cereais e grãos tem sido recomendada há anos (Honein et al., 2001; Marchioni et al., 2013). Além disso, o AF é prescrito na dose de 400-800 µg/dia para mulheres grávidas ou para aquelas que planejam uma gravidez, pelo menos três meses antes de engravidar. Para mulheres com antecedentes de DTNs, a dose recomendada é dez vezes superior (4 mg/dia) (US Preventive Services Task Force, 2009).

Está bem estabelecido que o AF atua como um cofator essencial na síntese de ácidos nucleicos, facilitando a metilação do DNA (Oommen et al., 2005; Barua et al., 2014a; Barua et al., 2014b) e, por conseguinte, tem uma maior exigência de suporte ao longo da gestação, sendo primordial para o crescimento e desenvolvimento cerebral do feto (Stamm e Houghton, 2013). Estudos demonstram que níveis alterados de AF e, em consequência de Hcy, podem afetar processos fundamentais de neuroplasticidade desenvolvimental e adulta, incluindo a proliferação e diferenciação celular em neurônios e células gliais, bem como a sobrevivência neuronal. Desse modo, a plasticidade sináptica pode ser sensível a Hcy, uma vez que este aminoácido é capaz tanto de alterá-la, como promover a degeneração neuronal, contribuindo inclusive para a patogênese de transtornos, como a esquizofrenia (Mattson e Shea, 2003; Parletta et al., 2013). Dhobale (2014) confirmam que os micronutrientes maternos (AF, vitamina B12 e ácidos graxos polinsaturados – PUFAs) atuam em conjunto no metabolismo de IC, assim, qualquer alteração em um destes componentes poderá causar mudanças nos padrões de metilação que afetam a expressão gênica, resultando em complicações durante a gestação e repercutindo na saúde da prole. Tudo isso pode predispor o aparecimento de transtornos psiquiátricos em algum momento da vida destes filhos (Dhobale, 2014).

De fato, a nutrição materna exerce um papel determinante na prevenção de diversas doenças (cardiovasculares, psiquiátricas e neurodegenerativas) na vida da prole (Peleg-Raibstein et al., 2012; Van Abeelen et al., 2012). Pesquisas experimentais sugerem que a dieta materna desequilibrada em AF e vitamina B12 pode influenciar a síntese de PUFAs, reduzindo os níveis de ácido docosahexaenóico (DHA) cerebral na prole (Hill et al., 2011; Sable et al., 2012). Os ácidos graxos são vitais para o desenvolvimento e funcionamento do cérebro e, quando em desequilíbrio na mãe, podem afetar o desempenho cognitivo (memória e a aprendizagem) nos filhos, uma vez que a natureza das mudanças ocorridas pode ser dependente do tempo e da duração do dano

durante o neurodesenvolvimento (Vickers, 2011; Howie et al., 2012). Adicionalmente, os processos epigenéticos são apontados como o mecanismo base pelos quais alterações nutricionais na fase pré-natal interferem no desenvolvimento cerebral da prole (Kim et al., 2009a). Assim, a epigenética caracteriza-se por afetar a expressão de genes, sem alterar a sequência genômica, ou seja, a sequência do DNA. Mudanças epigenéticas incluem vários mecanismos que influenciam a estrutura da cromatina e a expressão gênica, como a metilação do DNA e acetilação de histonas.

A metilação do DNA envolve a adição de grupos CH₃ em regiões específicas do genoma dos organismos logo após a replicação do DNA (Dahl e Guldborg, 2003; Alho, 2004). A incorporação destes grupos ocorre no carbono 5 das bases nitrogenadas citosinas (C) localizadas na posição 5 das bases guaninas (G), gerando a 5-metilcitosina (5mC) (Holliday e Grigg, 1993). A metilação é catalisada por um grupo de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) que estabelecem e mantêm o padrão de metilação (Robertson, 2005). As regiões promotoras de determinados genes são relativamente ricas em citosina e guanina, sendo denominadas ilhas CpG. Quando não metilada, os fatores de transcrição têm livre acesso aos seus sítios de ligação na região promotora, ocorrendo assim a transcrição do gene. A metilação das ilhas CpG das regiões promotoras está relacionada com a regulação da expressão gênica por impedir a ligação de elementos fundamentais ou fatores de transcrição na cadeia de DNA. Desta forma, o DNA metilado impede a transcrição, silenciando genes, sendo este um mecanismo regulatório da expressão gênica (Kim, 2004a; Wojdacz e Hansen, 2006). A metilação do DNA pode então conduzir a efeitos de longa duração sobre a expressão do gene e do fenótipo, enquanto outras modificações epigenéticas tendem a ser de natureza passageira (Gluckman et al., 2008). A exposição embrionária e fetal a nutrientes derivados da mãe pode ter impactos na metilação do DNA, sendo este o mecanismo sugerido pelo qual os nutrientes maternos alteram o fenótipo da prole, conforme observado em estudos pré-clínicos (Waterland, 2003; Grozinger et al., 2007). Estas mudanças fenotípicas através da metilação do DNA podem estar relacionadas ao metabolismo do AF, pelo fato desta vitamina atuar como um “substrato” no ciclo de 1C, sendo essencial na transferência de grupos CH₃ para as reações de metilação. Durante o período fetal, os padrões de metilação do DNA de órgãos específicos são estabelecidos através da reprogramação epigenética, no entanto, a estabilidade destes padrões não é imutável e

pode ser modificada ao longo da vida pelo ambiente (Kim et al., 2009a; 2009b).

Waterland e Michels (2007) propõe dois possíveis mecanismos para explicar o efeito epigenético dos nutrientes maternos no fenótipo da prole. Primeiramente, a disponibilidade reduzida de grupos CH₃, por exemplo, devido a deficiência de AF, parece alterar a metilação do DNA em epialelos metaestáveis, influenciando o metabolismo ou atividade, em especial, da enzima DNA metiltransferase-1 (DNMT-1). Outra explicação se dá pela repressão de genes críticos durante a nova metilação de DNA no desenvolvimento fetal precoce, o que pode resultar em um defeito permanente da regulação epigenética via metilação do DNA e contribuir para o desenvolvimento de doenças na prole (McKay et al., 2004). Estudos que relacionam AF, metabolismo de IC e nutrição materna com a esquizofrenia ainda são escassos. Há, no entanto, indícios indiretos de que a disponibilidade de AF durante períodos críticos de desenvolvimento do cérebro, como na fase gestacional, pode comprometer o neurodesenvolvimento dos filhos (Kirkbride et al., 2012).

Neste sentido, recente ensaio clínico mostrou benefícios com a suplementação de AF e vitamina B12 para pacientes com esquizofrenia, dependendo da resposta de variações individuais na absorção do folato (Roffman et al., 2013). O AF parece exercer um efeito promissor no tratamento dos sintomas negativos do transtorno, devido seu papel no metabolismo de IC, através da síntese de neurotransmissores (Hill et al., 2011). Estudo realizado por Zugno et al. (2016) observou que a suplementação de AF (10 e 50 mg/kg) em animais adultos submetidos ao modelo de esquizofrenia foi capaz de prevenir a hiperlocomoção, o déficit no comportamento social, além do dano a lipídeos e proteínas nas estruturas cerebrais avaliadas.

Considerando os achados acima e que a deficiência de AF ou alterações no seu metabolismo durante período gestacional pode estar envolvida na patogênese da esquizofrenia, a dose adequada e o tempo bem estabelecido para a suplementação desta vitamina periconcepcional, durante a gestação e lactação, assim como durante a vida, pode ser fundamental para o bom desempenho cerebral e da saúde da prole em geral, uma vez que o AF desempenha importante papel em processos neuronais (Barua et al., 2014b; Wang et al., 2017).

1.2.2 Estresse Oxidativo e Esquizofrenia

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e / ou nitrogênio (ERN) e a capacidade de defesa antioxidante do organismo (Halliwell, 2006). O cérebro é particularmente vulnerável ao dano oxidativo, principalmente devido seu alto consumo de oxigênio (O₂), pelo seu elevado conteúdo lipídico (PUFAs), por ser metabolicamente ativo com um modesto mecanismo de defesa antioxidante e pela presença de células microgliais, as quais podem produzir espécies reativas (ER). Desse modo, pesquisas indicam que alterações nos mecanismos de defesa antioxidante têm um papel crucial na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos, como esquizofrenia, transtorno bipolar e depressão (Halliwell e Gutteridge, 2007). Tanto fatores genéticos como ambientais podem ocasionar o aumento celular de ER e influenciar a capacidade da defesa antioxidante em pacientes psiquiátricos, desencadeando dano celular oxidativo a lipídeos, proteínas e DNA, afetando o crescimento e a diferenciação neuronal (Pandya et al., 2013).

Neste sentido, Koga et al. (2016) reforçam que ambos fatores de risco para esquizofrenia estão associados ao estresse oxidativo e podem impactar adversamente os processos neurodesenvolvimentais relevantes para a fisiopatologia do transtorno. Pacientes esquizofrênicos jovens têm demonstrado alterações nos níveis de nutrientes, em especial AF e DHA no início da psicose, o que pode estar relacionado à hipótese acima relatada (Kale et al., 2008; Kale et al., 2010). Roy et al. (2012) supõem que este desequilíbrio de nutrientes aumenta o estresse oxidativo devido à geração de radicais livres que interagem com ácidos graxos das membranas neuronais ou lipoproteínas. Estas espécies atacam as duplas ligações dos PUFAs e iniciam reações formando peróxido de lipídios. A deficiência de AF e vitamina B12 pode induzir estresse oxidativo pelo aumento de malondialdeído (MDA), um marcador de dano lipídico. Ademais, o excesso de Hcy geralmente associado à deficiência de vitaminas do complexo B, induz estresse oxidativo através da ativação de receptores glutamatérgicos, uma vez que a Hcy atua como um potente agonista dos receptores NMDA, o que produz ER, ou pela própria autooxidação deste aminoácido e outros dissulfetos, liberando O₂ e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), os quais podem oxidar fosfolípidos de membrana e proteínas, inclusive enzimas (Roy et al. 2012; Pandya et al., 2013; Koga et al., 2016).

A Hcy pode ter uma influência significativa sobre o desenvolvimento do cérebro, particularmente quando seus níveis estão aumentados na

mãe durante a gestação (Roy et al., 2012). Tudo isso sugere que a deficiência de AF, vitamina B12 e ômega-3 na fase pré-natal é capaz de desencadear estresse oxidativo, levando a diminuição dos níveis de PUFAs cerebrais na prole ao nascer, o que pode impactar na manifestação de sintomas clínicos da esquizofrenia em algum momento da vida da prole, contribuindo para a patogênese do transtorno (Akanji et al., 2007; Dietrich-Muszalska e Olas, 2009a). Diante disso, a nutrição materna adequada, especialmente em AF, tem um papel primordial no controle do estresse oxidativo por reduzir os níveis de Hcy, o que confere a esta vitamina uma importante ação neuroprotetora (Zhang et al., 1998; Boldyrev e Jonhson, 2007).

Está bem descrito que alterações nos níveis de MDA estão diretamente relacionadas à esquizofrenia e, portanto, outros marcadores de peroxidação lipídica têm sido investigados neste transtorno. Estudo realizado por Dietrich-Muszalska e Olas (2009a) mostrou que os produtos da peroxidação do ácido araquidônico (ômega-6), incluindo o 4-hidroxinonal (4-HNE) e 8-isoprostano (8-ISO), encontram-se aumentados em soro de pacientes esquizofrênicos e podem levar a alta susceptibilidade ao dano neuronal, disfunção mitocondrial e morte neuronal (Keller et al., 1999; Ramos-Loyo et al., 2013).

A determinação de proteínas oxidadas tem sido enfatizada na esquizofrenia, uma vez que as proteínas têm um papel crítico na função celular, ação de enzimas e transdução de sinal (Halliwell e Whiteman, 2004). Assim, a oxidação proteica contribui para danificar moléculas secundárias, resultando em novos grupos funcionais que podem seriamente comprometer a integridade celular (Dietrich-Muszalska et al., 2009; Bošković et al., 2011). Desse modo, o conteúdo de grupos carbonila (carbonilação de proteínas) mostra-se como o principal marcador para avaliar o dano proteico. A ação das ER contra proteínas adiciona-lhes radicais carbonil em determinados aminoácidos, alterando sua conformação e tornando-as disfuncionais (Dalle-Donne et al., 2006). Por exemplo, se H₂O₂ não é removido das células por enzimas antioxidantes, pode reagir com Fe²⁺, formando radicais hidroxila (OH⁻), os quais reagem com resíduos de aminoácidos (lisina, prolina, arginina e treonina) para formar grupos carbonila (Beal, 2002). Outra forma de dano oxidativo às proteínas ocorre através da nitração de resíduos de tirosina induzida pela formação de peroxinitrito (ONOO⁻), originando a 3-nitrotirosina (3-NT) (Beckman e Koppenol 1996, Naoi et al., 2005), sendo este último dano mais reversível quando comparado à carbonilação de proteínas (Irie et al., 2003, Osoata et al., 2009). Em geral, o dano proteico, mensurado principalmente através do conteúdo

de grupos carbonila e 3-NT, tem se mostrado aumentado em pacientes esquizofrênicos (Dietrich-Muszalska e Olas, 2009b; Dietrich-Muszalska et al., 2009).

Para contrapor-se ao aumento das ER e radicais livres, os quais são inevitáveis em decorrência do próprio metabolismo celular ou mediante situações adversas (estresse na fase pré-natal), a célula dispõe de um sistema antioxidante composto de diversas enzimas (Koga et al., 2016). Assim, a atividade das enzimas antioxidantes é avaliada como uma medida indireta de estresse oxidativo. Uma das enzimas de eliminação crítica mais comumente relatada na esquizofrenia é a superóxido dismutase (SOD), que converte os radicais superóxido (O_2^-) em H_2O_2 , detoxificando os radicais O_2^- . A catalase (CAT), por sua vez, permite a degradação de H_2O_2 em $O_2 + H_2O$, impedindo a produção de radicais livres (Garcia et al., 2005; Wu et al., 2013; Koga et al., 2016). Todavia, estudos têm demonstrado resultados contraditórios sobre as enzimas antioxidantes em indivíduos esquizofrênicos, as quais podem estar aumentadas ou diminuídas nestes pacientes (Wu et al., 2013).

Diante de tudo, tem sido elucidado que o estresse oxidativo interfere em todo o processo de neurodesenvolvimento desde a gestação, podendo permanecer durante a vida adulta. Evidência sugere que o uso de micronutrientes maternos, em particular o AF, pode ser eficaz na prevenção da esquizofrenia (Pandya et al., 2013), justificando novas pesquisas relacionadas a esta vitamina. Ademais, a associação entre fatores genéticos e ambientais representa um grande impacto na etiologia do transtorno (Shorter e Miller, 2015), o que torna cada vez mais evidente o possível envolvimento dos danos oxidativos na neurobiologia das alterações comportamentais verificadas em animais induzidos ao modelo de esquizofrenia, assim como na fisiopatologia deste transtorno neurodesenvolvimental.

1.3 MODELOS ANIMAIS DE ESQUIZOFRENIA

Nos últimos anos a neurofarmacologia tem utilizado o modelo animal para o estudo de transtornos psiquiátricos em laboratório. Infelizmente no grupo da esquizofrenia, devido à complexidade da doença, existe uma multiplicidade de fatores que não podem ser reproduzidos na realidade dos animais e, conseqüentemente, há uma certa dificuldade para se obter um modelo animal que contemple todos os aspectos do transtorno (Meyer e Feldon, 2010).

Desta forma, um modelo animal amplamente utilizado na esquizofrenia envolve a administração repetida ou aguda de cetamina

(De Oliveira et al., 2009; Canever et al., 2010; Fraga et al., 2011; Gama et al., 2012; Monte et al., 2013). Essa droga tem sido usada clinicamente como um anestésico dissociativo que atua com múltiplos mecanismos de ação, incluindo o antagonismo não-competitivo do receptor glutamatérgico NMDA e como agonista do receptor de dopamina D2, com uma afinidade ligeiramente menor pelos receptores 5-HT2 (Kapur e Seeman, 2002; Kapur e Mamo, 2003). É sabido que o efeito de substâncias psicoativas em humanos, tais como a anfetamina e os antagonistas dos receptores NMDA (fencilina, cetamina e MK-801) podem simular sintomas da esquizofrenia (Krystal et al., 2003; Krystal et al., 2005; Salgado et al., 2006).

Em roedores, estes fármacos estabelecem comportamentos anormais, tais como hiperlocomoção, comportamento estereotipado aumentado, déficits cognitivos e no filtro sensorio-motor, além de perturbações na interação social entre os animais, os quais são constitutivos da esquizofrenia (Sams-Dodd, 1998; Lipska e Weinberger, 2000). Estas substâncias também modulam, direta ou indiretamente, a atividade do sistema dopaminérgico, cuja disfunção é relevante na esquizofrenia, conforme demonstrado pela atenuação exercida por neurolépticos sobre certas manifestações do transtorno (Salgado et al., 2006).

Além da cetamina, outros modelos animais farmacológicos de esquizofrenia são utilizados através da fenciclidina (Hashimoto et al., 2007; Elsworth et al., 2012) e do MK-801 (Su et al., 2007; Boulay et al., 2010). Estes fármacos agem via bloqueio do canal NMDA, impedindo o influxo de cálcio (Ca^{2+}) através do canal deste receptor, o que induz um estado psicótico transitório e reversível, incluindo sintomas positivos, negativos e cognitivos da esquizofrenia em indivíduos saudáveis (Fig. 3) (Javitt et al., 2000; Mechri et al., 2010; Frohlich e Van Horn, 2014). Em animais, o bloqueio repetido do receptor NMDA induz hiperatividade, dificuldades de interação social, déficits na inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto (IPP) e prejuízos de memória, os quais se assemelham aos sintomas da esquizofrenia em humanos, além de mimetizar alterações bioquímicas, como hiperfunção do glutamato, o que induz excitotoxicidade neural devido ao excesso de glutamato, alteração em receptores nicotínicos de acetilcolina e hiperatividade na transmissão neuronal, semelhantes ao transtorno (Hunt et al., 2006; Canever et al., 2010).

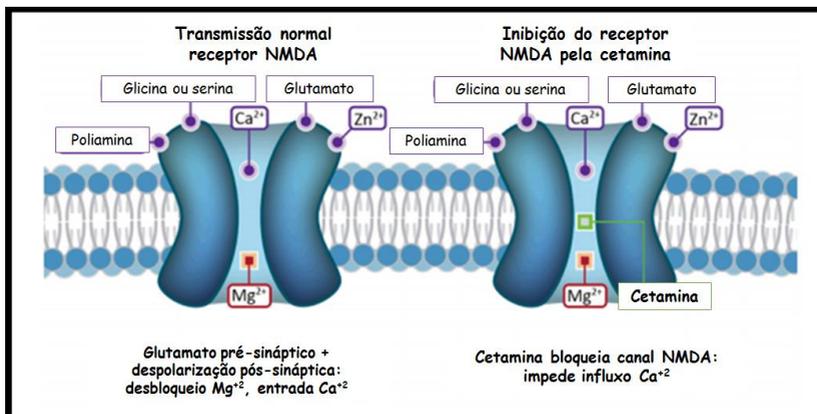


Figura 3: Modelo farmacológico da esquizofrenia com antagonista do receptor NMDA (cetamina) – Os receptores NMDA são ativados quando o bloqueio do canal NMDA pelo magnésio (Mg^{+2}) é revertido pela despolarização da membrana pós-sináptica. Então o Mg^{+2} é liberado do canal, permitindo a entrada de cálcio (Ca^{+2}) para o neurônio, levando a potenciação de longa duração (LTP) e o desempenho das funções glutamatérgicas (cognição, plasticidade). A cetamina gera um bloqueio no poro do canal NMDA, o que impede o influxo de Ca^{+2} , podendo induzir um estado psicótico transitório e reversível, inclusive em pessoas saudáveis, além de modelos animais. Fonte: Adaptado de Frohlich e Van Horn, 2014.

O uso da cetamina como um modelo animal para induzir a esquizofrenia está bem consolidado na literatura, sendo que sua validade de face (mimetizar os sintomas do transtorno), de construto (habilidade do modelo em reproduzir alguns aspectos fisiopatológicos da doença) e preditiva (avaliar se os medicamentos clássicos usados no tratamento do transtorno previne e / ou reverte às alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas no animal) estão comprovadas (Reddy e Yao, 1996; De Oliveira et al., 2009). Adicionalmente, a capacidade que os fármacos acima listados têm de induzir muitos, senão a maioria dos sintomas e déficits associados à esquizofrenia, sugere que a disfunção ou desregulação do receptor NMDA é capaz de explicar estas características do transtorno (Kantrowitz e Javitt, 2010).

Neste contexto, a pesquisa em animais tem representado um promissor instrumento para elucidar as bases biológicas das doenças e dos transtornos psiquiátricos. A indução de sintomas tipo esquizofrenia através de antagonistas NMDA é considerada um modelo altamente válido, e, por isso, a cetamina vem sendo usada como agente na pesquisa para o desenvolvimento de novos antipsicóticos e para

determinar a correlação neuroquímica da psicose (Levkovitz et al., 2007), visto que o bloqueio de receptores NMDA também interfere com a neurotransmissão dopaminérgica, a qual está diretamente envolvida com a esquizofrenia (Vasconcelos et al., 2015).

Diante de tudo, o presente estudo utilizou a cetamina para induzir o modelo animal de esquizofrenia na prole adulta, cujas mães foram expostas a dieta deficiente ou suplementada com diferentes doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg) na fase neurodesenvolvimental. Como mencionado acima, este modelo é baseado na teoria da hipofunção do receptor NMDA, onde ao bloquear este receptor, há um aumento da liberação de dopamina no sistema mesolímbico e igualmente aumenta-se a atividade dos demais receptores de glutamato (Anand et al., 2000). Além de induzir o modelo animal de esquizofrenia, Zugno et al. (2013a; 2013b; 2017) reforçam a hipótese de que agressões precoces durante a fase pré-natal (privação materna, exposição materna à fumaça de cigarro) interferem no sistema glutamatérgico, refletindo em uma maior sensibilidade aos efeitos da cetamina na idade adulta da prole submetida a este modelo.

1.4 JUSTIFICATIVA

Dados da literatura confirmam que a esquizofrenia se caracteriza como um transtorno neurodesenvolvimental, em que a presença de fatores estressores durante a fase pré-natal, bem como o desequilíbrio de micronutrientes maternos, em particular AF, pode causar sérios impactos na vida tardia da prole, influenciando em alterações comportamentais e neuroquímicas (Krebs et al., 2009). Desse modo, especula-se que os danos oxidativos e as mudanças nos padrões de metilação do DNA possam estar envolvidos na fisiopatologia da esquizofrenia, o que influencia o desenvolvimento do cérebro e, conseqüentemente, induz alterações comportamentais em algum momento da vida.

Adicionalmente, tem sido proposto que a deficiência de AF ou alterações no seu metabolismo durante período gestacional pode estar relacionada à patogênese da esquizofrenia (Barua et al., 2014b; Wang et al., 2017). Portanto, o presente estudo apresenta relevância por investigar os efeitos da deficiência materna de AF e da suplementação de diferentes doses desta vitamina durante a fase pré-natal, na prole adulta (machos) submetida ao modelo animal de esquizofrenia, uma vez que o transtorno apresenta discreta incidência entre os homens e, em particular, pelo fato da nutrição materna adequada em AF ser essencial

para o bom desenvolvimento cerebral da prole e, quando em desequilíbrio, é capaz de causar consequências bioquímicas e / ou comportamentais futuras.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito da dieta deficiente em AF, da dieta controle e da suplementação de AF em diferentes doses (5, 10 e 50 mg/kg) durante as fases de gestação e lactação em ratas Wistar sobre os parâmetros comportamentais, de estresse oxidativo e de epigenética, na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia induzido pela administração de cetamina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito das dietas maternas, deficiente em AF, dieta controle e dietas controle suplementadas com AF sobre a atividade locomotora, relacionada aos sintomas positivos, na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia induzido pela administração de cetamina;

- Avaliar o efeito das dietas maternas, deficiente em AF, dieta controle e dietas controle suplementadas com AF sobre os sintomas negativos através da interação social, realizada no campo aberto, na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia induzido pela administração de cetamina;

- Avaliar o efeito das dietas maternas, deficiente em AF, dieta controle e dietas controle suplementadas com AF sobre as alterações na função sensorio-motora, por meio do teste de IPP, na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia induzido pela administração de cetamina;

- Avaliar o efeito das dietas maternas, deficiente em AF, dieta controle e dietas controle suplementadas com AF sobre as alterações comportamentais relacionadas à memória aversiva, através da esQUIVA inibitória, na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia induzido pela administração de cetamina;

- Analisar o efeito das dietas maternas, deficiente em AF, dieta controle e dietas controle suplementadas com AF sobre os parâmetros de estresse oxidativo, a saber: dano lipídico (hidroperóxidos de lipídeo – LPO; 4-HNE e 8-ISO); dano proteico (conteúdo de grupos carbonila e 3-NT), bem como a atividade das enzimas antioxidantes (SOD e CAT), nas estruturas cerebrais córtex frontal e hipocampo, da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia induzido pela administração de cetamina;

- Analisar o efeito das dietas maternas, deficiente em AF, dieta controle e dietas controle suplementadas com AF sobre a atividade da enzima metiltransferase, um marcador epigenético, nas estruturas cerebrais córtex frontal, hipocampo e estriado, da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia induzido pela administração de cetamina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa se caracteriza como experimental, utilizando um modelo animal (ratos Wistar) de esquizofrenia. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) sob o protocolo 100-2014-01 (Anexo A). Os procedimentos foram executados de acordo com o Instituto Nacional de Guia de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) projetado para minimizar o sofrimento e limitar o número de animais utilizados.

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas adultos com aproximadamente 60 dias de vida, pesando em média 250 g a 300 g. Os animais foram obtidos do Biotério da UNESC e mantidos em gaiolas em ciclos de 12h dia-noite, com alimentação específica, água disponível e temperatura controlada entre $22 \pm 1^\circ \text{C}$.

3.1 RATAS *WISTAR* DUANTE A FASE DE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

Neste estudo utilizaram-se 60 ratas Wistar adultas, virgens, que foram mantidas cada uma com um rato Wistar macho adulto ($n=60$) para acasalamento durante sete dias. A partir do primeiro de contato com o macho, as ratas foram separadas aleatoriamente em cinco grupos experimentais maternos ($n=12$) e começaram a receber dois tipos de dieta (ração) especial: dieta AIN 93 (American Institute of Nutrition), também denominada dieta controle, e dieta deficiente em AF (Reeves et al., 1993). As fêmeas que receberam a dieta controle ainda foram subdivididas em três grupos para além desta ração, receberem a suplementação com AF em diferentes doses (5, 10 e 50 mg/kg), totalizando assim, cinco grupos experimentais maternos (Tabela 1).

