

**ARLINDO DA COSTA AFONSO**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DA  
MELATONINA SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS  
E DE METABOLISMO ENERGÉTICO NO MODELO ANIMAL  
DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade  
do Extremo Sul Catarinense para  
obtenção do título  
Orientadora: Prof<sup>ra</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alexandra  
Ioppi Zugno.

**CRICIÚMA  
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

A257a Afonso, Arlindo da Costa.

Avaliação dos efeitos da administração da Melatonina sobre parâmetros comportamentais e de metabolismo energético no modelo animal de esquizofrenia induzido por Cetamina / Arlindo da Costa Afonso. – 2017.

114 p: il. ; 21 cm.

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

Orientação: Alexandra Ioppi Zugno.

1. Esquizofrenia – Tratamento. 2. Melatonina – Uso terapêutico. 3. Metabolismo energético. 4. Cetamina. I. Título.

CDD. 22<sup>a</sup> ed. 616.8982

Bibliotecária Rosângela Westrupp – CRB 14º/364

Biblioteca Central Prof. Eurico Back – UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

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

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

---

## PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pelo candidato **Arlindo da Costa Afonso** sob o título “**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DA MELATONINA SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS EM UM MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA**”, para obtenção do grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

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

Criciúma, SC, 20 de julho de 2017.

Prof. Dr. **EDUARDO PACHECO RICO**

Membro Relator – UNESC

Prof.ª Dra. **SAMIRA DA SILVA VALVASSORI**

Membro Interno – UNESC

Prof.ª Dra. **LISIANE TUON GENEROSO BITENCOURT**

Membro Externo - UNESC

Prof.ª Dra. **GISLAINE TEZZA REZIN**

Membro Externo – UNISUL

Prof.ª Dra. **Alexandra Ioppi Zugno**

Orientadora

Prof.ª Dra. **Maria Inês da Rosa**

Coordenadora do PPGCS



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



**Dedico este trabalho à minha  
mãe Maria Teresa Cativa, por  
todo amor, carinho e  
encorajamento.**



## AGRADECIMENTOS

Depois desta longa jornada, agradecer torna-se uma tarefa delicada pelo risco de não poder mencionar todos que certamente contribuíram para que esta realização fosse hoje um fato. Então, antecipo-me agradecendo a todos aqueles que mesmo não sendo citados abaixo, a seu jeito tiveram alguma influência na concretização desta tese.

Agradeço em primeiro lugar, à Deus pelo dom da vida e por me permitir chegar a este momento com saúde.

À Reitoria e o sector de relações internacionais da Unesc, pela oportunidade para frequentar o doutorado e por todo apoio administrativo prestado durante o meu tempo na Unesc.

À todos os professores do PPGCS pelo profissionalismo e capacidade de bem ensinar.

À Prof. Dra. Alexandra Ioppi Zugno, pela sábia orientação, paciência e compreensão, certamente lhe serei grato pelo resto do meu tempo.

À Embaixada de Angola no Rio de Janeiro e o consulado em São Paulo, pelo apoio moral e administrativo durante o período de minha formação no Brasil.

Ao Instituto Nacional de Gestão de Bolsas – Angola (INAGB) e ao sector de apoio ao estudante do Rio de Janeiro, pela bolsa concedida.

À Universidade José Eduardo dos Santos (UJES) em particular ao Instituto Superior Politécnico do Huambo (ISPH) pela dispensa para continuidade dos estudos.

À todos colegas do laboratório de neurociências em particular ao Felipe Pacheco Damásio, Lara Canaver, Gustavo Mastella e todos alunos de iniciação científica pela participação e pelo apoio sem reservas no desenvolvimento desta tese.

Aos amigos Ederbal Forest da Silva, Gustavo Feier, Leonardo Spillere, Ricardo Cassoma, Tomás Mambo, Professor Jaime Rodolfo, Professor Cândido por vossa amizade, convivência e pelo apoio moral demonstrado durante o período de minha estadia em Criciúma.

Ao amigo Mone, por sua amizade genuína, pelo encorajamento permanente e por toda atenção que sempre demonstrou.

Ao amigo Helder Lucas Chipindo pelo encorajamento e sua amizade inabalável.

Aos meus compadres Amélia Marta Gonçalves Adriano e Deolindo Pinto Henriques Coelho, pela incondicional hospitalidade e por vossa grande amizade.



Aos meus irmãos Fastudo Cativa, Margarida José Tomás, António Candongo e Diamantino Manuel Antão, por todo apoio prestado.

À tia Helena Cativa, pelo incentivo e por ter mostrado o melhor caminho para seguir na vida.

À minha esposa e companheira Rebeca Júlia Gonçalves Adriano, por todo amor, carinho e apoio incondicional.

Aos meus filhos e aos meus sobrinhos que apesar das ausências prolongadas souberam demonstrar uma conduta responsável, carinho e muita compreensão.

À todos vocês os meus sinceros agradecimentos...



*“Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado”.*

**Albert Einstein**



## RESUMO

A pesar de várias décadas de esforços em pesquisa, a etiologia e fisiopatologia da esquizofrenia continuam sendo um desafio e os tratamentos existentes apresentam limitações consideráveis no manejo dos casos de esquizofrenia. Portanto, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito da administração da melatonina sobre parâmetros comportamentais e de metabolismo energético no modelo animal de esquizofrenia induzido pela administração de cetamina. Para tal, duas doses de MLT (1mg/kg e 10mg/kg) foram usadas em dois protocolos diferentes, sendo um de prevenção e outro de reversão. Assim, no protocolo de prevenção os animais receberam MLT nas doses de 1mg/kg ou 10mg/kg ou salina por gavagem, uma vez ao dia durante 14 dias, entre os dias 8 e 14 receberam cetamina (25mg/kg) ou salina via intraperitoneal (i.p). Enquanto que no protocolo de reversão, os animais receberam cetamina (25mg/kg) ou salina (i.p), uma vez por dia, durante 14 dias, entre os dias 8 e 14 receberam MLT (1mg/kg ou 10mg/kg), uma vez ao dia. No 14º dia, os animais foram submetidos a avaliação da distância percorrida, estereotipia, tempo de permanência no centro e nas bordas além da avaliação da inibição da IPP. O córtex pré-frontal, hipocampo e estriado foram dissecadas para posteriores análises da atividade dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial e atividade da Creatina Cinase (CK). Esses resultados demonstram que a administração repetida de cetamina, resulta em hiperatividade e comprometimento da IPP. Os resultados revelam que nos dois protocolos avaliados a cetamina induziu o aumento da distância percorrida, movimentos estereotipados e tempo de permanência no centro e nas bordas. A MLT, não teve influência sobre os efeitos da cetamina; no protocolo de prevenção a MLT na dose de 10mg/kg apresentou aumento dos movimentos de estereotipia e induziu os animais à um aumento do tempo de permanência no centro e diminuição do tempo de permanência nas bordas. Em relação a inibição do reflexo de sobressalto, a MLT nas duas doses testadas apresentou um efeito preventivo e de reversão das três intensidades avaliadas. Os resultados deste estudo também mostram que a MLT sozinha ou associada a cetamina induziu a alterações dos complexos da cadeia transportadora de elétrons (CTE). No protocolo de prevenção, o grupo MLT10+cetamina induziu o aumento da atividade do complexo IV no hipocampo; enquanto que no protocolo de reversão a MLT nas duas doses testadas sozinha ou em associação com a cetamina alterou a atividade dos complexos I, II-II e IV do córtex, estriado e hipocampo



respetivamente. Com relação a atividade da enzima CK, resultados deste estudo mostram que a cetamina alterou a sua atividade no córtex e hipocampo no protocolo de prevenção, enquanto que a MLT nas duas doses preveniu o efeito deletério da cetamina nestas estruturas cerebrais. Diante destes resultados, assume-se que o modelo de esquizofrenia induzido por cetamina representa uma ferramenta útil para o estudo da esquizofrenia e que a MLT possui algum potencial protetor sobre a IPP no modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina. Portanto mais estudos são necessários para um melhor entendimento desta hipótese.

**Palavras chaves:** Esquizofrenia; Melatonina; Mitochondria.



## ABSTRACT

Although decades of research efforts, the etiology and pathophysiology of schizophrenia remains a challenge and existing treatments have significant limitations in the management of schizophrenia cases. However, this study aimed to evaluate the effect of melatonin administration on behavioral and energy metabolism parameters in the animal model of schizophrenia induced by ketamine administration. Two doses of MLT (1mg/kg and 10mg/kg) were used in two different protocols, prevention and reversion. Thus, in the prevention protocol, the animals received MLT at doses of 1mg/kg or 10mg/kg or saline per gavage, once a day for 14 days, between days 8 and 14 received ketamine (25mg/kg) or saline intraperitoneally (i.p). While in the reversion protocol, the animals received ketamine (25mg/kg) or saline (ip) once daily for 14 days, between days 8 and 14 received MLT (1mg/kg or 10mg/kg), once a day. On the 14th day, the animals were submitted to evaluation of the traveled distance, stereotypy, time of permanence in the center and in the borders besides the evaluation of the inhibition of IPP. The pre-frontal cortex, hippocampus and striatum were dissected for further analysis of the complexes I, II, II-III and IV of the mitochondrial respiratory chain and creatine kinase (CK) activity. These results demonstrate that repeated administration of ketamine results in hyperactivity and impairment of IPP. The results show that in both protocols evaluated, ketamine induced an increase in traveled distance, stereotyped movements and increased time in the center and decreased time in the borders. MLT had no influence on the ketamine effects; In the prevention protocol, MLT at the 10mg/kg dose showed an increase of the movements of stereotypy and induced the animals to an increase of the time of permanence in the center and decrease of the time of permanence in the borders. Regarding the inhibition of the startle reflex, MLT in the two doses tested showed a preventive and reversion effect of the three evaluated intensities. The results of this study also show that MLT alone or associated with ketamine induced in electron transport chain complexes (CTE) changes. In the prevention protocol, the MLT10 + ketamine group induced increased IV complex activity in the hippocampus; While in the reversion protocol the MLT in the two tested doses alone or in association with ketamine altered the complexes I, II-II and IV activity of the cortex, striatum and



hippocampus respectively. Regarding the activity of the CK enzyme, results of this study show that ketamine altered its activity in the cortex and hippocampus in the prevention protocol, whereas MLT in both doses prevented the ketamine deleterious effect in these brain structures. Given these results, it is assumed that the ketamine-induced schizophrenia model represents a useful tool for schizophrenia study and that MLT has some protective potential over IPP in the animal model of ketamine-induced schizophrenia. Therefore more studies are needed to better understand this hypothesis.

**Keywords:** Schizophrenia; Melatonin; Mitochondria.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - O oxigénio molecular (O) é reduzido a vários radicais livres e espécies reactivas relacionadas como ilustrado nesta figura. Embora o radical anião superóxido (O<sub>2</sub>.-) não seja considerado especialmente reactivo, o radical hidroxilo (•OH) facilmente danifica qualquer molécula na vizinhança do local onde é produzido. Uma variedade de enzimas causa a formação do O<sub>2</sub>.- e, da mesma forma, por causa do vazamento de elétrons da cadeia de transporte de elétrons, os radicais são produzidos abundantemente nas mitocôndrias. Várias enzimas, incluindo superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) metabolizam estes reagentes para subprodutos menos tóxicos ou não tóxicos. Quando o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) é metabolizado por GPx, a glutatona reduzida (GSH) é oxidada para o glutatona dissulfureto (GSSG) que é convertido de volta a GSH pela enzima glutatona redutase (GRd) (Adaptado de Russel et al., 2004)... 47
- Figura 2 - Síntese da MLT a partir do aminoácido essencial triptofano (adaptado de Sergio et al., 2012)..... 50
- Figura 3 - Representação esquemática dos potenciais mecanismos pelos quais a MLT protege as mitocôndrias. (A) Posta no interior da mitocondria a MLT detoxifica diretamente as ERO. (B) A MLT aumenta a atividade de enzimas antioxidantes (SODs e GPx). (C) A MLT estabiliza a membrana interna mitocondrial (MIM). (D) A MLT aumenta a atividade e respiração da CTE e produção de ATP. (E) A MLT regula a expressão do genes mitocondriais. As letras romanas I, II, II, IV e V representam complexos da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais; ME membrana externa ; MI-membrana interna; PTPM-poro transitório de permeabilidade mitocondrial (adaptado de Hong-Mei e Yiqiang, 2014)..... 54
- Figura 4 - Os ratos foram separados aleatoriamente em seis grupos experimentais (n= 10-12). Os animais receberam MLT nas doses de 1 ou 10mg/kg ou água, uma vez por dia, durante 14 dias, entre os dias 8-14 (durante 7 dias) receberam cetamina 25mg ou salina, uma vez ao dia. No protocolo de reversão os animais receberam cetamina (25mg/kg), uma vez por dia durante 14 dias, entre os dias 8-14 (durante 7 dias) receberam MLT1 ou 10mg/kg, uma vez ao dia. Dados do pesquisador 2015..... 59



Figura 5 - Efeito da administração da MLT (1mg/kg e MLT10mg/kg) e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre a atividade locomotora (distância percorrida e esteriotipia) no protocolo de prevenção. Os dados estão expressos como média±EPM de 10-12 animais em cada grupo. *diferente de controle (*p<0,05; ***p<0,0001).....	66
Figura 6 - Efeito da administração da MLT (1mg/kg e 10mg/kg) e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre a atividade locomotora (distância percorrida, tempo de permanência no centro e nas bordas) no protocolo de prevenção. Os dados estão expressos como média ± EPM de 10-12 animais em cada grupo.....	67
Figura 7 - Efeito da administração da MLT (1mg/kg e 10mg/kg) e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre a atividade locomotora (tempo de permanência no centro e nas bordas) no protocolo de prevenção. Os dados estão expressos como média ± EPM de 10-12 animais em cada grupo. * diferente de controle (*p<0,05; ***p<0,0001). .....	68
Figura 8 - Efeito da administração da MLT (1mg/kg e 10mg/kg) e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre a inibição por pré-pulso no protocolo de prevenção. Os dados estão expressos como média ± EPM de 10-12 animais em cada grupo. * diferente de controle (*p<0,05; ***p<0,001).....	69
Figura 9 - Efeito da administração da MLT (1mg/kg e 10mg/kg) e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre a atividade dos complexos I, II, II-III e IV e da CK nas diferentes estruturas cerebrais de ratos no protocolo de prevenção. Os dados estão expressos como média±EPM de 10 animais em cada grupo. * diferente de controle (* = p< 0,05).....	70
Figura 10 - Efeito da administração da MLT (1mg/kg e 10mg/kg) e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre a atividade locomotora (distância percorrida e esteriotipia) no protocolo de reversão. Os dados estão expressos como média±EPM de 10-12 animais em cada grupo. *diferente de controle (*p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001). .....	71
Figura 11 - Efeito da administração da MLT1 (mg/kg e MLT10mg/kg) e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre a atividade locomotora (distância percorrida e esteriotipia) no protocolo de reversão. Os dados estão expressos como média±EPM de 10-12 animais em cada grupo. .	72
Figura 12 - Efeito da administração da cetamina (25mg/kg) e/ou tratamento com MLT (1mg/kg e 10mg/kg) sobre a atividade locomotora (tempo de permanência no centro e nas bordas) no protocolo de	



reversão. Os dados estão expressos como média±EPM de 10-12 animais em cada grupo. * diferente de controle (*p<0,05).....	73
Figura 13 - Efeito da administração da cetamina (25mg/kg) e/ou tratamento com MLT (1mg/kg e 10mg/kg) sobre a inibição por pré-pulso nas diferentes estruturas cerebrais de ratos no protocolo de reversão. Os dados estão expressos como média ± EPM de 10 animais em cada grupo. * diferente de controle (**p<0,001).....	74
Figura 14 - Efeito da administração da cetamina (25mg/kg) e/ou tratamento com MLT (1mg/kg e 10mg/kg) sobre a atividade dos complexos I, II, II-III e IV e da CK nas diferentes estruturas cerebrais de ratos no protocolo de reversão. Os dados estão expressos como média ± EPM de 10 animais em cada grupo. * diferente de controle (* = p<0,05). .....	75



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UNESC	Universidade do Extremo Sul Catarinense
PPGCS	Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde
UJES	Universidade José Eduardo dos Santos
SNC	Sistema Nervoso Central
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
IP3	Inositol Trifosfato
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
MLT	Melatonina
PCP	Fenciclidina
AFMK	N <sup>1</sup> -acetyl-N <sup>2</sup> -formil-5-methoxykynuramine
AMK	N <sup>1</sup> -acetyl-5-methoxykynuramina
NMDA	N-methyl-D-aspartate
CK	Creatine Kinase
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons
ADP	Adenosina Difosfato
IPP	Inibição por Pré-pulso
PMM	Potencial de Membrana Mitocondrial
PTPM	Poros Transitórios de Permeabilidade Mitocondrial
CPF	Córtex Pré-frontal
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
AMPA acid	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic
SOD	Superóxido Dismutase
CAT	Catalase
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione
ON	Óxido Nítrico
ATP	Trifosfato de Adenosina
WHO	World Health Organization
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases
TPH1	Triptofano hidroxilase 1
AANAT	Arlalquilamina N-acetiltransferase
IOMT	Hidroindol-oxi-meltransferase
CONCEA Animal	Conselho Nacional de Controle de Experimentação
CEUA	Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais



SBNeC	Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento
APA	American Psychiatric Association
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
UI/L	Unidades Internacionais por Litro
MEM	Membrana Externa Mitocondrial
MIM	Membrana Interna Mitocondrial
EEM	Espaço Entre Membranas
EPM	Erro padrão da média
5-HT <sub>2</sub>	Serotonina
GSH	Glutathiona Reduzida
GSSG	Glutathiona Dissulfeto
GRd	Glutathiona Redutase



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>37</b>
1.1 HIPÓTESE DOPAMINERGICA E GLUTAMATERGICA DA ESQUIZOFRENIA .....	40
1.2 ESQUIZOFRENIA E DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL .....	42
1.3 ANTIPSICÓTICOS .....	47
1.4 MELATONINA .....	49
1.5 MELATONINA E ESQUIZOFRENIA .....	52
1.6 MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA .....	54
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>56</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>57</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	57
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	57
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>58</b>
4.1 ASPECTOS ÉTICOS .....	58
4.2 ANIMAIS.....	58
4.3 FÁRMACOS .....	60
<b>4.3.1 Cetamina</b> .....	<b>60</b>
<b>4.3.2 Melatonina</b> .....	<b>60</b>
4.4 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL .....	60
<b>4.4.1 Atividade locomotora</b> .....	<b>61</b>
<b>4.4.2 Interação da inibição por pré-pulso</b> .....	<b>61</b>
4.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	62
<b>4.5.1 Atividade da Cadeia Respiratória Mitochondrial Determinação da atividade do Complexo I (NADH desidrogenase)</b> .....	<b>62</b>
<b>4.5.2 Atividade da Creatina Cinase Determinação da atividade da enzima CK</b> .....	<b>63</b>
<b>5 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>65</b>
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>66</b>
6.1 PROTOCOLO DE PREVENÇÃO.....	66
<b>6.1.1 Atividade locomotora</b> .....	<b>66</b>
<b>6.1.2 Teste de inibição por pré-pulso</b> .....	<b>68</b>
<b>6.1.3 Atividade dos complexos da cadeia respiratória e da CK</b> .....	<b>69</b>
6.2 PROTOCOLO DE REVERSÃO.....	70
<b>6.2.1 Atividade locomotora distância percorrida e movimentos estereotipados</b> .....	<b>70</b>
<b>6.2.2 Teste de inibição por pré-pulso</b> .....	<b>73</b>
<b>6.2.3 Atividade dos complexos da cadeia respiratória e da CK</b> .....	<b>74</b>
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	<b>76</b>
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	<b>85</b>



<b>9 PERPECTIVAS.....</b>	<b>86</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS ..</b>	<b>112</b>
<b>ANEXO B – FICHA DE AUTORIZAÇÃO .....</b>	<b>113</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico crônico que compromete várias funções cognitivas tais como memória, pensamento, percepção e emoções, assim como a motricidade e conduta social (Bowie e Harvey, 2006; Javitt, 2010). Por serem bastante complexos e diversos, os sintomas da esquizofrenia são tradicionalmente agrupados em positivos e negativos (Lesch, 2001). Os sintomas positivos podem ser caracterizados por delírios e alucinações, os sintomas negativos incluem embotamento afetivo, isolamento social, anedonia, escassez de pensamentos (Tandon et al., 2009). Um terceiro grupo de sintomas tornou-se particularmente importante na última década: os sintomas cognitivos. A este respeito, na esquizofrenia estão afetados desde os estágios iniciais do transtorno, vários domínios da cognição como a velocidade de processamento, atenção, memória de trabalho, aprendizagem verbal e visual, raciocínio e resolução de problemas (Van, 2009; Cuesta et al., 2015). Como consequência, estes pacientes tem sua produtividade, qualidade de vida e funcionamento sociais afetados.

Acreditava-se que este grupo de sintomas seria evidente somente em pacientes idosos com esquizofrenia, mas atualmente os sintomas cognitivos são considerados um dos núcleos na investigação deste transtorno. Sabe-se que estes sintomas não são causados pelas medicações utilizadas por estes pacientes e que essas medicações, em sua grande maioria, também são ineficazes em relação a esse grupo de sintomas (Kraus e Keefe, 2007; Galletly, 2009). É comum seu surgimento na fase mais tardia da adolescência ou no início da idade adulta e sua prevalência no mundo é de cerca de 1% (Sha et al., 2005; Messias et al., 2008), com uma incidência anual de 0,8 casos por 10.000 habitantes (Martín, 2009). A expectativa de vida de homens e mulheres com esquizofrenia é de cerca de 15 e 12 anos respectivamente mais curto, do que na população geral (Crump et al., 2013).

A esquizofrenia é uma doença cerebral grave com um curso heterogêneo, em que 25-30% das pessoas acometidas no mundo, apresentam um curso moderado com remissão quase completa, 50% têm um curso moderado com algum decréscimo dos sintomas e 20-25% apresentam sintomas crônicos (WHO; ICD-10, 2007). Não há diferença na frequência em relação ao gênero, no entanto, é comum os homens apresentarem início dos sintomas precocemente e por tal, tendem a apresentar formas mais graves do transtorno com mais sintomas negativos, menor probabilidade de remissão e geralmente, pior prognóstico quando comparados às mulheres (Jablensky, 2000).

Entre os pacientes com esquizofrenia é comum a comorbidade com outros transtornos psiquiátricos, doenças clínicas e uso de drogas lícitas e ilícitas. Apesar de estar associado com outras comorbidades, tais como o transtorno de pânico ou transtorno de stresse pós-traumático, as comorbidades mentais comuns em pacientes com esquizofrenia são o transtorno obsessivo-compulsivo com uma prevalência no mundo de cerca 46%, o transtorno por abuso de substâncias 47% e depressão 81% (Green et al., 2003). O risco de mortalidade em indivíduos com esquizofrenia é duas a três vezes maior do que na população geral (McGrath et al., 2008). O suicídio é a principal causa de mortalidade prematura entre esses pacientes cuja taxa estima-se em 10% e ocorre, principalmente, durante os primeiros dois anos do transtorno (Meltzer, 2002; Tandon, 2005). Além de uma elevada taxa de suicídio efetivado, a incidência de tentativas de suicídio em pacientes com esquizofrenia é de duas a cinco vezes maiores do que a encontrada na população geral (Siris, 2001). A esquizofrenia é, no contexto atual, responsável por um profundo impacto sócio-econômico para os pacientes acometidos assim como para suas famílias (Stefan et al., 2002).