Após o acasalamento, as ratas permaneceram isoladas uma por caixa e continuaram recebendo a dieta previamente determinada durante toda a gestação (21 a 28 dias) e lactação (21 dias). Foi utilizado um número significativo de fêmeas devido ao fato de que o estresse gerado pela oferta de uma nova ração durante este período, associado à manipulação dos animais e a própria fase gestacional, serem capazes de provocar aborto ou canibalismo por parte das mães logo após o nascimento dos filhotes (Desantis e Schmaltz, 1984). Convém reforçar que as ratas não

grávidas foram desconsideradas deste estudo após 21 a 28 dias de acompanhamento.

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais maternos: fêmeas durante a fase de gestação e lactação.

GRUPOS MATERNOS
1. Dieta deficiente em ácido fólico (AF)
2. Dieta AIN 93 ou dieta controle
3. Dieta controle + AF 5mg/kg
4. Dieta controle + AF 10mg/kg
5. Dieta controle + AF 50mg/kg

N = 12 animais por grupo. Fonte: Dados da pesquisadora, 2017.

3.2 COMPOSIÇÃO DAS DIETAS (RAÇÕES) ESPECIAIS OFERECIDAS ÀS RATAS *WISTAR*

Nesta pesquisa foram utilizados dois tipos de dieta ou ração especial: dieta AIN 93, descrita como dieta controle, e dieta deficiente em AF, produzida a partir da ração AIN 93. Estas rações foram confeccionadas e fornecidas pela empresa Pragsoluções Biociências (www.pragsolucoes.com.br), sendo oferecidas às ratas dos grupos experimentais maternos desde o acasalamento, seguindo durante toda a fase de gestação e lactação. Destaca-se que ambas as rações (controle e deficiente em AF) têm a mesma composição nutricional (ração AIN 93), porém a dieta deficiente em AF é isenta desta vitamina. O uso da ração AIN 93 está bem descrito na literatura, uma vez que essa é bastante utilizada em estudos dietéticos em roedores de laboratório para fins de pesquisa (Reeves et al., 1993).

Conforme orientações do fabricante, a ração AIN 93 foi selecionada e denominada como dieta controle, pelo fato de ser preparada apenas com ingredientes purificados. Desse modo, é possível saber exatamente quais são os componentes de cada fração de macronutrientes (carboidratos, lipídeos e proteínas), além das vitaminas e minerais. Convém destacar que o teor de AF da dieta AIN 93 é de 2 mg/kg de ração (Reeves et al., 1993). A dieta deficiente em AF foi preparada a partir da ração AIN 93, contendo os mesmos ingredientes purificados, porém o mix de vitaminas é isento de AF (Tabela 2). Em anexo são apresentadas as tabelas originais de composição nutricional da dieta controle (ração AIN 93 – Anexo B), da dieta deficiente em AF (ração AIN 93 isenta de AF –

Anexo C) e da ração padrão (dieta comum) utilizada no Biotério da UNESC no período em que foi realizado o experimento (Anexo D).

Tabela 2: Composição das dietas controle (AIN 93) e dieta deficiente em ácido fólico.

Composição nutricional das rações	Ração AIN 93 ou dieta controle (g/kg)	Dieta deficiente em AF (g/kg)
Amido de milho	398	398
Caseína	200	200
Amido dextrinizado	132	132
Sacarose	100	100
Óleo de soja	70	70
Óleo de peixe	0	0
Fibras	50	50
Mix de minerais ^a	35	35
Mix de vitaminas ^b	10	10
Ácido fólico	0.002	0
Vitamina B12	0.0025	0.0025
Cisteína	3	3
Bitartarato de colina	2.5	2.5
Butil terciário	0.014	0.014
Energia total (kJ)	1.57	1.57

^a Mistura de minerais (g/kg de mistura): carbonato de cálcio, 357; Fosfato de potássio, 196; Citrato de potássio, 70.78; Cloreto de sódio, 78; Sulfato de potássio, 46,6; Óxido de magnésio, 24; Citrato férrico, 6.06; Carbonato de zinco, 1.65; Carbonato manganoso, 0.63; Carbonato cúprico, 0.3; Iodato de potássio 0.01; Selenato de sódio, 0.01; Paramolibdato de amônio, 0.007; Metassulfato de sódio, 1.45; Cromo sulfato de potássio, 0.275; Cloreto de lítio, 0.01; ácido bórico, 0.08; Fluoreto de sódio, 0.06; Carbonato de níquel, 0.03; Vanadato de amônio, 0.006; Sacarose, 221.02.

^b Mistura de vitaminas (g/kg de mistura): ácido nicotínico, 3; Pantotenato de cálcio, 1.6; Piridoxina-HCl, 0.7; Tiamina-HCl, 0.6; Riboflavina, 0.6; D-biotina, 0.02; Vitamina B12 (em 0,1% de manitol), 2.5; Vitamina E, 15; Vitamina A, 0.8; Vitamina D-3, 0.25; Vitamina K, 0.075; Ácido fólico, 0.2 (controle) e sacarose 974.655. Essas quantidades foram utilizadas para fazer o peso total da mistura de vitaminas para 1 kg. Fonte: Adaptado de Reeves et al. (1993) e Sable et al. (2011).

É importante salientar que não se optou pela ração comum do Biotério como dieta controle neste experimento, por alguns motivos. Primeiramente, devido a dieta deficiente em AF ser elaborada somente a partir da ração AIN 93 que contém ingredientes purificados. Também pelo fato da ração comum não ser purificada, apresentando um padrão

nutricional diferente, inclusive em relação à fonte proteica que é de origem vegetal (soja, milho) quando comparada a proteína da ração AIN 93 (caseína, origem animal), além do teor de AF na ração comum (1 mg/kg de ração) ser diferente da quantidade contida na ração AIN 93 (2 mg/kg de ração). Adicionalmente, a dieta comum é preparada com ingredientes integrais como o milho em grão que contém frações de amido, óleo de milho, além de proteína, vitaminas e minerais misturados no mesmo grão e, assim, ocorre com os demais ingredientes da ração (Anexo D). Desta forma, torna-se difícil elaborar uma dieta livre de AF a partir da ração comum, visto que esta vitamina além de adicionada na ração pode estar presente nos demais ingredientes utilizados (grãos integrais) em maior ou menor concentração, dificultando a eliminação total do AF para obter-se a ração deficiente nesta vitamina.

Desta forma, a fim de evitar viés no estudo, foi estabelecido o uso da ração AIN 93 como dieta base (controle) nesta pesquisa. De fato, o uso da ração AIN 93 neste estudo é justificado pelo fato de que ambas as dietas (controle e deficiente em AF) tem a mesma composição nutricional, diferindo apenas quanto ao teor de AF. Estas rações também continham em sua composição butil hidroquinona terciária (BHQT) para evitar a oxidação (Reeves et al., 1993) e foram mantidas sob refrigeração, sendo fornecidas duas vezes por semana para as ratas Wistar desde o primeiro dia de acasalamento até o último dia de lactação.

3.3 SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO PARA AS RATAS WISTAR

As ratas Wistar que receberam a dieta controle foram divididas em três grupos, conforme demonstrado na Tabela 1, para suplementação com AF. Essa vitamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) foi suplementada nas doses de 5, 10 e 50 mg/kg/peso do animal, sendo preparada antes da administração e solubilizada em água em um volume de 1mL/100g. O AF foi administrado por via oral (v.o.), uma vez ao dia (período matutino), desde o acasalamento dos animais, seguindo durante a fase de gestação e lactação. As doses de suplementação foram administradas conforme respectivo peso de cada rata, no volume de 1mL/kg. As doses de AF foram escolhidas com base em estudos anteriormente realizados por Brocardo et al. (2008a; 2008b; 2009) e Budni et al. (2012), os quais avaliaram os efeitos das diferentes doses de AF no modelo animal de depressão, bem como estudo realizado por

Zugno et al. (2016) que verificou o efeito do AF (5, 10 e 50 mg/kg) no modelo animal de esquizofrenia.

Conforme mencionado acima, a ração AIN 93 contém 2 mg/kg/ração de AF em sua composição (Reeves et al., 1993). Este teor corresponde a necessidade normal de AF para ratas, o que equivale a suplementação de 400 µg/dia para mulheres grávidas, sugerindo que as ratas expostas à dieta controle receberam níveis adequados de AF durante a fase gestacional em que a exigência desta vitamina está aumentada, devido ao maior aporte nutricional para o feto (Haider et al., 2011). Em adição, neste estudo foi oferecida às ratas Wistar durante a gestação e lactação, além da ração AIN 93 (2 mg/kg), a suplementação de três doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg), com a finalidade de verificar o efeito das diferentes doses de AF maternas nas respostas comportamentais e bioquímicas da prole adulta submetida ao modelo de esquizofrenia. Assim, a dose de 5 mg/kg de AF suplementada para as ratas, correspondeu à dose na faixa de 400-800 µg/dia de AF para mulheres grávidas (Sable et al., 2011; Barua et al., 2016a; Barua et al., 2016b). A suplementação de AF na dose de 10 mg/kg para as ratas, equivaleu a dose máxima de 4 mg/dia recomendada para mulheres grávidas com histórico prévio de filhos com DTNs (US Preventive Services Task Force, 2009). Em síntese, estas duas doses de AF (5 e 10 mg/kg) estão em conformidade com as necessidades de AF para roedores na fase gestacional, uma vez que respeitaram a faixa de recomendação de AF (400 µg/dia a 4 mg/dia) prescrita para gestantes (US Preventive Services Task Force, 2009). Todavia, a dose de 50 mg/kg de AF foi selecionada como uma superdose, supostamente acima do recomendado para gestantes, inclusive em ratos. De qualquer forma, Barua et al. (2016a) reforçam que os roedores parecem ter uma melhor capacidade de metabolizar doses mais elevadas de AF em relação aos seres humanos, conforme evidenciado no estudo de Bailey e Ayling (2009), o qual demonstrou que a atividade da enzima DHFR é superior em ratos quando comparada a humanos. Isto ainda pode justificar, ao menos em parte, o fato das doses de AF serem utilizadas em mg para roedores e em µg para humanos.

Após o nascimento da prole, todos os filhotes (machos e fêmeas) permaneceram junto à mãe para amamentação durante 21 dias e as mães continuaram recebendo a mesma dieta oferecida durante a gestação, até o final da lactação. Logo após o desmame, a prole foi submetida à sexagem e os filhotes machos e fêmeas foram agrupados de acordo com a dieta materna, lembrando que após cessar a amamentação, foi introduzida a ração padrão do Biotério para estes animais. Após o

desmame, as ratas mães foram destinadas para outro estudo e os filhotes machos foram separados para uso na idade adulta (60 dias). A prole feminina adulta das ratas Wistar foi destinada a outro grupo de pesquisa do mesmo laboratório para realização de outros experimentos.

3.4 PROLE ADULTA DE RATAS WISTAR MÃES: MACHOS

Ao chegar à fase adulta, a prole de machos foi subdividida em grupos conforme a dieta materna administrada durante a fase gestacional para indução do modelo animal de esquizofrenia através da administração de salina ou cetamina (25 mg/kg). No total, formaram-se dez grupos (Tabela 3).

Tabela 3: Divisão da prole em grupos experimentais: machos adultos

GRUPOS: Prole machos adulta	
1.	Dieta controle+salina (grupo controle)
2.	Dieta controle +cetamina (grupo cetamina)
3.	Dieta deficiente AF+salina
4.	Dieta deficiente AF+cetamina
5.	Dieta controle+AF 5mg/kg + salina
6.	Dieta controle+AF 5mg/kg + cetamina
7.	Dieta controle+AF 10mg/kg + salina
8.	Dieta controle+AF 10mg/kg + cetamina
9.	Dieta controle+AF 50mg/kg + salina
10.	Dieta controle+AF 50mg/kg + cetamina

N = 10-12 animais por grupo. Fonte: Dados da pesquisadora, 2017.

3.5 ADMINISTRAÇÃO DE CETAMINA PARA INDUZIR O MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA

A partir da divisão dos grupos acima apresentados, foi iniciado o protocolo de indução do modelo de esquizofrenia, no qual os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de cetamina (25 mg/kg) ou salina, uma vez ao dia, durante sete dias (tratamento repetido). A dose de cetamina foi preparada em solução salina no volume de 1mL/100g, mediante estudos realizados previamente (Becker e Grecksch, 2004; Imre et al., 2006; Tomiya et al., 2006; Canever et al., 2010).

Após a última administração de salina ou cetamina, tempo determinado conforme o protocolo de execução de cada teste, os

animais foram submetidos às análises comportamentais: atividade locomotora, interação social, IPP e esQUIVA inibitória. Posteriormente, os ratos machos adultos foram eutanasiados em guilhotina e suas estruturas cerebrais, córtex frontal e hipocampo dissecadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80°C para posteriores análises de parâmetros de estresse oxidativo e da análise da atividade da enzima metiltransferase, sendo o estriado considerado apenas nesta última análise do padrão de metilação de DNA (Fig. 4).

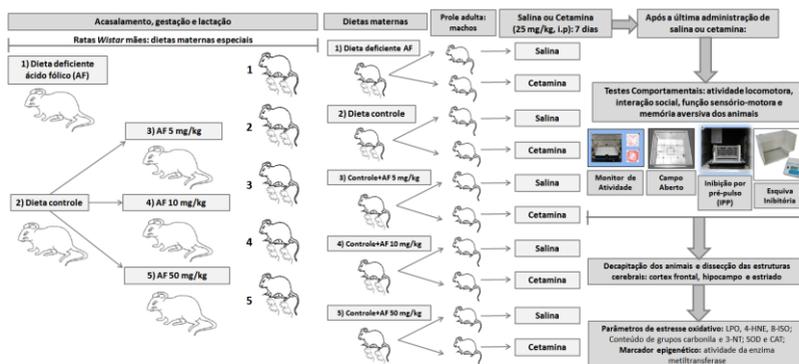


Figura 4: Desenho experimental – Ratos Wistar foram separadas em grupos experimentais maternos ($n=12$) para receber dois tipos de dieta (ração) especial – dieta AIN 93, também denominada dieta controle e dieta deficiente em ácido fólico (AF). As ratas que receberam a dieta controle foram ainda subdivididas em três grupos para que, além desta ração, recebessem a suplementação com AF nas doses de 5, 10 e 50 mg/kg, via oral (v.o.), desde o acasalamento, seguindo durante toda a gestação e lactação. No total, formaram-se cinco grupos experimentais maternos ($n=12$). Ao completar 60 dias de vida, a prole de machos adulta foi agrupada conforme a dieta materna para a indução do modelo animal de esQUIZOFRENIA através da administração intraperitoneal (i.p.) de salina ou cetamina (25 mg/kg) durante sete dias. Após a última administração de salina ou cetamina, os animais foram submetidos aos testes comportamentais. Posteriormente, foram eutanasiados em guilhotina e suas estruturas cerebrais, córtex frontal e hipocampo dissecadas, mantidas em freezer -80°C para posteriores análises bioquímicas dos parâmetros de estresse oxidativo e da atividade da enzima metiltransferase, sendo o estriado considerado apenas nesta última análise do padrão de metilação de DNA. Fonte: Desenho elaborado pela pesquisadora, 2017.

3.6 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS

As análises comportamentais, atividade locomotora, interação social, função sensório-motora e memória aversiva dos animais, foram realizadas no Laboratório de Neurociências (Neurolab).

3.6.1 Atividade locomotora

Trinta minutos após a última administração de salina ou cetamina, os animais foram submetidos individualmente à exploração em uma caixa de atividade locomotora com 50 x 25 x 50 cm de dimensões, contendo sensores laser acoplados a um computador (Activity Monitor, Insight Laboratory Equipment, Ribeirão Preto, SP). Este equipamento monitora a distância percorrida (em centímetros) pelo animal e reflete a atividade locomotora automaticamente, sendo o tempo de avaliação total (15 minutos) dividido em blocos de 5 minutos (Fig. 5) (Canever et al., 2010; De Oliveira et al., 2011). A distância total foi então calculada somando-se as mudanças de posições controladas pelo sistema (Zugno et al., 2013b).

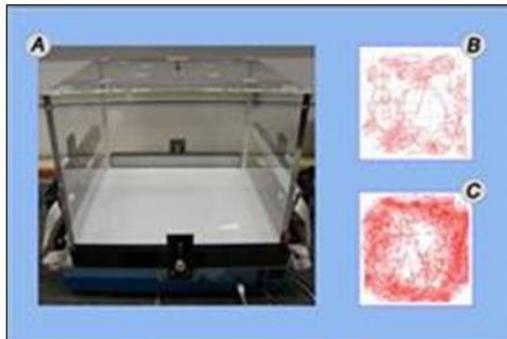


Figura 5: Representação do equipamento monitor de atividade locomotora. Fonte: Desenho elaborado pela pesquisadora, 2017.

Está bem descrito que a hiperlocomoção farmacologicamente induzida é um importante indicador dos sintomas positivos associados à esquizofrenia (Van Den Buuse, 2010). Assim, o objetivo do teste “campo aberto” é avaliar as mudanças comportamentais quando os ratos são colocados em um novo ambiente, como no meio de um espaço aberto, uma vez que a atividade exploratória e locomotora dos animais são analisadas (Canever et al., 2010; De Oliveira et al., 2011; Zugno et

al., 2013b). À medida que os animais sentem ansiedade, medo ou tem problemas de adaptação em um ambiente novo, as atividades exploratórias tendem a aumentar (Tsuchie et al., 2013).

3.6.2 Interação social

Existem inúmeros comportamentos sociais que são relevantes para a esquizofrenia e muitos deles são utilizados para estabelecer testes comportamentais pré-clínicos de sintomas negativos em uma variedade de espécies, variando entre roedores e primatas não humanos. O modelo que é mais amplamente utilizado neste contexto é o de interação social (Neill et al., 2014). Este avalia uma variedade de comportamentos exibidos por um sujeito (neste estudo, rato) quando exposto a um outro animal estranho (outro rato). Em geral, o teste de interação indica o perfil social dos animais, estando relacionado aos sintomas negativos da esquizofrenia. A resposta é quantificada de forma diferente dependendo do grupo de pesquisa (Neill et al., 2014).

Na presente pesquisa, no dia do experimento, após a última injeção de salina ou cetamina, os animais foram isolados socialmente em caixa de material plástico mensurando 43 x 28 x 15 cm e foram privados de água e comida por um período de seis horas antes do experimento. Posteriormente, animais de caixas diferentes, porém do mesmo grupo experimental, foram organizados em duplas e, colocados no campo aberto, uma caixa de acrílico (60 x 60 x 30 cm) com piso sólido para a realização do teste. O protocolo seguido neste estudo foi descrito por Niesink e Van Ree (1989) e Schneider e Przewlocki (2005). O comportamento social dos animais foi avaliado de par em par e não individualmente. O teste consistiu em analisar três parâmetros comportamentais da dupla de animais por um período de 15 minutos e os dados foram registrados manualmente. Desta forma, foi observado o tempo de latência (em segundos) para iniciar o contato entre os animais (seguir ou se aproximar do parceiro, a montagem sobre o parceiro, o cheirar ou grooming de qualquer parte do corpo do parceiro); o número total de contatos sociais e o tempo total em que os animais permaneceram em contato (Fig. 6) (Niesink e Van Ree, 1989; Schneider e Przewlocki, 2005). 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 acabam adormecendo juntos ao final do teste. A latência indica o grau de ansiedade, visto que o animal está no mesmo ambiente que outro rato desconhecido. 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).

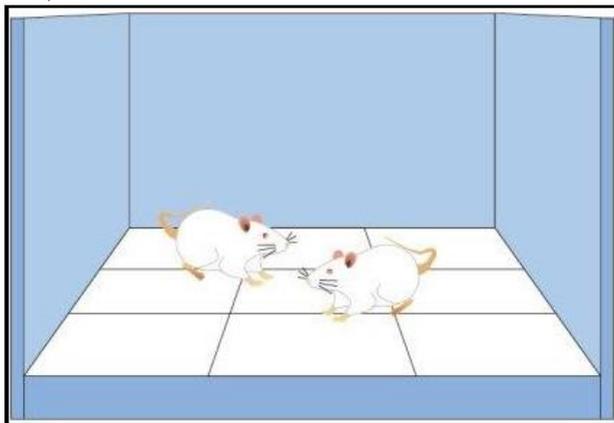


Figura 6: Representação do equipamento do teste de interação social. Fonte: Desenho elaborado pela pesquisadora, 2017.

O uso extensivo desse teste para mimetizar os sintomas negativos da esquizofrenia em animais se deve há algumas razões. Primeiramente, avaliar a interação social em animais é relativamente simples em comparação a outros sintomas negativos, como embotamento afetivo ou apatia. Esses sintomas são difíceis de mimetizar e até mesmo de identificar em animais, visto que a falta de resposta à emoção evocada por estímulos em animais pode ser completamente independente da falta de emoção. Em segundo lugar, diferente de muitas tentativas frustradas de modelar os aspectos mencionados anteriormente dos sintomas negativos, vários grupos foram capazes de mostrar com sucesso a inibição da interação social, induzida por antagonistas do receptor NMDA em animais (Sams-Dodd, 1998; Becker e Grecksch, 2004; Canever et al., 2010). Assim, a diminuição da interação social vem sendo estudada como um comportamento característico (sintoma negativo) em modelos animais de esquizofrenia e autismo (Schneider e Przewlocki, 2005; Diccio-Bloom et al., 2006).

3.6.3 Inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto (IPP)

Um dos modelos comportamentais mais utilizados para a avaliação dos sintomas da esquizofrenia, reconhecidamente um endofenótipo para o transtorno, é o modelo da IPP que oferece uma medida operacional do

filtro sensorio-motor refletido pela capacidade de inibição de um reflexo de sobressalto, quando um estímulo sensorial é precedido por outro de menor intensidade (Hoffman e Ison, 1980). A habilidade de discriminar estímulos externos de relevância fisiológica ou cognitiva, fornecida pelo filtro sensorio-motor, está comprometida em indivíduos com determinados transtornos psiquiátricos, como em pacientes esquizofrênicos (Salum et al., 2008).

A IPP é uma forma de plasticidade do reflexo do sobressalto, caracterizada por uma redução normal no sobressalto em resposta a um estímulo auditivo intenso (pulso), quando este é precedido imediatamente (30-500 ms) por um estímulo mais fraco (pré-pulso) (Fig. 7) (Weiss e Feldon, 2001). A ativação de processos cerebrais é aumentada em resposta ao estímulo fraco, o que impede a responsividade a eventos sensoriais posteriores durante uma rápida janela temporal. Este período protege a informação contida no estímulo inicial, para que seja adequadamente processada, durante o qual, somente estímulos suficientemente grandes serão capazes de ultrapassar este filtro protetor (Salum et al., 2008).

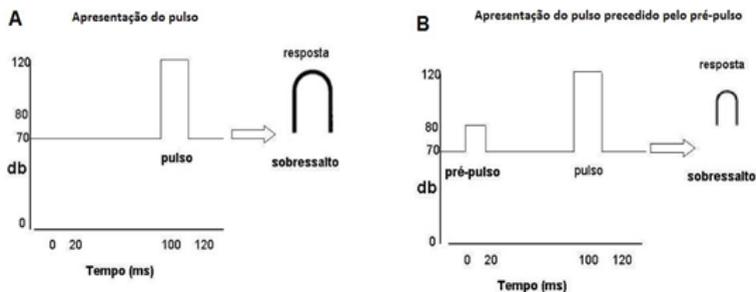


Figura 7: Esquema simplificado do mecanismo de inibição pré-pulso (IPP).
Fonte: Adaptado de Salum et al., 2008; Araújo, 2015.

Neste estudo a quantificação da IPP foi realizada de acordo com protocolo descrito por Levin et al. (2011). Trinta minutos após a última administração de salina ou cetamina, os animais foram submetidos ao teste. Foi utilizada uma caixa de medida de sobressalto com vedação sonora (Insight, São Paulo, Brasil) na qual 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 na caixa por um período de habituação de 5 minutos. O protocolo foi composto por 74 testes pseudo-randomizados, divididos em sete categorias distintas, apresentados com um intervalo de

20 segundos: 1) 20 apresentações de pulso sozinho (P) com uma intensidade de 120 dB por 50 ms; 2) 8 apresentações de cada intensidade de pré-pulso (PP) sozinho, intensidades de 70, 75 e 80 dB e 3000 Hz de frequência por 20 ms; 3) 10 apresentações de cada intensidade de PP + P, com um intervalo de 50 ms. No fenômeno de IPP, a diminuição da resposta ao P, estímulo repentino e intenso, ocorre quando esse é precedido de um PP, estímulo menos intenso (Fig. 8).

Assim, a IPP reflete a ação protetora do filtro sensorio-motor contra interferências: o estímulo mais fraco não só desencadeia o seu processamento, como também é capaz de suprimir o processamento de um estímulo mais forte subsequente (Graham, 1975). O resultado indica a porcentagem de IPP, avaliando assim as funções sensorio-motoras dos animais (Hoffman e Ison, 1980; Weiss e Feldon, 2001).

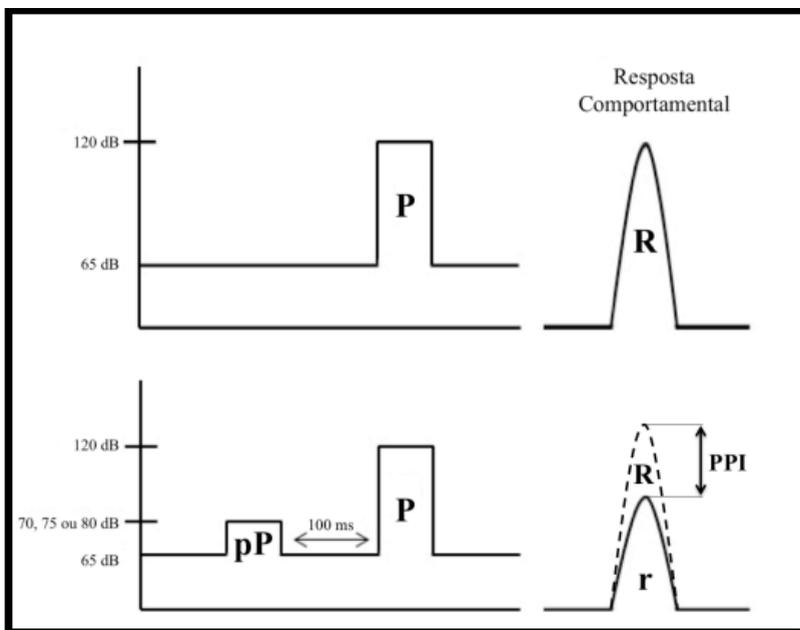


Figura 8:: Representação da inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto (IPP) – A figura representa a situação em que um estímulo forte (pulso, P) gera uma resposta (R), mas na presença de um estímulo fraco prévio (pré-pulso, PP), a resposta ao pulso é diminuída (r). O fenômeno de PPI é calculado a partir da diferença entre a resposta comportamental sem e com PP. Fonte: Adaptado de Koch e Schinztler (1997).

Drogas que induzem sintomas da esquizofrenia em humanos, como a cetamina, feniciclina, anfetamina, cocaína e a apomorfina reduzem a IPP. Porém, este efeito pode ser diminuído pelo tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos, mas nem sempre é abolido (Issy et al., 2009). A IPP ocorre naturalmente em humanos e na maioria dos animais experimentais, mas está diminuída ou ausente em esquizofrênicos (Mansbach et al., 1988). Assim, a IPP tem sido sugerida como um útil endofenótipo em potencial para a esquizofrenia e, por este motivo, foi avaliada nesta pesquisa.

3.6.1 Esquiva inibitória

Para analisar a memória aversiva dos animais (memória imediata ou de trabalho, memória de curto e longo prazo) um teste bastante utilizado é a esquiva inibitória. Este é baseado na tendência inata de roedores em explorar ambientes novos (Izquierdo et al., 1998; Bevilaqua et al., 2003; De Lima et al., 2005). Na esquizofrenia, a disfunção cognitiva não é global e generalizada, mas sim específica e seletiva, incluindo problemas de atenção e percepção, resolução de problemas, déficits na memória de trabalho e na memória de curto e longo prazo (Bégou et al., 2008). Dessa forma, este teste foi utilizado no presente estudo para verificar os sintomas cognitivos da esquizofrenia relacionados a diferentes tipos de memória aversiva nos animais.

O experimento foi realizado em uma caixa de acrílico, cujo 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 iniciou com uma sessão denominada treino, que aconteceu 24 horas após a última administração de salina ou cetamina. O animal foi colocado sobre a plataforma e o tempo que este levou para descer com as quatro patas nas barras de metal foi anotado (em segundos) e denominado de latência. Ao descer com as quatro patas nas barras de metal, o animal recebeu um choque de 0,4 mA por 2 segundos (Fig. 9). Cinco segundos após o treino, o rato foi submetido à segunda sessão, denominada como teste, sendo colocado novamente na plataforma e o tempo em segundos, denominado latência (no máximo 180 segundos) para o animal descer foi registrado, porém, nenhum choque foi acionado. Esta sessão avaliou a memória de trabalho ou imediata. Uma hora e meia depois, o animal foi submetido ao mesmo protocolo para avaliação da memória de curta duração (Izquierdo et al., 1998; Bevilaqua et al., 2003). No dia seguinte, 24 horas após a terceira sessão, foi avaliada a memória de longa duração no mesmo animal

(Bevilaqua et al., 2003; De Lima et al., 2005). A memória imediata, de curto e longo prazo foi considerada preservada quando o animal apresentou um tempo de latência estatisticamente maior nos testes que o tempo do treino.



Figura 9: Representação do equipamento esQUIVA inibitória utilizado para avaliar os sintomas cognitivos relacionados a diferentes tipos de memória aversiva nos animais. Fonte: Desenho elaborado pela pesquisadora, 2017.

3.7 ANÁLISESE BIOQUÍMICAS

Os parâmetros de estresse oxidativo, bem como a análise do marcador epigenético foram realizados em parceria com o Laboratório de Neurotoxicologia (Neurotox) da UNESC.

3.7.1 Preparo das amostras cerebrais

Após a eutanásia em guilhotina dos ratos machos (prole adulta), os cérebros foram removidos e dissecados em córtex frontal e hipocampo para análise dos parâmetros de estresse oxidativo e da atividade da enzima metiltransferase, sendo que para esta última análise, também foi considerado o estriado. Em geral, as amostras foram dissecadas em superfície gelada, posteriormente mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C para posteriores análises bioquímicas. Os tecidos cerebrais foram devidamente preparados de acordo com a técnica bioquímica a ser realizada.

3.7.2 Parâmetros de estresse oxidativo

3.7.2.1 Dano lipídico

Os marcadores de peroxidação lipídica, LPO (*No. 705003*) e 8-ISO (*No. 516351*), no córtex frontal e hipocampo foram avaliados por Kit ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – Cayman Chemical Company, USA*), conforme as recomendações do fabricante. Para quantificação dos níveis de 4-HNE (*STA-334-5*) também se utilizou Kit ELISA (*Cell Biolabs, Inc. - USA*), seguindo as instruções do fabricante.

3.7.3.2 Dano proteico

Os marcadores de dano proteico, conteúdo de grupos carbonila (*STA-310-5*) e 3-NT (*STA-305-5*), no córtex frontal e hipocampo, foram determinados através de Kit ELISA (*Cell Biolabs, Inc. – USA*), conforme as orientações do fabricante.

3.7.2.3 Enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas antioxidantes, SOD (*No. ab65354*) e CAT (*No. ab123456*) também foram avaliadas por Kit ELISA (*Abcam, USA*), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.8 PARÂMETROS EPIGENÉTICOS

3.8.1 Extração nuclear

Primeiramente todas as amostras foram submetidas ao protocolo de extração nuclear através do kit “Nuclear extraction Kit” (Cayman chemical, USA, N° 10009277) de acordo com as instruções do fabricante. Para isso, as amostras foram pesadas e homogeneizadas com 3ml/g de tecido com tampão hipotônico contendo fosfatase, inibidores de protease, ditiotreitól e reagente Nonidet p-40. Após homogeneizadas as amostras foram incubadas no gelo por 15 minutos e centrifugadas a 300g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pelet foi resuspendido em 500µL de tampão hipotônico e incubado por mais 15 minutos. As amostras foram então centrifugadas as 14000g por 30 segundos e o sobrenadante foi descartado. O pelet foi resuspendido em tampão de extração contendo inibidores de protease, inibidores de fosfatase e ditiotreitól. As amostras foram incubadas em gelo durante 30 minutos, com vórtex a cada 15 minutos. Após a incubação, estas foram centrifugadas a 14000g durante 10 minutos e o sobrenadante contendo a fração nuclear foi alicotado e armazenado em freezer a -80°C.

3.8.2 Atividade de metiltransferases no núcleo

A atividade de enzimas metiltransferases foi avaliada através do kit “Methyltransferase Fluorimetric Assay Kit” (Cayman chemical, USA, N° 700150) com adaptações para extratos nucleares. Nesse protocolo foi medida a concentração de resorufina, produto final dependente da atividade de metiltransferases dependentes do substrato SAM. Para isso, 5µL de amostras são adicionados em cada poço da placa de ensaio, logo após, são adicionados 100µL de Master Mixture, contendo tampão, mix de enzima, mix fluorimétrico e SAM. Imediatamente após, foi realizada a leitura cinética fluorimétrica da placa, a cada minuto, durante 30 minutos, utilizando um comprimento de onda de excitação de 535nm e um comprimento de onda de emissão de 590nm. Após foi calculado o aumento exponencial da concentração de resorufina de cada amostra, com base na curva padrão. A concentração de resorufina por minuto foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{RFU/min} = \frac{\text{RFU}(\text{tempo } 2) - \text{RFU}(\text{tempo } 1)}{\text{Tempo } 2 - \text{Tempo } 1}$$

OBS: RFU – Unidade Relativa de Fluorescência

O cálculo da atividade da metiltransferase foi realizado através da seguinte equação:

$$\text{Atividade de MT (nmol/min/mL)} = \frac{\text{RFU/min}}{\text{Curva de resorufina}} \times \text{concentração da amostra}$$

3.9 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As proteínas foram mensuradas de acordo com o método de Lowry et al. (1951) e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de normalidade foi realizado por meio de *Shapiro-Wilk*. Os resultados dos testes comportamentais, atividade locomotora, interação social e IPP, bem como os achados bioquímicos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, acompanhada do *post hoc de Newman-Keuls*, quando F foi significativo, exceto para análise da atividade da enzima metiltransferase, em que se utilizou o *post hoc de Duncan*. O efeito das dietas maternas, salina, cetamina e a interação entre as variáveis (fatores) foi verificado por ANOVA de duas vias.

Quando não houve interação entre as variáveis, ANOVA de uma via seguida pelo teste de *Newman-Keuls* ou *Duncan* (metiltransferase) foi utilizada para avaliar a diferença entre os grupos. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Os resultados do teste comportamental esquiva inibitória foram expressos por mediana e intervalos interquartis e, analisados pelo teste de *Wilcoxon* para comparações dentro de grupos individuais e, *Kruskal-Wallis H* para comparações entre os grupos. Em todas as análises, valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Dois programas foram utilizados para a realização das análises estatísticas: *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) e o software *Statística 7.0*. Todos os gráficos foram elaborados no programa *Graphpad Prism*.

4. RESULTADO

4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.1.1 Atividade locomotora

A distância percorrida pelos animais está representada na Fig. 10. ANOVA de duas vias não revelou interação significativa entre as variáveis: dietas maternas + salina e cetamina [$F(4,95) = 1,48, p = 0,21$]. ANOVA de uma via demonstra que houve diferença entre os grupos [$F(9,95) = 20,74, p \leq 0,01$]. Foi observado que a cetamina administrada na prole adulta de mães que receberam dieta controle (grupo cetamina) induziu hiperlocomoção nos animais ($p \leq 0,01$) quando comparado ao grupo controle (dieta controle+salina), mimetizando o sintoma positivo da esquizofrenia. A prole adulta tratada com cetamina, cujas mães receberam dieta deficiente em AF e suplementação com AF (5, 10 e 50 mg/kg), apresentou um aumento significativo na atividade locomotora em relação ao grupo controle ($p \leq 0,01$). Os animais que receberam cetamina e suas mães dieta deficiente em AF (dieta deficiente AF+cetamina) também apresentaram hiperlocomoção quando comparado ao grupo deficiente (dieta deficiente AF+salina) ($p \leq 0,01$).

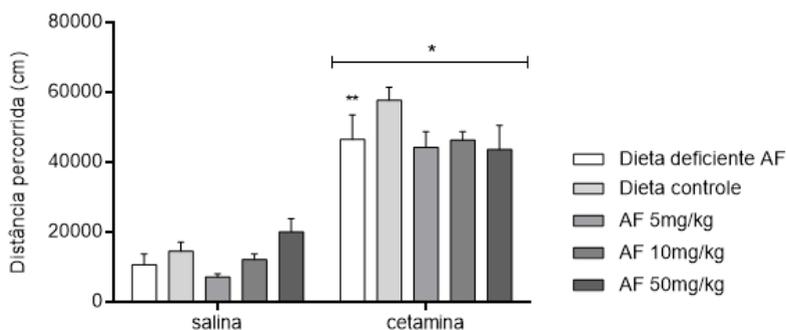


Figura 10: Representação do teste de atividade locomotora na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram submetidas à dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas controle suplementadas com diferentes doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,01$. N = 9-11). * diferente do grupo controle (dieta controle+salina); ** diferente do grupo deficiente em AF (dieta deficiente AF+salina). Fonte: Dados da pesquisadora, 2017.

4.1.2 Interação social

A cetamina também induz déficits sociais, conforme observado pela interação social no teste de campo aberto (Fig. 11). Na latência (Fig. 11A), ANOVA de duas vias não demonstrou interação entre as variáveis: dietas maternas + salina e cetamina [$F(4,70) = 2,10, p = 0,09$]. ANOVA de uma via revelou diferença significativa na prole adulta tratada com cetamina, cujas mães foram expostas à deficiência de AF em relação ao grupo deficiente em AF (dieta deficiente AF+salina) ($p \leq 0,05$), uma vez que houve um aumento no tempo para o primeiro contato entre os animais. Esse achado parece indicar que a cetamina contribuiu para um pior desempenho social na prole adulta.

De forma semelhante à latência, para o tempo total de contatos sociais (Fig. 11B), a cetamina não foi capaz de mimetizar o modelo animal de esquizofrenia, pois não houve alteração em ambos parâmetros de interação social. Por outro lado, para o tempo total de contatos, ANOVA de duas vias revelou interação significativa entre as variáveis acima descritas: [$F(4,70) = 4,01, p \leq 0,01$]. Foi observado que a prole adulta tratada com cetamina, cujas mães foram suplementadas com AF (50 mg/kg), apresentou um aumento no tempo de contatos sociais quando comparado ao grupo controle e ao grupo cetamina ($p \leq 0,05$).

Para o número de contatos (Fig. 11C), ANOVA de duas vias indica que houve interação entre as variáveis: dietas maternas + salina e cetamina [$F(4,70) = 3,89, p \leq 0,01$]. Os resultados apontam que os animais adultos tratados com salina, cujas mães receberam dieta deficiente em AF e suplementação com AF (5 mg/kg), apresentaram um menor número de contatos sociais quando comparado ao grupo controle ($p \leq 0,05$). A administração de cetamina na prole de mães expostas à dieta controle (grupo cetamina) foi capaz de diminuir o número total de contatos ($p \leq 0,01$) e mimetizar um sintoma tipo negativo nos animais, reproduzindo o modelo de esquizofrenia. A prole adulta tratada com cetamina, cujas mães receberam dieta deficiente em AF, demonstrou uma redução no número de interações sociais quando comparado ao grupo controle ($p \leq 0,01$), o que sugere um possível efeito sinérgico da deficiência materna de AF associada à cetamina na vida tardia dos animais. Os animais tratados com cetamina, cujas mães receberam suplementação com AF (10 mg/kg), também apresentaram um menor número de contatos em relação ao grupo controle ($p \leq 0,01$), resultado provavelmente atribuído a uma ação predominante da cetamina nestes animais adultos.

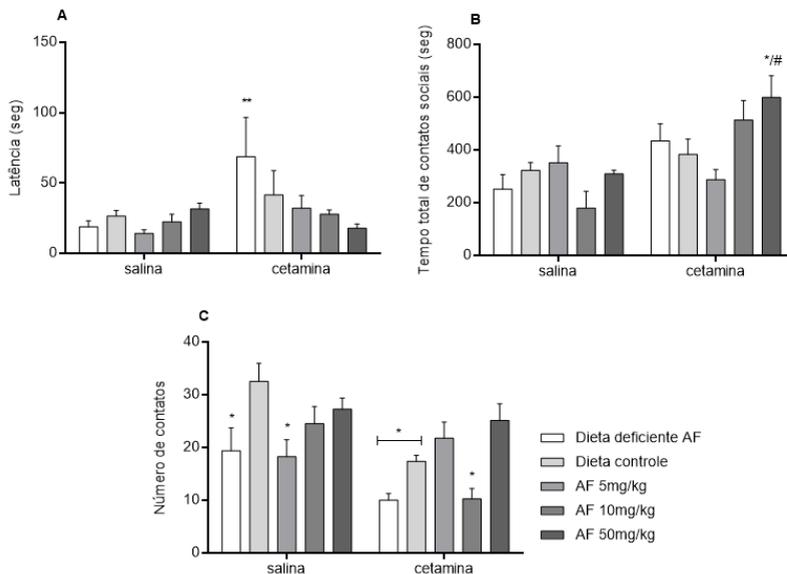


Figura 11: Parâmetros de interação social (painel A = latência, painel B = tempo total de contato e painel C = número de contatos sociais) na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas controle suplementadas com diferentes doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação. Os valores foram expressos como média \pm EPM, sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,05$. $N = 8$. * diferente do grupo controle (dieta controle+salina); # diferente do grupo cetamina (dieta controle+cetamina); ** diferente do grupo deficiente em AF (dieta deficiente AF+salina). Fonte: Dados da pesquisadora, 2017.

4.1.3 Inibição por pré-pulso do reflexo de sobresalto (IPP)

A Fig. 12 retrata os resultados da função sensório-motora, a partir do teste IPP, obtidos na prole adulta submetida ao modelo de esquizofrenia. ANOVA de duas vias demonstrou interação significativa entre as variáveis: dietas maternas, salina + cetamina em duas intensidades avaliadas no teste: 70dB [$F(4,80) = 2,60, p \leq 0,05$] e 80dB [$F(4,80) = 2,47, p \leq 0,05$]. Para 75dB, ANOVA de duas não revelou interação entre as variáveis acima: [$F(4,80) = 1,75, p = 0,14$], no entanto, ANOVA de uma via indica que houve diferença entre os grupos [$F(9,80) = 3,61, p \leq 0,01$]. Verificou-se que a administração de cetamina na prole adulta de mães que receberam dieta controle (grupo cetamina) reduziu o percentual de IPP quando comparado ao grupo controle para as três

intensidades estudadas: 70dB, 75dB e 80dB ($p \leq 0,01$). Este achado sugere que a cetamina desencadeou um déficit no perfil sensório-motor e, conseqüentemente, um comprometimento cognitivo nos animais adultos, o que confirma a indução do modelo de esquizofrenia.

A prole adulta tratada com salina, cujas mães receberam diferentes doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg), demonstrou um aumento no percentual de IPP para as três intensidades avaliadas: 70dB ($p \leq 0,01$), 75dB ($p \leq 0,01$) e 80dB ($p \leq 0,05$) quando comparado ao grupo cetamina, indicando que a suplementação de AF nas mães refletiu no bom desempenho cognitivo na vida adulta da prole. Os animais que receberam cetamina e suas mães AF (5, 10 e 50 mg/kg) demonstraram uma boa performance cognitiva neste teste, entretanto, não houve diferença estatística em relação aos grupos controle e cetamina.

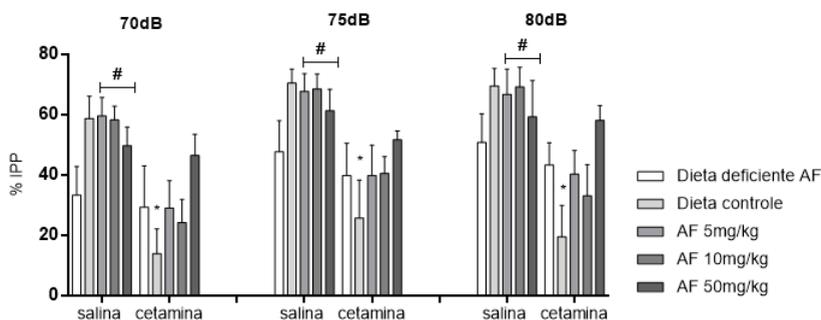


Figura 12: Efeito das dietas maternas, deficiente em AF, dieta controle e dietas controle suplementadas com diferentes doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação na função sensório-motora, a partir do teste de IPP, na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia. Os valores foram expressos como média \pm EPM, sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,05$. $N = 8-10$. * diferente do grupo controle (dieta controle+salina); # diferente do grupo cetamina (dieta controle+cetamina). Fonte: Dados da pesquisadora, 2017.

4.1.4 Esquiva inibitória

Os resultados referentes ao efeito das dietas maternas e da administração de salina ou cetamina na prole adulta sobre a memória aversiva dos animais foi obtido através do teste esquiva inibitória e estão representados na Fig. 13. Foi verificado que todos os grupos, com exceção do grupo cetamina (dieta controle+cetamina) apresentaram diferença significativa nas memórias de curto e longo prazo em relação ao treino ($p \leq 0,05$). A prole adulta tratada com salina, cujas mães foram

expostas à dieta controle (grupo controle) ($p = 0,058$), à suplementação com AF (50 mg/kg) ($p = 0,259$), bem como os animais adultos que receberam cetamina e suas mães dieta deficiente em AF ($p = 0,063$), dieta suplementada com AF (10 mg/kg) ($p = 0,074$) e AF (50 mg/kg) ($p = 0,058$), apresentaram um déficit na memória de trabalho (imediate). Vale ressaltar que a administração de cetamina na prole adulta de mães expostas à dieta controle reduziu significativamente o tempo de latência nas memórias de curto e longo prazo dos animais ($p \leq 0,05$) quando comparado ao grupo controle, confirmando que houve um comprometimento na memória aversiva dos animais do grupo cetamina. A suplementação materna de AF (5, 10 e 50 mg/kg) apresentou um possível efeito duradouro na prole adulta submetida ao modelo de esquizofrenia, ao prevenir os déficits na memória de curta e longa duração nestes animais.

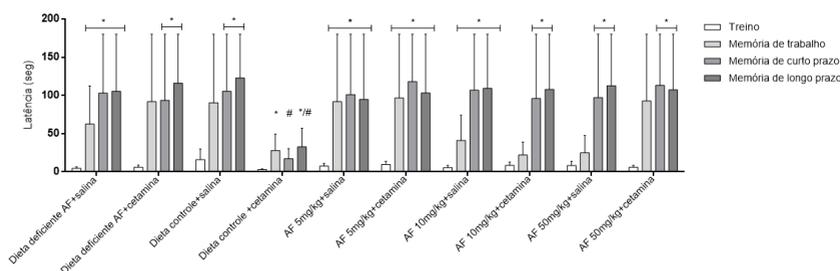


Figura 13: Efeito das dietas maternas, deficiente em AF, dieta controle e dietas controle suplementadas com diferentes doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação na memória aversiva obtida através do teste esquivo inibitório, na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia. Os valores foram expressos por mediana e intervalos interquartis e, analisados pelo teste de Wilcoxon para comparações dentro de grupos individuais e, Kruskal-Wallis H para comparações entre os grupos. Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$. $N = 8-10$. * comparado ao treino do respectivo grupo; # comparado ao mesmo tipo de memória (curto e longo prazo) em relação ao grupo controle (dieta controle+salina). Fonte: Dados da pesquisadora, 2017.

4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.2.1 Parâmetros de peroxidação lipídica

Os marcadores de dano lipídico no córtex frontal e hipocampo, respectivamente, da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF, dieta

controle e dietas controle suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg) são apresentados na Fig. 14: LPO (Fig. 14A e 14B); 4-HNE (Fig. 14C e 14D) e 8-ISO (Fig. 14E e 14F). ANOVA de duas vias revelou interação significativa entre variáveis: dietas maternas + salina e cetamina apenas para o LPO no córtex frontal [$F(4,40) = 38,31, p \leq 0,01$]. Para os marcadores 4-HNE e 8-ISO, ANOVA de duas vias demonstra que não houve interação entre as variáveis acima: [$F(4,40) = 2,29, p = 0,07$] e [$F(4,40) = 2,33, p = 0,07$], respectivamente. Assim, ANOVA de uma via apontou diferença significativa entre os grupos para os marcadores 4-HNE [$F(9,40) = 27,19, p \leq 0,01$] e 8-ISO [$F(9,40) = 56,82, p \leq 0,01$].

Os achados ilustram no córtex frontal que a dieta materna deficiente em AF associada à salina na prole adulta (dieta deficiente AF+salina) aumentou todos os marcadores de peroxidação lipídica avaliados: LPO (Fig. 14A); 4-HNE (Fig. 14C) e 8-ISO (Fig. 14E) quando comparado ao grupo controle ($p \leq 0,01$). A cetamina administrada nos animais adultos, cujas mães receberam dieta controle (grupo cetamina), aumentou significativamente os níveis de LPO, 4-HNE e 8-ISO na prole em relação ao grupo controle ($p \leq 0,01$), o que indica que a cetamina induziu peroxidação lipídica, comprovando seu efeito sobre as alterações bioquímicas na prole adulta submetida ao modelo de esquizofrenia. No córtex frontal, a dieta materna deficiente em AF associada à cetamina nos animais adultos também aumentou os níveis de LPO, 4-HNE e 8-ISO quando comparado ao grupo controle ($p \leq 0,01$). No entanto, apenas para o marcador LPO, a prole adulta tratada com cetamina, cujas mães foram expostas à deficiência de AF, apresentou níveis reduzidos de LPO em relação ao grupo cetamina ($p \leq 0,01$). A deficiência materna de AF combinada à cetamina nos animais adultos aumentou os níveis de 4-HNE e 8-ISO em relação ao grupo cetamina ($p \leq 0,01$) e ao grupo deficiente em AF ($p \leq 0,01$).

Convém salientar que a prole adulta tratada com salina, cujas mães receberam AF (5, 10 e 50 mg/kg), apresentou níveis de LPO, 4-HNE e 8-ISO semelhantes aos do grupo controle, o que sugere um efeito protetor persistente do AF na vida tardia da prole. No córtex frontal, somente a suplementação materna de AF (50 mg/kg) associada à salina na prole adulta foi capaz de reduzir os níveis de 8-ISO (Fig. 14E) quando comparado ao grupo controle ($p \leq 0,01$). Para o marcador LPO (Fig. 14A), foi observado que a administração de cetamina nos animais adultos associada a suplementação materna de AF (5 mg/kg) induziu dano lipídico em relação ao grupo controle ($p \leq 0,01$). Por outro lado, a suplementação com AF (5, 10 e 50 mg/kg) associada à cetamina na

prole adulta reduziu significativamente os níveis de LPO em relação ao grupo cetamina ($p \leq 0,01$).

Em relação aos níveis de 4-HNE no córtex frontal (Fig. 14C), a administração de cetamina na prole de mães suplementadas com AF (5 e 10 mg/kg) aumentou os níveis de peroxidação lipídica quando comparado ao grupo controle ($p \leq 0,01$). Em contrapartida, a suplementação materna de AF (50 mg/kg) associada à cetamina nos animais adultos foi capaz de reduzir significativamente os níveis de 4-HNE quando comparado ao grupo cetamina ($p \leq 0,01$), o que sugere para este marcador bioquímico, que apenas a suplementação de AF na dose mais elevada foi capaz de prevenir o efeito da cetamina na prole adulta induzida ao modelo de esquizofrenia.

Para o marcador 8-ISO (Fig. 14E), no córtex frontal, foi observado que a administração de cetamina na prole adulta de mães suplementadas com AF (5 mg/kg) aumentou o dano lipídico em relação ao grupo controle ($p \leq 0,01$). Em contrapartida, a suplementação com AF (10 e 50 mg/kg) associada à cetamina nos animais adultos foi capaz de reduzir os níveis de 8-ISO em relação ao grupo cetamina ($p \leq 0,01$), sugerindo um efeito neuroprotetor persistente do AF na vida adulta da prole induzida ao modelo de esquizofrenia.

No hipocampo (Fig. 14B, 14D e 14F), ANOVA de duas vias não revelou interação entre as variáveis: dietas maternas + salina e cetamina para os três marcadores de dano lipídico analisados: LPO [$F = (4,40) = 0,16$, $p = 0,95$]; 4-HNE [$F = (4,40) = 1,45$, $p = 0,23$] e 8-ISO [$F = (4,40) = 0,76$, $p = 0,55$], respectivamente, e também não foi observada diferença significativa entre os grupos para estes marcadores bioquímicos.