Apesar de vários fatores e mecanismos terem sido propostos para entender a patogênese da esquizofrenia, sua etiopatologia permanece desconhecida (Van Os e Kapur, 2009; Insel, 2010). A maioria dos estudos aponta para várias possíveis hipóteses etiológicas da esquizofrenia. A primeira, e a mais aceita, hipótese etiológica da esquizofrenia está relacionada com o desequilíbrio no sistema de neurotransmissores, principalmente nos sistemas dopaminérgico (Kapur e Remington, 2001), glutamatérgico (Konradi e Heckers, 2003; Kantrowitz e Javitt, 2010) e GABAérgico (Caruncho et al., 2004; Frankle et al., 2015) e alterações nas suas interações (Carlsson et al., 2001; Menschikov et al., 2016). As teorias adicionais sobre a patogênese da esquizofrenia incluem fatores genéticos e ambientais (McGuffin, 2004; Fatjo-Vilas et al., 2008), comprometimento do desenvolvimento neural e conectividade (White e Hilgetag, 2011), neuroinflamação (Tomasik et al., 2016; Trépanier et al., 2016), bem como bioenergética anormal (Ben-Shachar e Laifenfeld, 2004; Yuksel et al., 2015).

A hipótese neurodesenvolvimental realça a esquizofrenia como um transtorno com início pré-natal e desencadeado no começo da vida adulta. De acordo com esta hipótese, a esquizofrenia caracteriza-se por uma conectividade sináptica reduzida (McGlashan e Hoffman, 2000; Faludi e Mirmics, 2011) e múltiplos sistemas neurais desregulados, especialmente os sistemas dopaminérgico e glutamatérgico (Bauer et al.,

2012). Tem sido proposto que a trajetória do desenvolvimento inclui a elaboração reduzida de vias inibitórias e a poda excessiva de vias excitatórias, implicando um equilíbrio excitatório-inibitório alterado no córtex pré-frontal (Insel, 2010). A redução da mielinização também está relacionada com a alteração da conectividade neuronal. Além disso, múltiplas linhas de evidência sugerem associação da esquizofrenia com alterações progressivas na estrutura cerebral, tais como o alargamento ventricular lateral, aumento do caudado, anormalidades da substância cinzenta e branca, reduções volumétricas dos lobos frontais e temporais, bem como do hipocampo (DeLisi, 2008; Olabi et al., 2011; Vita et al., 2012), fornecendo evidências *prima facie* para a origem neuro-desenvolvimental deste transtorno. Pensa-se que tais alterações são mediadas por imuno-inflamação neuroprogressiva, estresse oxidativo, nitrosativo e vias de morte celular que são influenciadas por uma diversidade de fatores ambientais (Venkatasubramanian e Debnath, 2013). Entre outros fatores de que contribuem para o desenvolvimento da esquizofrenia encontram-se: o nascimento em meio urbano, nascimento no inverno, idade avançada dos progenitores, infecção pré-natal, desnutrição pré-natal, estresse materno, complicações obstétricas, status socioeconômico, entre outros (McGrath e Susser, 2009; Meyer e Feldon, 2010). Sabe-se que há uma grande contribuição genética para o desencadeamento da doença, entretanto, quando todos esses fatores ou a maioria deles ocorrem em conjunto, o risco para desenvolver esquizofrenia pode ser maior (Tamminga e Holcomb, 2005).

Os antipsicóticos constituem o principal tratamento para indivíduos com esquizofrenia. Embora tenham persistido como a melhor opção de tratamento deste transtorno mental, sendo efetivos para o tratamento de sintomas positivos, estas medicações permanecem limitadas em relação aos sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia (Buchanan et al., 2007). Acrescido a esta limitação, os efeitos colaterais podem ser estressantes e frequentemente intoleráveis, incluindo movimentos involuntários como; tremores e rigidez, discinesia tardia, hiper-salivação, aumento do ritmo cardíaco, síndrome metabólica e ganho de peso (Coccarello e Moles, 2010; Pramyothin e Khaodhiar, 2010). Dessa forma, estes efeitos colaterais por si, requerem mais tratamento farmacológico ou resultam na interrupção do tratamento, levando à subseqüentes recaídas. Uma aderência parcial ou completo abandono do tratamento, é geralmente comum em transtornos mentais graves. Estima-se que cerca de metade dos pacientes com esquizofrenia em tratamento, deixa de tomar 30% ou mais da medicação prescrita (Velligan et al., 2006; Goff et al., 2010). A não adesão está

associada à graves consequências clínicas tais como aumento do risco de recaída, suicídio ou comportamentos agressivos, entre outros além de elevados custos, tanto monetários como de recursos psicossociais (Sajatovic, 2010; Acosta, 2012). Outro fato importante é que aproximadamente um terço de indivíduos com esquizofrenia não respondem a medicações antipsicóticas (Bentall, 2009). Os défices de sono são frequentemente observados em pacientes com esquizofrenia e são reiteradamente parte da fase prodrômica anterior à recidiva, mesmo quando os pacientes estão sob medicação (Chemerinski et al., 2002). Existem evidências demonstrando que as alterações na arquitetura do sono sejam devido aos baixos níveis de melatonina (MLT) endógena circulante, cuja função original é de regular o ciclo circadiano sono/vigília (Fanget et al., 1989; Monteleone et al., 1992). Os pacientes com esquizofrenia não apresentam um padrão circadiano de secreção da MLT normal (Bersani et al., 2003; Trbovic, 2010). Alguns estudos mostraram níveis plasmáticos da MLT noturna reduzidos em pacientes não medicados e aqueles sob medicação antipsicótica (Fanget et al., 1989; Suresh et al., 2007).

### 1.1 HIPÓTESE DOPAMINÉRGICA E GLUTAMATÉRGICA DA ESQUIZOFRENIA

Apesar do crescente consenso de que a esquizofrenia é um transtorno neural, sua fisiopatologia continua a ser estudada (Meyer e Feldon, 2010). Entretanto, não há dúvidas da existência de alterações anatômicas e bioquímicas cerebrais em sua gênese, 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), que resultam em irregularidades no funcionamento de regiões córtico-basais, que pode levar ao desencadeamento dos sintomas do transtorno (Tost et al., 2012).

A hipótese dopaminérgica da esquizofrenia propõe uma hiperestimulação subcortical da transmissão dopaminérgica em receptores de dopamina do tipo D<sub>2</sub>, responsáveis pelos sintomas positivos do transtorno (Guillin et al., 2007) e os sintomas negativos e cognitivos seriam resultado do déficit dopaminérgico no córtex dorsolateral e préfrontal (Carlsson et al., 2001; Abi-dagham et al., 2004). Esta hipótese é apoiada pela estreita correlação entre doses terapêuticas de antipsicóticos convencionais e suas afinidades por receptores D<sub>2</sub> e, adicionalmente, devido à evidências de aumento do número de receptores D<sub>2</sub> em cérebros de pacientes com esquizofrenia

(Pearlson, 2000; Miyamoto et al., 2003; Wong e Van, 2003). O glutamato é o aminoácido excitatório mais abundante do sistema nervoso central (SNC), onde sua transmissão é mantida sob fino controle e é imprescindível para funções fisiológicas como aprendizado, memória, cognição, efeitos neurotróficos, neurotóxicos e neuroplasticidade (Davies et al., 1979; Watkins e Evans, 1987). Estes efeitos glutamatérgicos são mediados por duas grandes classes de receptores: ionotrópicos (NMDA, AMPA e cainato) e metabotrópicos (mGlu1,5; mGlu2,3; mGlu4,6,7,8) (Verkhratsky e Kirchhoff, 2007). Alterações no controle da transmissão glutamatérgica resultam em transtornos psiquiátricos, como a esquizofrenia (Javitt e Zukin, 1991; Javitt et al., 2011).

A hipótese glutamatérgica da esquizofrenia propõem que os sintomas positivos, negativos e cognitivos na esquizofrenia compartilham uma origem comum na disfunção da neurotransmissão de glutamato (Glu) (Coyle e Tsai, 2004; Gilbert-Rahola e Villena-Rodriguez, 2014). Esta proposta se originou de estudos em animais e, em seguida, nos estudos em humanos, que observaram que os antagonistas de receptores NMDA, especificamente, a cetamina e a fenciclidina (PCP), induzem sintomas semelhantes à esquizofrenia em voluntários saudáveis (Javit et al., 2012). O mecanismo pelo qual a disfunção do Glu ocorre ainda não é entendido, mas os receptores NMDA podem estar envolvidos. Geyer et al. (2002) descreveram em sua revisão que os antagonistas NMDA não competitivos, incluindo PCP e cetamina, produzem uma série de anormalidades comportamentais em ratos e macacos, que têm importantes relações com a sintomatologia esquizofrênica. Paralelamente as hipóteses neuroquímicas, a implicação fisiopatológica do estresse oxidativo tem ganhado atenção crescente e tem se demonstrado estar envolvida em muitas doenças mentais (Ng et al., 2008; Marazziti et al., 2011).

Apesar da complexidade inerente a essa área de pesquisa, com heterogeneidade significativa nos resultados e estudos negativos, uma quantidade significativa de achados fundamentais apoia uma associação entre o estresse oxidativo e a fisiopatologia da esquizofrenia (Flatow et al., 2013). Com relação aos distúrbios do SNC, níveis baixos de glutatona foram encontrados tanto no córtex pré-frontal como no líquido cefalorraquidiano por cromatografia líquida com espectrômetro de massa (Do et al., 2009). De acordo com esses estudos, um estudo proteômico do córtex pré-frontal (CPF) de pacientes com esquizofrenia revelou que metade das proteínas alteradas estavam associadas à função mitocondrial e ao estresse oxidativo (Prabakaran et al., 2004).

Com relação às hipóteses neuroquímicas da esquizofrenia, o aumento dos níveis de dopamina levam ao aumento da auto-oxidação e desaminação oxidativa, contribuindo assim para o aumento do estresse oxidativo (Yao e Keshavan, 2011; Davis et al., 2014). Entretanto, acredita-se que a hipofunção NMDA na esquizofrenia resulte em níveis aumentados de glutamato que poderiam causar sinais excitotóxicos em neurônios glutamatérgicos com aumento da liberação de cálcio intracelular e subseqüentemente aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Packer et al., 1997; Davis et al., 2014). Assim, a dopamina ou o glutamato, poderiam modular o estado oxidativo, que também poderia ter um impacto direto nessas vias neuroquímicas (Deslauriers et al., 2015, Grignon e Deslauriers, 2015; Hardingham e Do, 2016).

## 1.2 ESQUIZOFRENIA E DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL

Evidências de anormalidade primária de geração de energia na esquizofrenia são conhecidas desde 1934, apoiadas no aumento do lactato e diminuição de glutatona (Looney e Childs, 1934). A análise de proteomas tem revelado desregulação do metabolismo energético na área de Wernicke bem como a disfunção da glicose no tálamo e alteração da homeostase do cálcio no córtex dorsolateral e pré-frontal de pacientes com esquizofrenia (Martins-de-Sousa et al., 2009). Um outro estudo revelou anormalidades no metabolismo energético cerebral em pacientes com esquizofrenia, que pode ser devido ao fornecimento anormal de oxigênio e glicose e ou sinalização de fatores de crescimento resultando em perturbação metabólica global que pode ter contribuído para fisiopatologia da esquizofrenia (Prabakaran et al., 2004). As mitocôndrias são uma das mais importantes organelas celulares e têm um papel crucial na neuroinflamação, estresse oxidativo e sinalização apoptótica. É também evidente que as mitocôndrias podem modular a atividade neuronal, morfogênese e plasticidade dendrítica e sináptica (Li et al., 2005). Defeitos nesses processos resultam no desenvolvimento atípico dos neurônios. Além disso, vários fatores de risco para esquizofrenia tais como genética, desregulação dos sistemas de neurotransmissores, toxinas ambientais, desnutrição prenatal, infecções e substâncias de abuso podem levar a disfunção mitocondrial (Park et al., 2010; Jousse et al., 2014). Fatores relacionados a integridade das mitocôndrias são essenciais para o desenvolvimento embrionário e para formação de sinapses em camundongos. Prejuízos no seu funcionamento e consequente estado anormal de energia celular afeta o

neurodesenvolvimento possivelmente por afetar a conectividade neuronal, a neurotransmissão e a mielinização (Chen et al., 2003; Ishihara et al., 2009). A diversidade de funções mitocondriais tem despertado o interesse na investigação dessa organela em diversos transtornos mentais (Picard et al., 2016). Numerosas evidências de estudos que utilizam uma gama de técnicas experimentais, desde estudos de imagem até métodos ultraestruturais a meios genéticos e moleculares, sugerem um papel para as mitocôndrias nos distúrbios mentais em geral e na esquizofrenia em particular (de Oliveira et al., 2011; Amar et al., 2007; Marchbanks et al., 2003).

A mitocôndria é geradora do trifosfato de adenosina (ATP) necessário para o funcionamento da célula através da fosforilação oxidativa. Qualquer defeito na via de fosforilação mitocondrial ou no funcionamento normal do cérebro leva a pronunciadas deficiências de energia, insuficiência no transporte de cálcio e a formação de ERO nos neurônios, que em última instância pode resultar em morte neuronal. Evidências sugerem que o prejuízo do funcionamento mitocondrial e alterações das vias descendentes são associados a patogênese de vários transtornos mentais (Chaturvedi e Flint, 2013). Estudos bioquímicos, genéticos e neuroimagem em humanos sugerem que a disfunção mitocondrial na esquizofrenia, baseia-se em evidências sobre alteração do metabolismo energético cerebral, atividade da cadeia transportadora de elétrons (CTE) e expressão de genes envolvidos na função mitocondrial (de Oliveira et al., 2011). Focando no sistema de fosforilação oxidativa e conseqüentemente, abordando os complexos mitocondriais, estudos *post mortem* em cérebro de pacientes com esquizofrênia revelaram alterações na atividade da citocromo c oxidase (complexo IV), succinato desidrogenase (complexo II) e NADH-citocromo c redutase (complexos I-III) (Cavelier et al., 1995; Prince et al., 1999). Em conjunto, estes achados sugerem um funcionamento anormal dos complexos mitocondriais da cadeia respiratória na esquizofrenia, sendo que estas alterações mitocondriais podem não ser uniformes dependendo da região cerebral avaliada ou do tipo de célula estudada (Belogradov e Hatefi, 1994; Prince et al., 1999; Mehler-Wex et al., 2006). Pesquisas indicam que a atividade e expressão de subunidades do complexo I, desempenham um papel importante no controle da fosforilação oxidativa na mitocôndria (Davey et al., 1998), e encontram-se aumentadas em plaquetas de pacientes esquizofrênicos (Ben-Shachar et al., 1999; Taurines et al., 2010; Rosenfeld et al., 2011). Foi demonstrado também que o grau de aumento na atividade do complexo I está diretamente relacionado à severidade dos sintomas

positivos da esquizofrenia (Dror et al., 2002). Além disso, no córtex parieto-occipital de pacientes com esquizofrênia, verificou-se um aumento no nível de RNAm para genes que codificam subunidades que constituem o complexo I (Karry et al., 2004). Estas evidências sugerem que a atividade alterada do complexo I pode prejudicar a respiração celular e a dinâmica da mitocôndria na esquizofrenia (Dror et al., 2002; Rosenfeld et al., 2011).

Está demonstrado que as disfunções mitocondriais participam na neurodegeneração e deficiências cognitivas, características comuns da esquizofrenia (Schon e Manfredi, 2003; Picard e McEwen, 2014). Apesar deste entendimento, não se sabe se a esquizofrenia mediada pela mitocôndria é a causa primária da toxicidade ou é uma resposta ao dano provocado. Além das alterações mitocondriais, anormalidades em outros parâmetros do metabolismo energético têm sido observadas na esquizofrenia, como por exemplo, alterações no funcionamento da enzima creatina cinase (CK) (Canever et al., 2010). Esta enzima está envolvida na estocagem de fosfatos de alta energia produzidos pela mitocôndria, ou seja, catalisa a transferência reversível do grupo N-fosforil da fosfocreatina para a adenosina difosfato (ADP), regenerando o ATP (Pilla et al., 2003). Assim, uma diminuição na produção de ATP, pode levar a uma redução na atividade ou expressão desta enzima (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000). Neste sentido, Burbaeva et al. (2003), verificaram uma diminuição da enzima CK em tecido cerebral de pacientes esquizofrênicos, sugerindo que essa diminuição esteja associada à disfunção energética cerebral presente na esquizofrenia. De modo geral, estes achados suportam a ideia de que o metabolismo energético cerebral pode estar alterado em estruturas cerebrais de pacientes esquizofrênicos. Portanto, sugere-se que novas substâncias que tenham ação neste sistema, possam ser futuramente utilizadas na clínica para o tratamento da esquizofrenia. Alguns estudos sugerem que a MLT parece exercer um papel de prevenção de dano mitocondrial mantendo ou até mesmo aumentando os níveis de formação de ATP, bem como diminuindo a ação de radicais livres (Hong-Mei e Yiqiang, 2014). As CK são enzimas encontradas em todo o corpo, mas existem predominantemente em células de tecidos com altas demandas de energia e grandes flutuações no metabolismo energético, como músculos e nervos. Mais especificamente, as enzimas CK são expressas como duas isoenzimas mitocondriais, a isoforma CK-ubiquíticas e CK-sarcoméricas, e como três isoformas citosólicas (mono ou diméricas): As CK-MM, CK-MB e CK-BB são mais prevalentes nos músculos

esqueléticos, coração e cérebro, respectivamente (Wallimann et al., 1992).

Em condições fisiológicas normais, os níveis totais de CK variam dependendo da idade, sexo, raça, massa muscular, atividade física e condição climática (Brancaccio et al., 2008). Os níveis basais de CK tendem a ser persistentemente mais elevados nos homens do que nas mulheres, mais em homens negros em comparação com os homens caucasianos e aqueles com maior massa corporal (Black et al., 1986; Brancaccio et al., 2008). O limite superior para CK normal foi estabelecido para menos de 150 U/L para mulheres e menos de 175 U/L para homens (CK NAC UV, 1996). Além disso, há muitos fatores conhecidos associados com níveis aumentados de CK tais como agitação psicomotora, medicações, drogas, injeções intramusculares, rabdomiólise e miocardite (Knochel, 1993; APA, 1994). Um aumento da CK-MM sérica foi encontrado em pacientes com doenças agudas do cérebro, tais como infecções, doenças vasculares e traumatismos (Meltzer, 1976). Altos níveis de CK tipicamente duram 1-2 semanas, com níveis máximos atingindo 20.000 UI/L (Meltzer, 1969). Pesquisas anteriores também demonstraram níveis variáveis, mas consistentes de CK na maioria dos pacientes submetidos a psicoses agudas (Hatta et al., 1998; Hermesh et al., 2001).

Um dos mais conhecidos estudos clínicos de esquizofrenia neste sentido foi sobre a ocorrência de psicose associada à creatina cinase-emia, que se refere a níveis marcados de CK em episódios de psicose aguda (Schweid et al., 1972, Faulstich et al., 1984, Hermesh et al., 2002). O aumento dos níveis CK é encontrado na maioria dos pacientes hospitalizados com esquizofrenia aguda e pacientes com psicoses afetivas (Meltzer, 1976). Como se sabe, a principal função da cadeia transportadora de elétrons (CTE) é converter a energia redox para um gradiente eletroquímico de prótons que subsequentemente causa formação de ATP a partir do ADP e fosfato pela ATP sintase. O produto final da cadeia respiratória é a água que é gerada em uma redução de quatro elétrons de oxigênio molecular pelo complexo IV (Lee et al., 2001). Contudo, durante este processo, ocorre o vazamento de elétrons especialmente nos complexos I e III e uma pequena porcentagem de O<sub>2</sub> vazado, é convertida em EROs, tais como radicais anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o radical reativo hidroxílico (•OH) (Genova et al., 2001).

Muitos estudos sugerem que as ERO participam do mecanismo fisiopatológico de várias patologias humanas, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças cardiovasculares, catarata, disfunções cognitivas,

incluindo a esquizofrenia, podendo ser a causa ou fator agravante do quadro geral (Halliwell et al., 1992). Diante dessa perspectiva, é reconhecido que todos os tecidos são vulneráveis ao estresse oxidativo, porém o SNC é particularmente sensível ao estresse oxidativo pela sua alta taxa de consumo de oxigênio, dos elevados níveis de lipídios polinsaturados capazes de sofrer peroxidação lipídica e da auto-oxidação de alguns neurotransmissores que podem levar a formação de ERO (O'Neil et al., 1995).

Uma das hipóteses aceitas sobre a etiologia da esquizofrenia, postula que as variações em múltiplos genes de risco em interação com o ambiente e fatores de desenvolvimento, contribuem para o fenótipo da doença (Lohmueller et al., 2003; Harrison e Weinberger, 2005). Além disso, o estresse oxidativo pode levar à lesão celular e contribuir para neuropatologia da esquizofrenia (Mahadik et al., 2006). A relação entre a esquizofrenia e o estresse oxidativo já foi demonstrada em um estudo realizado por de Oliveira et al. (2009), sugerindo que a administração de cetamina em roedores, desencadeia alterações na atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx), resultando em dano proteico e lipídico. Também foi relatado que os níveis de antioxidantes não enzimáticos como a GSH estão diminuídos na esquizofrenia (Raffa et al., 2009; Raffa et al., 2011). Sabe-se, portanto, que o estresse oxidativo interfere em todo o processo de neurodesenvolvimento e pode permanecer durante toda a vida (Halliwell, 1992). O dano oxidativo é uma consequência da utilização ineficiente de O<sub>2</sub> pelas células. A maior parte do O<sub>2</sub> absorvido pelas células é utilizada para a geração de energia mitocondrial na forma de ATP (Acuña-Castroviejo et al., 2001). No entanto, uma pequena percentagem do O<sub>2</sub> tomado pelas células escapa ao metabolismo convencional e é reduzida a radicais e produtos não radicais que pela sua alta reatividade, são prejudiciais às estruturas subcelulares (figura 3). Os radicais livres são moléculas ou porção de moléculas que possuem um elétron não emparelhado em seu orbital de valência. Esse estado deficiente em elétrons torna esses agentes altamente reativos e danificam moléculas adjacentes abstraindo um elétron ou doando um elétron para eles. Embora o dano aos lipídios, proteínas e DNA pareça ser de maior interesse, a lesão que ocorre não se restringe a essas grandes moléculas (Acuña-Castroviejo et al., 2001). Para além disso, os compostos gerados são capazes de provocar dano a qualquer molécula na vizinhança do local onde são produzidos. Isto é particularmente verdadeiro para a maioria das espécies reactivas. Ex: O•OH, que devido à sua meia-vida curta, interage com a primeira molécula que encontra e devido a isso, as lesões moleculares que

ocorrem são descritas como sendo específicas do local (Russel et al., 2004).