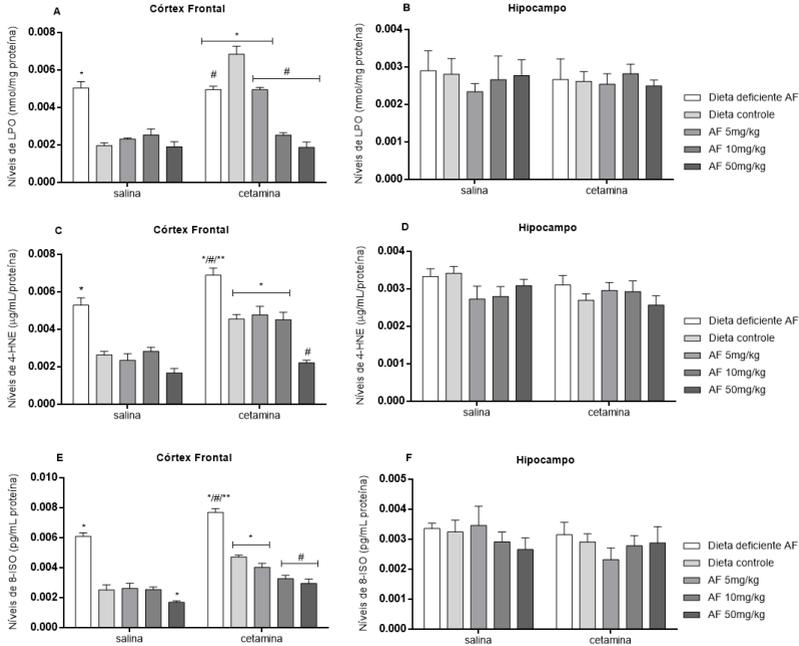


Figura 14: Parâmetros de peroxidação lipídica: LPO (painel A = córtex frontal, painel B = hipocampo); 4-HNE (painel C = córtex frontal, painel D = hipocampo) e 8-ISO (painel E = córtex frontal, painel F = hipocampo) na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas controle suplementadas com diferentes doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação. Os valores foram expressos como média ± EPM, sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,01$. N = 5. * diferente do grupo controle (dieta controle+salina); # diferente do grupo cetamina (dieta controle+cetamina); ** diferente do grupo deficiente em AF (dieta deficiente AF+salina). Fonte: Dados da pesquisadora, 2017.

4.2.2 Parâmetros de dano oxidativo a proteínas

Os marcadores de dano proteico, conteúdo de grupos carbonila (proteínas carboniladas) e 3-NT, são apresentados na Fig. 15, respectivamente, no córtex frontal (Fig. 15A e 15C) e hipocampo (Fig. 15B e 15D), da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas controle suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação. ANOVA de duas vias revelou interação

entre as variáveis: dietas maternas + salina e cetamina apenas para o conteúdo de grupos carbonila no córtex frontal: [$F = (4,40) = 29,29, p \leq 0,01$] (Fig. 15A).

A deficiência materna de AF associada à salina na prole adulta foi capaz de aumentar o conteúdo de proteínas carboniladas em relação ao grupo controle ($p \leq 0,01$). Do mesmo modo, a dieta deficiente em AF nas mães combinada à cetamina na prole adulta aumentou a carbonilação de proteínas nestes animais quando comparado ao grupo deficiente em AF, grupo controle e grupo cetamina ($p \leq 0,01$), o que indica que a insuficiência de AF durante a fase gestacional contribuiu para o dano proteico na vida adulta da prole. Os animais adultos tratados com cetamina, cujas mães receberam dieta controle (grupo cetamina), demonstraram níveis aumentados do conteúdo de grupos carbonila em relação ao grupo controle ($p \leq 0,01$), o que comprova o efeito da cetamina sobre o dano proteico no modelo de esquizofrenia. A cetamina administrada nos animais adultos, cujas mães receberam suplementação de AF (5 mg/kg) ($p \leq 0,01$) e AF (10 mg/kg) ($p \leq 0,05$), parece ter contribuído para o aumento da carbonilação de proteínas nos animais quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, a suplementação materna de AF (10 e 50 mg/kg) associada à cetamina na prole adulta reduziu o dano proteico em relação ao grupo cetamina ($p \leq 0,01$).

No hipocampo (Fig. 15B), para o conteúdo de grupos carbonila, ANOVA de duas vias aponta que não houve interação significativa entre as variáveis: dietas maternas + salina e cetamina: [$F (4,40) = 0,76, p = 0,55$] e também não foi observada qualquer diferença significativa entre os grupos. Da mesma forma, para o marcador 3-NT, no córtex frontal e hipocampo (Fig. 15C e 15D), ANOVA de duas vias não indicou interação entre as variáveis acima: [$F = (4,40) = 0,24, p = 0,91$] e [$F = (4,40) = 0,15, p = 0,96$], respectivamente. ANOVA de uma via foi utilizada para verificar diferenças estatísticas e revelou que não houve diferença entre os grupos para este marcador bioquímico.

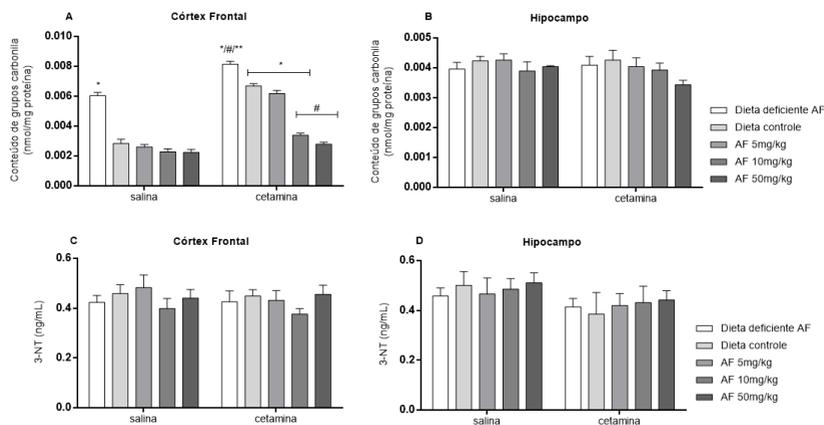


Figura 15: Parâmetros de dano proteico: conteúdo de grupos carboníla (painel A = córtex frontal, painel B = hipocampo) e 3-NT (painel C = córtex frontal, painel D = hipocampo) na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas controle suplementadas com diferentes doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação. Os valores foram expressos como média \pm EPM, sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,01$. N = 5. * diferente do grupo controle (dieta controle+salina); # diferente do grupo cetamina (dieta controle+cetamina); ** diferente do grupo deficiente em AF (dieta deficiente AF+salina). Fonte: Dados da pesquisadora, 2017.

4.2.3 Atividade das enzimas antioxidantes

No presente estudo também foi avaliada a atividade das enzimas antioxidantes, SOD (Fig. 16A e 16B) e CAT (Fig. 16C e 16D), no córtex frontal e hipocampo, respectivamente, da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas controle suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação. ANOVA de duas vias revela que houve interação significativa entre as variáveis: dietas maternas + salina e cetamina para ambas as enzimas, SOD e CAT respectivamente, no córtex frontal: $[F = (4,40) = 15,53, p \leq 0,01]$ e $[F = (4,40) = 22,74, p \leq 0,01]$ e no hipocampo: $[F = (4,40) = 30,12, p \leq 0,01]$ e $[F = (4,40) = 18,00, p \leq 0,01]$.

No córtex frontal e hipocampo, os resultados apontam que a deficiência materna de AF associada à salina e cetamina na prole adulta aumentou a atividade das enzimas SOD e CAT quando comparado ao grupo controle ($p \leq 0,01$). Em adição, foi verificado apenas no córtex frontal (Fig. 16A) que a prole adulta tratada com cetamina, cujas mães

receberam dieta deficiente em AF, apresentou uma atividade aumentada da SOD em relação ao grupo deficiente ($p \leq 0,01$). Observou-se ainda que, em ambas as estruturas cerebrais, os animais adultos tratados com cetamina, cujas mães receberam dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas controle suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg), apresentaram um aumento significativo na atividade da SOD e CAT quando comparado ao grupo controle ($p \leq 0,01$).

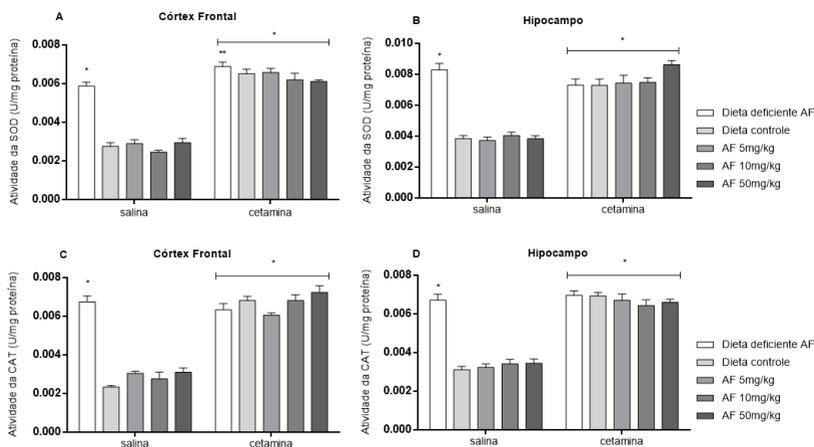


Figura 16: Atividade das enzimas antioxidantes: SOD (painel A = córtex frontal, painel B = hipocampo) e CAT (painel C = córtex frontal, painel D = hipocampo) na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas controle suplementadas com diferentes doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação. Os valores foram expressos como média \pm EPM, sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,01$. N = 5. * diferente do grupo controle (dieta controle+salina); ** diferente do grupo deficiente em AF (dieta deficiente AF+salina). Fonte: Dados da pesquisadora, 2017.

4.3 PARÂMETROS EPIGENÉTICOS

4.3.1 Atividade da enzima metiltransferase

A presente pesquisa avaliou também a atividade da enzima metiltransferase (Fig. 17), em extratos nucleares das estruturas cerebrais: córtex frontal (Fig. 17A), hipocampo (Fig. 17B) e estriado (Fig. 17C) da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas controle suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação. ANOVA de duas vias revelou interação

significativa entre as variáveis: dietas maternas + salina e cetamina, no córtex frontal: [$F = (4,31) = 2,78, p \leq 0,05$] e no estriado: [$F = (4,31) = 2,91, p \leq 0,05$]. No hipocampo, ANOVA de duas vias aponta que não houve interação entre as variáveis acima citadas: [$F (4,31) = 1,25, p = 0,30$], porém ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos [$F (9,29) = 4,92, p \leq 0,05$].

No córtex-frontal (Fig. 17A), foi observado que a prole adulta tratada com salina, cujas mães receberam suplementação com AF (50 mg/kg), apresentou um aumento na atividade da metiltransferase em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$). Os animais adultos tratados com cetamina, cujas mães foram suplementadas com AF (5 mg/kg) ($p \leq 0,05$) e AF (50 mg/kg) ($p \leq 0,01$), demonstraram uma atividade aumentada desta enzima quando comparado aos grupos controle e cetamina. No hipocampo (Fig. 17B), de modo similar, foi observado um aumento na atividade da metiltransferase em ambos os animais adultos administrados com salina ($p \leq 0,05$) e cetamina ($p \leq 0,01$), no entanto, suas mães foram expostas à suplementação com AF (10 mg/kg) durante a fase gestacional. No córtex frontal e hipocampo, tanto a deficiência materna de AF quanto a cetamina na vida adulta da prole (modelo animal de esquizofrenia) parece não ter afetado a metilação, uma vez que ambos os fatores não foram capazes de alterar a atividade da enzima metiltransferase.

No estriado (Fig. 17C), entretanto, a prole adulta tratada com cetamina, cujas mães receberam dieta deficiente em AF ($p \leq 0,05$), dieta controle (grupo cetamina) ($p \leq 0,01$) e dieta suplementada com AF (5 mg/kg) ($p \leq 0,05$), apresentou uma redução significativa na atividade da enzima metiltransferase quando comparado ao grupo controle. Nesta estrutura cerebral, a cetamina parece ter apresentado um efeito predominante na vida adulta dos animais, uma vez que isolada (grupo cetamina) reduziu a atividade da metiltransferase. Entretanto, a suplementação materna de AF (50 mg/kg) associada à cetamina nos animais adultos aumentou a atividade da enzima metiltransferase no estriado, indicando que o AF materno apresentou uma provável ação duradoura na prole adulta, sendo capaz de alterar este marcador epigenético envolvido na metilação do DNA.

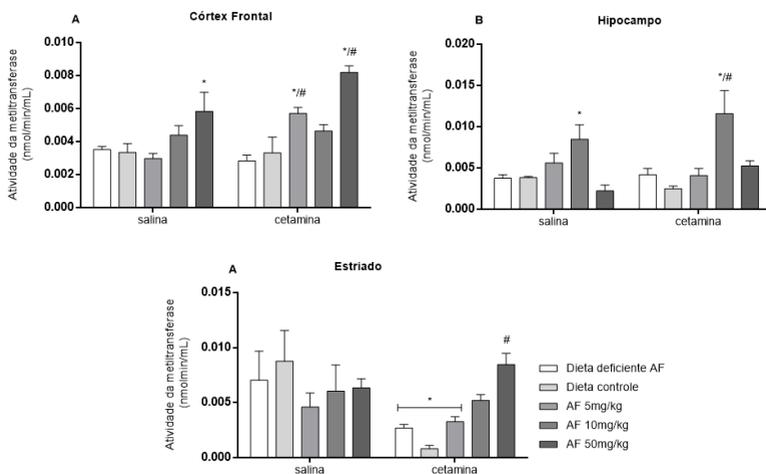


Figura 17: Atividade da enzima metiltransferase (painel A = córtex frontal, painel B = hipocampo, painel C = estriado) na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas controle suplementadas com diferentes doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação. Os valores foram expressos como média \pm EPM, sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,05$. N = 5. * diferente do grupo controle (dieta controle+salina); # diferente do grupo cetamina (dieta controle+cetamina). Fonte: Dados da pesquisadora, 2017.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo aponta que a cetamina induziu o modelo animal de esquizofrenia, mimetizando os sintomas positivos (hiperlocomoção) e negativos (redução de contatos sociais), além de prejuízos cognitivos (déficit na IPP e dano na memória aversiva) na prole adulta, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas controle suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação. É sabido que os sintomas positivos e negativos, bem como o prejuízo cognitivo induzido pela cetamina são atribuídos, em especial, ao bloqueio dos receptores NMDA (Balla et al., 2009; Chatterjee et al., 2012). Este bloqueio, localizado nos neurônios inibitórios GABAérgicos das regiões límbica e subcortical do cérebro, produz um aumento da atividade neuronal no circuito límbico-estriatal, devido aumento da liberação de glutamato e dopamina, sendo este evento relacionado aos sintomas positivos da esquizofrenia. Ademais, o bloqueio dos receptores NMDA na ATV induz uma menor liberação de dopamina no córtex pré-frontal, pois a produção basal de neurônios dopaminérgicos que se projetam para essa região está sob o controle excitatório dos receptores glutamatérgicos NMDA e receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) na ATV, bem como dos receptores AMPA no córtex pré-frontal, sendo portanto, esse bloqueio parcialmente responsável pelos sintomas negativos e cognitivos do transtorno (Chatterjee et al., 2012).

Com base nisso, a administração repetida de cetamina é considerada um bom modelo farmacológico para indução de sintomas tipo esquizofrenia, pois apresenta validade de face, constructo e preditiva comprovada (Reddy e Yao, 1996; De Oliveira et al., 2009; Chindo et al., 2012). Neste contexto, Zugno et al. (2017) e Canever et al. (2017) sugerem a hipótese de que insultos precoces durante o período pré-natal, tais como tabagismo ou deficiência de AF maternos, podem interferir com o sistema glutamatérgico, levando a uma sensibilidade importante aos efeitos da cetamina na vida tardia da prole. De fato, Zugno et al. (2017) observaram que animais adultos tratados com cetamina, cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro durante a gravidez, apresentaram hiperlocomoção e tempo de latência aumentado para iniciar o contato quando comparado ao grupo controle. Tais achados, ao menos em parte, estão em concordância com os resultados da atual pesquisa, uma vez que a dieta materna deficiente em AF associada à cetamina na prole adulta foi capaz de aumentar a atividade locomotora,

o tempo de latência para o primeiro contato social e reduzir o número de interações entre os animais. Em conjunto, estes dados reforçam que tanto a exposição ao tabagismo como a deficiência nutricional no período de gestação pode afetar o comportamento na idade adulta da prole submetida ao modelo de esquizofrenia, confirmando a hipótese acima. Tudo isso também comprova que a presença de um fator estressor durante a fase gestacional pode levar a alterações no neurodesenvolvimento dos animais que persistem ao longo da vida, contribuindo para a fisiopatologia deste transtorno (Krebs et al., 2009).

A administração de cetamina na prole adulta de mães suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg) induziu hiperatividade, a qual não foi prevenida pelo AF materno, o que indica que o efeito da cetamina prevaleceu na vida adulta dos animais, provavelmente devido à hipofunção do receptor NMDA e uma interação entre os sistemas dopaminérgico e glutamatérgico (Zugno et al., 2017).

Além disso, devido ao bloqueio do influxo de Ca^{2+} , os antagonistas do receptor NMDA em roedores induzem dificuldades de interação social que se assemelham aos sintomas negativos da esquizofrenia em humanos (Becker e Grecksch, 2004). Estudo confirma que a cetamina induziu isolamento social em humanos (Micallef et al., 2003) e, do mesmo modo na presente pesquisa, foi verificado um comportamento semelhante ao déficit social, evidenciado pela redução do número de contatos entre os animais. De forma similar, Gama et al. (2012) e Zugno et al. (2013a; 2016; 2017) observaram que administração de cetamina mimetizou o prejuízo social em ratos, corroborando as alterações sociais encontradas em pacientes esquizofrênicos (Neill et al., 2010).

Conforme já relatado, a dieta materna deficiente em AF associada à cetamina na prole adulta aumentou o tempo de latência e diminuiu o número de contatos entre os animais, sugerindo que a combinação de ambos fatores (deficiência materna de AF e cetamina) foi capaz de impactar expressivamente no comportamento social dos animais induzidos ao modelo de esquizofrenia. Com efeito, Gunawardana et al. (2011) apontam que a deficiência pré-natal de AF caracteriza-se como um fator de risco para a esquizofrenia na idade jovem-adulta dos filhos. Assim, a dieta materna equilibrada em micronutrientes desempenha um papel crucial na prevenção de transtornos psiquiátricos na prole por influenciar o desenvolvimento do cérebro (Peleg-Raibstein et al., 2012; Van Abeelen et al., 2012). Em adição, a presente pesquisa verificou que os animais adultos tratados com cetamina, cujas mães foram suplementadas com AF (10 mg/kg), apresentaram uma redução no número de interações sociais, possivelmente devido a ação

predominante da cetamina na vida tardia da prole, uma vez que quando isolado (grupo cetamina), este fármaco foi capaz de reduzir o número de contatos entre os animais.

Neste estudo atual, a prole adulta tratada com cetamina cujas mães receberam suplementação com AF (50 mg/kg) apresentou um aumento no tempo de contato social, o que pode ser atribuído a uma possível ação persistente do AF na dose mais elevada nestes animais. De fato, achados evidenciam a importância da nutrição materna na fase neurodesenvolvimental, uma vez que o AF age diretamente no metabolismo de 1C e é essencial para a transcrição gênica, metabolismo da Hcy e síntese de neurotransmissores (Krebs et al., 2009; Hill et al., 2011).

Gunawardana et al. (2011) reforçam que níveis maternos diminuídos de AF estão relacionados ao aumento de Hcy, a qual é neurotóxica em altas concentrações. A Hcy pode ser considerada um marcador dos níveis de AF, sendo capaz de alterar o neurodesenvolvimento por induzir estresse oxidativo e interagir com receptores NMDA, consequentemente, levando a hipofunção destes receptores glutamatérgicos, os quais estão diretamente envolvidos na patogênese da esquizofrenia (Goff e Coyle, 2001; Brown et al., 2007). Assim, estudo de coorte conduzido na Califórnia com crianças nascidas entre 1959 e 1967 mostrou que a hiperhomocisteïnemia (HHcy) materna durante o terceiro trimestre da gestação está associada ao maior risco de esquizofrenia nos filhos, confirmando a relação entre AF, Hcy e este transtorno (Brown et al., 2007; Xu et al. 2009). Tal associação também foi observada na pesquisa realizada recentemente por Canever et al. (2017), corroborando as informações acima.

Canever et al. (2017) demonstraram que a dieta deficiente em AF durante a gestação e lactação causou prejuízos na memória espacial, avaliada através do teste Y maze nas ratas mães, além de aumentar significativamente os níveis plasmáticos maternos de Hcy. É sabido que a deficiência de AF afeta a síntese, o reparo e a metilação do DNA e pode alterar a expressão de genes que regulam o neurodesenvolvimento, além de causar alterações na fluidez da membrana neuronal, comprometer a função sináptica e a síntese de neurotransmissores, inclusive de dopamina, podendo contribuir para a etiologia da esquizofrenia na prole (Gunawardana et al. 2011; Keenan et al., 2013). Em contrapartida, Canever et al. (2017) observaram que a suplementação materna com AF (5 e 10 mg/kg) preveniu o comprometimento cognitivo e o AF (5, 10 e 50 mg/kg) normalizou os níveis de Hcy nestas mães, confirmando o efeito protetor do AF

materno. Devido às inúmeras funções desta vitamina, Brocardo et al. (2008a) e Budni et al. (2012) ilustram o papel do AF na prevenção da morte e excitotoxicidade neuronal, o que pode explicar a ação neuroprotetora do AF nas mães.

Dando continuidade à pesquisa acima, esta tese também avaliou os parâmetros cognitivos na prole adulta submetida ao modelo de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas controle suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação. Está bem consolidado que em roedores, o bloqueio repetido do receptor NMDA induz déficits na IPP (Mansbach et al., 1988) e na memória (Izquierdo et al., 1998; Bevilaqua et al., 2003; De Lima et al., 2005), os quais se assemelham aos sintomas cognitivos da esquizofrenia em humanos. De fato, Zugno et al. (2017) verificaram que a prole adulta tratada com cetamina, cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro durante a gravidez, demonstrou comprometimento na memória de trabalho, memória de curto e longo prazo, bem como déficit no perfil sensorio-motor, confirmando a validade da cetamina e os efeitos do estresse pré-natal na vida tardia da prole.

Diante disso, a função sensorio-motora foi avaliada neste trabalho através do teste IPP que tem sido considerado um bom instrumento para avaliar o perfil cognitivo (Isolan et al., 2007). É sabido que essa função está severamente comprometida na esquizofrenia, ou seja, há um déficit do processamento da informação nos pacientes esquizofrênicos (Laurent et al., 1999). A IPP é classificada como um endofenótipo neurofisiológico (Greenwood et al., 2007) e o déficit da IPP está relacionado a alguns sintomas deste transtorno, como alterações de pensamento e distração (Turetsky et al., 2007). Adicionalmente, as estruturas corticais e límbicas, como córtex pré-frontal, hipocampo e estriado, estão diretamente envolvidas com o controle das funções sensorio-motoras (Swerdlow et al., 2001), portanto, o teste de IPP tem como objetivo avaliar o controle desempenhado por estas estruturas sobre o sistema de filtro sensorio-motor ou detectar déficits neste processo. O mecanismo de filtro parece preservar o sistema nervoso de um elevado número de informações (Weiss e Feldon, 2001).

Levando em consideração que estas estruturas cerebrais estão alteradas na esquizofrenia (Swerdlow e Geyer, 1998) e que este transtorno desencadeia dano intelectual e prejuízo de memória, atenção e execução em humanos (Weickert et al., 2000), o presente estudo verificou que a cetamina administrada na prole adulta reproduziu o dano cognitivo ao reduzir o percentual de IPP nos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia. Farber et al. (1995) reportam que a cetamina

induz dano e morte neuronal em regiões córtico-límbicas de ratos adultos. Ademais, evidências suportam que as alterações comportamentais produzidas por esta substância são, em parte, vinculadas ao bloqueio de receptores NMDA em interneurônios GABAérgicos, desencadeando uma desinibição da atividade neuronal nas estruturas do sistema límbico, como o córtex pré-frontal, e a demasiada liberação de glutamato e dopamina nessas regiões cerebrais (Moghddam et al., 1997; Lorrain et al., 2003; Razoux et al., 2007). Mohn et al. (1999), inclusive, mostraram a redução de receptores NMDAR1 (NR1) em ratos geneticamente modificados e o conseqüente déficit social e cognitivo. Similarmente, Chatterjee et al. (2011) e Zugno et al. (2014) verificaram que a administração de cetamina levou ao comprometimento cognitivo em ratos, mesmo após a suspensão do tratamento.

Na presente pesquisa também foi observado que a prole adulta tratada com salina, cujas mães receberam diferentes doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg), apresentou um aumento no percentual de IPP, o que sugere que o AF materno refletiu no bom desempenho cognitivo dos animais adultos. Em desacordo a estes achados, Wald et al. (2010) não verificaram efeito protetor do AF, na presença ou ausência de outras vitaminas do complexo B, sobre a função cognitiva. Todavia, Sable et al. (2011) enfatizam que os benefícios do AF apenas podem ser observados na presença de vitamina B12 e relatam que o desequilíbrio nutricional materno leva ao estresse oxidativo, o que pode influenciar os processos neuronais no feto e contribuir para os transtornos neurodesenvolvimentais na prole. Portanto, os resultados deste estudo apontam que a administração de cetamina comprometeu o perfil sensório-motor na prole adulta. Porém, nos animais tratados com cetamina, cujas mães foram suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg), esta vitamina não melhorou significativamente o perfil cognitivo, mas foi capaz de impedir o possível efeito predominante da cetamina na vida tardia da prole, prevenindo assim o dano na IPP nestes animais. Estes dados evidenciam que o AF suplementado durante a fase gestacional parece ter desempenhado um efeito protetor neste parâmetro cognitivo na vida adulta da prole e são consistentes, pelo menos em parte, as observações de Wang et al. (2017), as quais referem uma melhora no reflexo sensório-motor de animais que foram avaliados na infância, cujas mães foram suplementadas com AF (3,5 mg/kg) durante a gestação.

Wang et al. (2017) em seu estudo, focaram na análise do período de suplementação de AF (fase periconcepcional; apenas durante o

acasalamento; fase gestacional), a fim de verificar qual período foi capaz de levar ao melhor desenvolvimento comportamental da prole. Observaram, portanto, que a prole de mães suplementadas com AF durante a gravidez apresentou melhor desempenho cognitivo (perfil sensorio-motor na infância e capacidade de memória espacial na adolescência e vida adulta) do que a prole de mães cuja suplementação foi limitada ao período periconcepcional. Tudo isso confirma os efeitos protetores do AF materno durante a gestação na saúde mental da prole (McGarel et al., 2015) e ainda contribui para explicar o motivo pelo qual a pesquisa atual optou por oferecer às ratas mães, a dieta deficiente ou suplementada com AF durante a fase neurodesenvolvimental (gestação e lactação). No mais, a suplementação de AF em mulheres grávidas geralmente é interrompida após o primeiro trimestre de gestação, porém no terceiro trimestre pode haver um aumento nos níveis de Hcy, em especial nas mulheres que não estão suplementando o AF (Brown et al., 2007), justamente porque neste período final de gravidez há um aumento drástico nas necessidades de micro e macronutrientes do organismo, tanto para a manutenção da saúde e bem-estar da mãe, como para o adequado desenvolvimento fetal (Darnton-Hill e Mkpuru, 2015), o que também justifica o desenho experimental deste estudo.

Diante disso, Wang et al. (2017) tentam elucidar os mecanismos responsáveis pela aparente superioridade da suplementação contínua de AF durante a gravidez no comportamento da prole. O primeiro mecanismo está relacionado ao fato de que o AF tem efeitos benéficos persistentes no desenvolvimento do cérebro, inclusive após o fechamento do tubo neural, uma vez que em torno do 11º dia gestacional em ratos, o SNC começa a formar neuroepitélio e, em seguida, a porção caudal do tubo neural dá origem à medula espinhal (Dwyer et al., 2009) e as regiões cerebrais (córtex, hipocampo, estriado) mediante rápidos processos de morfogênese e sinaptogênese que acontecem no feto ao final do período gestacional e na fase pós-natal precoce (McGarel et al., 2015). O segundo mecanismo sugere que a suplementação de AF apenas no período periconcepcional pode contribuir para uma mudança persistente no fenótipo, levando a lesões cerebrais na prole se os níveis maternos de AF não forem mantidos adequados durante toda gestação (Burdge e Lillycrop, 2014). Por exemplo, Wang et al. (2017) verificaram que a concentração materna de AF nas mães que receberam suplementação durante 10 dias consecutivos a partir do acasalamento, diminuiu quando a suplementação cessou, o que pode ter gerado uma deficiência no fornecimento de AF para o feto, o qual já tinha se adaptado a um maior aporte desta vitamina.

A presente tese avaliou ainda a memória aversiva na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas às dietas deficientes e suplementadas com AF durante a gestação e lactação. Nesta perspectiva, foi observado que a cetamina induziu déficits na memória de curto e longo prazo nos animais, sendo capaz de mimetizar alterações cognitivas no modelo de esquizofrenia. Tais achados estão em concordância aos resultados de Enomoto e Floresco (2009), Gama et al. (2012) e Zugno et al. (2017), os quais demonstraram um comprometimento na memória aversiva dos animais, comprovando que a cetamina é capaz de causar prejuízos cognitivos associados à perda de memória e percepção do animal (Kidd, 2007).

Está bem consolidado na literatura que os micronutrientes maternos (AF e vitamina B12) desempenham um papel crítico no desenvolvimento cerebral do feto e na saúde cognitiva da prole (Blaise et al., 2007; Gueant et al., 2013). Desta forma, o estresse pré-natal, inclusive a deficiência materna de AF, se caracteriza como um fator etiológico para a esquizofrenia (Jadavji et al., 2015), a medida em que pode influenciar mudanças neurodesenvolvimentais no córtex pré-frontal que se manifestam como alterações cognitivas ou neuroquímicas, conforme observado em pacientes esquizofrênicos (Negrón-Oyarzo et al., 2016). Esta região cerebral é considerada a principal área envolvida no controle executivo (Fuster, 2001; Miller e Cohen, 2001). Estudos clínicos demonstram que fatores estressores durante a gravidez podem afetar as funções cognitivas nos filhos, tais como a memória de trabalho, controle da ansiedade e estratégias de aprendizagem (Schwabe et al., 2004; Mennes et al., 2006; Entringer et al., 2009; Buss et al., 2011). Do mesmo modo, pesquisas em roedores indicam que o estresse materno altera a cognição dependente do córtex límbico na prole adulta (Weinstock, 2008; Richetto e Riva, 2014), o que pode estar relacionado à patogênese da esquizofrenia (Moore et al., 2011; Levine et al., 2014). Nesta fase de desenvolvimento neurofisiológico, condições estressoras pré-natais, são capazes de afetar a sincronização neuronal entre o córtex pré-frontal e o hipocampo, impactando na consolidação de memórias (Nieuwenhuis e Takashima, 2010; Richetto e Riva, 2014), uma vez que estas regiões são críticas para este processo (Antunes e Biala, 2012).

No presente estudo, ao contrário do esperado, a dieta materna deficiente em AF durante a gestação e lactação, independentemente do tratamento com salina ou cetamina na prole adulta, não alterou os parâmetros cognitivos avaliados (IPP e memória aversiva) nos animais, contrastando os dados acima da literatura. Diferentemente dos resultados observados nesta tese, Wang et al. (2017) verificaram que a

deficiência de AF durante a gestação levou ao atraso no desenvolvimento do reflexo sensorio-motor na infância e comprometeu a capacidade de aprendizagem e memória na adolescência e idade adulta da prole. Estes dados foram explicados pelo fato do aporte insuficiente de AF interferir no metabolismo de 1C, uma vez que os níveis plasmáticos de Hcy nas mães e na prole encontraram-se aumentados. Sabe-se que o folato promove a metilação da Hcy em metionina através deste ciclo (Bhatia e Singh, 2015). Por este mecanismo, a deficiência de AF induz HHcy (Li et al., 2005), que pode desencadear estresse oxidativo, levando a apoptose e danos cerebrais (Obeid e Herrmann, 2006; Dhobale e Joshi, 2012; Jadavji et al., 2012). Ademais, o aumento da Hcy materna pode elevar os níveis de Hcy no feto e impactar em alterações comportamentais na prole (Blaise et al., 2007). A HHcy, juntamente com o estresse oxidativo, pode comprometer as funções do SNC por danificar a BHE (Abbott, 2013; Kalani et al., 2014), inibir a mielinização axonal (Tiwari et al., 2015) e interferir nos processos sinápticos e, em consequência, influenciar o comportamento da prole (Franco-Pons et al., 2007; Fan et al., 2008), reduzindo a capacidade de aprendizagem e memória espacial (Yang et al., 2015), conforme evidenciado por Wang et al (2017).

Considerando os achados da atual pesquisa, em que a deficiência materna de AF não comprometeu o perfil cognitivo na prole adulta, alguns pontos devem ser destacados. Primeiramente, Canever et al. (2017) em estudo anterior a esta tese, reportam que a dieta deficiente em AF durante a gestação e lactação causou prejuízos na memória espacial das ratas mães e aumentou os níveis plasmáticos maternos de Hcy. Entretanto, na prole adulta, independentemente do tratamento com salina ou cetamina, não foi observado alteração nos níveis plasmáticos de Hcy nestes animais, cujas mães foram expostas à deficiência de AF. O fato da dieta materna deficiente em AF não ter alterado os níveis de Hcy na prole adulta pode sugerir, ao menos nos parâmetros cognitivos, que o aporte insuficiente de AF na fase neurodesenvolvimental não apresentou uma ação duradoura na vida tardia da prole e, por conseguinte, não prejudicou a cognição dos animais. Estes dados também podem estar relacionados a outros fatores, tais como: as possíveis reservas de AF nas mães podem ter sido suficiente para suprir a necessidade desta vitamina na prole durante a gestação e lactação, prevenindo o declínio cognitivo na vida adulta; a introdução da dieta padrão do Biotério para a prole, logo após o desmame, pode ter normalizado os níveis de AF nos animais, cujas mães receberam dieta deficiente em AF, contribuindo para preservar as funções cognitivas na

prole adulta. Neste contexto, Sable et al. (2012) enfatizam que a dieta pós-natal é capaz de normalizar o metabolismo de 1C, o que poderia colaborar para o entendimento dos resultados desta tese. De qualquer forma, ressalta-se que nas ratas mães (Canever et al., 2017), a relação entre deficiência pré-natal de AF, HHcy e dano cognitivo foi comprovada, corroborando estudo de Moustafa et al. (2015).

Pesquisas elucidam que o AF ajuda a melhorar a memória, devido ao controle do dano oxidativo e à manutenção da integridade neuronal, inclusive durante o envelhecimento (Singh et al., 2011), desempenhando um papel neuroprotetor (Matté et al., 2009). Com base nisso, os dados deste estudo evidenciam que a suplementação materna de AF (5, 10 e 50 mg/kg) apresentou um possível efeito protetor persistente na prole adulta submetida ao modelo de esquizofrenia, uma vez que não houve declínio cognitivo (dano nas memórias de curto e longo prazo) nestes animais, reforçando os achados de Wang et al. (2017) anteriormente relatados. Por conseguinte, a memória de trabalho não foi prevenida pelo AF (10 e 50 mg/kg) na prole adulta, o que pode estar relacionado ao fato desta análise ter sido realizada imediatamente após o treino, fase em que ocorre o choque, o qual pode desencadear estresse ou ansiedade no rato, interferindo inclusive na memória imediata dos animais (Tuon et al., 2008). Em adição, Canever et al. (2017) observaram que a suplementação materna com AF (5 e 10 mg/kg) preveniu o comprometimento cognitivo nas mães desta prole, no entanto, o AF (50 mg/kg) induziu dano na memória espacial materna. Entretanto, convém salientar que na prole adulta submetida ao modelo de esquizofrenia, essa dose mais elevada de AF materno (50 mg/kg) não apontou qualquer ação prejudicial, mas ao contrário, preveniu o dano na memória aversiva dos animais.

Contrariando os resultados acima desta tese, Bahous et al. (2017) revelam que a suplementação de AF (20 mg/kg) durante a gestação e lactação em roedores desencadeou prejuízos de memória na prole jovem (21 dias). Isto foi atribuído ao elevado consumo materno de AF, o qual pode ter efeitos negativos similares à dieta deficiente em AF, inclusive porque o excesso desta vitamina é capaz de inibir a MTHFR, uma enzima essencial para o ciclo de 1C, o que poderia inativar outras enzimas ou transportadores dependentes do AF. Assim, Bahous et al. (2017) supõem que doses maternas elevadas de AF levam a uma “falsa deficiência da MTHFR” tanto nas mães como na prole, com conseqüente perturbações nesta via metabólica. Neste sentido, Sable et al. (2012) encontraram níveis relativamente baixos de AF na prole de mães suplementadas com AF (2 e 8 mg/kg) durante a gestação, tanto na

ausência como na presença de vitamina B12 e sugerem que a maior dose de AF materna (8 mg/kg) pode ter desequilibrado o metabolismo de 1C, tornando o AF inativo, o que resultou na deficiência de AF na prole. Em conjunto, isso pode ter contribuído para reduzir os níveis maternos de AF e comprometer a transferência de folato para a prole, levando a impactos no metabolismo desta vitamina e em processos neuronais, como plasticidade sináptica, cognição e fatores neurotróficos na vida tardia dos animais.

Diante disso, do mesmo modo que a deficiência de AF durante a gravidez pode ter consequências para a prole, estudos recentes têm revelado que níveis plasmáticos maternos aumentados de AF podem estar associados ao maior risco de desenvolvimento de autismo em crianças (Barua et al., 2014b; Barua et al., 2016a; Raghavan, et al., 2016), possivelmente devido às disfunções no metabolismo do AF, ao atraso do crescimento intrauterino e os prejuízos cognitivos relatados acima por Bahous et al. (2017). Em contrapartida, vale ressaltar que na presente tese, não se observou qualquer efeito tóxico do AF materno em doses elevadas no comportamento da prole adulta, mas sim efeitos protetores, em particular nas funções cognitivas. De qualquer forma, não ter avaliado os níveis plasmáticos e cerebrais de AF maternos e na prole adulta e não ter suplementado a vitamina B12 nas mães durante a fase gestacional, bem como não ter dosado seus níveis maternos e na prole, podem ser consideradas limitações desta pesquisa, uma vez que Sable et al. (2013) reforçam que os efeitos da suplementação materna são determinados não apenas pelo tempo e dose do nutriente suplementado, mas também pela combinação de diferentes micronutrientes (AF, vitamina B12 e DHA), os quais agem em conjunto. Além disso, uma alimentação materna inadequada pode predispor o aparecimento de transtornos na prole, como a esquizofrenia, a qual se torna mais aparente na idade jovem-adulta, mas pode ter início na vida fetal mediante situações de estresse materno (Cannon et al., 2008; Roy et al., 2012). Desta forma, a determinação de um limite superior seguro de suplementação de AF durante a fase gestacional, bem como o equilíbrio de nutrientes maternos tem um papel crítico para a saúde mental da prole (Bahous et al., 2017; Wang et al., 2017).

O AF está envolvido no estresse oxidativo, porém o seu papel nesta condição deve ser melhor investigado. Uma hipótese para explicar a relação entre transtornos mentais e vitaminas é a "hipótese da Hcy" (Kennedy, 2016), uma vez que em excesso, este aminoácido induz estresse oxidativo, o que tem impactos sobre a função cerebral, mediante alterações na síntese de neurotransmissores, neurotoxicidade e

disfunção mitocondrial (Parletta et al., 2013). Em adição, o aporte materno inadequado de AF, vitamina B12 e ômega 3 durante o crescimento e desenvolvimento fetal influenciam os níveis plasmáticos e neuronais de lipídios e proteínas, danificando estas moléculas, o que pode determinar a vulnerabilidade do indivíduo aos transtornos psiquiátricos, como a esquizofrenia (Sable et al., 2011).

Com efeito, o estresse oxidativo está fortemente relacionado à fisiopatologia da esquizofrenia e estudos experimentais apontam que esta condição induz anormalidades comportamentais e moleculares em animais semelhantes às observadas em pacientes esquizofrênicos (Koga et al., 2016). Metabólitos da peroxidação lipídica aumentados, tais como MDA e 4-HNE, levam a maior susceptibilidade ao dano neuronal, disfunção mitocondrial e, conseqüentemente, morte neuronal (Keller et al., 1999; Ramos-Loyo et al., 2013). Desta forma, Dietrich-Muszalska e Olas (2009a) verificaram um aumento considerável nos níveis de isoprostanos na urina de indivíduos com esquizofrenia e constataram que o 4-HNE, o principal produto da peroxidação lipídica aldeídica do ômega-6, é um mediador chave do dano mitocondrial induzido pelo estresse oxidativo e também tem sido altamente relevante para a esquizofrenia, conforme descrito por Ciobica et al. (2011). Do mesmo modo, a oxidação de proteínas está bastante envolvida neste transtorno e pode seriamente comprometer a integridade celular (Dietrich-Muszalska et al., 2009; Bošković et al., 2011). Em particular, a carbonilação de proteínas tem se mostrado aumentada na esquizofrenia, especialmente em pacientes que apresentam baixos níveis de vitamina B6 e AF. Existe ainda um subgrupo de pacientes esquizofrênicos com altos níveis de carbonilação proteica idiopática e depleção de vitamina B6 (Arai et al., 2012).

Sendo assim, o presente estudo avaliou os parâmetros de estresse oxidativo na prole adulta. Os resultados ilustram que a cetamina alterou os níveis de LPO, 4-HNE, 8-ISO e o conteúdo de grupos carbonila no córtex frontal dos animais. Este anestésico atua como um antagonista do receptor NMDA e é extensivamente utilizado para mimetizar modelos animais de esquizofrenia, desencadeando estresse oxidativo e hipofunção do receptor NMDA (Chatterjee et al., 2011). Pesquisas anteriores deste laboratório (Canever et al., 2010; De Oliveira et al., 2011; Zugno et al., 2013a; 2014; 2016) confirmam a validade da cetamina neste modelo animal, mediante sua capacidade de induzir alterações comportamentais e bioquímicas no cérebro dos animais, corroborando os achados desta tese. Ressalta-se que a cetamina não alterou os níveis do marcador de dano proteico, 3-NT, na prole adulta.

Tal achado pode ser atribuído ao fato de que este dano parece ser mais reversível quando comparado à carbonilação de proteínas (Irie et al., 2003, Osoata et al., 2009). De modo semelhante, Genius et al. (2013), ao induzir o modelo animal de esquizofrenia através do MK-801, não verificaram mudanças nos níveis de 3-NT no hipocampo e giro denteado dos animais, o que indica que este marcador pode ser, de fato, mais resistente. Ademais, foi observado nesta tese que a prole adulta tratada com cetamina (grupo cetamina) demonstrou um aumento considerável no conteúdo de grupos carbonila, os quais possivelmente mostraram-se mais sensíveis aos efeitos da cetamina e da deficiência materna de AF, sofrendo alterações.

Em geral, a dieta deficiente em AF durante a gestação e lactação associada ao tratamento com salina e cetamina na prole adulta apontou uma possível ação persistente, uma vez que os níveis de LPO, 4-HNE, 8-ISO e a carbonilação de proteínas permaneceram elevados no córtex frontal, comprovando o dano oxidativo na vida tardia dos animais. Brown et al. (2007) sugerem que concentrações maternas elevadas de Hcy, em especial no terceiro trimestre de gestação, podem ser um fator de risco para a esquizofrenia. Assim, Canever et al. (2017) verificaram um aumento nos níveis plasmáticos de Hcy nas mães da prole avaliada nesta tese e, embora a prole adulta não tenha apresentado HHcy ou prejuízos cognitivos, quando analisados os marcadores de estresse oxidativo, estes animais revelaram peroxidação lipídica e dano proteico no córtex frontal, o que pode estar relacionado à HHcy materna durante a fase gestacional.

Adicionalmente, evidências têm identificado uma importante associação entre a severidade dos sintomas negativos e o estresse oxidativo (Sarandol et al., 2007; Pazvantoglu et al., 2009; Ramos-Loyo et al., 2013). Diante de tudo, os achados desta tese, ao menos em parte, estão em concordância com a hipótese de Brown et al. (2007) e parecem corroborar as informações sobre estresse oxidativo e sintomas negativos. Isso por ser atribuído ao fato da deficiência materna de AF ter sido capaz de induzir dano oxidativo, aumentar o tempo de latência e reduzir o número de contatos sociais entre os animais, sugerindo um sintoma negativo tipo esquizofrenia na prole adulta, o qual poderia ainda, ser atribuído a alterações na síntese de dopamina, devido ao aporte materno insuficiente de AF (Prado et al., 2017). Em conjunto, estes dados suportam uma provável relação entre deficiência pré-natal de AF, estresse oxidativo e esquizofrenia na prole adulta (Bitanirwe e Woo, 2011).

Por outro lado, foi observado nesta pesquisa que a suplementação de AF durante a fase gestacional, especialmente nas doses mais elevadas (10 e 50 mg/kg), foi capaz de prevenir o efeito da cetamina nos marcadores de dano lipídico e proteico no córtex frontal da prole adulta, indicando que a possível ação neuroprotetora do AF materno persistiu na vida adulta dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia. Zugno et al. (2016) verificaram que o AF (5, 10 e 50 mg/kg) suplementado durante 7 e 14 dias preveniu a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas no modelo animal de esquizofrenia. Similarmente, Brocardo et al. (2010) demonstraram um efeito protetor do AF (50 mg/kg) administrado por um período de 7 dias contra o dano lipídico no modelo animal de mania. Em resumo, estes resultados reforçam o efeito antioxidante do AF, mediante sua capacidade de combater radicais livres, ERO e ERN no cérebro (Joshi et al., 2001). Brocardo et al. (2008a) e Budni et al. (2012) sugerem que o AF desempenha um papel inibitório sobre os receptores glutamatérgicos NMDA, o que contribui ainda para explicar a ação protetora do AF, conforme os resultados desta tese, uma vez que a cetamina induziu estresse oxidativo e o AF preveniu este dano. Estes achados despertam a atenção para o importante papel desta vitamina no neurodesenvolvimento, neuroplasticidade e na manutenção da integridade cerebral (Hyland et al., 2010), prevenindo o dano oxidativo e a excitotoxicidade neuronal (Brocardo et al., 2008a).

De fato, as vitaminas do complexo B parecem exercer um efeito neuroprotetor através da modulação do estresse oxidativo induzido pela Hcy no cérebro (Zhang et al., 1998; Boldyrev e Jonhson, 2007). Roy et al. (2012) propõem que o estresse oxidativo desencadeado pela deficiência materna de nutrientes, como AF, pode persistir na adolescência e na vida adulta, contribuindo para o início de doenças neurodesenvolvimentais. Estes dados, ao menos em parte, foram confirmados nesta tese, uma vez que a deficiência de AF durante a gestação e lactação induziu dano oxidativo na prole submetida ao modelo de esquizofrenia.

Está bem descrito que baixos níveis de AF estão diretamente relacionados ao aumento da Hcy (Hyland et al., 2010; Micle et al., 2012), o que leva à diminuição tanto do potencial quanto da atividade de enzimas antioxidantes (Garcia et al., 2005). Bitanhirwe e Woo (2011) reforçam que alterações nos sistemas antioxidantes podem ser relevantes para a esquizofrenia. Todavia, evidências têm relatado dados controversos sobre estas enzimas em indivíduos esquizofrênicos.

Em pacientes com esquizofrenia crônica, a atividade da SOD tem se mostrado elevada em várias pesquisas (Herken et al., 2001b; Gama et al., 2006; Sarandol et al., 2007; Padurariu et al., 2010; Wu et al., 2011), no entanto, em pacientes no primeiro episódio psicótico observou-se uma atividade diminuída da SOD (Mukerjee et al., 1996; Ranjekar et al., 2003). Achados de Wu et al. (2011) revelaram que pacientes esquizofrênicos não medicados, tanto no primeiro episódio como os pacientes crônicos, apresentaram aumento na atividade plasmática da SOD quando comparado aos indivíduos controle e, ainda, pacientes crônicos medicados com antipsicóticos demonstraram uma atividade da SOD significativamente maior que os indivíduos esquizofrênicos no primeiro episódio psicótico. Outro estudo, por exemplo, reporta que a atividade da SOD em eritrócitos de pacientes com esquizofrenia está diminuída (Zhang et al., 2010), enquanto Raffa et al. (2011) não relatam mudança na atividade desta enzima. Já a atividade da CAT foi encontrada aumentada nos estudos de Pulido et al. (2005) e Herken et al. (2001a; 2001b), em outras pesquisas mostrou-se diminuída (Reddy et al., 1991; Ben Othmen et al., 2008; Raffa et al., 2011) e ainda há estudos (Yao et al., 1998; Srivastava et al., 2001; Zhang et al., 2010; Miljevic et al., 2010) que não demonstraram alteração na atividade desta enzima em indivíduos esquizofrênicos.

Embora os níveis diminuídos destas enzimas possam indicar uma implicação direta devido ao aumento do estresse oxidativo, os níveis aumentados podem refletir um efeito compensatório das enzimas para combater o dano oxidativo presente na célula. Assim, os achados contraditórios parecem depender de fatores como a presença de sintomas clínicos e a terapêutica seguida pelo paciente com esquizofrenia. Também, podem ser atribuídos ao estado dinâmico das enzimas antioxidantes, as quais estão envolvidas em outras vias e sistemas biológicos, dependendo do equilíbrio da célula (Wu et al., 2013).

Diante disso, nesta tese, verificou-se que a prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia através da administração de cetamina apresentou um aumento na atividade das enzimas antioxidantes, SOD e CAT no córtex frontal e hipocampo, possivelmente na tentativa de controlar a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas induzida pela própria cetamina. Estudo realizado por este grupo de pesquisa sugere que a cetamina induz alterações na atividade da SOD e CAT e, inclusive, danos a lipídeos e proteínas (De Oliveira et al., 2009). De qualquer forma, ressalta-se que os dados referentes às enzimas

antioxidantes são controversos na esquizofrenia, o que também pode contribuir para a compreensão destes achados.

A deficiência materna de AF, independentemente da administração de salina ou cetamina na prole adulta, foi capaz de aumentar a atividade da SOD e CAT, provavelmente visando neutralizar o dano oxidativo gerado pela insuficiência de AF durante a fase gestacional, uma vez que este dano persistiu na vida tardia dos animais. Outra explicação se dá pela tentativa de combater o dano lipídico e proteico induzido pela cetamina na prole adulta. Os achados também apontam que os animais adultos tratados com cetamina, cujas mães receberam suplementação com AF (5, 10 e 50 mg/kg), apresentaram um aumento na atividade da SOD e CAT no córtex frontal e hipocampo. Este aumento pode ter ocorrido como uma forma de controlar o efeito pró-oxidativo da cetamina ou com o objetivo de estimular a ação antioxidante do AF, a fim de minimizar o estresse oxidativo induzido por este fármaco nos animais, o que confirma que o AF materno teve uma ação protetora persistente, em especial, no córtex frontal.

Diante deste aumento da atividade da SOD e CAT no hipocampo, estrutura cerebral cujos marcadores de dano lipídico e proteico não se mostraram alterados, um aspecto importante deve ser considerado: os radicais livres, ERO e ERN poderiam estar presentes no hipocampo, porém não causaram um dano oxidativo significativo a ponto de aumentar os marcadores de estresse oxidativo, mas foram capazes de ativar as enzimas antioxidantes. Possivelmente, este aumento de radicais livres sinalizou uma maior quantidade de substrato para as enzimas tentarem combater, o que pode ter contribuído para o aumento da atividade da SOD e CAT, apesar do dano oxidativo não ter sido diretamente verificado nesta estrutura cerebral. Desta forma, Wu et al. (2013) sugerem que os níveis aumentados das enzimas antioxidantes retratam um mecanismo compensatório deste sistema ou um dano oxidativo precedente na célula, o que condiz com os achados desta tese e, ainda, contribui para melhor compreensão destes resultados.

A presente pesquisa reforça que os marcadores de dano oxidativo (LPO, 4-HNE, 8-ISO e proteínas carboniladas) na prole adulta tratada com salina e cetamina, cujas mães receberam dieta deficiente em AF, dieta controle e suplementação com AF (5, 10 e 50 mg/kg), apresentaram-se alterados apenas no córtex frontal, exceto a atividade da SOD e CAT que aumentou em ambas as estruturas cerebrais. Dados da literatura têm demonstrado que a heterogeneidade dos resultados relacionados às enzimas antioxidantes depende das áreas cerebrais estudadas, bem como do tipo de enzima avaliada, sendo tais variações

frequentemente comuns, porém pouco esclarecidas (De Oliveira et al., 2009; Zugno et al., 2014).

Ademais, não se sabe exatamente por quais motivos o córtex frontal foi mais susceptível às alterações oxidativa nesta tese. No entanto, Anjos et al. (2013) evidenciam que os fatores nutricionais maternos podem afetar o desenvolvimento e a função estrutural do cérebro, inclusive o córtex cerebral. Esta região em humanos é pré-formada no útero materno e continua seu amadurecimento durante a vida pós-natal através da rápida proliferação de células progenitoras. Em torno de 2 anos de idade, há sinaptogênese em larga escala e a reorganização de redes neurais no córtex permanece até a adolescência (Huttenlocher e Dabholkar, 1997). Em roedores, a formação do córtex ocorre de modo similar, iniciando após o 11º dia gestacional e persistindo na fase pós-natal mediante estes mesmos processos neuronais (McGarel et al., 2015). Conforme relatado acima, os nutrientes parecem afetar particularmente o córtex cerebral, então considerando-se que neste estudo a dieta deficiente ou suplementada com AF foi oferecida às ratas mães durante a gestação e lactação, isto poderia ao menos em parte, contribuir para o entendimento do porque as alterações oxidativas ocorreram expressivamente no córtex frontal da prole adulta, uma vez que esta região do cérebro parece ser mais vulnerável aos fatores nutricionais na fase gestacional (Anjos et al., 2013).