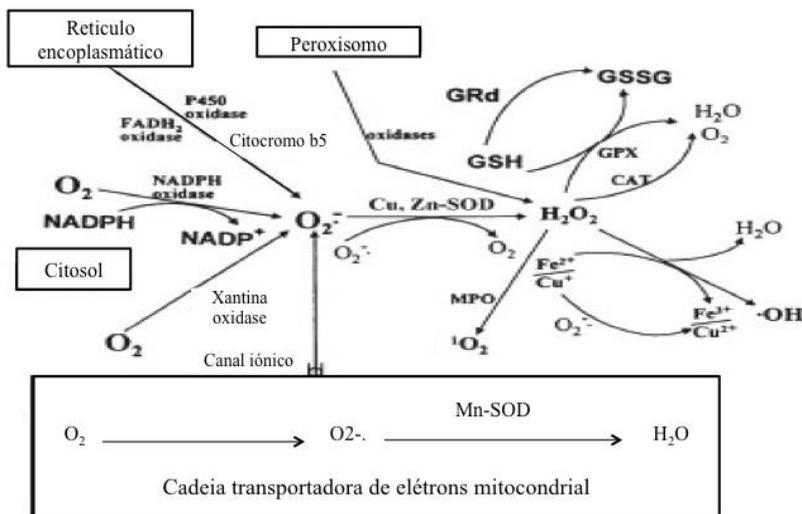


Figura 1 - O oxigênio molecular ( $O_2$ ) é reduzido a vários radicais livres e espécies reativas relacionadas como ilustrado nesta figura. Embora o radical anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) não seja considerado especialmente reativo, o radical hidroxilo ( $^{\cdot}OH$ ) facilmente danifica qualquer molécula na vizinhança do local onde é produzido. Uma variedade de enzimas causa a formação do  $O_2^{\cdot-}$  e, da mesma forma, por causa do vazamento de elétrons da cadeia de transporte de elétrons, os radicais são produzidos abundantemente nas mitocôndrias. Várias enzimas, incluindo superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) metabolizam estes reagentes para subprodutos menos tóxicos ou não tóxicos. Quando o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é metabolizado por GPx, a glutaciona reduzida (GSH) é oxidada para o glutaciona dissulfureto (GSSG) que é convertido de volta a GSH pela enzima glutaciona redutase (GRd) (Adaptado de Russel et al., 2004).

### 1.3 ANTIPSICÓTICOS

Os primeiros antipsicóticos a serem descobertos na década de 1950 foram o haloperidol e a clorpromazina, seguidos por outros agentes, incluindo flufenazina, loxapina, piperfenazina, pimozida, tioridazina, tiotixeno e trifluoperazina. Conhecidos como antipsicóticos "de primeira geração" ou "típicos", esses fármacos foram usados para

tratar psicose (independentemente da causa), distúrbios psicóticos crônicos (por exemplo, esquizofrenia) e outras condições psiquiátricas. Entretanto, os efeitos adversos proeminentes incluíram efeitos colaterais extrapiramidais tais como discinesia tardia, rigidez muscular e tremores, isto é, sintomas parecidos com Parkinson (Pratt et al., 2012). Novos antipsicóticos, conhecidos como antipsicóticos "de segunda geração" ou "atípicos", apresentam menor risco de efeitos colaterais extrapiramidais. No entanto, muitos têm efeitos metabólicos graves. Estes antipsicóticos incluem aripiprazole, clozapina, iloperidona, olanzapina e risperidona. Antes da descoberta dos primeiros antipsicóticos, o manejo da esquizofrenia dependia de sedação forte, terapia eletroconvulsiva e institucionalização (Van e Kapur, 2009). Atualmente, o principal tratamento para a esquizofrenia consiste no uso de medicação antipsicótica, cuja ação principal é a diminuição da atividade dos receptores de dopamina e em muitos casos, essas medicações exercem efeito sobre a atividade dos receptores de serotonina (Becker e Kilian, 2006; Millan et al., 2016). O desenvolvimento de antipsicóticos de segunda geração produziu alguns avanços em termos de eficácia, com alguma melhora modesta no tratamento dos sintomas negativos e na tolerabilidade, particularmente no que se refere aos efeitos colaterais extrapiramidais nesta condição (Garay et al., 2016). No entanto, nenhum antipsicótico apresenta efeitos robustos sobre os déficits cognitivos ou problemas de processamento social que são componentes importantes deste transtorno (Millan et al., 2016).

Durante anos, a eficácia limitada de agentes convencionais e de segunda geração levou a teoria segundo a qual a manipulação de outros alvos cerebrais além dos receptores da dopamina  $D_2$  podia ser necessária para tratar esse distúrbio e para melhorar a segurança e a tolerabilidade. Nos últimos anos, a hipótese de receptores NMDA da esquizofrenia foi validada em modelos pré-clínicos e humanos (Howes et al., 2015). De acordo com esta teoria, a liberação excessiva da dopamina na via mesolímbica e a diminuição da liberação de dopamina da via mesocortical no córtex pré-frontal, que são responsáveis por alguns dos sintomas da esquizofrenia, são secundárias a uma diminuição no controle de receptores NMDA dos neurônios GABAérgicos inibitórios. Nenhuma medicação capaz de melhorar seletivamente a atividade de receptores NMDA nesta região chave do cérebro foi aprovada para uso humano. Estudos indicam que os pacientes com esquizofrenia prodromica e precoce têm níveis elevados de glutamato cerebral em comparação com controles saudáveis e pacientes de alto risco que não se tornam psicóticos (de la Fuente-Sandoval et al., 2011). As alterações na

excitação mediada por receptores NMDA dos neurônios GABAérgicos indicam que a esquizofrenia está associada a sistemas glutamatérgicos disfuncionais no córtex pré-frontal e nas regiões límbicas do cérebro. Contudo, existe cada vez mais evidências de que o número de mecanismos fisiológicos tais como o estresse oxidativo, respostas atípicas imunomediadas, são observados em indivíduos com esquizofrenia e não apenas a fisiopatologia dopaminérgica como atesta a hipótese dopaminérgica da esquizofrenia (Arroll et al., 2014). A este respeito, abordagens alternativas orientadas para outros receptores mGluRs, como os do grupo III, bem como para outros receptores de dopamina (D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>) também estão atualmente a ser estudadas em modelos pré-clínicos de esquizofrenia (Wierońska et al., 2013). Evidências tem relatado uma associação entre a esquizofrenia, disfunção do ritmo circadiano e níveis de MLT em pacientes com esquizofrenia (Wulff et al., 2012).

#### 1.4 MELATONINA

A MLT, *N-acetil-5-metoxitriptamina*, é o principal hormônio produzido pela glândula pineal (Armando, 2013; Onaolapo et al., 2017). A MLT é uma indolamina de peso molecular 232,3 sintetizada a partir do aminoácido essencial triptofano. Foi identificada inicialmente na glândula pineal de bovinos (Lerner et al., 1959), mais tarde descobriu-se que podia estar presente ou ser sintetizada em outros órgãos e tecidos como, retina, trato gastrointestinal, testículos e linfócitos. A sua função originalmente descrita é a de regulador de ritmos biológicos (Reitter et al., 2007). Sua descoberta remonta de 1917 data em que se publicou um pequeno artigo sobre a glândula pineal. Segundo este artigo, a glândula pineal podia produzir uma substância que clareia a pele de girinos. Sua difusão deu-se a partir de 1958, através de um artigo de uma página publicada por Aarón Lerner, dermatólogo de Yale no jornal *American Chemical Society*. As primeiras provas sobre a ação da MLT como tranquilizante e indutora de sono foram observadas em 1970 quando Tay, (1970) trabalhando com doze voluntários, mediu ondas cerebrais, ciclos respiratórios e o ritmo cardíaco. Ao injetar 75mg de MLT nos indivíduos observou que, poucos minutos depois da administração, as ondas cerebrais haviam lentificado e a maioria dos sujeitos estavam dormindo. Este e outros estudos demonstraram que a MLT gerava efeitos opostos aos da adrenalina. Estudos subsequentes usando radioimunoensaio, demonstraram uma evidência crucial: os seres humanos produzem de cinco a dez vezes mais MLT durante a noite do

que durante o dia, um ritmo circadiano que também se observa em outros animais (Russel e Reiter, 1995).

A síntese de MLT em mamíferos, que é liberada na fase do escuro, depende, necessariamente, de uma ativação do sistema nervoso autônomo na sua divisão simpática e da consequente liberação de noradrenalina pelos terminais que inervam a glândula pineal. A noradrenalina, interagindo com os receptores pós-sinápticos dos tipos  $\alpha_1$  e  $\beta_1$ -adrenérgicos presentes nos pinealócitos, desencadeia uma série de eventos bioquímicos intracelulares que levam à síntese de MLT. A síntese de MLT (figura 1) acontece pela conversão do triptofano em 5-hidroxitriptofano pela ação da enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1), a qual passa por uma descarboxilação subsequente catalisada pela descarboxilase de 1-aminoácidos aromáticos que resulta na formação de serotonina. A serotonina é por sua vez, acetilada pela ação da arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT) e convertida em N-acetilserotonina, que tem o grupamento hidroxila trocado por metil pela ação da hidroxindol-oxi-meltransferase (IOMT), culminando na formação da MLT (Cipolla et al., 1999).

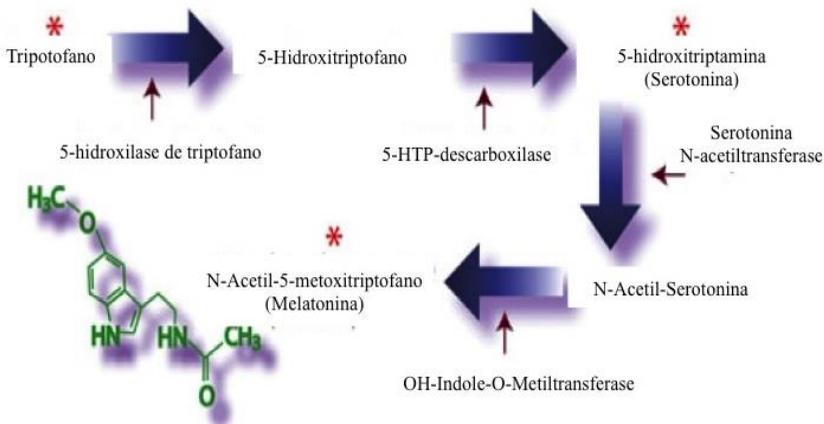


Figura 2 - Síntese da MLT a partir do aminoácido essencial triptofano (adaptado de Sergio et al., 2012).

O ritmo da MLT é gerado pelo relógio circadiano endógeno no núcleo supraquiasmático do hipotálamo e é segregado de acordo com o ciclo de 24 horas de luz e escuridão (Tan et al., 2003). Anormalidades na função pineal altera a secreção da MLT, que leva a alteração dos

picos de secreção diurna e noturna verificada em pacientes com depressão unipolar, depressão bipolar e esquizofrenia (Srinivasan et al., 2010; Khaleghipour et al., 2012). Esta propriedade deve-se a atividade de um pequeno feixe de neurônios chamado núcleo supraquiasmático, localizado no hipotálamo, que transmite sinais elétricos seguindo um padrão regular de 12 horas de fase de liberação e outras 12 horas de fase de não liberação da MLT (Russel e Reiter, 1995).

O sistema neural que controla o metabolismo da glândula pineal origina-se no núcleo paraventricular do hipotálamo, que se projeta para coluna intermédio-lateral da medula torácica alta, nos neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo simpático. Estes neurônios projetam-se então para os gânglios cervicais superiores, cujos neurônios pós-ganglionares se projetam para glândula pineal através dos ramos carotídeos internos e nervos conários. O ritmo diário de síntese de MLT depende do sistema neural que controla a ritmicidade circadiana e que começa na retina e se projeta, via trato retino-hipotalâmico, principalmente para o núcleo supraquiasmático, que se conecta com o núcleo paraventricular hipotalâmico, controlando nas 24 horas a atividade da via neural descrita acima (Cipolla- Neto e Afeche, 2008). Fisiologicamente a secreção da MLT aumenta assim que escurece e atinge seu pico por volta de 2 à 4h am e diminui na segunda metade da noite (Cicardin, 2010). A MLT possui tempo de meia vida curto (30-40minutos) e os níveis fisiológicos durante a noite são mantidos pelo processo de secreção continua (Srinivasan et al., 2010).

Existe diferenças consideráveis entre a MLT sintetizada na glândula pineal e a sintetizada em outros órgãos, principalmente em relação ao local de retenção, local do metabolismo e liberação na circulação. Em mamíferos por exemplo, a contribuição da MLT extra pineal é normalmente baixa (Pozo, 1997) com exceção do trato gastrointestinal em que a produção da MLT alcança concentrações substanciais, mas somente sob influência de fatores nutricionais, em termos de resposta pós pandrial (Bubenik, 2002; Hardeland e Pandi, 2005). A quantidade de MLT liberada pelo trato gastrointestinal e que aparece na circulação pode superar de longe a quantidade liberada pela glândula pineal (Huether et al., 1992), podendo influenciar ações no SNC, porém seus efeitos permanecem fracos por razões relativas a curva de resposta da MLT (Hardeland e Pandi, 2005).

Um dos primeiros mecanismos de ação da MLT está relacionado às suas propriedades hipnogênicas (Lushington, 1997). Além disso, a MLT também tem ações de resincronização de ritmos biológicos. A respeito destas propriedades, a MLT tem sido usada para tratar

distúrbios de ritmo como, *jet lag* e síndrome de atraso de fase de sono (Arendt, 1988), entre outros distúrbios do ritmo circadiano.

### 1.5 MELATONINA E ESQUIZOFRENIA

O uso de MLT como agente terapêutico pode ser datado de 1920, quando um grupo de pacientes com "dementia praecox" foi tratado com extratos da glândula pineal (Becker, 1920). Entre as décadas de 1950 até meados da década de setenta, a MLT foi utilizada na forma de injeções de extrato pineal (Bigelow, 1974). Com relação à esquizofrenia, os estudos iniciais envolvendo a MLT foram realizados com injeções de extratos da glândula pineal bovina (Eldred e Bell, 1960; Bigelew, 1974). Logo após, os extratos de glândula pineal deram lugar ao uso de preparações de MLT para tratar distúrbios do sono (Shamir et al., 2000; Suresh et al., 2007) e discinesia tardia na esquizofrenia (Castro et al., 2011).

Evidências demonstram unanimidade sobre a indicação clínica da MLT para regulação do sono, comum em pessoas idosas, pacientes com as mais diversas patologias, incluindo doenças neurodegenerativas e transtornos psiquiátricos. A MLT parece exercer uma série de outras funções ainda pouco estudadas tais como: detoxificador de radicais livres, modulador de processos inflamatórios, agente anticolinérgico, protetor de dano mitocondrial, protetor de dano por alteração de influxo de cálcio, redutor de resistência à insulina e protetor da integridade de membrana celular (Esposito e Cuzzocrea, 2010; Reiter et al., 2002; Tan et al., 2007). Muitas ações da MLT são mediadas através da interação com receptores específicos ligados à membrana. Além disso, a MLT é uma molécula anfipática, por isso pode atravessar a membrana celular e submembranas intracelulares com facilidade. Devido a esta propriedade, a MLT é capaz de atuar não apenas sobre receptores de membrana, mas modificar diretamente reações que ocorrem no interior das células e suas organelas.

O metabolismo da MLT no SNC é particularmente relevante por sua contribuição relativa das vias catabólicas, pode ser influenciada por condições de inflamação e de estresse oxidativo (Galano et al., 2011). Isto é evidenciado por elevados níveis de produtos de oxidação da MLT tais como a N<sup>1</sup>-acetyl-N<sup>2</sup>-formil-5-methoxykynuramine (AFMK) no líquido cerebrospinal de pacientes com meningite (Prunet et al., 2001). Este metabólito e seus produtos secundários como a N<sup>1</sup>-acetyl-5-methoxykynuramina (AMK), têm demonstrado possuir propriedades de proteção celular incluindo efeitos benéficos na mitocôndria (Rodrigues

et al., 2004). Além disso, numerosas publicações têm demonstrado o potencial neuroprotetor da MLT sob várias condições experimentais (Wang et al., 2013).

Vários estudos relataram o funcionamento anormal da MLT na fisiopatologia da esquizofrenia (Bersani et al., 2010; Morera-Funmero et al., 2010). Wulff et al. (2012) relataram associação entre esquizofrenia, disfunção do ritmo circadiano e níveis de MLT em pacientes com esquizofrenia. A MLT também tem sido utilizada no controle de distúrbios do sono associados à esquizofrenia (Gorfine et al., 2006) e discinesia tardia relacionada à fármacos antipsicóticos (Shamir et al., 2001). Os efeitos da MLT exógena têm sido estudados extensivamente (Kopp et al., 1999; El Mrabet et al., 2012; Onalapo et al., 2014; Onalapo et al., 2017). Em seres humanos, a administração diurna de MLT promoveu o sono e resultou em padrões de atividade cerebral semelhantes ao sono no córtex parieto occipital e no hipocampo (Gorfine e Zisapel, 2007). Enquanto em roedores, vários estudos demonstraram efeitos anticonvulsivantes (Yildirim e Marangoz, 2006), ansiolíticos (El Mrabet et al., 2012), antidepressivos (Mantovani et al., 2003 e efeitos facilitadores da memória (He et al., 2013; Onalapo et al., 2017) da MLT exógena. Estudos que avaliam os efeitos comportamentais da MLT em camundongos relataram um efeito depressor central; com uma diminuição nos comportamentos de campo aberto (Onalapo et al., 2014) e reversão dos efeitos comportamentais e sistêmicos da exposição de camundongos prepúberos ao estresse cronológico imprevisível (Onalapo et al., 2017). No entanto, também houve estudos que relataram efeitos convulsivos, (Stewart e Leung, 2005) supressão de formação de memória (Rawashdeh et al., 2007) e comprometimento da aquisição, mas não a expressão de medo contextual em ratos (Yang et al., 2013). A MLT tem sido relatada como benéfica na reversão de alterações comportamentais e bioquímicas associadas à esquizofrenia induzida por cetamina em camundongos (da Silva et al., 2017). Embora os estudos tenham avaliado a eficácia da MLT como coadjuvante no tratamento da esquizofrenia em humanos (Suresh et al., 2007; Romo-Nava et al., 2014), ainda existe uma escassez de informações pré-clínicas sobre seu potencial como único agente.

Durante a última década, estudos demonstraram que a MLT desempenha um papel eficaz na regulação da homeostase mitocondrial (Martín et al., 2000). Além de ser um detoxificador de radicais livres, a MLT reduz a produção de óxido nítrico (ON) dentro das mitocôndrias (figura 2). Além disso, mantém o fluxo de elétrons, a eficiência da fosforilação oxidativa, a produção de ATP e a função bioenergética da

célula, regulando a atividade dos complexos da cadeia respiratória, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e a abertura de poros de transição de permeabilidade mitocondrial (Martin et al., 2000; Lopez et al., 2009).

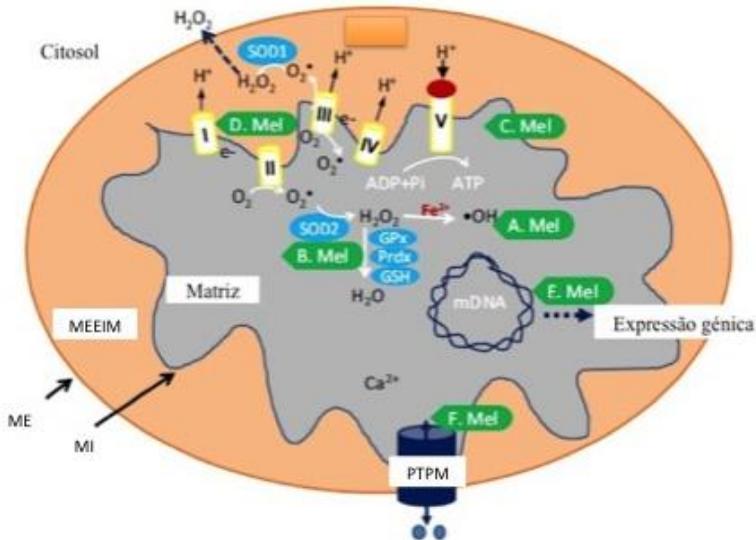


Figura 3 - Representação esquemática dos potenciais mecanismos pelos quais a MLT protege as mitocôndrias. (A) Posta no interior da mitocôndria a MLT detoxifica diretamente as ERO. (B) A MLT aumenta a atividade de enzimas antioxidantes (SODs e GPx). (C) A MLT estabiliza a membrana interna mitocondrial (MIM). (D) A MLT aumenta a atividade e respiração da CTE e produção de ATP. (E) A MLT regula a expressão do genes mitocondriais. As letras romanas I, II, II, IV e V representam complexos da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais; ME membrana externa ; MI-membrana interna; PTPM-poro transitório de permeabilidade mitocondrial (adaptado de Hong-Mei e Yiqiang, 2014).

## 1.6 MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA

Para facilitar nossa compreensão e manejo da esquizofrenia, foram desenvolvidos modelos experimentais (Steeds et al., 2015) que mimetizam alterações comportamentais e bioquímicas semelhantes as alterações observadas nos vários sistemas de neurotransmissores associados à esquizofrenia. Atualmente, os modelos farmacológicos que usam antagonistas de receptores glutamatérgicos NMDA como

cetamina, fenciclidina e MK801 tornaram-se muito importantes. Seu uso está baseado em observações de que essas drogas induzem com sucesso sintomas positivos e negativos de esquizofrenia (Uribe et al., 2013). O modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina foi reconhecido como tendo validade de face superior em comparação com a fenciclidina; porque é menos tóxico e a administração repetida induz a mudanças comportamentais semelhantes as observadas na esquizofrenia (Imre et al., 2006; Schumacher et al., 2016). O modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina é hoje amplamente aceito; trata-se de um anestésico dissociativo que afeta a atividade glutamatérgica pelo bloqueio dos receptores NMDA (Ellison, 1995). Sabe-se que a cetamina causa psicose em indivíduos com esquizofrenia e pode induzir sintomas (positivos e negativos) similares aos da esquizofrenia em voluntários saudáveis (Becker et al., 2004). Estes autores também sugerem que animais tratados de forma subcrônica com cetamina fornecem evidências de que a cetamina é um modelo animal útil para esquizofrenia.

A pesquisa básica em animais representa uma promissora ferramenta para o estudo da base neurobiológica do distúrbio neural e comportamental relevante para a esquizofrenia, para estabelecer e avaliar, novas terapias farmacológicas para seu tratamento (Meyer e Feldon, 2010). Sabe-se que a cetamina bloqueia o poro do canal NMDA, impedindo deste modo o influxo de cálcio o que resulta em efeitos psicóticos que incluem sintomas positivos transitórios e reversíveis, negativos e cognitivos da esquizofrenia em indivíduos saudáveis e exacerba os mesmos sintomas em pacientes com esquizofrenia (Mechri et al., 2001; Javitt et al., 2011). Em roedores, estas substâncias estabelecem comportamentos anormais, como hiperatividade, estereotipia, alteração do comportamento social e déficit sensorio e cognitivo, que são constitutivos da esquizofrenia (Lipska e Weinberger, 2000). Nestes modelos, a capacidade de reversão e/ou prevenção da patologia por fármacos, prevê que estes compostos poderão apresentar função antipsicótica em humanos (Neill et al., 2010; Meltzer et al., 2011).