É sugestivo salientar nesta tese que a suplementação materna de diferentes doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg) combinada com a cetamina na prole adulta foi capaz de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes em ambas as estruturas cerebrais avaliadas, provavelmente na tentativa de neutralizar o dano oxidativo induzido pela cetamina. O AF, em particular nas doses mais elevadas (10 e 50 mg/kg), mostrou um efeito protetor contra o dano lipídico e proteico no córtex frontal da prole adulta, corroborando os achados de Zugno et al. (2016). Alterações na migração neuronal, formação de sinapses, mielinização e neurotransmissão estão correlacionadas à esquizofrenia e podem ser adversamente afetadas pelo estresse oxidativo. Portanto, a deficiência pré-natal de AF pode levar a anormalidades fisiopatológicas, desencadeando estresse oxidativo e alterações comportamentais na prole (Krebs et al., 2009; Roy et al., 2012). Assim, no presente estudo, a deficiência materna de AF associada à salina e cetamina na vida adulta da prole, apesar de não ter afetado a cognição, aumentou o estresse oxidativo no córtex frontal dos animais, o que possivelmente contribuiu para a hiperatividade locomotora e os déficits no comportamento social da prole, confirmando os achados acima.

O metabolismo de 1C atua como um mediador chave ao se relacionar a nutrição pré-natal e o risco subsequente de esquizofrenia na prole, visto que os nutrientes maternos influenciam as mudanças epigenéticas, as quais podem estar associadas ao desenvolvimento do transtorno (Kirkbride et al., 2012). Com efeito, os padrões de metilação do DNA, os quais podem ser alterados pela ingestão materna de AF, são estabelecidos durante o desenvolvimento embrionário (Irwin et al., 2016) e podem impactar na programação fetal e no desenvolvimento cerebral da prole (McGarel et al., 2015), uma vez que o estado pré-natal de AF é capaz de modular a expressão de genes envolvidos na metilação do DNA (Barua et al., 2016b).

Todavia, os baixos níveis de AF na dieta e sua relação com a taxa de metilação do DNA em modelos animais permanece controverso. Por exemplo, uma dieta pobre em AF por 4 semanas diminuiu em 20% a metilação do DNA em fígado de ratos (Balaghi e Wagner, 1993); entretanto, quando submetidos a tal dieta por 6 semanas, os animais apresentaram aumento de 60% na taxa de metilação global (Kim et al., 1997). De fato, a deficiência de AF parece diminuir a metilação genômica (Kim, 2004b; Pufulete et al., 2005a; Linhart et al., 2009; Schernhammer et al., 2010), enquanto a suplementação desta vitamina resulta no aumento da metilação do DNA, ao menos na mucosa colônica (Pufulete et al., 2005b).

Tem sido proposto que a análise da metilação do DNA pode fornecer uma melhor compreensão sobre a interferência de impactos ambientais na esquizofrenia (Nishioka et al., 2012; Popov et al., 2012), haja vista que sua etiologia depende da interação entre fatores genéticos e ambientais. Sabe-se que os marcadores epigenéticos integram a informação de ambos contribuintes causais para o fenótipo do transtorno, portanto, avaliar a metilação do DNA pode ajudar no entendimento da patogênese da esquizofrenia (Grayson e Guidotti, 2013; Liu et al., 2014). Com esta perspectiva, o presente estudo avaliou a atividade da enzima metiltransferase na prole adulta, a qual apresenta papel relevante nas reações de metilação. Foi observado, no córtex frontal e hipocampo, que a deficiência materna de AF associada à cetamina nos animais adultos não alterou a atividade da metiltransferase, sugerindo que ambos fatores (deficiência de AF e cetamina), pelo menos nestas estruturas cerebrais e para este marcador epigenético, parecem não comprometer o padrão de metilação.

Maloney et al. (2007) verificaram que a deficiência de AF aumentou os níveis plasmáticos maternos de Hcy, corroborando estudo de Canever et al. (2017). Porém, Maloney et al. (2007) também não observaram

alteração na metilação do DNA em fígados maternos ou fetais, o que condiz parcialmente com os resultados acima referidos. Os autores atribuem estes achados a um mecanismo indireto pelo qual as interações gene-nutriente modificam o processo de metilação durante o desenvolvimento (Maloney et al., 2007), o que também poderia justificar os dados deste estudo. Em relação ao modelo animal de esquizofrenia, até o momento, não foi encontrado nenhum trabalho que relacione cetamina e metilação do DNA, o que torna esta pesquisa pioneira e inovadora neste aspecto.

Em contrapartida, no córtex frontal e hipocampo da prole adulta tratada com salina e cetamina, cujas mães receberam suplementação com AF (50 mg/kg) e AF (10 mg/kg), respectivamente, houve um aumento na atividade da enzima metiltransferase, o que indica um efeito persistente do AF pré-natal na vida tardia dos animais. A suplementação materna de AF (50 mg/kg) associada à cetamina nos animais adultos também aumentou a atividade da metiltransferase no estriado. Embora mais investigações sobre as alterações epigenéticas sejam necessárias para complementar o presente estudo, este provável aumento da metilação do DNA suportado pela atividade aumentada da metiltransferase, em especial no córtex frontal e hipocampo, poderia em parte contribuir para explicar o efeito neuroprotetor do AF materno nas doses mais elevadas (10 e 50 mg/kg), principalmente no estresse oxidativo (Wang et al., 2017).

Contudo estes achados reforçam o papel do AF como um substrato para o metabolismo de 1C, confirmando seu envolvimento na metilação do DNA (Kim et al., 2009a; Kim et al., 2009b). Durante a gravidez, o estado materno de AF é tipicamente associado com a metilação do DNA (Park et al., 2005). Kim et al. (2009a; 2009b) apontam que em situações de HHcy materna, a dieta suplementada com AF aumentou a metilação, enquanto a deficiência de AF diminuiu a metilação do DNA placentário. Tem sido descrito que os doadores de CH₃, como AF, aumentam a atividade da enzima DNMT, influenciando a metilação (Cooney et al., 2002). No caso do fenótipo Avy em animais Agouti, o aumento da metilação nos embriões de mães suplementadas com AF está associado ao silenciamento de genes envolvidos com o aumento do apetite, obesidade, diabetes mellitus e câncer neste alelo, o que desencadeia um efeito positivo por reprimir a ativação destes genes relacionados a doenças (Morgan et al., 1999; Wolff et al., 1999; Waterland et al., 2008).

Nesta tese, o aumento da atividade da metiltransferase parece estimular a metilação do DNA, corroborando ao menos em parte, os

achados acima. Entretanto, não foi avaliado se o DNA está metilado, em qual região do DNA está acontecendo este fenômeno e quais genes estão envolvidos na metilação, o que implica na realização de mais pesquisas para complementar este trabalho. A análise de outros marcadores epigenéticos, por exemplo a 5mC, contribuirá para elucidar se o DNA está metilado e, se confirmado, poderá sugerir que houve a repressão de genes associados a esquizofrenia, uma vez que o AF materno preveniu alterações comportamentais e bioquímicas na prole adulta avaliada neste estudo.

Verificou-se ainda que os animais adultos tratados com cetamina, cujas mães receberam dieta deficiente em AF, dieta controle (grupo cetamina) e dieta suplementada com AF (5 mg/kg), apresentaram uma redução na atividade da enzima metiltransferase no estriado, sugerindo que a cetamina possivelmente foi capaz de alterar o padrão de metilação nesta estrutura cerebral. Porém, novamente não foi avaliado se o DNA está metilado, os genes envolvidos e em qual região do DNA ocorreu este processo, o que limita chegar a maiores conclusões relacionadas à epigenética neste estudo. Em geral, na presente pesquisa, a cetamina mimetizou alterações comportamentais e bioquímicas da esquizofrenia, reproduzindo o modelo animal. Evidências demonstram que pacientes esquizofrênicos apresentam mutações em genes relacionados ao desenvolvimento cerebral, em particular, genes envolvidos na via de sinalização do receptor NMDA (Gilman et al., 2012, Hall et al., 2014). Considerando estes achados e que a cetamina induz a hipofunção do receptor NMDA, alterações nesta via poderiam explicar em parte o fato da cetamina ter reduzido a atividade da metiltransferase, no entanto, novos estudos são necessários.

Adicionalmente, alterações no gene da enzima MTHFR foram associadas a HHcy e várias mutações foram descritas neste gene, como o polimorfismo MTHFR C677T, descrito por Frosst et al. (1995). Este consiste na troca de uma citosina por uma timina no nucleotídeo 677, acarretando assim, na substituição da alanina por uma valina na posição 226 (A226V) da enzima MTHFR (Lieviers et al., 2003). Este polimorfismo foi associado a redução da atividade da MTHFR, levando a menor concentração de 5-MTHF e, conseqüentemente, à HHcy (Kang et al., 1988; Kim, 2000). De fato, estudos reportam a relação entre nutrição pré-natal e esquizofrenia e incluem genes candidatos para a psicose envolvidos no metabolismo de 1C, como a MTHFR (Friso et al., 2002; Shi et al., 2008). Desta forma, o polimorfismo do gene MTHFR C677T influencia o metabolismo do AF e a metilação do DNA,

suportando a hipótese de que o estado materno de AF é um determinante do risco de esquizofrenia na prole (Lewis et al., 2007).

Neste estudo, no estriado, foi observado que a dieta deficiente em AF associada à cetamina na prole adulta reduziu a atividade da enzima metiltransferase, indicando que a deficiência pré-natal de AF pode comprometer a metilação do DNA a longo prazo na prole. Kirkbride et al. (2012) relatam que uma mudança epigenética induzida no útero pode não necessariamente persistir ao longo do ciclo de vida para iniciar a doença no adulto, mas pode predispor uma cadeia de eventos biológicos que culminam na esquizofrenia. Estes eventos incluem alterações comportamentais precoce que agem como um fenótipo intermediário chave induzido pelas mudanças epigenéticas maternas (Kirkbride et al., 2012).

Diante de tudo, na presente pesquisa, a deficiência materna de AF por si só ou associada à cetamina na prole adulta não foi capaz de alterar todos os comportamentos tipo esquizofrenia no modelo animal, entretanto, comprometeu o perfil social da prole, além de aumentar o estresse oxidativo no córtex frontal e reduzir a atividade da metiltransferase no estriado dos animais adultos. A diminuição desta enzima na prole de mães deficiente em AF poderia estar relacionada à provável hipometilação do DNA no estriado dos animais e, a possível ativação de genes envolvidos com a esquizofrenia, uma vez que um aspecto comportamental característico do transtorno (déficit no comportamento social), assim como o estresse oxidativo, mostraram-se presente neste grupo. No entanto, convém ressaltar que os marcadores epigenéticos que permitem analisar se o DNA está metilado não foram avaliados neste estudo, sendo considerados, portanto, limitações deste trabalho.

Outra limitação desta tese foi não ter analisado os parâmetros de estresse oxidativo no estriado, uma vez que apenas nesta estrutura cerebral foi verificada alteração da metiltransferase. Neste estudo, a dieta materna deficiente em AF, apesar de induzir estresse oxidativo no córtex frontal, não foi capaz de causar prejuízos cognitivos nos animais adultos, o que pode estar relacionado ao fato da prole não ter apresentado alterações na enzima metiltransferase no córtex frontal e hipocampo, regiões diretamente envolvidas com a memória e aprendizagem. Isto sugere que a deficiência pré-natal de AF parece não alterar o padrão de metilação do DNA na prole adulta nesta pesquisa e, ao menos nestas estruturas cerebrais, o que pode ter contribuído parcialmente para preservar a função cognitiva dos animais adultos.

Por fim, a presente tese enfatiza que a suplementação materna de AF, particularmente nas doses mais elevadas (10 e 50 mg/kg), apresentou um efeito protetor na função cognitiva da prole, além de prevenir o dano lipídico e proteico no córtex frontal e aumentar a atividade da enzima metiltransferase nas estruturas cerebrais dos animais adultos submetidos ao modelo de esquizofrenia, o que confirma a importância do aporte nutricional adequado em AF durante a fase gestacional para o bom desenvolvimento cerebral da prole.

6 CONCLUSÃO

Este estudo permite concluir que a dieta materna deficiente em AF ou suplementada com diferentes doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação foi capaz de induzir alterações cerebrais relacionadas ao estresse oxidativo e alterar, em parte, o marcador epigenético relacionado ao padrão de metilação do DNA, além de impactar no comportamento da prole adulta submetida ao modelo de esquizofrenia pela administração de cetamina.

A cetamina induziu o modelo animal de esquizofrenia, ao mimetizar os sintomas positivos (hiperlocomoção), negativos (redução de contatos sociais) e prejuízos cognitivos (déficit na IPP e dano na memória aversiva) na prole adulta, além de alterar os níveis dos marcadores de estresse oxidativo (LPO, 4-HNE, 8-ISO, conteúdo de grupos carbonila, SOD e CAT), particularmente no córtex frontal dos animais, cujas mães foram expostas à dieta controle (grupo cetamina) durante a gestação e lactação. Ademais, a cetamina reduziu a atividade da enzima metiltransferase no estriado da prole adulta, o que sugere que este fármaco possivelmente foi capaz de alterar este padrão de metilação do DNA, embora apenas nesta estrutura cerebral.

Tomados em conjunto, os resultados suportam que o AF materno suplementado nas doses mais elevadas (10 e 50 mg/kg) apontou um efeito protetor persistente na prole adulta submetida ao modelo de esquizofrenia, ao preservar a função cognitiva e prevenir o dano oxidativo no córtex frontal, contribuindo ainda para o aumento da metiltransferase, uma enzima implicada diretamente nas reações de metilação do DNA. Tudo isso confirma que o equilíbrio nutricional materno em AF é essencial para o bom desenvolvimento cerebral da prole. Com exceção, o AF administrado nas ratas durante a fase gestacional, de modo geral, não foi capaz de prevenir a hiperlocomoção e o déficit no comportamento social dos animais adultos tratados com cetamina, o que indica um possível efeito predominante deste fármaco na prole adulta.

Adicionalmente, os achados apontam que a deficiência materna de AF pode estar envolvida na fisiopatologia da esquizofrenia, uma vez que esta demonstrou uma ação duradoura na vida tardia da prole, alterando parâmetros bioquímicos no cérebro, o que provavelmente foi capaz de influenciar à saúde mental dos animais via alteração comportamental.

7 PERSPECTIVAS

Pretende-se dar continuidade a este estudo por meio da avaliação de outros marcadores epigenéticos, tais como: 5mC e 5-hidroximetilcitosina (5hmC) para verificar se o DNA está metilado. Com intuito de analisar as alterações na acetilação de histonas, também será avaliada a atividade das histonas deacetilase (HDACs), as quais silenciam genes, impedindo a transcrição, bem como os níveis da histona H3 acetilada, a qual ativa a transcrição gênica. Em conjunto aos achados da atividade da enzima metiltransferase, estas novas investigações complementarão os resultados referentes à epigenética, permitindo melhor compreender e correlacionar o envolvimento do AF materno nos parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo e, assim, na patogênese da esquizofrenia na vida adulta da prole.

REFÊRENCIAS

- Abbott NJ. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inherit Metab Dis.* 2013;36(3):437–449.
- Akanji AO, Ohaeri JU, Al-Shammri SA, Fatania HR. Associations of blood homocysteine concentrations in Arab schizophrenic patients. *Clin. Biochem.* 2007;40(13-14):1026-31.
- Alho CS. Fundamentos da Genômica: Dinamica dos genes e medicina genômica. In: MIR, L. Genômica. Ed: Atheneu, Sao Paulo. 2004;4:71-91.
- American Psychiatric Association (APA). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5^a ed. Arlington, VA: American Psychitric Publishing; 2013.
- Amminger GP, Schäfer MR, Papageorgiou K, Klier CM, Cotton SM, Harrigan SM, Mackinnon A, McGorry PD, Berger GE. Long-chain ω -3 fatty acids for indicated prevention of psychotic disorders: A randomized, placebo-controlled trial. *Arch Gen Psychiatry.* 2010;67(2):146–154.
- Anand A, Charney DS, Oren DA, Berman RM, Hu XS, Cappiello A, Krystal JH. Attenuation of the neuropsychiatric effects of ketamine with lamotrigine: support for hyperglutamatergic effects of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Arch Gen Psychiatry.* 2000;57(3):270-6.
- Anjos T, Altmae S, Emmett P, Tiemeier H, Closo-Monasterolo R, Luque V, Wiseman S, Perez-Garcia M, Lattka E, Demmelmair H, Egan B, Straub N, Szajewska H, Evans J, Horton C, Paus T, Isaacs E, van Klinken JW, Kolet-zko B, Campoy C. Nutrition and neurodevelopment in children: focus on NUTRIMENTHE project. *Eur J Nutr.* 2013;52(8):1825–1842.
- Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process.* 2012;13(2):93-110.

Apa, American Psychiatric Association, "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Diseases". 4^a ed. Washington, DC: APA; 1994.

Arai M, Miyashita M, Ichikawa T, Itokawa M. Carbonyl stress-related schizophrenia perspective on future therapy and hypotheses regarding pathophysiology of schizophrenia. *Seishin Shinkeigaku Zasshi*. 2012;114(3):199-208.

Araújo TS. Papel de moduladores da via das quinureninas na reversão de sintomas e alterações neuroquímicas tipo-esquizofrenia induzidos pela administração repetida de cetamina em camundongos [Dissertação de Mestrado]. Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Centro de Fisiologia e Farmacologia. Faculdade de Medicina. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2015.

Bagdy G, Juhasz G. Biomarkers for personalised treatment in psychiatric diseases. *Expert Opin Med Diagn*. 2013;7(5):417-22.

Baguelin-Pinaud A, Robert S, Menard JF, Thibaut F. Prenatal exposure to tobacco and risk for schizophrenia: a retrospective epidemiological study. *Compr Psychiatry*. 2010; 51(2):106-9.

Bahous RH, Jadavji NM, Deng L, Cosín-Tomás M, Lu J, Malysheva O, Leung KY, Ho MK, Pallàs M, Kaliman P, Greene NDE, Bedell BJ, Caudill MA, Rozen R. High dietary folate in pregnant mice leads to pseudo-MTHFR deficiency and altered methyl metabolism with embryonic growth delay and short-term memory impairment in offspring. *Hum Mol Genet*. 2017;26(5):888-900.

Bailey SW, Ayling JE. The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2009; 106:15424–15429.

Balaghi M, Wagner C. DNA methylation in folate deficiency: use of CpG methylase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;193(3):1184-1190.

Balla A, Nattini Me, Sershen H, Lajtha A, Dunlop Ds, Javitt Dc. GABAB/ NMDA receptor interaction in the regulation of extracellular dopamine levels in rodent prefrontal cortex and striatum. *Neuropharmacology*. 2009;56(5):915-21.

Barua S, Chadman KK, Kuizon S, Buenaventura D, Stapley NW, Ruocco F, Begum U, Guariglia SR, Brown WT, Junaid MA. Increasing maternal or post-weaning folic acid alters gene expression and moderately changes behavior in the offspring. *PLoS One*. 2014a;9(7):e101674.

Barua S, Kuizon S, Junaid MA. Folic acid supplementation in pregnancy and implications in health and disease. *J Biomed Sci*. 2014b; 21: 77.

Barua S, Kuizon S, Brown WT, Junaid MA. High Gestational Folic Acid Supplementation Alters Expression of Imprinted and Candidate Autism Susceptibility Genes in a sex-Specific Manner in Mouse Offspring. *J Mol Neurosci*. 2016a;58(2):277-86.

Barua S, Kuizon S, Brown WT, Junaid MA. DNA Methylation Profiling at Single-Base Resolution Reveals Gestational Folic Acid Supplementation Influences the Epigenome of Mouse Offspring Cerebellum. *Front Neurosci*. 2016b;10:168.

Baumgartner MR. Vitamin-responsive disorders: cobalamin, folate, biotin, vitamins B1 and E. *Handb Clin Neurol*. 2013; 113:1799-1810.

Beal MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med*. 2002;32(9):797-803.

Becker A, Grecksch G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004;28(8):1267-77.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996;271(5 Pt 1):C1424-37.

Bégou M, Volle J, Bertrand JB, Brun P, Job D, Schweitzer A, Saoud M, D'Amato T, Andrieux A, Suaud-Chagny MF. The stop null mice model for schizophrenia displays [corrected] cognitive and social deficits partly alleviated by neuroleptics. *Neuroscience*. 2008;157(1):29-39.

Ben Othmen L, Mechri A, Fendri C, Bost M, Chazot G, Gaha L, Kerkeni A. Altered antioxidant defense system in clinically stable

patients with schizophrenia and their unaffected siblings. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008;32(1):155-9.

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 inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci*. 2003;17(4):897-902.

Bharath S, Hsu M, Kaur D, Rajagopalan S, Andersen JK. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(5-6):1037-48.

Bhatia P, Singh N. Homocysteine excess: delineating the possible mechanism of neurotoxicity and depression. *Fundam Clin Pharmacol*. 2015;29(6):522-528.

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

Blaise SA, Nedelec E, Schroeder H, Alberto JM, Bossenmeyer- Pourie C, Gueant JL, Daval JL. Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am J Pathol*. 2007;170(2):667-679.

Boldyrev AA, Johnson P. Homocysteine and its derivatives as possible modulators of neuronal and non-neuronal cell glutamate receptors in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2007;11(2):219-28.

Bošković M, Vovk T, Kores Plesničar B, Grabnar I. Oxidative stress in schizophrenia. *Curr Neuropsychopharmacol*. 2011;9(2):301-12.

Bottiglieri T. Homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005;29(7):1103-12.

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

Bressan RA, Pilowsky I. S. Hipótese glutamatérgica da esquizofrenia. *Rev Bras Psiquiatr*. 2003;25(3):177-83.

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

Brocardo PS, Budni J, Kaster MP, Santos AR, Rodrigues AL. Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Neuropharmacology*. 2008b;54(2):464-73.

Brocardo PS, Budni J, Lobato KR, Santos AR, Rodrigues AL. Evidence for the involvement of the opioid system in the antidepressant-like effect of folic acid in the mouse forced swimming test. *Behav Brain Res*. 2009;200(1):122-7.

Brocardo OS, Budni J, Pavesi E, Franco JL, Uliano-Silva M, Trevisan R, Terenzi MG, Dafre AL, Rodrigues AL. Folic acid administration prevents ouabain-induced hyperlocomotion and alterations in oxidative stress markers in the rat brain. *Bipolar Disord*. 2010;12(4):414-424.

Brown AS, Bottiglieri T, Schaefer CA, Quesenberry CP Jr, Liu L, Bresnahan M, Susser ES. Elevated prenatal homocysteine levels as a risk factor for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2007; 64(1):31-9.

Brown CJ, Cheek CF, Verma CS, Lane DP. Reactivation of p53: from peptides to small molecules. *Trends Pharmacol Sci*. 2011;32(1):53-62.

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

Budni J, Freitas AE, Binfaré RW, Rodrigues AL. Role of potassium channels in the antidepressant like effect of folic acid in the forced swimming test in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012;101(1):148-54.

Budni J. Investigação da ação antidepressiva e neuroprotetora do ácido fólico. [Tese de doutorado]. Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Centro de Ciências Biológicas. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2012.

Burdge GC, Lillycrop KA. Environment-physiology, diet quality and energy balance: the influence of early life nutrition on future energy balance. *Physiol Behav.* 2014;134:119–122.

Buss C, Davis EP, Hobel CJ, Sandman CA. Maternal pregnancy-specific anxiety is associated with child executive function at 6–9 years age. *Stress.* 2011;14(6):665–76.

Canever L, Oliveira L, D'altoe De Luca R, Correa PT, De BFD, 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.

Canever L, Alves CS, Mastella G, Damázio L, Polla JV, Citadin S, De Luca LA, Barcellos AS, Garcez ML, Quevedo J, Budni J, Zugno AI. The Evaluation of Folic Acid-Deficient or Folic Acid-Supplemented Diet in the Gestational Phase of Female Rats and in Their Adult Offspring Subjected to an Animal Model of Schizophrenia. *Mol Neurobiol.* 2017. doi: 10.1007/s12035-017-0493-7. [Epub ahead of print]

Cannon TD, Yolken R, Buka S, Torrey EF. Collaborative Study Group on the Perinatal Origins of Severe Psychiatric Disorders. Decreased neurotrophic response to birth hypoxia in the etiology of schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2008;64(9):797–802.

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

Chatterjee M, Verma R, Ganguly S, Palit G. Neurochemical and molecular characterization of ketamine-induced experimental psychosis model in mice. *Neuropharmacology.* 2012;63(6):1161-71.

Chien MF, Huang CC, Kusano T, Endo G. Facilities for transcription and mobilization of an exon-less bacterial group II intron nested in transposon TnMERI1. *Gene.* 2008;408(1-2):164-71.

Chindo Ba, Adzu B, Yahaya Ta, Gamaniel Ks. Ketamine-Enhanced Immobility in Forced Swim Test: A Possible Animal Model for the

Negative Symptoms of Schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012;38(2):310-6.

Ciobica A, Padurariu M, Dobrin I, Stefanescu C, Dobrin R. Oxidative stress in schizophrenia — focusing on the main markers. *Psychiatr Danub*. 2011;23(3):237-45.

Clarke MC, Tanskanen A, Huttunen M, Whittaker JC, Cannon M. Evidence for an interaction between familial liability and prenatal exposure to infection in the causation of schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2009; 166(9):1025-30.

Cooney CA, Dave AA, Wolff GL. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr*. 2002;132(8 Suppl.):2393S–2400S.

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

Dahl C, Guldberg P. DNA methylation analysis techniques. *Biogerontology*. 2003;4:233-250.

Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med*. 2006;10(2):389-406.

Darnton-Hill I, Mkpuru UC. Micronutrients in pregnancy in low- and middle-income countries. *Nutrients*. 2015;7(3):1744–1768.

de la Fuente-Sandoval C, León-Ortiz P, Favila R, Stephano S, Mamo D, Ramírez-Bermúdez J, Graff-Guerrero A. Higher levels of glutamate in the associative-striatum of subjects with prodromal symptoms of schizophrenia and patients with first-episode psychosis. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36(9):1781–1791.

De Lima MN, Laranja DC, Bromberg E, Roesler R, Schroder N. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav Brain Res*. 2005;156(1):139-43.

De Oliveira L, Spiazzi CM, Bortolin T, Canever L, Petronilho F, Mina FG, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Zugno AI. Different sub-anesthetic doses of ketamine increase oxidative stress in the brain of rats. *Prog 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 ketamine. *Metab Brain Dis*. 2011;26(1):69-77.

Desantis DT, Schmaltz LW. The mother-litter relationship in developmental rat studies: cannibalism vs caring. *Dev Psychobiol*. 1984;17(3):255-62.

Dhobale M, Joshi S. Altered maternal micronutrients (folic acid, vitamin B(12)) and omega 3 fatty acids through oxidative stress may reduce neurotrophic factors in preterm pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012;25(4):317-323.

Dhobale M. Neurotrophins: Role in adverse pregnancy outcome. *Int J Dev Neurosci*. 2014;37:8-14.

Dicicco-Bloom E, Lord C, Zwaigenbaum L, Courchesne E, Dager SR, Schmitz C, Schultz RT, Crawley J, Young LJ. The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. *J Neurosci*. 2006;26(26):6897-906.

Dietrich-Muszalska A, Olas B. Isoprostenes as indicators of oxidative stress in schizophrenia. *World J Biol Psychiatry*. 2009a;10(1):27-33.

Dietrich-Muszalska A, Olas B. Modifications of blood platelet proteins of patients with schizophrenia. *Platelets*. 2009b;20(2):90-96.

Dietrich-Muszalska A, Olas B, Glowacki R, Bald E. Oxidative/ nitrative modifications of plasma proteins and thiols from patients with schizophrenia. *Neuropsychobiology*. 2009;59(1):1-7.

Djukic A. Folate-responsive neurologic diseases. *Pediatric Neurol*. 2007;37(6):387-97.

Dogan M, Ozdemir O, Sal EA, Dogan SZ, Ozdemir P, Cesur Y, Caksen H. Psychotic disorder and extrapyramidal symptoms associated with vitamin B12 and folate deficiency. *J Trop Pediatr.* 2009;55(3):205-7.

Dwyer JB, McQuown SC, Leslie FM. The dynamic effects of nicotine on the developing brain. *Pharmacol Ther.* 2009;122(2):125-39.

Elsworth JD, Groman SM, Jentsch JD, Valles R, Shahid M, Wong E, Marston H, Roth RH. Asenapine effects on cognitive and monoamine dysfunction elicited by subchronic phencyclidine administration. *Neuropharmacology.* 2012;62(3):1442-52.

Enomotto T, Floresco SB. Disruptions in spatial working memory, but not short-term memory, induced by repeated ketamine exposure. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009; 33 (4): 668–75.

Entringer S, Buss C, Kumsta R, Hellhammer DH, Wadhwa PD, Wust S. Prenatal psychosocial stress exposure is associated with subsequent working memory performance in young women. *Behav Neurosci.* 2009;123(4):886–93.

Fan LW, Chen RF, Mitchell HJ, Lin RC, Simpson KL, Rhodes PG, Cai Z. Alpha-phenyl-n-tert-butyl-nitron attenuates lipopolysaccharide-induced brain injury and improves neurological reflexes and early sensorimotor behavioral performance in juvenile rats. *J Neurosci Res.* 2008;86(16):3536–3547.

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.

Finglas PM, Wright AJ, Wolfe CA, Hart DJ, Wright DM, Dainty JR. Is there more to folates than neural-tube defects? *Proc Nutr Soc.* 2003;62:591-8.

Fraga DB, Deroza PF, Ghedim FV, Steckert AV, De Luca RD, Silverio A, Cipriano AL, Lefea DD, Borges GD, Quevedo J, Pinho RA, Andrade VM, Dal-Pizzol F, Zugno AI. Prenatal exposure to cigarette smoke causes persistent changes in the oxidative balance and in DNA structural

integrity in rats submitted to the animal model of schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2011;45(11):1497-503.

Franco-Pons N, Torrente M, Colomina MT, Vilella E. Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination. *Toxicol Lett.* 2007;169(3):205–213.

Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, Olivieri O, Jacques PF, Rosenberg IH, Corrocher R, Selhub J. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2002;99(8):5606–5611.

Frohlich J, Van Hom JD. Reviewing ketamine model for schizophrenia. *J Psychopharmacol.* 2014;28(4):287-302.

Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, Den Heijer M, Kluijtmans LA, Van Den Heuvel P, Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics.* 1995;10(1):111-113.

Fuster JM. The prefrontal cortex—an update: time is of the essence. *Neuron.* 2001;30(2):319–33.

Gama CS, Salvador M, Andreatza AC, Kapczinski F, Silva Belmonte-de-Abreu P. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: a study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2006;30:512–5.

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

Garcia YJ, Rodríguez-Malaver AJ, Peñaloza N. Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices. *J Neurosci Methods.* 2005;144(1):127-35.

Genius J, Geiger J, Dölzer AL, Benninghoff J, Giegling I, Hartmann AM, Möller HJ, Rujescu D. Glutamatergic dysbalance and oxidative stress in in vivo and in vitro models of psychosis based on chronic NMDA receptor antagonism. *PLoS One*. 2013;15;8(7):e59395.

Gilman SR, Chang J, Xu B, Bawa TS, Gogos JA, Karayiorgou M, Vitkup D. Diverse types of genetic variation converge on functional gene networks involved in schizophrenia. *Nat Neurosci*. 2012;15(12):1723-1728.

Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med*. 2008;359:61–73.

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

Graham F. The more or less startling effects of weak prestimulation. *Psychophysiology*. 1975;12(3):238-48.

Grayson DR, Guidotti A. The dynamics of DNA methylation in schizophrenia and related psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(1):138–66.

Greenwood TA, Braff DL, Light GA, Cadenhead KS, Calkins ME, Dobie DJ, Freedman R, Green MF, Gur RE, Gur RC, Mintz J, Nuechterlein KH, Olincy A, Radant AD, Seidman LJ, Siever LJ, Silverman JM, Stone WS, Swerdlow NR, Tsuang DW, Tsuang MT, Turetsky BI, Schork NJ. Initial heritability analyses of endophenotypic measures for schizophrenia: the consortium on the genetics of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2007;64(11):1242-50.

Grozinger CM, Fan Y, Hoover SE, Winston ML. Genome-wide analysis reveals differences in brain gene expression patterns associated with caste and reproductive status in honey bees (*Apis mellifera*). *Mol Ecol*. 2007;16:4837–4848.

Gueant JL, Namour F, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24(6):279-89.

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.

Haider BA, Yakoob MY, Bhutta ZA. Effect of multiple micronutrient supplementation during pregnancy on maternal and birth outcomes. *BMC Public Health*. 2011;11 Suppl 3:S19.

Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Nova York: Oxford University Press; 2007. p.851.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol*. 2004;142(2):231- 255.

Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*. 2006;97(6):1634-58.

Harrison PJ, Weinberger DR. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry*. 2005;10(1):40-68.

Hashimoto K, Fujita Y, Iyo M. Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of fluvoxamine: role of sigma-1 receptors. *Neuropsychopharmacol*. 2007;32(3):514-21.

Haukvik UK, Lawyer G, Bjerkan PS, Hartberg CB, Jonsson EG, Mcneil T, Agartz I. Cerebral cortical thickness and a history of obstetric complications in schizophrenia. *J Psychiatric Res*. 2009;43(16):1287-93.

Herken H, Uz E, Ozyurt H, Akyol O. Red blood cell nitric oxide levels in patients with schizophrenia. *Schizophr Res*. 2001a;52(3):289–290.

Herken H, Uz E, Ozyurt H, Sogut S, Virit O, Akyol O. Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2001b;6(1):66–73.

Hill M, Shannahan K, Jasinski S, Macklin EA, Raeke L, Roffman JL, Goff DC. Folate supplementation in schizophrenia: a possible role for MTHFR genotype. *Schizophr Res*. 2011;127(1-3):41-5.

Ho V, Massey TE, King WD. Effects of methionine synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms on markers of one-carbon metabolism. *Genes Nutr*. 2013;8(6):571-80.

Hoffman HS, Ison JR. Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. *Psychol Rev*. 1980;87(2):175-89.

Holliday R, Grigg Gw. DNA methylation and mutation. *Mutat Res*. 1993;285:61-67.

Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ, Erickson JD, Wong LY. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *Jama*. 2001;285:2981-2986.

Hor K, Taylor M. Suicide and schizophrenia: a systematic review of rates and risk factors. *J psychopharmacol*. 2010;24(4)81-90.

Howie J, Sloboda M, Vickers H. Maternal undernutrition during critical windows of development results in differential and sex-specific effects on postnatal adiposity and related metabolic profiles in adult rat offspring. *Br J Nutr*. 2012;108(2):298-307.

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

Huttenlocher PR, Dabholkar AS. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J Comp Neurol*. 1997;387(2):167-178.

Hyland K, Shoffner J, Heales SJ. Cerebral folate deficiency. *Inherit Metab Dis*. 2010;33(5):563-570.

Imre G, Fokkema DS, Den Boer JA, Ter Horst GJ. Dose-response characteristics of ketamine effect on locomotion, cognitive function and central neuronal activity. *Brain Res Bull*. 2006;69(3):338-45.

Irie Y, Saeki M, Kamisaki Y, Martin E, Murad F. Histone H1.2 is a substrate for denitrase, an activity that reduces nitrotyrosine immunoreactivity in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(10):5634-9.

Irwin RE, Pentieva K, Cassidy T, Lees-Murdock DJ, McLaughlin M, Prasad G, McNulty H, Walsh CP. The interplay between DNA methylation, folate and neurocognitive development. *Epigenomics*. 2016;8(6):863-879.

Iskandar BJ, Nelson A, Resnick D, Skene JH, Gao P, Johnson C, Cook TD, Hariharan N. Folic acid supplementation enhances repair of the adult central nervous system. *Ann Neurol*. 2004;56(2):221-7.

Isobe C, Murata T, Sato C, Terayama Y. Increase of total homocysteine concentration in cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Life Sci*. 2005;77(15):1836-43.

Isolan L, Pheula G, Salum GA Jr, Oswald S, Rohde LA, Manfro GG. An open-label trial of escitalopram in children and adolescents with social anxiety disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2007;17(6):751-60.

Issy AC, Salum C, Del Bel EA. Nitric oxide modulation of methylphenidate-induced disruption of prepulse inhibition in Swiss mice. *Behav Brain Res*. 2009;205(2):475-81.

Izquierdo I, Barros DM, Mello E Souza T, De Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ *Nature*. 1998;393(6686):635-6.

Jadavji NM, Deng L, Leclerc D, Malysheva O, Bedell BJ, Caudill MA, Rozen R. Severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency in mice results in behavioral anomalies with morphological and biochemical changes in hippocampus. *Mol Genet Metab*. 2012;106(2):149-159.

Jadavji NM, Deng L, Malysheva O, Caudill MA, Rozen R. MTHFR deficiency or reduced intake of folate or choline in pregnant mice results in impaired short-term memory and increased apoptosis in the hippocampus of wild-type offspring. *Neuroscience*. 2015;300:1-9.

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

Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet.* 2007;8(4):253-62.

Johnstone EVEC, Frith CD, Kreef L. Schizophrenia ment emerges principally in those items in the battery. *The Lancet.* 1976;2(7992):924-926.

Joshi R, Adhikari S, Patro BS, Chattopadhyay S, Mukherjee T. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. *Free Radic Med.* 2001;30(12):1390-1399.

Kalani A, Kamat PK, Givvimani S, Brown K, Metreveli N, Tyagi SC, Tyagi N. Nutri-epigenetics ameliorates blood-brain barrier damage and neurodegeneration in hyperhomocysteinemia: role of folic acid. *J Mol Neurosci.* 2014;52(2):202-215.

Kale A, Joshi S, Naphade N, Sapkale S, Raju MS, Pillai A, Nasrallah H, Mahadik SP. Opposite changes in predominantly docosahexaenoic acid (DHA) in cerebrospinal fluid and red blood cells from never-medicated first-episode psychotic patients. *Schizophr Res.* 2008;98:295-301.

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

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

Kang SS, Zhou J, Wong PWK, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet.* 1988;43(4):414-421.

Kantrowitz JT, Javitt DC. Thinking glutamatergically: changing concepts of schizophrenia based upon changing neurochemical models. *Clin Schizophr Relat Psychoses.* 2010;4(3):189-200.

Kapur S, Seeman P. NMDA receptor antagonists ketamine and PCP have direct effects on the dopamine D(2) and serotonin 5-HT(2)receptors- implications for models of schizophrenia. *Mol psychiatry*. 2002;7(8):837–844.

Kapur S, Mamo D. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003;27(7):1081-90.

Keenan K, Bartlett TQ, Nijland M, Rodriguez JS, Nathanielsz PW, Zürcher NR. Poor nutrition during pregnancy and lactation negative y affects neurodevelopment of the offspring: evidence from a translational primate model. *Am J Clin Nutr*. 2013;98(2):396-402.

Keller J, Hanni K, Markesbery W. 4-hydroxynonenal increases neuronal susceptibility to oxidative stress. *J Neurosci Res*. 1999;58:823–30.

Kennedy DO. B vitamins and the brain: mechanisms, dose and efficacy- a review. *Nutrients*. 2016;8(2):68.

Keshavan MS, Nasrallah HA, Tandon R. Schizophrenia, "Just the Facts" 6. Moving ahead with the schizophrenia concept: from the elephant to the mouse. *Schizophr Res*. 2011;127(1-3):3-13.

Kidd PM. Omega-3 DHA and EPA for cognition, behavior and mood: clinical findings and structural-functional synergies with cell membrane phospholipids. *Altern Med Rev*. 2007;12(3):207-27.

Kim YI. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: a paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. *Nutr Rev*. 2000;58(7):205-209.

Kim YI. Folate, colorectal carcinogenesis, and DNA methylation: lessons from animal studies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2004a. 44(1); 10-25.

Kim YI. Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004b;13(4):511–519.

Kim JM, Hong K, Lee JH, Lee S, Chang N. Effect of folate deficiency on placental DNA methylation in hyperhomocysteinemic rats. *J Nutr Biochem.* 2009a;20(3):172-6.

Kim KC, Friso S, Choi SW. DNA methylation an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. *J Nutr Biochem.* 2009b; 20(12):917-26.

Kirkbride JB, Susser E, Kundakovic M, Kresovich JK, Smith GD, Relton CL. Prenatal nutrition, epigenetics and schizophrenia risk: can we test causal effects? *Epigenomics.* 2012;4(3):303–15.

Koch M, Schnitzler HU. The acoustic startle response in rats - circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. *Behav Brain Res.* 1997;89(1):35-49.

Koga M, Serritella AV, Sawa A, Sedlak TW. Implications for reactive oxygen species in schizophrenia pathogenesis. *Schizophr Res.* 2016;1:52-71.

Koyama S, Sakurai T, Nakahara T, Miyakoshi J. Extremely low frequency (ELF) magnetic fields enhance chemically induced formation of apurinic/apyrimidinic (AP) sites in A172 cells. *Int J Radiat Biol.* 2008;84(1):53-9.

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

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

Krystal JH, D'Souza DC, Mathalon D, Perry E, Belger A, Hoffman R. NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacology (Berl).* 2003; 169 (3-4): 215-33.

Krystal JH, Abi-Saab W, Perry E, D'Souza DC, Liu N, Gueorguieva R, McDougall L, Hunsberger T, Belger A, Levine L, Breier A. Preliminary evidence of attenuation of the disruptive effects of the NMDA glutamate receptor antagonist, ketamine, on working memory by pretreatment with

the group II metabotropic glutamate receptor agonist, LY354740, in healthy human subjects. *Psychopharmacology*. 2005;179(1):303-9.

Lamers Y. Indicators and methods for folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status assessment in humans. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011;14(5):445-54.

Larson SC, Giovannucci E, Wolk A. Folate intake, MTHFR polymorphisms, and risk of esophageal, gastric and pancreatic cancer. A meta-analysis. *Gastroenterology*. 2006;131(4):1271-83.

Larson MK, Walker EF, Compton MT. Early signs, diagnosis and therapeutics of the prodromal phase of schizophrenia and related psychotic disorders. *Expert Rev Neurother* 2010; 10(8):1347–59.

Laurent A, Saoud M, Bougerol T, d'Amato T, Anchisi AM, Biloa-Tang M, Dalery J, Rochet T. Attentional deficits in patients with schizophrenia and in their non-psychotic first-degree relatives. *Psychiatry Res*. 1999;89:147–159.

Le Pen G, Moreau JL. Disruption of prepulse inhibition of startle reflex in a neurodevelopmental model of schizophrenia: reversal by clozapine, olanzapine and risperidone but not by haloperidol. *Neuropsychopharmacology*. 2002;27(1):1-11.

Lee PR, Brady DL, Shapiro RA, Dorsa DM, Koenig JI. Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: Reversal by oxytocin. *Brain Res*. 2007;2:152-67.

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

Levin R, Calzavara MB, Santos CM, Medrano WA, Niigaki ST, Abílio VC. Spontaneously hyper-tensive rats (SHR) present deficits in prepulse inhibition of startle specifically reverted by clozapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35(7):1748-52.

Levine SZ, Levav I, Yoffe R, Pugachova I. The effects of pre-natal-, early-life-and indirectly-initiated exposures to maximum adversities on the course of schizophrenia. *Schizophr Res.* 2014;158(1–3):236–40.

Levkovitz Y, Levi U, Braw Y, Cohen H. Minocycline, a second-generation tetracycline, as a neuroprotective agent in an animal model of schizophrenia. *Brain Res.* 2007;1154:154-62.

Lewis SJ, Zammit S, Gunnell D, Smith GD. Folate deficiency during pregnancy impacts on methyl metabolism without affecting global DNA methylation in the rat fetus. *Br J Nutr.* 2007;97(6):1090-8.

Li D, Pickell L, Liu Y, Wu Q, Cohn JS, Rozen R. Maternal methylenetetrahydrofolate reductase deficiency and low dietary folate lead to adverse reproductive outcomes and congenital heart defects in mice. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(1):188–195.

Linhart HG, Troen A, Bell GW, Cantu E, Chao WH, Moran E, Steine E, He T, Jaenisch R. Folate deficiency induces genomic uracil misincorporation and hypomethylation but does not increase DNA point mutations. *Gastroenterology.* 2009;136(1): 227–235 e3

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

Liu J, Chen J, Ehrlich S, Walton E, White T, Perrone-Bizzozero N, Bustillo J, Turner JA, Calhoun VD. Methylation patterns in whole blood correlate with symptoms in schizophrenia patients. *Schizophr Bull.* 2014;40(4):769–76.

Lodge DJ, Grace AA. Hippocampal dysregulation of dopamine system function and the pathophysiology of schizophrenia. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32(9):507–513, 2011.

Lorrain DS, Bacceti CS, Bristow LJ, Anderson JJ, Varney MA. Effects of ketamine and N-methyl-D-aspartate on glutamate and dopamine release in the rat prefrontal cortex: modulation by a group II selective metabotropic glutamate receptor agonist LY379268. *Neuroscience.* 2003;117(3):697-706.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.

Maloney CA, Hay SM, Rees WD. Folate deficiency during pregnancy impacts on methyl metabolism without affecting global DNA methylation in the rat fetus. *Br J Nutr.* 2007;97(6):1090-8.

Mann J, Truswell AS. *Essentials of human nutrition.* 4th ed. New York: Oxford University Press; 2012. 282 p.

Mansbach RS, Geyer MA, Braff DL. Dopaminergic stimulation disrupts sensorimotor gating in the rat. *Psychopharmacology.* 1988;94(4):507-14.

Marchioni DM, Verly Jr E, Steluti J, Cesar CL, Fisberg RM. Folic acid intake before and after mandatory fortification: a population-based study in São Paulo, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2013;29(10):2083-92.

Marsman A, Van Den Heuvel MP, Klomp DW, Kahn RS, Luijten PR, Hulshoff Pol HE. Glutamate in schizophrenia: a focused review and meta-analysis of (1)H-MRS studies. *Schizophr Bull.* 2013;39(1):120-9.

Matriciano F, Tueting P, Dalal I, Kadriu B, Grayson DR, Davis JM, Nicoletti F, Guidotti A. Epigenetic modifications of GABAergic interneurons are associated with the schizophrenia-like phenotype induced by prenatal stress in mice. *Neuropharmacology.* 2013; 68:184-94.

Matté C, Mackedanz V, Stefanello FM, Scherer EB, Andreatza AC, Zanutto C, Moro AM, Garcia SC, Gonçalves CA, Erdtmann B, Salvador M, Wyse AT. Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: protective effect of folic acid. *Neurochem Int.* 2009;54(1):7-13.

Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 2003;26(3):137-46.

McGarel C, Pentieva K, Strain JJ, McNulty H. Emerging roles for folate and related B-vitamins in brain health across the life cycle. *Proc Nutr Soc.* 2015;74(1):46-55.

McGrath JJ. Myths and plain truths about schizophrenia epidemiology — the NAPE lecture 2004. *Acta Psychiatr Scand.* 2005; 111 (1): 4-11.

McKay JA, Williams EA, Mathers JC. Folate and DNA methylation during in utero development and aging. *Biochem Soc Trans.* 2004;32:1006–1007.

Mechri A, Saoud M, Khiari G, D'amato T, Dalery J, Gaha L. Glutamnergic hypothesis of schizophrenia: clinical research studies with ketamine. *Encephale* 2010; 27(1):53-9.

Melo GJO. A importância do ácido fólico para o desenvolvimento embrionário e seu papel protetor de ocorrência de gestações afetadas pelos defeitos do tubo neural fetal. *Cadernos Interdisciplinares: Saúde Tecnologia e Questão Social.* 2004;1(1):1-20.

Mennes M, Stiers P, Lagae L, Van den Bergh B. Long-term cognitive sequelae of antenatal maternal anxiety: involvement of the orbitofrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006;30(8):1078–86.

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

Meyer U, Schwarz MJ, Müller N. Inflammatory processes in schizophrenia: A promising neuroimmunological target for the treatment of negative/cognitive symptoms and beyond. *Pharmacol Ther.* 2011;132(1):96–110.

Micallef J, Tardieu S, Gentile S, Fakra E, Jouve E, Sambuc R, Blin O. Effects of a subanaesthetic dose of ketamine on emotional and behavioral state in healthy subjects. *Neurophysiol Clin.* 2003;33(3):138-47.

Micle O, Muresan M, Antal L, Bodog F, Bodog A. The influence of homocysteine and oxidative stress on pregnancy outcome. *J Med Life.* 2012;5(1):68-73.

Miljevic C, Nikolic M, Nikolic-Kokic A, Jones DR, Niketic V, Lecic-Tosevski D, Spasic MB. Lipid status, anti-oxidant enzyme defence and haemoglobin content in the blood of long-term clozapine-treated

schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010;34(2):303-307.

Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biol Psychiatry*. 2009;65(9):732-41.

Miller AL. The methylation, neurotransmitter, and antioxidant connections between folate and depression. *Altern Med Rev*. 2008;12(3):216-26.

Miller EK, Cohen JD. An integrative theory of prefrontal cortex function *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:167–202.

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

Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci*. 1997;17(8):2921-7.

Moghaddam B, Krystal JH. Capturing the angel in "angel dust": twenty years of translational neuroscience studies of NMDAR antagonists in animals and humans. *Schizophr Bull*. 2012;38(5):942-9.

Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell*. 1999;98(4):427-36.

Monte AS, de Souza GC, McIntyre RS, Soczynska JK, dos Santos JV, Cordeiro RC, Ribeiro BM, de Lucena DF, Vasconcelos SM, de Sousa FC, Carvalho AF, Macêdo DS. Prevention and reversal of ketamine-induced schizophrenia related behavior by minocycline in mice: Possible involvement of antioxidant and nitric pathways. *J of psychopharmacol*. 2013;27(11):1032– 43.

Moore H, Susser E. Relating the effects of prenatal stress in rodents to the pathogenesis of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2011;70(10):906–7.

Morgan HD, Sutherland HGE, Martin DIK, Whitelaw E. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet.* 1999;23(3):314–318.

Moustafa AA, Hewedi DH, Eissa AM, Frydecka D, Misiak B. Homocysteine levels in schizophrenia and affective disorders-focus on cognition. *Front Behav Neurosci.* 2015;9:81.

Mukerjee S, Mahadik SP, Scheffer R, Correnti EE, Kelkar H. Impaired antioxidant defense at the onset of psychosis. *Schizophr Res.* 1996;19:19–26.

Naoi M, Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Yi H, Akao Y, Tanaka M. Oxidative stress in mitochondria: decision to survival and death of neurons in neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol.* 2005;31(1-3):81-93.

Negrón-Oyarzo I, Lara-Vásquez A, Palacios-García I, Fuentealba P, Aboitiz F. Schizophrenia and reelin: a model based on prenatal stress to study epigenetics, brain development and behavior. *Biol Res.* 2016;49:16.

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

Neill JC, Harte MK, Haddad PM, Lydall ES, Dwyer DM. Acute and chronic effects of NMDA receptor antagonists in rodents, relevance to negative symptoms of schizophrenia: a translational link to humans. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2014;24(5):822-35.

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.

Nieuwenhuis ILC, Takashima A. The role of the ventromedial prefrontal cortex in memory consolidation. *Behav Brain Res.* 2010;218(2):325–34.

Nishioka M, Bundo M, Kasai K, Iwamoto K. DNA methylation in schizophrenia: progress and challenges of epigenetic studies. *Genome Med.* 2012;4(12):96.

Obeid R, Herrmann W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett.* 2006;580(13):2994–3005.

Oommen AM, Griffin JB, Sarath G, Zemleni J. Roles for nutrients in epigenetic events. *J Nutr Biochem.* 2005;16:74–77.

Osoata GO, Yamamura S, Ito M, Vuppusetty C, Adcock IM, Barnes PJ, Ito K. Nitration of distinct tyrosine residues causes inactivation of histone deacetylase 2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;384(3):366-71.

Padurariu M, Ciobica A, Dobrin I, Stefanescu C. Evaluation of antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation in schizophrenic patients treated with typical and atypical antipsychotics. *Neurosci Lett.* 2010;479(3):317-20.

Palmer BA, Pankratz VS, Bostwick JM. The lifetime risk of suicide in schizophrenia: a reexamination. *Arch Gen Psychiatry.* 2005;62(3):247-53.

Pandya CD, Howell KR, Pillai A. Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013;46:214–23.

Park BH, Kim YJ, Park JS, Lee HY, Ha EH, Min JW, Park HS. Folate and homocysteine levels during pregnancy affect DNA methylation in human placenta. *J Prev Med Pub Health.* 2005;38(4):437–442.

Parletta N, Milte CM, Meyer BJ. Nutritional modulation of cognitive function and mental health. *J Nutr Biochem.* 2013;24(5):725-43.

Pazvantoglu O, Selek S, Okay IT, Sengul C, Karabekiroglu K, Dilbaz N, Erel O. Oxidative mechanisms in schizophrenia and their relationship with illness subtype and symptom profile. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2009;63(5):693–700.

Peleg-Raibstein D, Luca E, Wolfrum C. Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood. *Behav Brain Res.* 2012;233(2):398-404.

Poels EM, Kegeles LS, Kantrowitz JT, Javitt DC, Lieberman JA, Abi-Dargham A, Girgis RR. Glutamatergic abnormalities in schizophrenia: a review of proton MRS findings. *Schizophr Res.* 2014;152(2-3):325-32.

Popov NT, Stoyanova VK, Madzhirova NP, Vachev TI. Epigenetic aspects in schizophrenia etiology and pathogenesis. *Folia Med (Plovdiv).* 2012;54(2):12-6.