## 2 JUSTIFICATIVA

Os antipsicóticos constituem a principal opção de tratamento da esquizofrenia, portanto estas medicações apresentam limitações consideráveis como a fraca eficácia principalmente para os sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia; além disso em sua maioria estas medicações apresentam efeitos colaterais significativos que por si justificam mais tratamento farmacológico ou resultam em recaídas, maior risco de agressividade e até de suicídio. Abordagens alternativas orientadas para outros receptores mGluRs, como os do grupo III, bem como para outros receptores de dopamina D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub> também estão atualmente a ser estudadas em modelos pré-clínicos de esquizofrenia (Wierońska et al., 2013). Evidências tem mostrado uma associação entre a esquizofrenia, disfunção do ritmo circadiano e níveis de MLT em pacientes com esquizofrenia (Wulff et al., 2012). Isto permite sugerir que a redução da produção da MLT que se observa no quadro clínico da esquizofrenia seja consequência do processo patológico de transtornos psiquiátricos que apresentam déficits do sono em seu quadro sintomatológico, incluindo a esquizofrenia. Tendo em vista que os fármacos atualmente utilizados no tratamento da esquizofrenia ainda não apresentam uma resposta ideal no manejo dos casos de esquizofrenia, a prevenção bem como o desenvolvimento de terapias alternativas ou adjuvantes como a MLT apresenta-se justificável.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da administração da MLT sobre parâmetros comportamentais e de metabolismo energético no modelo animal de esquizofrenia induzido pela administração de cetamina.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar os efeitos da MLT sobre a distância percorrida, movimentos estereotipados, tempo de permanência no centro e nas bordas em ratos submetidos aos protocolos de prevenção e reversão;

Avaliar os efeitos da MLT sobre a inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto de ratos submetidos aos protocolos de prevenção e reversão;

Avaliar os efeitos da MLT sobre a atividade dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial em tecidos cerebrais de ratos submetidos aos protocolos de prevenção e reversão;

Avaliar os efeitos da MLT sobre a atividade da enzima CK em tecidos cerebrais de ratos submetidos aos protocolos de prevenção e reversão.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Os experimentos foram realizados na Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), no Laboratório de Neurociências em colaboração com o Laboratório de Toxicologia. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e comportamento (SBNeC). Os protocolos de manuseio e experimentação foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da UNESC sob Protocolo nº 045/2015-2 (Anexo A).

### 4.2 ANIMAIS

Os animais foram obtidos de colônias mantidas no Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Foram utilizados ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* machos com 45 dias de vida, pesando aproximadamente 170 à 200g. A quantidade total de animais foi de 120, considerando-se 10-12 animais por grupo (6 grupos experimentais) e dois protocolos (prevenção e reversão) com 60 animais cada. Os ratos foram acondicionados em grupos de cinco por caixa. Os experimentos foram realizados obedecendo o ciclo claro/escuro de 12 horas (claro as 7:00h) e comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido a temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Os animais tiveram seu peso, condição da pelagem e comportamento alimentar monitorados diariamente durante o período de estudo.

Os ratos desta espécie são descritos na literatura há muitos anos como uma linhagem de roedores apropriada para o estudo da esquizofrenia, bem como para testar novas propostas farmacológicas em estudos pré-clínicos (Ellenbroek e Cools, 2000; Nestler e Hyman, 2010).

Optou-se pela utilização de ratos machos porque às fêmeas apresentarem uma grande variabilidade de resposta em ambos os testes comportamentais e bioquímicos, fato geralmente associado ao perfil hormonal específico.

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

sufrimento e limitar o número de animais utilizados. No presente estudo foram usados dois protocolos (prevenção e reversão) conforme (figura 4). A fim de verificar um eventual efeito profilático e terapêutico da MLT, foram utilizados dois protocolos, sendo um de prevenção e outro de reversão adaptados de acordo com de Oliveira et al. (2011). Portanto, no protocolo de prevenção os animais receberam MLT nas doses de 1mg/kg ou 10mg/kg ou salina por gavagem, uma vez ao dia durante 14 dias, entre os dias 8 e 14 receberam cetamina (25mg/kg) ou salina via intraperitoneal (i.p). A administração repetida de cetamina induz sintomas típicos da esquizofrenia em ratos (Hunt et al., 2006; de Oliveira et al., 2011). No procolo de reversão, os animais receberam cetamina (25 mg/kg) ou salina (i.p), uma vez por dia, durante 14 dias, entre os dias 8 e 14 receberam MLT nas doses de 1mg/kg ou 10 mg/kg, uma vez ao dia (Castro et al., 2011; Ozyrt et al., 2014).

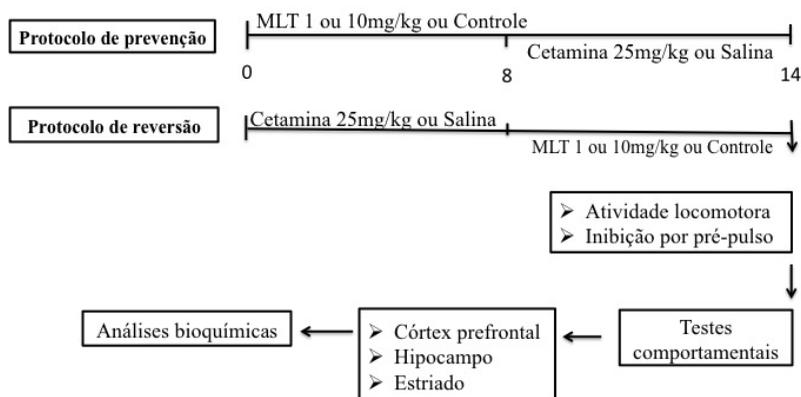


Figura 4 - Os ratos foram separados aleatoriamente em seis grupos experimentais (n= 10-12). Os animais receberam MLT nas doses de 1 ou 10mg/kg ou água, uma vez por dia, durante 14 dias, entre os dias 8-14 (durante 7 dias) receberam cetamina 25mg ou salina, uma vez ao dia. No protocolo de reversão os animais receberam cetamina (25mg/kg), uma vez por dia durante 14 dias, entre os dias 8-14 (durante 7 dias) receberam MLT1 ou 10mg/kg, uma vez ao dia. Dados do pesquisador 2015.

Após a última administração de salina ou cetamina, tempo determinado conforme o protocolo de execução de cada teste, os animais foram submetidos aos testes comportamentais: atividade locomotora (distância percorrida, esteriotipia, tempo de permanência no centro e nas bordas), teste de Inibição do Pré-Pulso (IPP).

Posteriormente, foram mortos por decapitação em guilhotina. As estruturas cerebrais, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado dos dois hemisférios foram guardados separadamente, dissecadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises bioquímicas da atividade dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial, e atividade da creatina cinase.

## 4.3 FÁRMACOS

### 4.3.1 Cetamina

A cetamina foi administrada via i.p. na dose de 25mg/kg, preparada em solução salina no volume de 1mL/1000g. A administração da dose de 25mg/kg foi utilizada para mimetizar alguns sintomas psicóticos, tais como a hiperlocomoção e comportamento estereotipado, déficits cognitivos e filtro sensorio-motor (Sams-Dodd, 1998). O modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina é amplamente aceito; trata-se de um anestésico dissociativo, que afeta a atividade glutamatérgica através do bloqueio do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (Becker et al., 2003). Sabe-se que a cetamina causa psicose em pacientes com esquizofrenia e esta substância é também usada para avaliar sintomas positivos e negativos da esquizofrenia em voluntários saudáveis (Ellison, 1995).

### 4.3.2 Melatonina

A MLT (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) foi administrada na dose de 1mg/kg e 10mg/kg, dissolvida em 0,5% de etanol, e a solução diluída em água, administrada dentro de um volume de 1ml por quilograma de peso (Subramanian et al., 2007). Para o grupo controle, foi administrado o mesmo volume de etanol dissolvido em água.

## 3.4 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Aos animais submetidos aos dois protocolos, foram submetidos aos seguintes testes comportamentais conforme descritos abaixo:

#### **4.4.1 Atividade locomotora**

Para observar a capacidade de 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 durante o período de 15 minutos, onde a atividade foi avaliada automaticamente (Activity Monitor, Insight Laboratory Equipment, Ribeirão Preto, SP). Este teste avaliou a atividade locomotora através da distância (cm) percorrida pelo animal, dividindo o tempo total de avaliação em blocos de 5 minutos (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., 2013). O dispositivo é capaz de registrar vários parâmetros da atividade locomotora. Os seguintes parâmetros foram registrados no presente trabalho: distância percorrida, movimentos estereotipados e tempo de permanência no centro e nas bordas do campo aberto. A distância percorrida e a estereotipia são medidas padrão dos efeitos alucinógenos da cetamina, bem como os sintomas da esquizofrenia (de Oliveira et al., 2009).

A estereotipia foi definida como movimentos rápidos e repetitivos da cabeça e das pernas (Hirritri et al., 1993; Battisti et al., 2000). Este parâmetro foi analisado no mesmo momento e equipamento da atividade locomotora. A estereotipia é considerada pelo software, como um movimento instável em qualquer momento em que movimentos repetitivos são registrados em leituras subsequentes, sem alteração no centro de massa do animal. As possíveis unidades de medida a serem consideradas são mm (milímetros), cm (centímetros) e polegadas (polegadas).

O tempo de permanência no centro e nas bordas são parâmetros de ansiedade e defesa conhecida, uma vez que os roedores tendem a evitar o centro de um campo, temendo a presença de predadores (Lapiz et al., 2000). No entanto, uma quantidade normal de tempo no centro pode sinalizar atividade exploratória do roedor (Avila-Martin et al., 2015).

#### **4.4.2 Interação da inibição por pré-pulso**

A quantificação IPP foi realizada com base no protocolo descrito por Levin et al. (2011). Utilizou-se uma caixa de medida de sobressalto com vedação sonora (Insight, São Paulo, Brasil). 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 65, 70 e 75 dB e 3000 Hz de frequência por 20 ms; 3) 10 apresentações de cada intensidade de PP + P, com um intervalo de 50 ms. A média da amplitude de sobressalto após as sessões de P, bem como a média da amplitude da resposta de sobressalto após as sessões de PP+P foram calculadas para cada animal. O nível de IPP para cada animal foi determinado pela expressão da amplitude de sobressalto de PP+P, como uma redução percentual a partir da amplitude de sobressalto de P, sendo calculada de acordo com a seguinte equação:  $\% \text{ IPP} = 100 - [(PP/P) \times 100]$ . Desta forma, 0% correspondeu à ausência de diferença entre a amplitude de sobressalto após as sessões de P e PP+P e, conseqüentemente, à ausência de inibição da resposta de sobressalto. O resultado indicou a porcentagem de IPP, avaliando assim as funções sensorio-motoras dos animais (Hoffman e Ison, 1980; Weiss e Feldon, 2001).

#### 4.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Após a morte dos animais por decapitação, suas estruturas cerebrais foram retiradas (córtex pré-frontal, hipocampo e estriado). As amostras foram inicialmente mantidas em freezer com temperatura - 80°C. Foram realizadas as seguintes análises bioquímicas como descrito abaixo:

##### **4.5.1 Atividade da Cadeia Respiratória Mitocondrial Determinação da atividade do Complexo I (NADH desidrogenase)**

Ao meio contendo tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,4) e proteínas do homogeneizado foram adicionados 14 mM de NADH, 1 mM de rotenona e 10 mM de ferrocianeto de potássio. As absorbâncias foram registradas por 3 minutos a 420°C. A atividade do complexo I (EC 1.6.5.3) foi medida através da taxa de redução do ferricianeto dependente de NADH (Cassina e Radi, 1996). Os resultados foram expressos em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .

##### **Determinação da atividade do Complexo II (succinato: ubiquinona oxirredutase)**

O meio de incubação foi constituído de fosfato de potássio (40 mM, pH 7,4), 16 mM de succinato de sódio e 8  $\mu$ M de 2,6-dicloroindofenol (DCIP). Inicialmente, pré-incubou-se com 40-80  $\mu$ g de proteínas do homogeneizado a 30°C por 20 minutos. Depois, foram adicionados ao meio 4 mM de azida sódica e 7  $\mu$ M de rotenona e a reação iniciou com adição de 40  $\mu$ M de DCIP. As absorbâncias foram registradas por 5 minutos em 600 nm. A atividade do complexo II (EC 1.3.5.1) foi medida pela diminuição da absorbância causada pela redução do DCIP (Fischer et al., 1985). Os resultados foram expressos em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .

#### **Determinação da atividade do Complexo II+CoQ+III (succinato: citocromo c oxirredutase)**

O meio de reação, constituído de fosfato de potássio (40 mM, pH 7,4) contendo 16 mM de succinato de sódio, foi pré-incubado com 40-80  $\mu$ g de proteínas do homogeneizado a 30°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 mM de azida sódica e 7  $\mu$ M de rotenona e a reação se iniciou pela adição de 0,6  $\mu\text{g/mL}$  de citocromo c e as absorbâncias foram registradas por 5 minutos a 550 nm. A atividade do complexo II+CoQ+III (EC 1.3.99.1) foi medida pelo aumento da absorbância causado pela redução do citocromo c (Fischer et al., 1985). Os resultados foram expressos em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .

#### **Determinação da atividade do Complexo IV (citocromo c oxidase)**

O meio de incubação continha tampão fosfato de potássio (10 mM, pH 7,0), N-dodecil-D-maltosídeo (0,6 mM) e 10-20  $\mu$ g de proteínas (homogeneizado). A reação foi iniciada pela a adição de 0,7  $\mu$ g de citocromo c reduzido. A atividade do complexo IV (EC 1.9.3.1) foi medida a 25°C por 10 minutos pelo decréscimo na absorbância devido à oxidação de citocromo c previamente reduzido. As leituras foram feitas em 550 nm (Rustin et al., 1994). Os resultados foram expressos em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .

#### **4.5.2 Atividade da Creatina Cinase Determinação da atividade da enzima CK**

Para a determinação da atividade da CK (EC 2.7.3.2), a reação foi iniciada pela adição de ADP 3,2 mM em meio contendo 7,08 mM de

fosfocreatina e de 0,8 a 1  $\mu\text{g}$  de proteínas (homogeneizado). Após um período de 10 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de ácido *p*-hidroximercuribenzoico 50 mM e a coloração rósea foi obtida pela adição de  $\alpha$ -naftol 20% e diacetil 20%. A leitura foi realizada por espectrofotometria a 540 nm, segundo o método de Hughes (1962). Para calcular a atividade da creatina quinase nas amostras, foi feita uma curva de calibração utilizando-se creatina como padrão. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de creatina.  $\text{min}^{-1}$ .  $\text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>.

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos testes comportamentais e do metabolismo energético foram obtidos pela ANOVA de duas vias, quando os valores de F foram significativos, comparações *post hoc* foram feitas pelo teste de *Tukey*. Os dados foram expressos como média ( $\pm$ ) e erro padrão da média (média  $\pm$  E.P.M). A significância estatística foi considerada para valores de  $p < 0,05$ . Os dados foram calculados pelo software GraphPadPrism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 PROTOCOLO DE PREVENÇÃO

#### 6.1.1 Atividade locomotora

Os abaixo resultados mostram a distância percorrida, movimentos de estereotipia, tempo de permanência no centro e nas bordas apresentados pelos animais durante 15 minutos. Os animais foram avaliados 30 minutos e 24 horas após a última injeção de cetamina e de MLT respetivamente.

As figuras 5 e 6, mostram os resultados relativos a distância percorrida bem como os movimentos de estereotipia exibidos pelos animais no protocolo de prevenção. Observou-se que os grupos controle+cetamina, MLT1+cetamina e MLT10+cetamina, apresentaram aumento da distância percorrida quando comparados ao grupo controle. Para os movimentos de estereotipia, observou-se que os grupos MLT10+salina, controle+cetamina, MLT1+cetamina e MLT10+cetamina apresentaram aumento dos movimentos de estereotipia quando comparados ao grupo controle. De maneira geral estes resultados mostram que a cetamina induziu aumento da distância percorrida e dos movimentos de estereotipia e a MLT não foi capaz de prevenir os efeitos da cetamina. Contrariamente ao esperado, a MLT10 apresentou um efeito semelhante ao da cetamina para os movimentos de estereotipia.

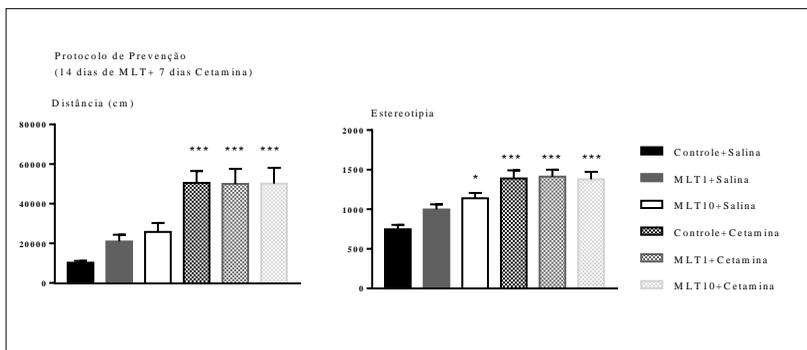


Figura 5 - Efeito da administração da MLT (1mg/kg e MLT10mg/kg) e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre a atividade locomotora (distância percorrida e estereotipia) no protocolo de prevenção. Os dados estão expressos

como média±EPM de 10-12 animais em cada grupo. \*diferente de controle (\* $p<0,05$ ; \*\*\* $p<0,0001$ ).

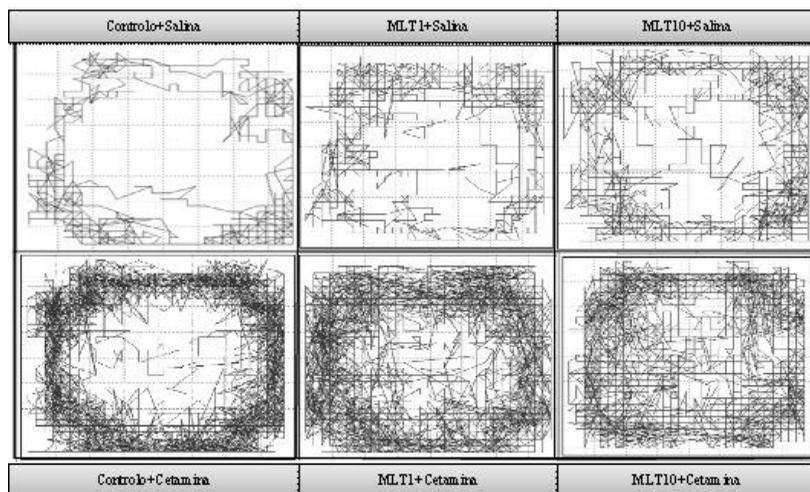


Figura 6 - Efeito da administração da MLT (1mg/kg e 10mg/kg) e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre a atividade locomotora (distância percorrida, tempo de permanência no centro e nas bordas) no protocolo de prevenção. Os dados estão expressos como média ± EPM de 10-12 animais em cada grupo.

### **Tempo de permanência no centro e nas bordas (prevenção)**

A figura 7 mostra os resultados para o tempo de permanência dos animais no centro e nas bordas depois dos respectivos tratamentos. Quanto ao tempo de permanência no centro e nas bordas do protocolo de prevenção, estes resultados mostram que os grupos MLT1+salina, MLT10+salina e o grupo MLT1+cetamina, apresentaram aumento significativamente estatístico do tempo de permanência no centro e diminuição do tempo de permanência nas bordas; estes resultados sugerem ao contrário do esperado que, a MLT sozinha ou com cetamina, além de não ter prevenido, induziu a comportamentos tipo esquizofrênico.

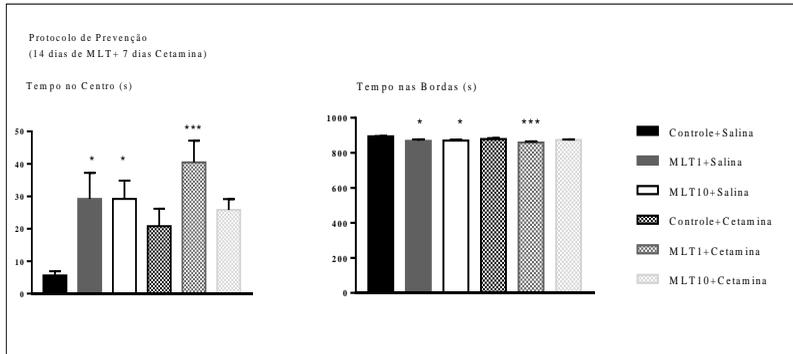


Figura 7 - Efeito da administração da MLT (1mg/kg e 10mg/kg) e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre a atividade locomotora (tempo de permanência no centro e nas bordas) no protocolo de prevenção. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 10-12 animais em cada grupo. \* diferente de controle (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ ).

### 6.1.2 Teste de inibição por pré-pulso

A figura 8 mostra os resultados sobre a inibição da interação por pré-pulso do reflexo de sobressalto apresentada pelos animais durante 15 minutos na caixa de pré-pulso. Os animais foram avaliados 30 minutos e 24 horas após a última injeção de cetamina e MLT respectivamente. Observou-se que o grupo controle+cetamina apresentou diminuição da inibição por pré-pulso nas três intensidades avaliadas (65dB, 70dB e 75dB) quando comparado ao grupo controle; o grupo MLT1+cetamina apresentou diminuição estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) para a intensidade de 70dB e apresentou um efeito preventivo nas intensidades de 65 e 75dB quando comparado ao grupo controle; já o grupo MLT10+cetamina apresentou diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) da inibição por pré-pulso nas três intensidades avaliadas quando comparado ao grupo controle.

Este achado sugere que a cetamina desencadeou um déficit no perfil sensorio-motor dos animais, confirmando a capacidade deste fármaco de indução do modelo de esquizofrenia na indução de alterações da IPP, já a MLT apresentou um leve efeito de prevenção, sugerindo seu potencial preventivo neste modelo.

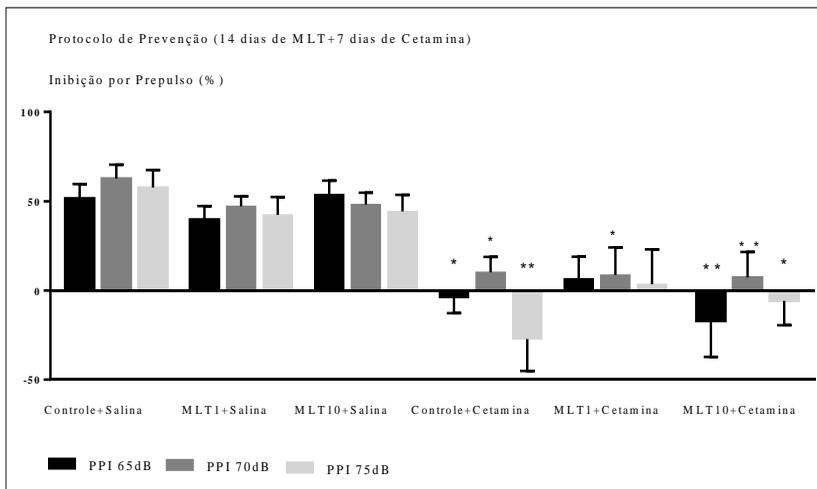


Figura 8 - Efeito da administração da MLT (1mg/kg e 10mg/kg) e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre a inibição por pré-pulso no protocolo de prevenção. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 10-12 animais em cada grupo. \* diferente de controle (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,001).