Prado EL, Sebayang SK, Apriatni M, Adawiyah SR, Hidayati N, Islamiyah A, Siddiq S, Harefa B, Lum J, Alcock KJ, Ullman MT, Muadz H, Shankar AH. Maternal multiple micronutrient supplementation and other biomedical and socioenvironmental influences on children's cognition at age 9-12 years in Indonesia: follow-up of the SUMMIT randomised trial. *Lancet Glob Health.* 2017;5(2):e217-e228.

Preventive Services Task Force (US). Folic acid for the prevention of neural tube defects: U.S. Preventive services task force recommendation statement. *Ann Intern Med.* 2009;150:626-631.

Pufulete M, Al-Ghnaniem R, Rennie JA, Appleby P, Harris N, Gout S, Emery PW, Sanders TA. Influence of folate status on genomic DNA methylation in colonic mucosa of subjects without colorectal adenoma or cancer. *Br J Cancer.* 2005a;92(5):838-842

Pufulete M, Al-Ghnaniem R, Khushal A, Appleby P, Harris N, Gout S, Emery PW, Sanders TA. Effect of folic acid supplementation on genomic DNA methylation in patients with colorectal adenoma. *Gut.* 2005b;54(5):648-653.

Pulido R, Jiménez-Escrig A, Orensanz L, Saura-Calixto F, Jiménez-Escrig A. Study of plasma antioxidant status in Alzheimer's disease. *Eur J Neurol.* 2005;12(7):531-5.

Quevedo J, Vianna M, Zanatta MS, Roesler R, Izquierdo I, Jerusalinsky D, Quillfeldt JA. Involvement of mechanisms dependent on NMDA receptors, nitric oxide and protein kinase A in the hippocampus but not

in the caudate nucleus in memory. *Behav Pharmacol.* 1997;8(8):713–717.

Raffa M, Atig F, Mhalla A, Kerkeni A, Mechri A. Decreased glutathione levels and impaired antioxidant enzyme activities in drug-naïve first-episode schizophrenic patients. *BMC Psychiatry.* 2011;11:124.

Raghavan R, Fallin MD, Wang X. Maternal plasma folate, vitamin B12 levels and multivitamin supplementation during pregnancy and risk of Autism Spectrum Disorder in the Boston Birth Cohort. *FASEB J.* 2016;30,151.6.

Ramaekers VT, Blau N. Cerebral folate deficiency. *Dev Med Child Neurol.* 2004;46(12):843-51.

Ramaekers VT, Sequeira JM2, Quadros EV2. The basis for folinic acid treatment in neuro-psychiatric disorders. *Biochimie.* 2016;126:79-90.

Ramos-Loyo J, Medina-Hernández V, Estarrón-Espinosa M, Canales-Aguirre A, Gómez-Pinedo U, Cerdán-Sánchez LF. Sex differences in lipid peroxidation and fatty acid levels in recent onset schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013;44:154-61.

Ranjekar PK, Hinge A, Hegde MV, Ghate M, Kale A, Sitasawad S, Wagh UV, Debsikdar VB, Mahadik SP. Decreased antioxidante enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Res.* 2003;121(2):109–22.

Rapoport JL, Addington AM, Frangou S, Psych MR. The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005. *Mol Psychiatry.* 2005;10(5):434-49.

Neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2012.

Rapoport JL, Giedd JN, Gogtay N. *Mol Psychiatry.* 2012; 17(12):1228-38.

Razoux F, Garcia R, Lena I. Ketamine, at a dose that disrupts motor behavior and latent inhibition, enhances prefrontal cortex synaptic

- efficacy and glutamate release in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32(3):719-27.
- Reddy R, Sahebarao MP, Mukherjee S, Murthy JN. Enzymes of the antioxidant defense system in chronic schizophrenic patients. *Biol Psychiatry*. 1991;30:409–12.
- Reddy RD, Yao JK. Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1996;55(1-2):33-43.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123(11):1939-51.
- Richetto J, Riva MA. Prenatal maternal factors in the development of cognitive impairments in the offspring. *J Reprod Immunol*. 2014;104–105:20–5.
- Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*. 2005;6(8):597-610.
- Roesler R, Schroder 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):207–213.
- Roffman JL, Lamberti JS, Achtyes E, Macklin EA, Galendez GC, Raeke LH, Silverstein NJ, Smoller JW, Hill M, Goff DC. Randomized multicenter investigation of folate plus vitamin B12 supplementation in schizophrenia. *JAMA Psychiatry*. 2013a;70(5):481-9.
- Ross BM, Seguin J, Sieswerda LE. Omega-3 fatty acids as treatments for mental illness: which disorder and which fatty acid? *Lipids Health Dis*. 2007;6:21.
- Ross CA, Margolis RL, Reading SA, Pletnikov M, Coyle JT. Neurobiology of schizophrenia. *Neuron*. 2006;52(1):139-53.

Roy S, Anvita K, Dangat K, Sable P, Asmita K, Joshi S. Maternal micronutrients (folic acid and vitamin B12) and omega 3 fatty acids: Implications for neurodevelopmental risk in the rat offspring. *Brain Dev.* 2012;34:64–71.

Sable P, Dangat K, Kale A, Joshi S. Altered brain neurotrophins at birth: consequence of imbalance in maternal folic acid and vitamin B12 metabolism. *Neuroscience.* 2011;190:127–34.

Sable PS, Dangat KD, Joshi AA, Joshi SR. Maternal ômega-3 fatty acid supplementation during pregnancy to a micronutrient-imbalanced diet protects postnatal reduction of brain neurotrophins in the rat offspring. *Neuroscience.* 2012;217:46-55.

Sable PS, Kale AA, Joshi SR. Prenatal omega 3 fatty acid supplementation to a micronutrient imbalanced diet protects brain neurotrophins in both the cortex and hippocampus in the adult rat offspring. *Metabolism.* 2013;62(11):1607-22.

Salgado JV, Hetem LA, Sandner G. Modelos experimentais de esquizofrenia – uma revisão Experimental models of schizophrenia – a review. *Rev Bras Psiquiatr.* 2006;28(2):135–141.

Salum C, Raisman-Vozari R, Michel PP, Zanardo Gomes M, Mitkovski M, Ferrario JE, Ginestet L, Del Bel EA. Modulation of dopamine uptake by nitric oxide in cultured mesencephalic neurons. *Brain Res.* 2008;1198:27–33.

Sams-Dodd F. Effects of continuous D-amphetamine and phencyclidine administration on social behaviour, stereotyped behaviour, and locomotor activity in rats. *Neuropsychopharmacology.* 1998;9(1):18–25.

Sarandol A, Kirli S, Akkaya C, Altin A, Demirci M, Sarandol E. Oxidative-antioxidative systems and their relation with serum S100 B levels in patients with schizophrenia: effects of short term antipsychotic treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2007;31(6):1164–9.

Sarna LK, Wu N, Wang P, Hwang SY, Siow YL, O K. Folic acid supplementation attenuates high fat diet induced hepatic oxidative stress

via regulation of NADPH oxidase. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012;90(2):155-65.

Schernhammer ES, Giovannucci E, Kawasaki T, Rosner B, Fuchs CS, Ogino S. Dietary folate, alcohol and B vitamins in relation to LINE-1 hypomethylation in colon cancer. *Gut.* 2010;59(6):794–799.

Schneider T, Przewlocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology.* 2005;30(1):80-9.

Schwabe K, Enkel T, Klein S, Schütte M, Koch M. Effects of neonatal lesions of the medial prefrontal cortex on adult rat behaviour. *Behav Brain Res.* 2004;153(1):21–34.

Shamsi S, Lau A, Lencz T, Burdick KE, DeRosse P, Brenner R, Lindenmayer JP, Malhotra AK. Cognitive and symptomatic predictors of functional disability in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2011;126:257–64.

Shi J, Gershon ES, Liu C. Genetic associations with schizophrenia: meta-analyses of 12 candidate genes. *Schizophr Res.* 2008;104(1-3):96–107.

Shorter KR, Miller BH. Epigenetic mechanisms in schizophrenia. *Prog Biophys Mol Biol.* 2015; 118(1-2):1-7.

Silva, R. C. Esquizofrenia: uma revisão. *Psicologia USP.* 2006;17(4):263– 285, 2006.

Singh R, Kanwar SS, Sood PK, Nehru B. Beneficial effects of folic acid on enhancement of memory and antioxidant status in aged rat brain. *Cell Mol Neurobiol.* 2011;31(1):83–91.

Snyder SH. The dopamine hypothesis of schizophrenia: focus on the dopamine receptor. *Am J Psychiatry.* 1976;133(2):197-202.

Srivastava N, Barthwal MK, Dalal PK, Agarwal AK, Nag D, Srimal RC, Seth PK, Dikshit M. Nitrite content and antioxidant enzyme levels in the blood of schizophrenia patients. *Psychopharmacology (Berlin).* 2001;158(2):140–145.

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

Stamm RA, Houghton LA. Nutrient intake values for folate during pregnancy and lactation vary widely around the world. *Nutrients*. 2013;5:3920–47.

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

Swerdlow NR, Geyer MA, Braff DL. Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology*. 2001;156(2-3):194-215.

Swerdlow NR, Geyer MA. Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schizophr Bull*. 1998;24(2):285-301.

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

Tiwari SK, Agarwal S, Chauhan LK, Mishra VN, Chaturvedi RK. Bisphenol-A impairs myelination potential during development in the hippocampus of the rat brain. *Mol Neurobiol*. 2015;51(3):1395–1416.

Tomiya M, Fukushima T, Kawai J, Aoyama C, Mitsushashi S, Santa T, Imai K, Toyo'oka T. Alterations of plasma and cerebrospinal fluid glutamate levels in rats treated with the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, ketamine. *Biomed Chromatogr*. 2006;20(6-7):628-33.

Tost H, Meyer-Lindenberg A. Dopamine-glutamate interactions: a neural convergence mechanism of common schizophrenia risk variants. *Biol Psychiatry*. 2011;69(10):912-3.

Tsuchie K, Miyaoka T, Furuya M, Liaury K, Ieda M, Wake R, Horiguchi J, Takechi M. The effects of antipsychotics on behavioral

abnormalities of the Gunn rat (unconjugated hyperbilirubinemia rat), a rat model of schizophrenia. *Asian J Psychiatr.* 2013;6(2):119-23.

Tuon L, Comim CM, Petronilho F, Barichello T, Izquierdo I, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Memory-enhancing treatments reverse the impairment of inhibitory avoidance retention in sepsis-surviving rats. *Crit Care.* 2008;12(5):R133.

Turetsky BI, Calkins ME, Light GA, Olincy A, Radant AD, Swerdlow NR. Neurophysiological endophenotypes of schizophrenia: the viability of selected candidate measures. *Schizophr Bull.* 2007;33(1):69-94.

Van Abeelen AF, Elias SG, Bossuyt PM, Grobbee DE, Van Der Schouw VT, Roseboom TJ, Uiterwaal CS. Famine exposure in the young and the risk of type 2 diabetes in adulthood. *Diabetes.* 2012;61(9):2255-60.

Van Den Buuse M. Modeling the positive symptoms of schizophrenia in genetically modified mice: Pharmacology and methodology aspects. *Schizophr Bull.* 2010;36(2):246–270.

Vasconcelos GS, Ximenes NC, de Sousa CN, Oliveira Tde Q, Lima LL, de Lucena DF, Gama CS, Macêdo D, Vasconcelos SM. Alpha-lipoic acid alone and combined with clozapine reverses schizophrenia-like symptoms induced by ketamine in mice: Participation of antioxidant, nitrenergic and neurotrophic mechanisms. *Schizophr Res.* 2015;165(2-3):163-70.

Vickers M. Developmental programming of the metabolic syndrome — critical windows for intervention. *World J Diabetes.* 2011;2(9):137–48.

Wagner C. Biochemical role of folate. In: Bailey LB. *Cellular metabolism. Folate in Health and Disease.* New York: Marcel Dekker; 1995. p. 23-42.

Wald DS, Kasturiratne A, Simmonds M. Effect of folic acid, with or without other B vitamins, on cognitive decline: meta-analysis of randomized trials. *Am J Med.* 2010;123(6):522-527.

Wang X, Li W, Li S, Yan J, Wilson JX, Huang G. Maternal Folic Acid Supplementation During Pregnancy Improves Neurobehavioral Development in Rat Offspring. *Mol Neurobiol.* 2017.

Waterland RA. Do maternal methyl supplements in mice affect DNA methylation of offspring? *J Nutr*. 2003; 133:238.

Waterland RA, Michels KB. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annu Rev Nutr*. 2007;27:363-88.

Waterland RA, Travisano M, Tahiliani KG, Rached MT, Mirza S. Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity. *Int J Obes*. 2008;32(9):1373–1379.

Weickert TW, Goldberg TE, Gold JM, Bigelow LB, Egan MF, Weinberger DR. Cognitive impairments in patients with schizophrenia displaying preserved and compromised intellect. *Arch Gen Psychiatry*. 2000;57(9):907-13.

Weinstock M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog Neurobiol*. 2001; 65(5):427-51.

Weinstock M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008;32(6):1073–86.

Weiss IC, Feldon J. Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. *Psychopharmacology*. 2001;156(2-3):305-26.

Wojdacz TK, Hansen LL. Techniques used in studies of age-related DNA methylation changes. *Ann NY Acad Sci*. 2006;1067:479-487.

Wolff GL, Roberts DW, Mountjoy KG. Physiological consequences of ectopic agouti gene expression: the yellow obese mouse syndrome. *Physiol Genomics*. 1999;1(3):151–163.

Wu Z, Zhang XY, Wang H, Tang W, Xia Y, Zhang F, Liu J, Fu Y, Hu J, Chen Y, Liu L, Chen DC, Xiu MH, Kosten TR, He J. Elevated plasma superoxide dismutase in first-episode and drug naive patients with schizophrenia: Inverse association with positive symptoms. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011;36(1):34–8.

Wu JQ, Kosten TR, Zhang XY. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013;46:200-6.

Xu MQ, Sun WS, Liu BX, Feng GY, Yu L, Yang L, He G, Sham P, Susser E, St Clair D, He L. Prenatal malnutrition and adult schizophrenia: further evidence from the 1959- 1961 Chinese famine. *Schizophr Bull*. 2009;35(3):568-76.

Yao JK, Reddy R, McElhinny LG, van Kammen DP. Effects of haloperidol on antioxidant defense system enzymes in schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 1998a;32:385-91.

Zhang F, Slungaard A, Vercellotti GM, Iadecola C. Superoxide-dependent cerebrovascular effects of homocysteine. *Am J Physiol*. 1998;274(6 Pt 2):R1704-11.

Zhang M, Zhao Z, He L, Wan C. A meta-analysis of oxidative stress markers in schizophrenia. *Sci China Life Sci*. 2010;53(1):112-24.

Zhao M, Chen YH, Chen X, Dong XT, Zhou J, Wang H, Wu SX, Zhang C, Xu DX. Folic acid supplementation during pregnancy protects against lipopolysaccharide-induced neural tube defects in mice. *Toxicol Lett*. 2014;224(2):201-8.

Zugno AI, Fraga DB, De Luca RD, Ghedim FV, Deroza PF, Cipriano AL, Oliveira MB, Heylmann AS, Budni J, Souza RP, Quevedo J. Chronic exposure to cigarette smoke during gestation results in altered cholinesterase enzyme activity and behavioral deficits in adult rat offspring: potential relevance to schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 2013a;47(6):740-6.

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*. 2013b;248:252-60.

Zugno AI, Chipindo HL, Volpato AM, Budni J, Steckert AV, De Oliveira MB, Heylmann AS, Da Rosa Silveira F, Mastella GA, Maravai

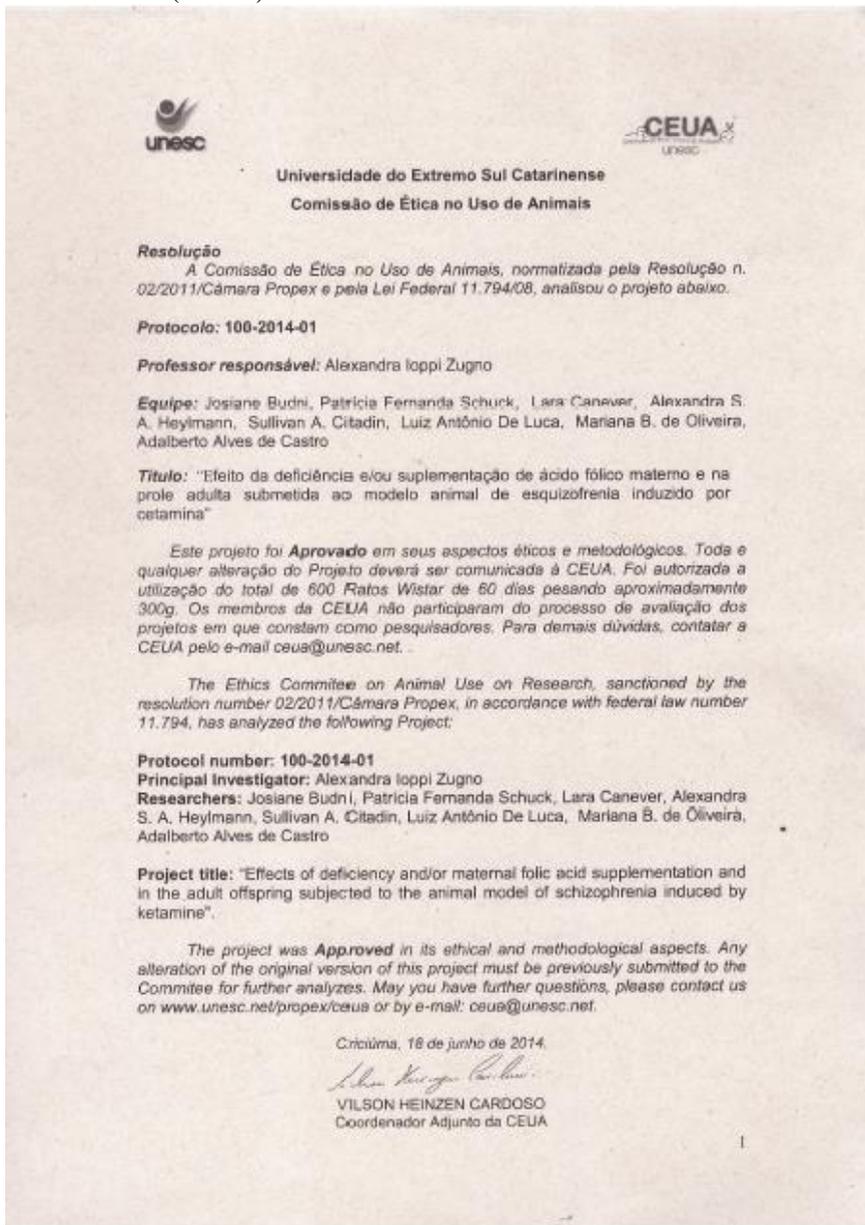
SG, Wessler PG, Binatti AR, Panizzutti B, Schuck PF, Quevedo J, Gama CS. Omega-3 prevents behavior response and brain oxidative damage in the ketamine model of schizophrenia. *Neuroscience*. 2014;259:223-31.

Zugno AI, Canever L, Heylmann AS, Wessler PG, Steckert A, Mastella GA, de Oliveira MB, Damázio LS, Pacheco FD, Calixto OP, Pereira FP, Macan TP, Pedro TH, Schuck PF, Quevedo J, Budni J. Effect of folic acid on oxidative stress and behavioral changes in the animal model of schizophrenia induced by ketamine. *J Psychiatr Res*. 2016;81:23-35.

Zugno AI, Oliveira MB, Mastella GA, Heylmann AS, Canever L, Pacheco FD, Damazio LS, Citadin SA, de Lucca LA, Simões LR, Malgarin F, Budni J, Barichello T, Schuck PF, Quevedo J. Increased risk of developing schizophrenia in animals exposed to cigarette smoke during the gestational period. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017;75:199-206.

ANEXO

Anexo A: Carta de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).



Anexo B: Composição nutricional da Dieta AIN 93 ou dieta controle.

Quantidades produzidas de cada substância na fórmula

Pedido
 Cliente Lara Canever UNESC
 Data 11/07/2014
 Validade 09/10/2014 Em geladeira 07/01/2015 Em freezer
 Manipulador
 Formula Dieta AIN 93 M
 Dose (g ou ml) 20.300 Vezes: 5 X
 Dose (Kg ou L) 20.30



Cód	Produto	Quantidade prescrita	Fornecedor	Fator correção	Lote	Validade	Quantidade prod. (g/ml)	Pesados prod. (g/ml) qsp	Verif OK
	AMIDO DE MILHO	48,67000%	ComProducts	1	834088	19/08/15	9.453,71	9.453,71	
	CASEINA	14,00000%	China	1	-L 13058	31/12/14	2.842,000	2.842,000	
	AMIDO DEXTRINIZADO	15,50000%	ComProducts	1	717183	08/10/14	3.146,500	3.146,500	
	SACAROSE	10,00000%	GA	1	708	27/05/16	2.030,000	2.030,000	
	OLEO DE MILHO	4,00000%	Bunge	1	L1213	19/09/14	812,000	812,000	
	CELULOSE MICROCRISTALINA	5,00000%	Famos	1	023279	30/07/17	1.015,000	1.015,000	
	MIX MINERAL AIN 93 M	3,50000%	PragSolucões	1	030814	03/06/15	710,500	710,500	
	MIX VIT AIN 93	1,00000%	PragSolucões	1	040714	04/07/15	203,000	203,000	
	L Castina	0,1800%	Pharma Nostra	1	130710	30/07/2015	36,540	36,540	
	BITARTARATO DE COLINA	0,2500%	Fragon	1	1211088	17/11/15	50,750	50,750	
	BHT	0,0008%	Oficialis	1			0,182	0,182	
		100,00000%					20.300	20.300	

diluições: 1/0000 em sacarose

Manipulado:

Aprovado:

OBS: Produto destinado a pesquisa. Isento de registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Fonte: Tabela adaptada de Pragsoluções Biociências
www.pragsolucoes.com.br

Anexo C: Composição nutricional da dieta deficiente em ácido fólico.

Quantidades produzidas de cada substância na fórmula

Pedido
 Cliente Lara Canever UNESC
 Data 11/07/2014
 Validade 09/10/2014 Em geladeira 07/01/2015 Em freezer
 Manipulador
 Formula Dieta AIN 93 M - Mod Deficiente Acido Folico
 Dose (g ou ml) 20.500 Vezes: 2 X
 Dose (Kg ou L) 20,50



Cód	Produto	Quantidade prescrita	Fornecedor	Fator correção	Lote	Validade	Quantidade prod. (g/ml)	Pesados prod. (g/ml)	Verif OK
	AMIDO DE MILHO	45,570000%	ComProducts	1	834088	19/08/15	9.546,85	9.546,85	
	CASEINA	14,000000%	China	1	HL 13058	31/12/14	2.870,000	2.870,000	
	AMIDO DEXTRINIZADO	15,500000%	ComProducts	1	717183	06/10/14	3.177,500	3.177,500	
	SACAROSE	10,000000%	GA	1	708	27/05/16	2.050,000	2.050,000	
	OLEO DE SOJA	4,000000%	Bunge	1	L1213	18/09/14	820,000	820,000	
	CELULOSE MICROCRISTALINA	5,000000%	Farmos	1	023279	30/07/17	1.025,000	1.025,000	
	MIX MINERAL AIN 93 M	3,500000%	PragSoluções	1	030614	03/06/15	717,500	717,500	
	MIX VIT AIN Mod P% Ac. Fólico	1,000000%	PragSoluções	1	110714	11/07/15	205,000	205,000	
	L Cistina	0,180000%	Pharma Nostra	1	130710	30/07/2015	36,900	36,900	
	BIFITARATO DE GULINA	0,250000%	Praxon	1	1211086	17/11/15	51,250	51,250	
	CORANTE VERMELHO								
	BHT	0,000800%	Officialis	1			0,164	0,164	
		100,000800%					20,500	20,500	

diluições: 1/10000 em sacarose

Manipulado:

Aprovado:

OBS: Produto destinado a pesquisa. Isento de registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Corante vermelho na água

Fonte: Tabela adaptada de Pragsoluções Biociências
www.pragssolucoes.com.br.

Anexo D: Composição nutricional da ração comum (padrão) oferecida aos animais no Biotério.

100110002		NUVILAB CR-1		Ração para animais de laboratório		17
						92-29392
COMPOSIÇÃO BÁSICA DO PRODUTO:						
Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio (sal comum), vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, nicotina, pentotato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, monóxido de manganês, óxido de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, leicina, metionina, BHT.						
NÍVEIS DE GARANTIA POR QUILOGRAMA DE PRODUTO:						
UMIDADE (máx)	125	g/kg	MATÉRIA MINERAL (máx)	90	g/kg	CÁLCIO (mín-máx)
PROTEÍNA BRUTA (mín)	220	g/kg	FIBRA BRUTA (máx)	70	g/kg	FÓSFORO (mín)
EXTRATO ETÉREO (mín)	40	g/kg				10-14
						8.000
VITAMINAS: VITAMINA A (mín) 13.000 UI/kg; VITAMINA D3 (mín) 2.000 UI/kg; VITAMINA E (mín) 34 UI/kg; VITAMINA K3 (mín) 3 mg/kg; VITAMINA B1 (mín) 5 mg/kg; VITAMINA B2 (mín) 6 mg/kg; VITAMINA B6 (mín) 7 mg/kg; VITAMINA B12 (mín) 22 mcg/kg; NIACINA (mín) 60 mg/kg; PANTOTEN DE CÁLCIO (mín) 20 mg/kg; ÁCIDO FÓLICO (mín) 1 mg/kg; BIOTINA (mín) 0,05 mg/kg; COLINA (mín) 1.900 mg/kg. MINERAIS: SÓDIO (mín) 2.700 mg/kg; FERRO (mín) 50 mg/kg; MANGANÊS (mín) 60 mg/kg; ZINCO (mín) 60 mg/kg; COBRE (mín) 10 mg/kg; IODO (mín) 2 mg/kg; SELENIO (mín) 0,05 mg/kg; COBALTO (mín) 1,5 mg/kg; FLUOR (máx) 80 mg/kg; AMINOÁCIDOS: LISINA (mín) 12 g/kg; METIONINA (mín) 4.000 mg/kg. ADITIVOS: BHT 100 mg/kg.						
INDICAÇÃO: Ração pronta para uso, indicado para a alimentação de camundongos e ratos de laboratório.						
USO: Administração à vontade, através de comedouros suspensos.						
CONSERVAÇÃO: Conservar o produto em ambiente seco e arejado, sobre estrados, evitando-se luz e calor excessivos.						
DATA DE FABRICAÇÃO: 15/06/2016		VALIDADE: 06 meses após a data de fabricação.				
VALIDADE: 12/12/2016		PESO LÍQUIDO: 20,00 kg				
0015061614		CENTRO DE REGISTRO NO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - INDÚSTRIA BRASILEIRA				
					 0920029392017	

Fonte: Rótulo da ração do Biotério. Foto registrada pela pesquisadora, 2014.