### 6.1.3 Atividade dos complexos da cadeia respiratória e da CK

A figura 9 mostra os resultados do protocolo de prevenção sobre a atividade dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória e atividade da enzima CK de três estruturas cerebrais (córtex, hipocampo e estriado) dos animais que receberam MLT(1mg/kg ou 10mg/kg) ou controle e seguido de tratamento com cetamina (25mg/kg) ou salina.

Com relação aos complexos I, II, II-III e IV da cadeia de transporte de elétrons, observou-se que o grupo MLT10+cetamina apresentou alteração do complexo IV no hipocampo quando comparado ao grupo controle. Relativamente a determinação da atividade da enzima CK; pode-se observar que o grupo controle+cetamina apresentou alterações significativas da atividade da CK no córtex e no hipocampo quando comparado ao grupo controle. Estes achados sugerem que a cetamina pode alterar a atividade da enzima CK em cérebro de roedores, podendo causar disfunções no metabolismo energético que pode ser relevante para o contexto da esquizofrenia.

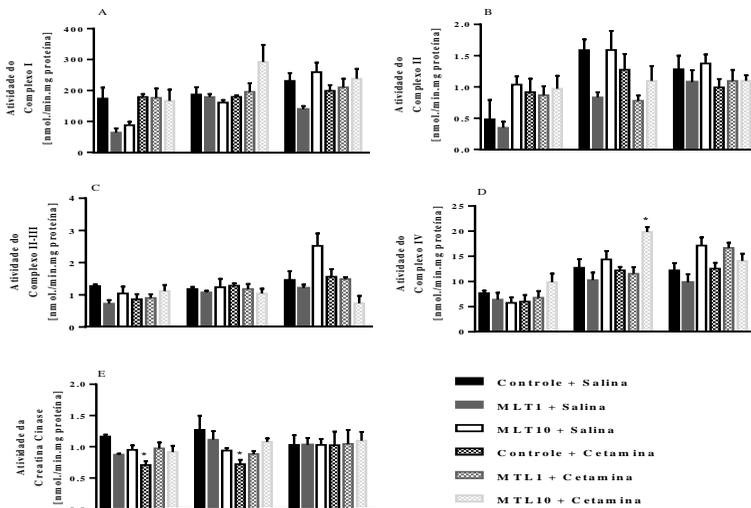


Figura 9 - Efeito da administração da MLT (1mg/kg e 10mg/kg) e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre a atividade dos complexos I, II, II-III e IV e da CK nas diferentes estruturas cerebrais de ratos no protocolo de prevenção. Os dados estão expressos como média+EPM de 10 animais em cada grupo. \* diferente de controle (\* =  $p < 0,05$ ).

## 6.2 PROTOCOLO DE REVERSÃO

### 6.2.1 Atividade locomotora distância percorrida e movimentos estereotipados

As figuras 10 e 11 mostram os resultados da distância percorrida, movimentos de estereotipia, tempo de permanência no centro e nas bordas apresentados pelos animais durante 15 minutos na caixa de atividade locomotora. Os animais foram avaliados 30 minutos e 24 horas após a última injeção de cetamina e de MLT respectivamente. Para a distância percorrida, os resultados mostram que o grupo controle+cetamina, MLT1+cetamina, MLT10+cetamina, apresentaram aumento significativo da distância percorrida quando comparados ao grupo controle. Relativamente aos movimentos de estereotipia, os grupos controle+cetamina, MLT1+cetamina, MLT10+cetamina, apresentaram aumento significativo dos movimentos de estereotipia quando comparados ao grupo controle. Estes dados sugerem que a

cetamina mimetizou os sintomas da esquizofrenia no modelo animal de esquizofrenia por ela induzido e as diferentes doses de MLT administradas de forma crônica, não foram capazes de prevenir os efeitos da cetamina.

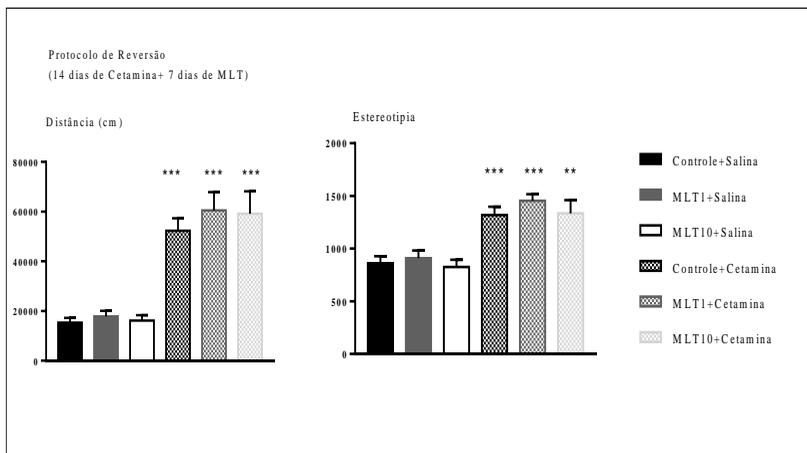


Figura 10 - Efeito da administração da MLT (1mg/kg e 10mg/kg) e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre a atividade locomotora (distância percorrida e estereotipia) no protocolo de reversão. Os dados estão expressos como média±EPM de 10-12 animais em cada grupo. \*diferente de controle (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ ).

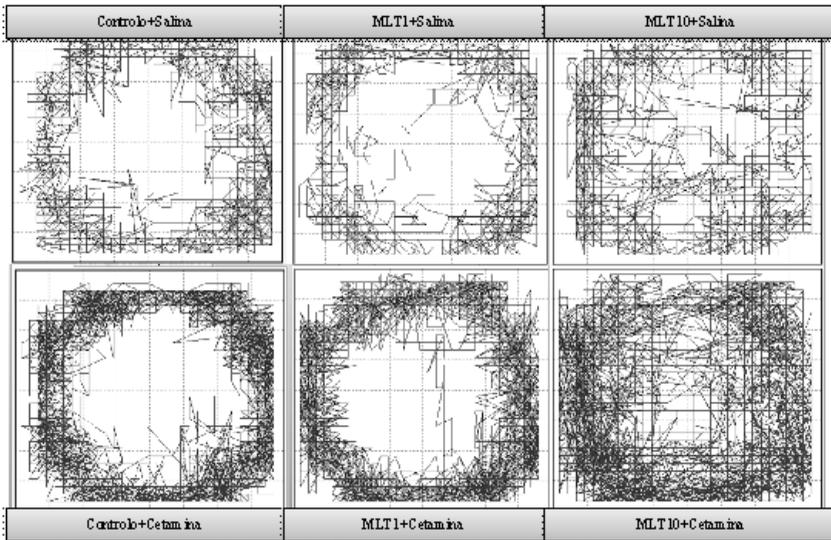


Figura 11 - Efeito da administração da MLT1 (mg/kg e MLT10mg/kg) e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre a atividade locomotora (distância percorrida e estereotipia) no protocolo de reversão. Os dados estão expressos como média±EPM de 10-12 animais em cada grupo.

### Tempo de permanência no centro e nas bordas

A figura 12 mostra os resultados para o tempo de permanência dos animais no centro e nas bordas no protocolo de reversão; para estes parâmetros, os resultados mostram que o grupo MLT10+cetamina apresentou aumento significativo do tempo de permanência no centro e diminuição do tempo nas bordas. De maneira geral, verificou-se que a interação da MLT10 e cetamina alterou o comportamento de evitação de espaços abertos, característica natural destes animais por tentarem evitar o centro temendo o encontro com seus predadores.

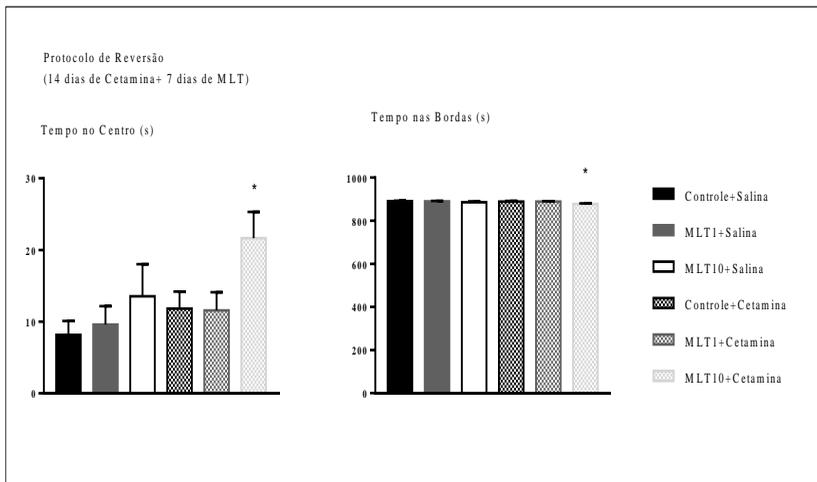


Figura 12 - Efeito da administração da cetamina (25mg/kg) e/ou tratamento com MLT (1mg/kg e 10mg/kg) sobre a atividade locomotora (tempo de permanência no centro e nas bordas) no protocolo de reversão. Os dados estão expressos como média±EPM de 10-12 animais em cada grupo. \* diferente de controle (\* $p < 0,05$ ).

### 6.2.2 Teste de inibição por pré-pulso

A figura 13 mostra os resultados sobre a inibição da interação por pré-pulso do reflexo de sobressalto apresentada pelos animais durante 15 minutos na caixa de pré-pulso. Os animais foram avaliados 30 minutos e 24 horas após a última injeção de cetamina e MLT respectivamente no protocolo de reversão. Os resultados mostram que o grupo controle+cetamina apresentou diminuição da inibição por pré-pulso nas intensidades de 65dB e 70dB quando comparado ao grupo controle, já os grupos MLT1+cetamina e MLT10+cetamina, apresentaram um efeito de reversão nas três intensidades avaliadas. Regra geral, a cetamina induziu a diminuição da IPP nas três intensidades e a MLT foi capaz de reverter os efeitos danosos da cetamina nas três intensidades avaliadas, o que revelou seu potencial de uso para reverter a IPP já descrito por outros estudos.

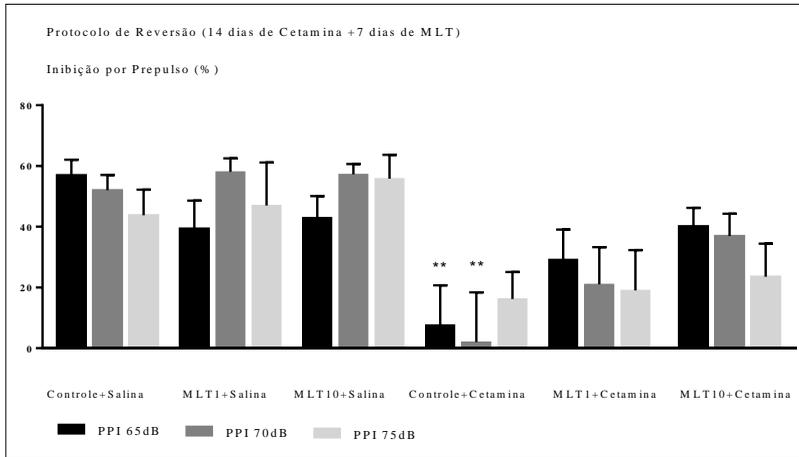


Figura 13 - Efeito da administração da cetamina (25mg/kg) e/ou tratamento com MLT (1mg/kg e 10mg/kg) sobre a inibição por pré-pulso nas diferentes estruturas cerebrais de ratos no protocolo de reversão. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 10 animais em cada grupo. \* diferente de controle (\*\* $p < 0,001$ ).

### 6.2.3 Atividade dos complexos da cadeia respiratória e da CK

A figura 14, mostra os resultados da atividade dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia transportadora de elétrons e da atividade da CK de três estruturas cerebrais (córtex, hipocampo e estriado), dos animais que receberam cetamina ou salina por 14 dias e tratados com MLT (1mg/kg e 10mg/kg) ou salina por 7 dias. Os resultados deste estudo mostram que o grupo MLT1+salina apresentou alteração significativa do complexo I no córtex e no estriado; o grupo MLT1+cetamina apresentou alteração significativa do complexo I do estriado, complexo II-III no hipocampo e do complexo IV do córtex pré-frontal; o grupo MLT10+cetamina apresentou alteração significativa do complexo I do estriado, do complexo IV do córtex e hipocampo; o grupo controle+cetamina apresentou alteração significativa do complexo IV no córtex pré-frontal. De maneira geral a interação da MLT nas duas doses testadas com a cetamina, alterou a atividade dos complexos da CTE de todas as estruturas analisadas neste protocolo.

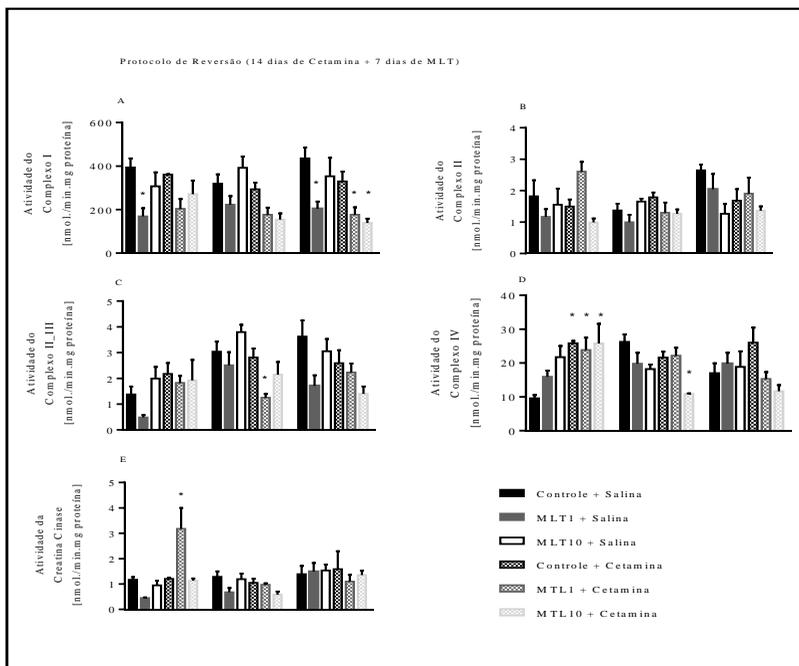


Figura 14 - Efeito da administração da cetamina (25mg/kg) e/ou tratamento com MLT (1mg/kg e 10mg/kg) sobre a atividade dos complexos I, II, II-III e IV e da CK nas diferentes estruturas cerebrais de ratos no protocolo de reversão. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 10 animais em cada grupo. \* diferente de controle ( $* = p < 0,05$ ).

## 7 DISCUSSÃO

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico complexo, e para estudá-lo, foi induzido um modelo animal de esquizofrenia induzido por doses subanestésicas crônicas de cetamina por 7 ou 14 dias. Sabe-se que a cetamina produz efeitos comportamentais similares aos sintomas positivos e negativos da esquizofrenia observados em pacientes com esquizofrenia (Adler et al., 1999; Hunt et al., 2006). Duas doses de MLT foram administradas para testar um possível efeito preventivo ou de reversão; para tal, foram avaliados diferentes parâmetros comportamentais tais como distância percorrida, movimentos de estereotipia, tempo de permanência no centro e nas bordas; foi igualmente avaliada a IPP do reflexo de sobressalto. Procedeu-se também a realização de análises bioquímicas, que consistiram na avaliação da atividade dos complexos I, II, II-III e IV da CTE e atividade da enzima CK.

Os resultados deste estudo, mostraram que a administração da cetamina em doses subanestésicas, induziu a um aumento da distância percorrida, movimentos de estereotipia, aumento do tempo de permanência no centro e diminuiu o tempo de permanência nas bordas nos dois protocolos executados neste estudo, o que sugere um aumento nos índices de atividade locomotora. Nestes parâmetros, a MLT nas duas doses testadas não foi capaz de prevenir ou reverter as alterações induzidas pela cetamina, e em alguns casos pareceu ter efeitos semelhantes aos apresentados pela cetamina, possivelmente esta alteração se deve a sua interação com receptores dopaminérgicos. Estes resultados mostram que a cetamina em doses subanestésicas e administrada de forma crônica induz a alteração da motricidade dos animais, consistentes com estudos realizados em humanos, que demonstram que a administração de antagonistas NMDA em voluntários saudáveis, provoca alterações comportamentais semelhantes aos observados em pacientes com esquizofrenia e pode piorar o quadro clínico de pacientes acometidos por esse transtorno (Covington et al., 2007) e provoca alterações comportamentais tipo esquizofrenia em roedores tais como hiperlocomoção, comportamentos parecidos com isolamento social (Uribe et al., 2013), déficits da inibição por pré-pulso (Kamiyama et al., 2011) e perda de memória (Chatterjee et al., 2011), seguidos de alterações dos níveis de glutamato e dopamina (Adejoke et al., 2017). Para além disso os resultados deste estudo corroboram com estudos anteriores do nosso laboratório, que igualmente revelaram que a administração da cetamina (25mg/kg) induziu ao surgimento de

comportamentos similares aos observados em quadros clínicos de pacientes com esquizofrenia (Zugno et al., 2014). Esta evidência, reforça a relevância deste modelo animal no estudo da esquizofrenia.

Os comportamentos estereotipados são característicos de distúrbios psiquiátricos tais como esquizofrenia e transtorno obsessivo-compulsivo (Ridley, 1994), e consiste na apresentação de vários tipos de movimentos anormais. Demonstrou-se que nos dois protocolos, a cetamina induziu ao aumento de movimentos de estereotipia quando comparado ao grupo controle. O principal efeito da MLT neste estudo, sugere que esta não foi capaz de prevenir ou reverter as alterações comportamentais induzidas pela cetamina nos dois protocolos. Entretanto, a MLT10, no protocolo de prevenção apresentou efeito semelhante ao observado nos grupos que tomaram cetamina, possivelmente a explicação esteja relacionada a relação da MLT com receptores de dopamina. Alguns estudos demonstraram que a MLT aumenta a atividade de receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> (Binfaré et al., 2010), e diminui a atividade de receptores noradrenérgicos (Mitchell e Weinsheker, 2010). Tal como o grooming a estereotipia é regulada pela sinalização dopaminérgica através da ativação de receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, neurotransmissão GABAérgica (Kaluef et al., 2016) e influência glutamatérgica (Hong et al., 2014). A ativação dos receptores D<sub>1</sub> leva a aumento de movimentos estereotipados (Karler et al., 1997; Komorowska e Pellis, 2004). É possível que a MLT10 tenha provocado aumento da liberação dopaminérgica e gerado alterações nos movimentos de estereotipia neste sistema de neurotransmissores. Com base nestes dados pode-se inferir que a hiperlocomoção gerada pela cetamina é resultado do bloqueio do receptores NMDA, enquanto os movimentos de estereotipia e o maior e menor tempo de permanência no centro e bordas respectivamente, gerado pela MLT10, pode ser resultado da estimulação de receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>. Estes resultados corroboram com um estudo realizado por Adejoke et al. (2017), que mostrou que a MLT5mg/kg diminuiu o grooming nos ratos e este efeito benéfico foi perdido na dose de MLT10mg/kg; este mesmo estudo a administração de MLT (5 e 10mg/kg) levou a um significativo aumento na interação social dependente de dose, com a administração repetida mas não no início. Vários sistemas de neurotransmissores têm sido implicados em alterações nos comportamentos de interação social; o estudo realizado por Xi-Ming et al. (1998), demonstrou que as influências GABAérgicas, dopaminérgicas, glutamatérgicas, colinérgicas e norepinefrínicas são cruciais para iniciar e controlar comportamentos de interação social. Neste contexto a influência da

MLT em qualquer desses neurotransmissores pode ser responsável pelos efeitos observados. No entanto, mais pesquisa são necessárias para avaliar adequadamente os mecanismos envolvidos.

Déficits de atenção e percepção têm sido observados na esquizofrenia e podem se dever a um mau funcionamento nos mecanismos neuronais que filtram a informação sensorial do ambiente (McGhie e Chapman, 1961). A IPP representa um índice dos mecanismos sensorio-motores essenciais para a proteção da integridade das informações sensoriais e cognitivas (Kilts, 2001). O reflexo de sobressalto, que é regulado por um circuito neural relativamente simples (Koch, 1999), é um mecanismo de defesa involuntário universal a um estímulo súbito intenso (geralmente auditivo) e pode ser inibido se o estímulo surpreendente for intimamente precedido por um estímulo mais fraco (pré-pulso) (Graham, 1975). Os déficits da IPP de maneira geral podem indicar a incapacidade do cérebro, de filtrar as informações desnecessárias, e estão ligados a anomalias na supressão sensorio-motor. Supõe-se que os déficits sensoriais e sensorio-motor conduzem a uma inundação excessiva das regiões cerebrais superiores, que por sua vez resultam em distúrbios cognitivos e em última análise em psicose (Perry et al., 1999). Os resultados deste estudo no protocolo de prevenção, avaliando a IPP em três intensidades diferentes de 65dB, 70dB e 75dB, mostram que a cetamina diminuiu a IPP nas três intensidades testadas. Contudo, os resultados deste estudo sugerem que a MLT nas duas doses testadas foi capaz de prevenir e rever a diminuição da inibição por pré-pulso induzida pela cetamina.

Embora o mecanismo neuroquímico pelo qual a IPP é modulada em humanos não esteja ainda completamente esclarecido, corroborando com os nossos achados, existem evidências substanciais do envolvimento de agonistas de receptores de dopamina, assim como antagonistas de receptores NMDA como a cetamina, no estabelecimento de alterações da IPP (Van e Eikelis, 2001). A administração destes compostos, produz um estado hiperdopaminérgico na via mesocortical, o qual está associado aos sintomas positivos da esquizofrenia (Chaves et al., 2009). A avaliação da supressão sensorio-motora e as medições operacionais da IPP, tornaram-se um importante instrumento para um melhor entendimento do processamento de deficiências de informação na esquizofrenia e transtornos relacionados (Braff e Geyer, 2001), tais como diminuição anormal da IPP em pacientes com esquizofrenia (Caine et al., 1992). Modelos animais da IPP induzidos por agonistas dopaminérgicos e antagonistas NMDA, têm sido propostos como tendo uma boa validade preditiva para o desenvolvimento de medicações

antipsicóticas e pesquisas sobre a etiologia de transtornos psicóticos (Kilts, 2001).

Os efeitos benéficos da administração crônica de MLT sobre déficits da IPP ou déficit sensorio-motor podem ser explicados por mecanismos dopaminérgicos e serotoninérgicos por ela modulados. Algumas evidências que sugerem que a MLT modula a atividade estriatal e límbica (Zisapel et al., 1983). Os locais de ligação à MLT foram verificados em algumas áreas cerebrais, tais como o estriado e o sistema límbico, que são ricas em conteúdo dopaminérgico. Existe também a hipótese de que a MLT inibe a atividade dopaminérgica límbica. Deste modo, o teor de dopamina mesolímbica e mesocortical pode aumentar quando a secreção de MLT diminui (Sandyk e Kay, 1992; Zisapel, 1983). Estes dados sugerem que a MLT pode ser essencial no ajuste da atividade dopaminérgica em algumas áreas cerebrais. Assim, como resultado da diminuição da secreção de MLT durante a puberdade, o teor dopaminérgico mesolímbico pode ser excessivamente aumentado, e seu efeito pode ser responsável, em parte, pelo desencadeamento dos sinais da esquizofrenia durante a adolescência (Sandyk e Kay, 1990). Além disso, em roedores, enquanto os agonistas dopaminérgicos como apomorfina causam comprometimento da IPP, os antagonistas dopaminérgicos, como o haloperidol, revertem esse efeito (Uzbay et al., 2010). Portanto, os efeitos benéficos da MLT no presente estudo podem estar relacionados à sua ação reguladora sobre o teor dopaminérgico em algumas regiões cerebrais.

A MLT em doses farmacológicas também interage com os receptores 5-HT<sub>2</sub>, agindo como um antagonista desses receptores. Além disso, tem sido sugerido que a administração crônica de MLT ou análogos em conjunto com antipsicóticos atípicos poderia aumentar os seus efeitos sobre os sintomas negativos da esquizofrenia (Sandyk e Kay, 1991). A respeito disso, muitos agentes antipsicóticos atípicos como a Clozapina, a Olanzapina, a Risperidona e a Quetiapina também bloqueiam os receptores 5-HT<sub>2</sub> e existe uma ligação entre a sua atividade antipsicótica e atividade bloqueadora de receptores 5-HT<sub>2</sub> (Uzbay, 2009). A Clozapina e a Quetiapina também reverteram os déficits de IPP em ratos (Uzbay et al., 2010). Demonstrou-se que a principal vantagem dos antipsicóticos atípicos sobre os fármacos clássicos é que eles bloqueiam e regulam negativamente os receptores 5-HT<sub>2</sub> e por conseguinte, podem atuar em sincronia com os mecanismos fisiológicos endógenos que reduzem a actividade do receptor 5-HT<sub>2</sub> (Sandyk, 1991). Nesse sentido, nossos achados quanto aos efeitos do

tratamento crônico com MLT e cetamina sobre IPP, também podem estar relacionados à sua propriedade antagonista de receptores 5-HT<sub>2</sub>.

Embora as alterações comportamentais sejam parâmetros importantes para entender os sintomas encontrados em pacientes com esquizofrênia, existem algumas evidências que mostram anormalidades bioquímicas e fisiológicas relevantes, incluindo a desorganização neuronal do córtex pré-frontal (Uranova, 2001) e uma redução no volume cortical (Zipursky, 1992). Assim, as alterações nos neurônios do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), assim como alterações dopaminérgicas (Toda e Abi-Dargham, 2007), glutamatérgicas e de metabolismo energético, também são fundamentais para entender os mecanismos fisiopatológicos da esquizofrenia (Tsai e Coyle, 2002). Distúrbios do metabolismo energético e o estresse oxidativo no cérebro devido à disfunção mitocondrial têm sido documentados na esquizofrenia (Prabakaran et al., 2004). As disfunções mitocondriais também têm demonstrado contribuir para neurodegeneração e deficiências cognitivas, características que são comumente encontradas na esquizofrenia (Schon e Manfredi, 2003; Picard e McEwen, 2014). As mitocôndrias geram ATP necessário para aporte energético a função celular através da fosforilação oxidativa. Qualquer defeito na via mitocondrial ou o mau funcionamento das mitocôndrias cerebrais leva a uma grave deficiência energética, a um déficit no armazenamento de cálcio e a produção de ERO nos neurônios, o que pode resultar em morte neuronal. Vários estudos bioquímicos, genéticos, expressão gênica e de imagem em humanos sugerem disfunções mitocondriais na esquizofrenia com base em evidências de alteração no metabolismo de energia cerebral, atividade da cadeia de transporte de elétrons e expressão de genes envolvidos na função mitocondrial (Ben-Shachar, 2016; Park et al., 2010; Brisch et al., 2014; Jousse et al., 2014).

Os resultados deste estudo referentes ao protocolo de prevenção, mostram que a MLT10 associada à cetamina alterou a atividade do complexo IV no hipocampo. Este achado sugere que dependendo da dose administrada, a MLT pode eventualmente potencializar a ação da cetamina e alterar o funcionamento dos complexos da CTE. Entretanto, embora a maior parte dos estudos experimentais tenham revelado que a MLT é um potente antioxidante, algumas evidências recentes *in vitro*, sugerem que a MLT pode ocasionalmente promover a produção de ERO em algumas células (Osseni et al., 2000; Radogna et al., 2009). Com base nestes dados é possível que o aumento da atividade do complexo IV do hipocampo, possa ser devido ao mecanismo de produção de ERO, dependente da dose administrada. Alguns estudos têm demonstrado que

a MLT interage com os complexos I e IV da CTE mitocondrial para promover o fluxo de elétrons em condições basais e aumentar a produção de ATP (Martin et al., 2000; Martin et al., 2002). O potencial redox elevado da MLT (-0,98 V) foi proposto como facilitador de transferência de elétrons na CTE, doando um elétron para o complexo I do CTE (Acuna-Castroviejo, 2001). No entanto, o papel da MLT no metabolismo mitocondrial, tal como o consumo de oxigênio, permanece pouco investigado e elucidado (de Atenor, 1994; Reyes-Toso et al., 2006). Os resultados deste estudo, referentes ao protocolo de reversão mostram que a MLT1 sozinha ou administrada com a cetamina alterou a atividade do complexo I no córtex e estriado, do complexo II-III no hipocampo e do complexo IV no córtex, enquanto que a MLT10 diminuiu a atividade do complexo IV do hipocampo.

Os nossos resultados corroboram com o estudo de Rudin et al. (2005) que mostraram que algumas doses subanestésicas de cetamina, variando de 10 a 40 (mg/kg), podem causar apoptose, aumentando o número de neurônios danificados em camundongos neonatais, confirmado pela fragmentação do DNA, no córtex e no cerebelo. Os resultados deste estudo corroboram ainda com outras pesquisas que recorrem a estudos clínicos utilizando tecidos periféricos e modelos animais: os primeiros mostraram um aumento da atividade mitocondrial em plaquetas de pacientes (Ben-Shachar et al., 1999; Dror et al., 2002) que também estão relacionados com os escores de sintomas positivos (Ben-Shachar et al., 2007). Com relação a este último, um modelo de esquizofrenia induzido por cetamina em ratos demonstrou de forma semelhante um aumento na atividade dos complexos I e IV da CTE no córtex, hipocampo e estriado (de Oliveira et al., 2011).

Estudos sugerem que a interação entre neurotransmissores e disfunção mitocondrial contribui potencialmente para a fisiopatologia da esquizofrenia (Deslauriers et al., 2014). Em cultura de células neuronais, demonstrou-se que a dopamina induz uma redução nos níveis de ATP e especificamente a inibição de complexo I (Ben-Shachar., 2002, Ben-Shachar et al., 2004, Brenner-Lavie et al., 2008, 2009). Em um modelo animal de esquizofrenia, o aumento dos níveis de ATP mitocondrial no estriado correspondeu ao aumento dos níveis de dopamina (Möller et al., 2013). Além disso, a via glutamatérgica parece estar envolvida pela via de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) através da sinalização de movimentos do receptor de NMDA. De fato, as reservas de cálcio das mitocôndrias participam de sua homeostase; inversamente, concentrações mais elevadas de  $Ca^{2+}$  intra-mitocondrial levam a uma maior atividade da cadeia respiratória (Brookes et al., 2004).

A capacidade da MLT de influenciar a função mitocondrial foi testada tanto *in vivo* como *in vitro*. Os primeiros estudos *in vivo* conduzidos em ratos, mostram que os complexos da CTE das mitocôndrias do cérebro e do fígado foram medidos após injeções de MLT(10mg/kg). Verificou-se que a MLT aumentou a actividade do complexo I e IV de CTE mitocondrial de maneira dependente ao tempo, os complexos II e III não foram afetados (Mártin et al., 2000). Os efeitos da MLT na regulação dos complexos I e IV presumivelmente não refletem seu papel antioxidante, mas indicam uma interação com complexos da CTE, doando e aceitando elétrons, aumentando assim o fluxo de elétrons, um efeito não compartilhado por outros antioxidantes. A principal consequência da ação da MLT sobre a mitocôndria pode ser evitar dano e disfunção, contribuindo assim para aumentar a produção de ATP (Márin et al., 2002; Okatani et al., 2003). A MLT aumenta a eficiência da CTE, limitando assim o vazamento de elétrons e geração de radicais livres, e consequentemente promovendo a síntese protéica (Leon et al., 2004; Escames et al., 2010). Entretanto os resultados deste estudo mostram que a MLT sozinha ou associada a cetamina alterou a atividade dos complexos da CTE, possivelmente por sua ação oxidante. Estudos sugerem que a MLT induz a produção de ERO através da CTE em algumas células (Osseni et al., 2000; Radogna et al., 2009; Zhang et al., 2011).

No presente estudo, também foram avaliados os efeitos da MLT (1mg/kg e 10mg/kg) no modelo animal induzido por cetamina, sobre a atividade da CK uma enzima responsável pelo armazenamento energético em tecidos que utilizam altas taxas de energia no cérebro, como o córtex pré-frontal, hipocampo, cerebelo, estriado e córtex cerebral de animais. Sobre a determinação da atividade da CK, após administração da cetamina e duas doses de MLT; os resultados deste estudo sugerem que a cetamina administrada no protocolo de prevenção, alterou a atividade da enzima CK no hipocampo e estriado, enquanto que a MLT parece ter prevenido este efeito nas três estruturas analisadas. A atividade de CK constitui uma reserva de energia importante nos tecidos que necessitam de uma elevada procura de energia. Alguns estudos relacionaram uma atividade hipometabólica no córtex pré-frontal (Kasai et al., 2002) e alterações na neurotransmissão dopaminérgica, colinérgica e serotoninérgica em cérebro de pacientes com esquizofrenia (Bertolino, 1999).

Neste contexto, de Oliveira et al. (2009) observaram que doses subanestésicas de cetamina (4, 10 e 30 mg/kg), implicaram um aumento da peroxidação lipídica, dano oxidativo às proteínas e diminuição de

defesas enzimáticas antioxidantes. Assim, um desequilíbrio no metabolismo energético pode produzir radicais livres e qualquer alteração da atividade da CK, pode mostrar um aumento na demanda de ATP, de modo que o estresse oxidativo também pode estar relacionado a progressão da esquizofrenia (Reddy e Keshavan, 2004). A disfunção mitocondrial pode surgir quando a fosfocreatina é repetidamente depletada porque não está mais disponível para reabastecer os recursos de ATP. Em vez disso, a célula deve voltar para a via da glicólise menos eficiente para atender às demandas de energia, o que pode preparar o cenário para uma cascata de eventos que levam à patologias do cérebro (Stork e Renshaw, 2005). Considerando que o metabolismo da CK depende da função mitocondrial, foi proposto que o estresse provoca mudanças na creatina, fosfocreatina ou creatina cinase em áreas cerebrais ligadas à doença mental (Allen, 2012). Isto sugere que qualquer perturbação dentro desta via metabólica pode predispor certos indivíduos a transtornos afetivos. Níveis de atividade de CK aumentados permanecem um fenômeno clínico amplamente visto, dentro das internações psiquiátricas. Porém, pouco se sabe sobre o mecanismo subjacente à sua relação com a psicopatologia. Quando foi avaliado o efeito da reversão, constatou-se que o grupo MLT1+cetamina aumentou a atividade da CK no córtex, sugerindo que esta interação pode ter potenciado o efeito da cetamina sobre a CK no córtex. De outro modo, a cetamina sozinha não induziu alteração da atividade da CK em nenhuma das estruturas analisadas.

Sabe-se que a cetamina é um fármaco apropriado para induzir comportamento psicótico; entretanto, não existe consenso na literatura sobre a dose adequada. Existem evidências que demonstram que a cetamina em doses muito baixas, como 5, 10 e 15 mg/kg, pode ser um agente antidepressivo (Garcia et al., 2008; Rezin et al., 2009). Para induzir a hiperatividade locomotora e a disfunção celular, a dose varia de 10 a 50 mg/Kg (Becker e Grecksch, 2004; Littlewood et al., 2006), e em doses mais elevadas, a cetamina é um anestésico potente (Jang et al., 2009). Outros estudos afirmam que a cetamina promove um efeito protetor de energia celular, mantém o metabolismo da glicose e a produção de ATP (Pfenninger et al., 1997). De maneira geral, estes resultados são consistentes com os nossos resultados do efeitos da cetamina sobre a CK. Sabe-se também que, os distúrbios no metabolismo energético cerebral, são fatores importantes que contribuem para as lesões neuronais em pacientes com esquizofrenia (Piezenick et al., 2007; Mattson et al., 2008). A CK participa de um importante sistema que mantém a homeostase energética, esta regulação

da homeostase celular é feita por duas isoformas, mitocondrial (mtCK) e citosólicas (ctCK) e qualquer alteração no circuito fosfocreatinacina-se pode ser um passo importante para o processo neurodegenerativo que leva à perda neuronal no cérebro (Wallimann et al., 1992; Pilla et al., 2003).

Modelos experimentais têm procurado mimetizar uma condição humana e muitos modelos têm sido utilizados para simular distúrbios esquizofrênicos. Os mecanismos subjacentes à fisiopatologia da esquizofrenia não são completamente compreendidos. No entanto, podemos sugerir que o metabolismo energético cerebral pode estar alterado no cérebro de pacientes com esquizofrenia, levando provavelmente a alterações drásticas que podem estar envolvidas na patogênese da esquizofrenia.

Níveis aumentados CK são encontrados na maioria dos pacientes hospitalizados com esquizofrenia aguda e pacientes com psicose afetivas (Meltzer, 1976). Hermesh et al. (2002), descobriram que os pacientes, principalmente com esquizofrenia, exibem níveis CK consistentemente elevados durante cada episódio psicótico sucessivo e sugeriram que os pacientes que exibem níveis marcados de CK durante a psicose aguda estão em maior risco de síndrome neuroléptica maligna. Apesar destes dados, os mecanismos envolvendo a MLT com a CK permanecem pouco estudados e elucidados, logo, faz-se importante que novas informações sobre os mecanismos envolvidos na sintomatologia e desenvolvimento desse transtorno sejam providenciadas.

## 8 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo relativos a administração crônica da MLT no modelo animal de esquizofrenia, fornecem as seguintes indicações:

A administração exógena e crônica de MLT nas duas doses testadas neste estudo, não foi capaz de prevenir ou reverter as alterações comportamentais induzidas pela cetamina.

Em relação a inibição do reflexo de sobressalto, um déficit observado em pacientes com esquizofrenia, a MLT nas duas doses testadas, foi capaz de prevenir e reverter os efeitos da cetamina nos dois protocolos implementados neste estudo, validando assim seu potencial de ação sobre a IPP no modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina.

A MLT nas duas doses testadas não foi capaz de prevenir ou reverter os efeitos danos da cetamina sobre os complexos da CTE em nenhum dos protocolos implementados neste estudo.

## **9 PERSPECTIVAS**

As pesquisas para o entendimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia e na identificação de novas propostas terapêuticas são cada vez mais ativas. Apesar destes esforços, muitas dúvidas relacionadas aos mecanismos envolvidos na sua patogenese ainda prevalecem; em função disso, o uso de modelos animais e outras metodologias aplicadas tanto na pesquisa pré-clínica quanto em humanos é justificável. Sendo assim, a continuidade deste estudo poderá consistir na análise de parâmetros de estresse oxidativo como: T-BARS, GPx, GSH, SOD em amostras dos mesmos animais, o que poderá contribuir para o levantamento de hipóteses a serem investigadas para um entendimento cada vez melhor da ação da MLT no modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina.

## REFERÊNCIAS

- Abi-Dargham A, Kegeles LS, Zea-Ponce Y, Mawlawi O, Martinez D, Mitropoulou V, O'Flynn K, Koenigsberg HW, Van Heertum R, Cooper T, Laruelle M, Siever LJ. Striatal amphetamine-induced dopamine release in patients with schizotypal personality disorder studied with single photon emission computed tomography and [123I]iodobenzamide. *Biol Psychiatry*. 2004; 55(10):1001-6.
- Acosta FJ, Hernandez JL, Pereira J, Herrera J, Rodriguez CJ. Medication adherence in schizophrenia. *World J Psychiatry*. 2012; 2:74-82.
- Acuña-Castroviejo D, Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res*. 2001; 30: 65–74.
- Adejoke YO, Olufemi AA, Olakunle JO. Melatonin attenuates behavioural deficits and reduces brain oxidative stress in a rodent model of schizophrenia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017; 92:373–383.
- Adler CM, Malhotra AK, Elman I, Goldberg T, Egan M, Pickar D, Breier A. Comparison of ketamine-induced thought disorder in healthy volunteers and thought disorder in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1999; 156(10):1646-9.
- Allen PJ. Creatine metabolism and psychiatric disorders: does creatine supplementation have therapeutic value? *Neurosci Biobehav Rev*. 2012; 36:1442–1462.
- Amar S, Shamir A, Ovadia O, Blanaru M, Reshef A, Kremer I, Mishmar D. Mitochondrial DNA HV lineage increases the susceptibility to schizophrenia among Israeli Arabs. *Schizophr Res*. 2007; 94(1-3):354–358.
- Anderson G, Maes M. Melatonin: an overlooked factor in schizophrenia and in the inhibition of anti-psychotic side effects. *Metabolic Brain Disorders*. 2012; 27 (2):113–119.
- Anderson G, Maes M. Melatonin: an overlooked factor in schizophrenia and in the inhibition of anti-psychotic side effects. *Metab Brain Dis*. 2012; 27:113– 119.
- APA. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Diseases. Fourth edition (DSM-IV). Washington, DC: APA; 1994.
- Arendt J, Aldhous M, Wright J. Synchronisation of a disturbed sleep-wake cycle in a blind man by melatonin treatment. *Lancet*. 1988; 1:772–773.
- Armando L, Morera-Fumero, Pedro Abreu-Gonzalez. Role of melatonin in schizophrenia. *Int J Mol Sci*. 2013; 14:9037–50.

- Arroll MA, Wilder L, Neil J. Nutritional interventions for the adjunctive treatment of schizophrenia: a brief review. *Nutr J.* 2014; 16:13-91.
- Avila-Martin G, Galan-Arriero I, Ferrer-Donato A, Busquets X, Gomez-Soriano J, Escribá PV, Taylor J. Oral 2-hydroxyoleic acid inhibits reflex hypersensitivity and open-field-induced anxiety after spared nerve injury. *Eur J Pain.* 2015; 19(1):111-22.
- Battisti JJ, Shreffler CB, Uretsky NJ, Wallace LJ. NMDA antagonists block expression of sensitization of amphetamine- and apomorphine-induced stereotypy. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000; 67:241-6.
- Bauer M, Praschak-Rieder N, Kasper S, Willeit M. Is dopamine neurotransmission altered in prodromal schizophrenia? A review of the evidence. *Curr Pharm Des.* 2012; 18: 1568–1579.
- Becker A, Grecksch G. Ketamine-induced changes in rat behavior: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2004; 28:1267-77.
- Becker T, Kilian R. Psychiatric services for people with severe mental illness across Western Europe: what can be generalized from current knowledge about differences in provision, costs and outcomes of mental health care. *Acta Psychiatrica Scandinavica Suppl.* 2006; 113:9-16.
- Becker WH. Epiglandol bei dementia praecox. *Ther Halbmonat.* 1920; 34:667–668.
- Belogradov G, Hatefi Y. Catalytic sector of complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase): subunit stoichiometry and substrate-induced conformation changes. *Biochemistry.* 1994; 33(15):4571-4576.
- Ben-Shachar D, Bonne O, Chisin R, Klein E, Lester H, Aharon-Peretz J, Yona I, Freedman N. Cerebral glucose utilization and platelet mitochondrial complex I activity in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2007; 31:807-813.
- Ben-Shachar D, Zuk R, Gazawi H, Ljubuncic P. Dopamine toxicity involves mitochondrial complex I inhibition: implications to dopamine-related neuropsychiatric disorders. *Biochem Pharmacol.* 2004; 67:1965–1974.
- Ben-Shachar D, Zuk R, Gazawi H, Reshef A, Sheinkman A, Klein E. Increased mitochondrial complex I activity in platelets of schizophrenic patients. *Int J Neuropsychopharmacol.* 1999; 2(4):245-253.
- Ben-Shachar D. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: a possible linkage to dopamine. *J Neurochem.* 2002; 83:1241–1251.
- Ben-Shachar D. Mitochondrial multifaceted dysfunction in schizophrenia; complex I as a possible pathological target. *Schizophr Res.* 2016; 16:30466-2.

- Bentall RP. Doctoring the mind: why psychiatric treatments fail. London: Penguin. 2009.
- Bersani G, Mameli M, Garavini A, Pancheri P, Nordio M. Reduction of night/day difference in melatonin blood levels as a possible disease-related index in schizophrenia. *Neuroendocrinology Letters*. 2003; 24:181–4.
- Bersani G, Mameli M, Garavini A, Pancheri P, Nordio M. Reduction of night/ day difference in melatonin blood levels as a possible disease-related index in schizophrenia. *Neurol Endocrinol Lett*. 2003; 24:181–184.
- Bertolino A. Dysregulation of dopamine and pathology of prefrontal neurons: neuroimaging studies in schizo- phrenia and related animal models. *Epidemiol Psichiatr Soc*. 1999; 8:248-54.
- Bigelow LB. Effects of aqueous pineal extract in chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1974; 8:5–15.
- Binfaré RW, Mantovani M, Budni J, Santos AR, Rodrigues AL. Involvement of dopamine receptors in the antidepressant-like effect of melatonin in the tail suspension test. *Eur J Pharmacol*. 2010; 25:638(1-3):78-83.
- Black HR, Quallich H, Gareleck CB. Racial differences in serum creatine kinase levels. *Am J Med*. 1986; 81:479–487.
- Bowie CR, Harvey PD. Schizophrenia from a Neuropsychiatric Perspective. *Mt Sinai J Med*. 2006; 73:993-8.
- Braff DL, Geyer MA, Swerdlow NR. Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology*. 2001; 156 (2–3):234–258.
- Brancaccio P, Maffulli N, Buonauro R, Limongelli FM. Serum enzyme monitoring in sports medicine. *Clin Sports Med*. 2008; 27:1–18.
- Brenner-Lavie H, Klein E, Ben-Shachar D. Mitochondrial complex I as a novel target for intraneuronal DA: modulation of respiration in intact cells. *Biochem Pharmacol*. 2009; 78:85–95.
- Brenner-Lavie H, Klein E, Zuk R, Gazawi H, Ljubuncic P, Ben-Shachar D. Dopamine modulates mitochondrial function in viable SH-SY5Y cells possibly via its interaction with complex I: relevance to dopamine pathology in schizophrenia. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1777:173–185.
- Brisch R, Saniotis A, Wolf R, Bielau H, Bernstein HG, Steiner J, Bogerts B, Braun, AK, Jankowski Z, Kumaritlake J, Henneberg M, Gos T. The role of dopamine in schizophrenia from a neurobiological and evolutionary perspective: old fashioned, but still in vogue. *Front*

Psychiatry. 2014; 19(5):47.

Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004; 287:C817–C833.

Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci.* 2002; 47:2336-2348.

Buchanan RW, Javitt DC, Marder SR, Schooler NR, Gold JM, McMahon RP. The Cognitive and Negative Symptoms in Schizophrenia Trial (CONSIST): the efficacy of glutamatergic agents for negative symptoms and cognitive impairments. *Am J Psychiatry.* 2007; 164:1593–1602.

Burbaeva GSH, Savushkina OK, Boksha IS. Creatine kinase BB in brain in schizophrenia. *World Biology Psychiatric.* 2003; 4:177-183.

Caine SB, Geyer MA, Swerdlow NR. Hippocampal modulation of acoustic startle and prepulse inhibition in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 1992; 43(4):1201-8.

Canevar 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.

Carlsson A, Waters N, Holm-Waters S, Tedroff J, Nilsson M, Carlsson ML. Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001; 41:237-60.

Caruncho HJ, Dopeso-Reyes IG, Loza MI, Rodriguez MA. A GABA, reelin, and the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Crit Rev Neurobiol.* 2004; 16:25–32.

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

Castro F, Carrizo E, Prieto de RD, Rincon CA, Asian T, Medina-Leendertz S, Bonilla E. [11]Effectiveness of melatonin in tardive dyskinesia. *Invest Clin.* 2011; 52:252–260.

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

Chaturvedi RK, Flint Beal M. Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radic Biol Med.* 2013; 63:1-29.

Chaves C, Marque CR, Trzesniak C, Machado de Sousa JP, Zuardi AW, Crippa JA, Dursun SM, Hallak JE. Glutamate-N-methyl-D-aspartate

- receptor modulation and minocycline for the treatment of patients with schizophrenia: an update. *Braz J Med Biol Res.* 2009; 42(11):1002-14.
- Chemerinski E, Ho BC, Flaum M, Arndt S, Fleming F, Andreasen NC. Insomnia as a predictor for symptom worsening following antipsychotic withdrawal in schizophrenia. *Comprehensive Psychiatry.* 2002; 43(5): 393–396.
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 co-ordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol.* 2003; 160 (2):189–200.
- Cipolla-Neto J, Afeche SC. Glândula pineal. In: AIRES, M. M. (coord.). *Fisiologia.* Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2008; 3:980-990.
- Cipolla-Neto J, Skorupa A, Ribeiro-Barbosa E, Bartol I, Mota S, Afeche S, Cateras, N. The role of the retrochiasmatic area in the control of pial metabolism. *Neuroendocrinol.* 1999; 97-104.
- Circadin: summary of product characteristics. 2010 [[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_Product\\_Information/human/000695/WC500026811.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Product_Information/human/000695/WC500026811.pdf)].
- CK NAC UV. Liquid Determinazione cinetica UV secondo le raccomandazione D6Kc nel siero e nel plasma. Sentinel CH, Milano, Italy. 1996.
- Coccorello R, Moles A. Potential mechanisms of atypical antipsychotic-induced metabolic derangement: clues for understanding obesity and novel drug design. *Pharmacol Ther.* 2010; 127:210-51.
- Covington MA, Riedel WJ, Brown B, He C, Morris E, Weinstein S. Does ketamine mimic aspects of schizophrenic speech? *J Psychopharmacol.* 2007; 21:338-46.
- Crump C, Winkleby MA, Sundquist K, Sundquist J. Comorbidities and mortality in persons with schizophrenia: A Swedish national cohort study. *Am J Psychiatry.* 2013; 170:324-33.
- Cuesta MJ, Sanchez-Torres AM, Cabrera B, Bioque M, Merchán-Naranjo J, Corripio I. Premorbid adjustment and clinical correlates of cognitive impairment in first-episode psychosis. The PEPsCog Study. *Schizophr Res.* 2015; 164:65-73.
- da Silva Araújo T, Maia Chaves Filho AJ, Monte AS, Isabelle de Góis Queiroz A, Cordeiro RC, de Jesus Souza Machado M, de Freitas Lima R, Freitas de Lucena D, Maes M, Macêdo D. Reversal of schizophrenia-like symptoms and immune alterations in mice by immunomodulatory drugs. *J Psychiatr Res.* 2017; 84: 49–58.

- Davey GP, Peuchen S, Clark JB. Energy thresholds in brain mitochondria: potential involvement in neurodegeneration. *J Biol Chem.* 1998; 273:12753-12757.
- Davies J, Evans RH, Francis AA, Watkins JC. Excitatory amino acid receptors and synaptic excitation in the mammalian central nervous system. *J Physiol (Paris).* 1979; 75(6):641-54.
- Davis J, Moylan S, Harvey BH, Maes M, Berk M. Neuroprogression in schizophrenia: pathways underpinning clinical staging and therapeutic corollaries. *Aust N Z J Psychiatry.* 2014; 48:512–529.
- De Atenor MS, De Romero IR, Brauckmann E. Effects of the pineal gland and melatonin on the metabolism of oocytes in vitro and on ovulation in *Bufo arenarum*. *J Exp Zool.* 1994; 268:436–441.
- de la Fuente-Sandoval C, León-Ortiz P, Favila R. Higher levels<sup>[SEP]</sup> 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 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.
- 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; 33:1003-8.
- Deakin JF, Simpson MD. A two-process theory of schizophrenia: evidence from studies in post-mortem brain. *J Psychiatr Res.* 1997; 31(2):277-95.
- Deakin JF, Slater P, Simpson MD, Gilchrist AC, Skan WJ, Royston Mc, Reynolds GP, Gross AJ. Frontal cortical and left temporal glutamatergic dysfunction in schizophrenia. *Journ of Neurochem.* 1989; 52:1781-6.
- DeLisi LE. The concept of progressive brain change in schizophrenia: implications for understanding schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2008; 34:312–321.
- Deslauriers J, Racine W, Sarret P, Grignon S. Preventive effect of  $\alpha$ -lipoic acid on prepulse inhibition deficits in a juvenile two-hit model of schizophrenia. *Neuroscience.* 2014; 272:261– 270.
- Deslauriers J, Sarret P, Grignon S. The impact of oxidative stress on the dopaminergic neurotransmission, in: *Study on Psychiatric Disorders.* 2015; 197–210.

- Do KQ, Cabungcal JH, Frank A, Steullet P, Cuenod M. Redox dysregulation, neurodevelopment, and schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol.* 2009; 19:220–230.
- Dror N, Klein E, Karry R, Sheinkman A, Kirsh Z, Mazor M, Tzukerman M, Ben-Shachar D. State dependent alterations in mitochondrial complex I activity in platelets: A potential peripheral marker for schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2002; 7:995-1001.
- Dursun SM, Deakin JF. Augmenting antipsychotic treatment with lamotrigine or topiramate in patients with treatment-resistant schizophrenia: A Naturalistic Case-Series Outcome Study. *J Psychopharm.* 2001; 15:297-301.
- El Mrabet FZ, Ouakki S, Mes\_oui A, El Hessni A, Ouichou A. Pinealectomy and exogenous melatonin regulate anxiety-like and depressive-like behaviors in male and female wistar rats. *Neurosci Med.* 2012; 3: 394–403.
- Eldred SH, Bell NW, Sherman LJ. A pilot study comparing the effects of pineal extract and a placebo in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med.* 1960; 263:1330–1335.
- Ellenbroek BA, Cools AR. Animal models for the negative symptoms of schizophrenia. *Behav Pharmacol.* 2000; 11(3-4):223-33.
- Ellison G. The N-methyl-d-aspartate antagonists phen- cyclidine, ketamine and dizocilpine as both behavioral and anatomical models of the dementias. *Brain Res Bull.* 1995; 20:250-67.
- Emilia K, Lehtinen, Ebru U, Birte Y, Glenthøj, Bob O. Effects of melatonin on prepulse inhibition, habituation and sensitization of the human startle reflex in healthy volunteers. *Psychiatry Research.* 2014; 216:418–423.
- Escames G, López A, García JA. The role of mitochondria in brain aging and the effects of melatonin. *Current Neuropharmacology.* 2010; 8(3):182–193.
- Espósito E, Cuzzocrea S. Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system. *Curr Neuropharmacol.* 2010; 8(3):228–42.
- Faludi G, Mirnics K. Synaptic changes in the brain of subjects with schizophrenia. *Int J Dev Neurosci.* 2011; 29 (3):305–309.
- Fanget F, Claustrat B, Dalery J, Brun J, Terra JL, Marie-Cardine M, Guyotat J. Nocturnal plasma melatonin levels in schizophrenic patients. *Biol Psychiatry.* 1989; 25:499–501.
- Fatjo-Vilas M, Gourion D, Campanera S, Mouaffak F, Levy-Rueff M, Navarro ME, Chayet M, Miret S, Krebs MO, Fananas L. New evidences of gene and environment interactions affecting prenatal

- neurodevelopment in schizophrenia-spectrum disorders: a family dermatoglyphic study. *Schizophr Res*. 2008; 103:209–217.
- Faulstich ME, Brantley PJ, Barkemeyer CA. Creatine phosphokinase, the MMPI, and psychosis. *Am J Psychiatry*. 1984; 141:584–586.
- Ferrier IN, Johnstone EC, Crow TJ, Arendt J. Melatonin/cortisol ratio in psychiatric illness. *Lancet*. 1982; 1:1070.
- Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders M, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta*. 1985; 153:23–36.
- Flatow J, Buckley P, Miller BJ. Meta-analysis of oxidative stress in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2013; 74:400–409.
- Frankle WG, Cho RY, Prasad KM, Mason NS, Paris J, Himes ML, Walker C, Lewis DA, Narendran R. In vivo measurement of GABA transmission in healthy subjects and schizophrenia patients. *Am J Psychiatry*. 2015; 172:1148–1159.
- Galletly C. Recent advances in treating cognitive impairment in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berlin)*. 2009; 202:259–73.
- Garay RP, Citrome L, Samalin L. Therapeutic improvements expected in the near future for schizophrenia and schizoaffective disorder: an appraisal of phase III clinical trials of schizophrenia-targeted therapies as found in US and EU clinical trial registries. *Expert Opin Pharmacother*. 2016; 17(7):921–36.
- Garcia LS, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Andreazza AC, Stertz L. Chronic administration of ketamine elicits antidepressant-like effects in rats without affecting hippocampal brain-derived neurotrophic factor protein levels. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008; 103:502–6.
- Genova ML, Ventura B, Giuliano G. The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Letters*. 2001; 505(3):364–368.
- Geyer MA, Moghaddam B. Animal models relevant to schizophrenia disorders. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. In: Davis KL, Dennis Charney D, Coyle JT, Nemeroff C. *Am Coll Neuropsychopharmacol USA*. 2002.
- Goff DC, Hill M, Freudenreich O. Strategies for improving treatment adherence in schizophrenia and schizoaffective disorder. *J Clin Psychiatry*. 2010; 71(2):20–6.
- Gorfine T, Assaf Y, Goshen-Gottstein Y, Yeshurun Y, Zisapel N. Sleep-anticipating effects of melatonin in the human brain. *Neuroimage*. 2006; 31:10–418.

- Gorfine T, Zisapel N. Melatonin and the human hippocampus, a time dependent interplay. *J Pineal Res.* 2007; 43:80–86.
- Graham FK. The more or less startling effects of weak prestimulation. *Psychoph.* 1975; 12(3); 238–248.
- Green AI, Canuso CM, Brenner MJ, Wojcik JD. Detection and management of comorbidity in patients with schizophrenia. *Psychiatr Clin North Am.* 2003; 26:115-39.
- Grignon S, Deslauriers J. The reciprocal effects of oxidative stress and glutamate neurotransmission, in: *Study on Psychiatric Disorders.* 2015; 211–230.
- Guillin O, Demily C, Thibaut F. Brain-derived neurotrophic factor in schizophrenia and its relation with dopamine. *Int Rev Neurobiol.* 2007; 78:377-95.
- Hardeland R, Pandi-Perumal SR. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and pro-drug. *Nutr Metab.* 2005; 22:1743-7075.
- Hardingham G, Do KQ. Linking early-life NMDAR hypofunction and oxidative stress in schizophrenia pathogenesis. *Nat Rev Neurosci.* 2016; 1–9.
- Harrison PJ, Weinberger DR. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry.* 2005;10(1):40-68.
- Hatta K, Takahashi T, Nakamura H, Yamashiro H, Endo H, Fujii S, Fukami G, Masui K, Asukai N, Yonezawa Y. Abnormal physiological conditions in acute schizophrenic patients on emergency admission: dehydration, hypokalemia, leukocytosis and elevated serum muscle enzymes. *Eur. Arch. Psychiatry Clin Neurosci.* 1998; 248:180–188.
- He P, Ouyang X, Zhou S, Yin W, Tang C, Laudon M, Tian S. A novel melatonin agonist Neu-P11 facilitates memory performance and improves cognitive impairment in a rat model of Alzheimer’s disease. *Horm Behav.* 2013; 64:1–7.
- Hermesh H, Manor I, Shiloh R, Weizman R, Munitz H. Absence of myoglobinuria in acute psychotic patients with marked elevation in serum creatine phosphokinase level. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2001; 11:111–115.
- Hermesh H, Stein D, Manor I, Shechtman T, Blumensohn R, Meged S, Shiloh R, Benjamini Y, Weizman A. Serum creatine kinase levels in untreated hospitalized adolescents during acute psychosis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2002; 41:1045–1053.

- Hitri A, O'Connor DA, Cohen JM, Keuler DJ, Deutsch SI. Differentiation between MK-801- and apomorphine-induced stereotyped behaviors in mice. *Clin Neuropharmacol.* 1993; 16:220-36.
- 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.
- Hong-Mei Z, Yiqiang Z. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J Pineal Res.* 2014; 57:131-146.
- Howes O, McCutcheon R, Stone J. Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21<sup>st</sup> century. *J Psychopharmacol.* 2015; 29(2):97-115.
- Huether G, Poeggele B, Reimer A, George A. Effect of tryptophan administration on circulation melatonin levels in chicks and rats: evidences of stimulating melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci.* 1992; 51:945-953.
- Hughes BP. A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathologic sera. *Clin Chim.* 1962; 7:597-604.
- Hunt MJ, Raynaud B, Garcia R. Ketamine dose-dependently unduces high-frequency oscillations in the nucleus accumbens in freely moving rats. *Biol Psychiat.* 2006; 60:1206-14.
- Insel TR. Rethinking schizophrenia. *Nature.* 2010; 468 (7321):187-193.
- Ishihara N, Nomura M, Jofuku A, Kato H, Suzuki SO, Masuda K. Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol.* 2009; 11:958-966.
- Jablensky A. Prevalence and incidence of schizophrenia spectrum disorders: implications for prevention. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry.* 2000; 34:26-34.
- Jang HS, Choi HS, Lee SH, Jang KH, Lee MG. Evaluation of the anaesthetic effects of medetomidine and ketamine in rats and their reversal with atipamizole. *Vet Anaesth Analg.* 2009; 36:319-27.
- Javitt DC, Schoepp D, Kalivas PW, Volkow ND, Zarate C, Merchant K, Bear MF, Umbricht D, Hajos M, Potter WZ, Lee CM. Translating glutamate: from pathophysiology to treatment. *Sci Transl Med.* 2011; 28(102):102mr2
- Javitt DC; Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 1991; 148(10):1301-1308.
- Javitt DC. Glutamatergic theories of schizophrenia. *Isr J Psychiatry Relat Sci.* 2010;47, 4-16.

- Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Montaurier C, Even P, Launay JM. Perinatal protein malnutrition affects mitochondrial function in adult and results in a resistance to high fat diet-induced obesity. *PLoS One*. 2014; 13 (9):104896.
- Kantrowitz JT, Javitt DC. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor dysfunction or dysregulation: the final common pathway on the road to schizophrenia? *Brain Res Bull*. 2010; 83:108–121.
- Kapur S, Remington G. Dopamine D2 receptors and their role in atypical antipsychotic action: still necessary and may even be sufficient. *Biol Psychiatry*. 2001; 50:873–883.
- Karry R, Klein E, Ben Shachar D. Mitochondrial complex I subunits expression is altered in schizophrenia: a postmortem study. *Biol Psychiatry*. 2004; 55(7):676-684.
- Kasai K, Iwanami A, Yamasue H, Kuroki N, Nakagome K, Fukuda M. Neuroanatomy and neurophysiology in schizophrenia. *Neurosc Res*. 2002; 43:93-110.
- Khaleghipour S, Masjedi M, Ahade H, Enayate M, Pasha G, Nadery F, Ahmadzade G. Morning and nocturnal serum melatonin rhythm levels in patients with major depressive disorder: an analytical cross-sectional study. *São Paulo Med J*. 2012;130(3):167-72.
- Kilanczyk E, Bryszewska M. The effect of melatonin on antioxidant enzymes in human diabetic skin fibroblasts. *Cell Mol Biol Lett*. 2003; 8:333–336.
- Kilts CD. The changing roles and targets for animal models of schizophrenia. *Biological Psychiatry*. 2001; 50:845–55.
- Knochel JP. Mechanisms of rhabdomyolysis. *Curr Opin Rheumatol*. 1993; 5:725–731.
- Koch M. The neurobiology of startle. *Progress in Neurobiology*. 1999; 59 (2):107–128.
- Konradi C, Heckers S. Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. *Pharmacol Ther*. 2003; 97:153–179.
- Kopp C, Vogel E, Rettori MC, Delagrance P, Renard P, Lesieur D, Misslin R. Antagonistic effects of S 22153, a new MT1 and MT2 receptor ligand, on the neophobia-reducing properties of melatonin in Balb/c mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 1999; 64:136–1310.
- Kraus Ms, Keefe RS. Cognition as an outcome measure in schizophrenia. *British Journal Of Psychiatry*. 2007; 50:46-51.
- Lapiz MD, Mateo Y, Parker T, Marsden C. Effects of noradrenaline depletion in the brain on response on novelty in isolation-reared rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000; 152(3):312-20.

- Lee I, Bender E, Arnold S, Kadenbach B. New control of mitochondrial membrane potential and ROS formation a hypothesis. *Biological Chemistry*. 2001; 382 (12):1629–1636
- Leon J, Acuña-Castroviejo, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sciences*. 2004; 7(57):765–790.
- Lerner AB, Case JD, Heizelman RV. Structure of melatonin. *Chem Soc*. 1959; 81:6084–6085.
- Lesch KP. Schizophrenia. Weird world inside the brain. *Lancet*. 2001; 358:59.
- Levin R, Calzavara MB, Santos CM, Medrano WA, Niigaki ST, Abílio VC. Spontaneously hypertensive rats (SHR) present deficits in prepulse inhibition of startle specifically reverted by clozapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011; 35:1748–52.
- Li NB, Luo HQ, Liu SP. Resonance Rayleigh scattering study of the inclusion complexation of chloramphenicol with beta-cyclodextrin. *Talanta*. 2005; 66 (2):495–500.
- Lipska BK, Weinberger DR. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology*. 2000; 23(3):223–39.
- Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet*. 2003; 33(2):177–82.
- Looney JM, Childs HM. The Lactic Acid And Glutathione Content Of The Blood Of Schizophrenic Patients. *J Clin Invest*. 1934; 13(6):963–8.
- López A, García JA, Escames G. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *Journal of Pineal Research*. 2009; 46(2):188–198.
- Lushington K, Pollard K, Lack L, Kennaway DJ, Dawson D. Daytime melatonin administration in elderly good and poor sleepers: Effects on core body temperature and sleep latency. *Sleep*. 1997; 20:1135–1144.
- Mahadik SP, Pillai A, Joshi S, Foster A. Prevention of oxidative stress-mediated neuropathology and improved clinical outcome by adjunctive use of a combination of antioxidants and omega-3 fatty acids in schizophrenia. *Int Rev Psychiatry*. 2006;18(2):119–31.
- Mantovani M, Pertile R, Calixto JB, Santos AR, Rodrigues AL. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L- arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci Lett*. 2003; 343:1–4.

- Marazziti D, Baroni S, Picchetti M, Landi P, Silvestri S, Vatteroni E, Catena Dell'Osso M. Mitochondrial alterations and neuropsychiatric disorders. *Curr Med Chem*. 2011; 18:4715–4721.
- Marchbanks RM, Ryan M, Day IM, Owen M, McGuffin P, Whatley SA. A mitochondrial DNA sequence variant associated with schizophrenia and oxidative stress. *Schizophr Res*. 2003; 65:33–38.
- Martín García-Sancho J. (coord.). Guía de práctica clínica para el tratamiento de la esquizofrenia en centros de salud mental. Subdirección de Salud Mental. Servicio Murciano de Salud. 2009.
- Martin M, Macías M, Escames G, Leon J, Acuna- Castroviejo D. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress, *FASEB Journal*. 2000; 14(12):1677–1679.
- Martín M, Macías M, Escames G. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *Journal of Pineal Research*. 2000; 28(4):242–248.
- Martín M, Macías M, León J, Escames G, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2002; 34(4):348–357.
- Martins-de-Souza D, Gattaz WF, Schmitt A, Maccarrone G, Hunyadi-Gulyás E, Eberlin MN, Souza GH, Marangoni S, Novello JC, Turck CW, Dias-Neto E. Proteomic analysis of dorsolateral prefrontal cortex indicates the involvement of cytoskeleton, oligodendrocyte, energy metabolism and new potential markers in schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 2009; 43(11):978-86.
- Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in neuroplasticity and neurobiological disorders. *Neuron*. 2008; 60:748-66.
- McGhie A, Chapman J. Disorders of attention and perception in early schizophrenia. *British Journal of Medical Psychology*. 1961; 34:103–116.
- McGlashan TH, Hoffman RE. Schizophrenia as a disorder of developmentally reduced synaptic connectivity. *Arch Gen Psychiatry*. 2000; 57:637–648.
- McGrath JJ, Susser ES. New directions in the epidemiology of schizophrenia. *Med J Aust*. 2009; 190(4):7-9.
- McGrath JS. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence and mortality. *Epidemiological Review*. 2008; 30:67-76.

- McGuffin P. Nature and nurture interplay: schizophrenia. *Psychiatr Pract.* 2004; 31(2): S189–S193.
- Mechri A, Saoud M, Khiari G, d'Amato T, Dalery J, Gaha L. Glutaminergic Hypothesis of Schizophrenia: Clinical Research Studies With Ketamine. *Encephale.* 2001; 27 (1):53-59.
- Mehler-Wex C; Grunblatt E; Zeiske S; Gille G; Rausch D; Warnke A; Gerlach M. Microarray analysis reveals distinct gene expression patterns in the mouse cortex following chronic neuroleptic and stimulant treatment: Implications for body weight changes. *J Neural Transm.* 2006; 113:1383-393.
- Meltzer H. Muscle enzyme release in the acute psychoses. *Arch Gen Psychiatry.* 1969; 21:102–112.
- Meltzer H. Serum creatine phosphokinase in schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 1976; 133:192–197.
- Meltzer HY, Holy PA. Black white differences in serum creatine phospho-kinase (CPK) activity. *Clin Chim Acta.* 1974; 54:215–224.
- Meltzer HY, Horiguchi M, Massey BW. The role of serotonin in the NMDA receptor antagonist models of psychosis and cognitive impairment. *Psychopharmacology.* 2011; 213(2-3):289-305.
- Meltzer HY. Suicidality in schizophrenia: a review of the incidence for risk factors and treatment options. *Curr Psychiatry.* 2002; 4:279-83.
- Menschikov PE, Semenova NA, Ublinskiy MV, Akhadov TA, Keshishyan RA, Lebedeva IS, Omelchenko MA, Kaleda VG, Varfolomeev SD. 1H-MRS and MEGA-PRESS pulse sequence in the study of balance of inhibitory and excitatory neurotransmitters in the human brain of ultra-high risk of schizophrenia patients. *Dokl Biochem Biophys.* 2016; 468:168–172.
- Messias EL, Chen CY, Eaton WW. Epidemiology of schizophrenia: review of findings and myths. *Psychiatr Clin North Am.* 2007; 30:323-338.
- Meyer U, Feldon J. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Prog Neurobiol.* 2010; 90(3):285-326.
- Millan MJ, Andrieux A, Bartzokis G. Altering the course of schizophrenia: progress and perspectives. *Nat Rev Drug Discov.* 2016; 15(7):485–515.
- Mitchell A, Weinshenker D. Good night and good luck: norepinephrine in sleep pharmacology. *Biochemical Pharmacology.* 2010; 79(6):801–809.
- Miyamoto S, LaMantia AS, Duncan GE, Sullivan P, Gilmore JH, Lieberman JA. Recent advances in the neurobiology of schizophrenia. *Mol Interv.* 2003; 3:27-39.

- Moghaddam B, Adams BW. Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. *Scienc*. 1998; 281:1349-52.
- Möller M, Du Preez JL, Viljoen FP, Berk M, Emsley R, Harvey BH. Social isolation rearing induces mitochondrial, immunological, neurochemical and behavioural deficits in rats, and is reversed by clozapine or N-acetyl cysteine. *Brain Behav Immun*. 2013; 30:156–167.
- Monteleone P, Maj M, Fusco M, Kemali D, Reiter RJ. Depressed nocturnal plasma melatonin levels in drug-free paranoid schizophrenics. *Schizophrenia Research*. 1992; 7(1):77–84.
- Morera-Fumero AL, Diaz-Mesa E, Abreu-Gonzalez P, Henry M, Yelmo S, Fernandez-Lopez L, Gracia-Marco R. Agomelatine facilitates benzodiazepine discontinuation in schizophrenia with severe insomnia. *Eur Psychiatry*. 2010; 25:932.
- Neill C, 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.
- Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008; 11:851–876.
- O'Neill CA, van der Vliet A, Eiserich JP, Last JA, Halliwell B, Cross CE. Oxidative damage by ozone and nitrogen dioxide: synergistic toxicity in vivo but no evidence of synergistic oxidative damage in an extracellular fluid. *Biochem Soc Symp*. 1995; 61:139-52.
- Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Miyahara Y. Acutely administered melatonin restores hepatic mitochondrial physiology in old mice. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2003; 35(3):367–375.
- Olabi B, Ellison-Wright I, McIntosh AM, Wood SJ, Bullmore E, Lawrie SM. Are there progressive brain changes in schizophrenia? A meta-analysis of structural magnetic resonance imaging studies. *Biol Psychiatry*. 2011; 70 (1):88–96.
- Onaolapo AY, Adebayo AN, Onaolapo OJ. Exogenous daytime melatonin modulates response of adolescent mice in a repeated unpredictable stress paradigm. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2017; 390:149–161.
- Onaolapo OJ, Onaolapo AY, Akanni AA, Eniafe AL. Central depressant and nootropic effects of daytime melatonin in mice: *Ann Neurosci*. 2014; 21:90–96.

- Osseni RA, Rat P, Bogdan A. Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2. *Life Sci.* 2000; 68:387–399.
- Ozyurt H, Ozyurt B, Sarsilmaz M, Kus I, Songur A, Akyol O. Potential role of some oxidant/antioxidant status parameters in prefrontal cortex of rat brain in an experimental psychosis model and the protective effects of melatonin. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(15):2137-44.
- Packer L, Tritschler HJ, Wessel K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid. *Free Radic Biol Med.* 1997; 22:359–378.
- Park HJ, Park JK, Kim SK, Cho AR, Kim JW, Yim SV, Chung JH. Association of polymorphism in the promoter of the melatonin receptor 1A gene with schizophrenia and with insomnia symptoms in schizophrenia patients. *J Mol Neurosci.* 2011; 45: 304–308.
- Park YU, Jeong J, Lee H, Mun JY, Kim JH, Lee J.S. Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) plays essential roles in mitochondria in collaboration with Mitofilin. *Proc Natl Acad. Sci USA.* 2010; 107 (41):17785–17790.
- Pearlson GD. Neurobiology of schizophrenia. *Ann Neurol.* 2000; 48:556-66.
- Perry W, Geyer MA, Braff DL. Sensorimotor gating and thought disturbance measured in close temporal proximity in schizophrenic patients. *Archives of General Psychiatry.* 1999; 56 (3):277–281.
- Pfenninger E, Himmelseher S. Neuroprotection by ketamine at the cellular level. *Anaesthesist.* 1997; 46:47-54. 31.
- Picard M, McEwen BS. Mitochondria impact brain function and cognition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111(1):7–8.
- Picard M, Wallace DC, Burelle Y. The rise of mitochondria in medicine. *Mitochondrion.* 2016; 30:105–116.
- Piezenick SR, Neustadt J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol.* 2007; 83:84-92.
- Pilla C, Cardozo RF, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM. Creatine kinase activity from rat brain is inhibited by branched-chain amino acids in vitro. *Neurochemical Research.* 2003; 28:675-79.
- Pilla C, Cardozo RFO, Dornelles PKB, Dutra-Filho CS, Wyse T, Angela TS. Kinetic studies on the inhibition of creatine kinase activity by branched-chain  $\alpha$ -amino acids in the brain cortex of rats. *I J Develop Neurosci.* 2003; 21:145-51.

- Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR et al. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem.* 1997; 65:430–442.
- Prabakaran S, Swatton JE, Ryan MM, Huffaker SJ, Huang JTJ, Griffin JL, Wayland M, Freeman T, Dudbridge F, Lilley KS, Karp NA, Hester S, Tkachev D, Mimmack ML, Yolken RH, Webster MJ, Torrey EF, Bahn S. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol Psychiatry.* 2004; 9(684–97):643.
- Pramyothin P, Khaodhjar L. Metabolic syndrome with the atypical antipsychotics. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010;17(5):460-6.
- Pratt V, McLeod H, Dean L. Thioridazine Therapy and CYP2D6 Genotypes. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012-.
- Prince JA, Blennow K, Gottfries CG, Karlsson I, Oreland L. Mitochondrial function is differentially altered in the basal ganglia of chronic schizophrenics. *Neuropsychopharm.* 1999; 21:372-79.
- Prunet-Marcassus B, Ambid L, Viguerie-Bascands N. Evidence for a direct effect of melatonin on mitochondrial genome expression of Siberian hamster brown adipocytes. *J Pineal Res.* 2001; 30:108–115.
- Radogna F, Sestili P, Martinelli C. Lipoxygenase mediated pro-radical effect of melatonin via stimulation of arachidonic acid metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 238:170–177.
- Raffa M, Mechri A, Othman L, Ben Fendri C, Gaha L, Kerkeni A. Decreased glutathione levels and antioxidant enzyme activities in untreated and treated schizophrenic patients. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiat.* 2009; 33 (7):1178–1183.
- Rawashdeh O, de Borsetti NH, Roman G, Cahill GM. Melatonin suppresses night time memory formation in zebra fish. *Science.* 2007; 318:1144–1146.
- Reddy RD, Keshavan MS. Reduced red blood cell membrane essential polyunsaturated fatty acids in first episode schizophrenia at neuroleptic-naive baseline. *Schizophr Bull.* 2004; 30(4):901–911.
- Reiter RJ, Tan DX, Burkhardt S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. *Mech Ageing Dev.* 2002; 123:1007–1019.
- Reiter RJ, Tan DX, Terron MP. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their  $^{\cdot}$ radical scavenging actions. *Acta Biochim Pol.* 2007; 54:1–9.

- Reyes-Toso CF, Rebagliati IR, Ricci CR. Effect of melatonin treatment on oxygen consumption by rat liver mitochondria. *Amino Acids*. 2006; 31:299–302.
- Rezin GT, Gonçalves CL, Daufenbach JF, Fraga DB, Santos PM, Ferreira GK, Hermani FV, Comim CM, Quevedo J, Streck EL. Acute administration of ketamine reverses the inhibition of mitochondrial respiratory chain induced by chronic mild stress. *Brain Res Bull*. 2009; 79(6):418-21.
- Ridley RM. The psychology of perseverative and stereotyped behaviour. *Prog Neurobiol*. 1994; 44:221-31.
- Robinson S, Rosca P, Durst R, Shai U, Ghinea C, Schmidt U, Nir I. Serum melatonin levels in schizophrenic and schizoaffective hospitalized patients. *Acta Psychiatrica Scandinavia*. 1991; 84(3):221–224.
- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*. 2004; 36:1–9.
- Romo-Nava F, Alvarez-Icaza GD, Fresán-Orellana A, Saracco Alvarez R, Becerra-Palars C, Moreno J, Ontiveros Uribe MP, Berlanga C, Heinze G, Buijs RM. Melatonin attenuates antipsychotic metabolic effects: an eight-week randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled clinical trial. *Bipolar Disord*. 2014; 16:410–421.
- Rosenfeld M, Brenner-Lavie H, Ari SG, Kavushansky A, Ben-Shachar D. Perturbation in mitochondrial network dynamics and in complex I dependent cellular respiration in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2011; 69(10):980-8.
- Rudin M, Ben-Abraham R, Gazit V, Tendler Y, Tashlykov V, Katz Y. Single-dose ketamine administration induces apoptosis in neonatal mouse brain. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2005; 16:231-43.
- Russel J, Reiter, Dun-Xian T, Eloisa G, Rosa M, Sainz, Juan C, Mayo, Josefa L, Lucien C. Manchester, Vijayalaxmi, Ertugrul Kilic, Ülkan Kilic. Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. *Pol J Pharmacol*. 2004; 56:159–170.
- Russel J, Reiter. Melatonin. Your body`s natural wonder drug. Málaga: Editorial Sírios. 1995.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Act*. 1994; 228:35–51.
- Sajatovic M, Velligan DI, Weiden PJ, Valenstein MA, Ogedegbe G. Measurement of psychiatric treatment adherence. *J Psychosom Res*. 2010; 69:591-9.
- Salgado JV. Modelos experimentais de esquizofrenia – uma revisão

- Experimental models of schizophrenia – a review. *Rev Bras Psiquiatr.* 2006; 28 (2):135–141.
- Sams-Dodd F. Effects of continuous D-amphetamine and phencyclidine administration on social behaviour, stereotyped behaviour, and locomotor activity in rats. *Neuropsychopharm.* 1998; 19(1):18–25.
- Sandyk R, Anastasiadis PG, Anninos PA, Tsagas N. Is postmenopausal osteoporosis related to pineal gland functions. *Int Journ Neurosc.* 1992; 62:215–25.
- Sandyk R, Kay SR. Down regulation of 5-HT<sub>2</sub> receptors: possible role of melatonin and significance for negative schizophrenia. *International Journal of Neuroscience.* 1991; 56:209–14.
- Sandyk R, Kay SR. Pineal melatonin in schizophrenia: a review and hypothesis. *Schizophrenia Bulletin.* 1990; 16:653–62.
- Schon EA, Manfredi G. Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction. *J Clin Invest.* 2003; 111(3): 303–312.
- Schweid DE, Steinberg JS, Sudak HS. Creatine phosphokinase and psychosis. *Arch Gen Psychiatry.* 1972; 26:263–265.
- Sergio A, Rosales-Corral, Dario Acuña-Castroviejo, Ana Coto- Montes, Jose A, Boga, Lucien C. Manchester, Lorena F, Ahmet K, Shuran M, Dun- Xian T, Russel J. Reiter. Alzheimer's disease: pathological mechanisms and the beneficial role of melatonin. *J Pineal Res.* 2012; 52:167–202.
- Sha S, Chant D, Welham J, McGrath J. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med.* 2005; 2(5):141.
- Shamir E, Barak Y, Shalman I, Laudon M, Zisapel N, Tarrasch R, Elizur A, Weizman R. Melatonin treatment for tardive dyskinesia: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Arch Gen Psychiatry.* 2001; 58:1049– 1052.
- Shamir E, Laudon M, Barak Y. Melatonin improves sleep quality of patients with chronic schizophrenia. *J Clin Psychiatry.* 2000; 61:373–377.
- Siris, SG. Suicide and schizophrenia. *J Psychopharmacol.* 2001; 15:127–35.
- Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Spence DW. Potential use of melatonergic drugs in analgesia: mechanisms of action. *Brain Research Bulletin.* 2010; 81 (4-5):362–371.
- Stefan M, Travis M, Murray R. An atlas of schizophrenia. (The encyclopedia of visual medicine series), Part Public G London UK. 2002.
- Stewart LS, Leung LS. Hippocampal melatonin receptors modulate seizure threshold. *Epilepsia.* 2005; 46:473–480.

- Stork C, Renshaw PF. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: evidence from magnetic resonance spectroscopy research. *Mol Psychiatry*. 2005; 10:900–919.
- Subramania P, Mirunalini S, Pandi-Perumal SR. Melatonin treatment improves the antioxidant status and decreases lipid content in brain and liver of rats. *Eur J Pharmacol*. 2007; 571:116-119.
- Suresh Kumar PN, Andrade C, Bhakta SG, Singh NM. Melatonin in schizophrenic outpatients with insomnia: a double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Clinical Psychiatry*. 2007; 68 (2):237–41.
- Suresh Kumar PN, Andrade C, Bhakta SG, Singh NM. Melatonin in schizophrenic outpatients with insomnia: a double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Psychiatry*. 2007; 68:237–241 [SEP].
- Tamminga CA, Holcomb HH. Phenotype Of Schizophrenia: a review and formulation. *Mol Psychiatry*. 2005; 10:27-39.
- Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res*. 2003; 34(1):75-8.
- Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS. Schizophrenia, "just the facts" 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophr Res*. 2009;110(1-3):1-23.
- Tandon R. Suicidal behavior in schizophrenia. *Expert Rev Neurother*. 2005; 5:95-9.
- Taurines R, Thome J, Duvigneau JC, Forbes-Robertson S, Yang L, Klampfl K, Romanos J, Müller S, Gerlach M, Mehler-Wex C. Expression analyses of the mitochondrial complex I 75-kDa subunit in early onset schizophrenia and autism spectrum disorder: increased levels as a potential biomarker for early onset schizophrenia. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2010; 19(5):441-448.
- Tay CH. Cutaneous Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. *Australasian Journal of Dermatology*. 1970; 11(1):30–41
- Toda M, Abi-Dargham A. Dopamine hypothesis of schizophrenia: making sense of it all. *Curr Psychiatric Rep*. 2007; 9:329-36.
- Tomasik J, Rahmoune H, Guest PC, Bahn S. Neuroimmune biomarkers in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2016; 176:3–13.
- Tost H, Bilek E, Meyer-Lindenberg A. Brain Connectivity in Psychiatric imaging genetics. *Neuroimage Journal of Neuroimage Neuroimage*. 2012; 1:62(4):2250-60.
- Trbovic SM. Schizophrenia as a possible dysfunction of the suprachiasmatic nucleus. *Medical Hypotheses*. 2010; 74:127–31.

- Trépanier MO, Hopperton KE, Mizrahi R, Mechawar N, Bazinet RP. Postmortem evidence of cerebral inflammation in schizophrenia: a systematic review. *Mol Psychiatry*. 2016; 21(8):1009-26.
- Tsai G, Coyle TJ. Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2002; 42:165-79.
- Uranova N, Orlovskaya D, Vikhрева O, Zimina I, Kolomeets N, Vostrikov V. Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness. *Brain Res Bull*. 2001; 55:597-610.
- Uzbay IT. New pharmacological approaches to the treatment of schizophrenia. *Türk Psikiyatri Dergisi*. 2009; 20:175–82.
- Uzbay T, Kayir H, Goktalay G, Yildirim M. Agmatine disrupts prepulse inhibition of acoustic startle reflex in rats. *Journal of Psychopharmacology*. 2010; 24:923–39.
- Van den Buuse M, Eikelis N. Estrogen increases prepulse inhibition of acoustic startle in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2001; 425:33–41.
- Van Os J, Kapur S. Schizophrenia. *Lancet*; 2009; 374:635-45.
- Velligan DI, Lam YW, Glahn DC, Barrett JA, Maples NJ, Ereshefsky L. Defining and assessing adherence to oral antipsychotics: A review of the literature. *Schizophr Bull*. 2006; 32:724-42.
- Venkatasubramanian G, Debnath M. The TRIPS (Toll-like receptors in immuno-inflammatory pathogenesis) Hypothesis: a novel postulate to understand schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013; 44:301-11.
- Verkhatsky A, Kirshhoff F. NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist*. 2007; 13:28-37.
- Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the “phosphocreatine circuit” for cellular energy homeostasis. *Biochem J*. 1992; 281:21–40.
- Wang F, Tian X, Zhang L. Melatonin promotes the in vitro development of pronuclear embryos and increases the efficiency of blastocyst implantation in murine. *J Pineal Res*. 2013; 55:267–274.
- Watkins JC, Evans RH. Excitatory Amino Acid Transmitters. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 1987; 21:165-204.
- Weiss IC, Feldon J. Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. *Psychopharmacol*. 2001; 156(2-3):305-26.
- White T, Hilgetag CC. Gyrfication and neural connectivity in schizophrenia. *Dev Psychopathol*. 2011; 23:339–352.

WHO: ICD-10, chapter V, version 2007.

Wierońska JM, Acher FC, Sławińska A. The antipsychotic-like effects of the mGlu group III orthosteric agonist, LSP1-2111, involves 5-HT Psychopharmacology (Berl). 2013; 227(4):711–25.

Wong AH, Van Tol HH. Schizophrenia: From phenomenology to neurobiology. *Neurosci Biobehav Rev.* 2003; 27:269-306.

Wulff K, Dijk D-j Middleton B, Foster RG, Joyce EM. Sleep and circadian rhythm disruption in schizophrenia. *Br J Psychiatry.* 2012; 200:308–316.

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

Yang Z, Li C, Huang F. Melatonin impaired acquisition but not expression of contextual fear in rats. *Neurosci Lett.* 2013; 552:10–14.

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

Yildirim M, Marangoz C. Anticonvulsant effects of melatonin on penicillin- induced epileptiform activity in rats. *Brain Res.* 2006; 1099:183–188.

Yuksel C, Tegin C, O'Connor L, Du F, Ahat E, Cohen BM, Ongur D. Phosphorus magnetic resonance spectroscopy studies in schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2015; 68:157–166.

Zipursky RB, Lim KO, Sullivan EV, Brown BW, Pfefferbaum A. Widespread cerebral gray matter volume deficits in schizophrenia. 1992; 49:195-2.

Zisapel N, Egozi Y, Laudon M. Inhibition of dopamine release by melatonin: regional distribution in the rat brain. *Brain Research.* 1983; 246:161–3.

Zugno AI, Juliao RF, Budni J, Volpato AM, Fraga DB, Pacheco FD, Deroza PF, Luca RD, De Oliveira MB, Heylmann AS, Quevedo J. Rivastigmine reverses cognitive deficit and acetylcholinesterase activity induced by ketamine in an animal model of schizophrenia. *Metab Brain Dis.* 2013; 28(3):501-8.

Zugno AI, Matos MP, Canevar L, Fraga DB, De Luca RD, Ghedim FV, Deroza PF, De Oliveira MB, Pacheco FD, Valvassori SS, Volpato AM, Budni J, Quevedo J. Evaluation of acetylcholinesterase activity and behavioural alterations induced by ketamine in an animal model of schizophrenia. *Acta Neuropsychiatr.* 2014; 26(1):43-50.

Coyle JT, Tsai G. The NMDA receptor glycine modulatory site: a therapeutic target for improving cognition and reducing negative symptoms in schizophrenia. *Psychopharmacology.* 2004; 174: 32–8.

- Gilbert-Rahola J, Villena-Rodriguez A. Glutamatergic drugs for schizophrenia treatment. *Actas españolas Psiquiatr.* 2014; 42: 234–41.
- Javitt DC, Zukin SR, Heresco-Levy U, Umbricht D. Has an angel shown the way? Etiological and therapeutic implications of the PCP/NMDA model of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2012; 38: 958–66.
- Becker A, Peters B, Schroeder H, Mann T, Huether G, Grecksch G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: A possible animal model of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatric.* 2003; 27:687-700.
- Ellison G. The N-methyl-d-aspartate antagonists phen- cyclidine, ketamine and dizocilpine as both behavioral and anatomical models of the dementias. *Brain Res Bull.* 1995; 20:250-67.
- Wulff K, Dijk D-j Middleton B, Foster RG, Joyce EM. Sleep and circadian rhythm disruption in schizophrenia. *Br J Psychiatry.* 2012; 200:308–316.
- Uribe E, Landaeta J, Wix R, Eblen A. Memantine reverses social withdrawal induced by ketamine in rats. *Exp Neurobiol.* 2013; 22:18–22.
- Chatterjee M, Verma R, Ganguly S, Palit G. Neurochemical and molecular characterization of ketamine-induced experimental psychosis model in mice. *Neuropharmacology.* 2012; 63:1161–1171.
- Kamiyama H, Matsumoto M, Otani S, Kimura SI, Shimamura KI, Ishikawa S, Yanagawa Y, Togashi H. Mechanisms underlying ketamine-induced synaptic depression in rat hippocampus-medial prefrontal cortex pathway. *Neuroscience.* 2011; 177:159–169.
- 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; 216:247–254.
- Xi-Ming L, Perry KW, Wong DT, Bymaster FP. Olanzapine increases in vivo dopamine and norepinephrine release in rat prefrontal cortex, nucleus accumbens and striatum. *Psychopharmacology.* 1998; 136:153–161.
- Steeds H, Carhart-Harris RL, Stone JM. Drug models of schizophrenia. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2015; 5:43–58.
- 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; 69:338–345.
- Schumacher A, Sivanandan B, Tolledo EC, Woldegabrie J, Ito R. Different dosing regimens of repeated ketamine administration have opposite effects on novelty processing in rats. *Prog*

Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2016; 69:1–10.

Komorowska J, Pellis SM. Regulatory mechanisms underlying novelty-induced grooming in the laboratory rat. Behav Process. 2004; 67:287–293.

Kalueff AA, Stewart AM, Song C, Berridge KC, Graybiel AM, Fentress JC. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. Nat Rev Neurosci. 2016; 17:45–59.

Hong W, Kim DW, Anderson DJ. Antagonistic control of social versus repetitive self-grooming behaviors by separable amygdala neuronal subsets. Cell. 2014; 158:1348–1361.

Karler R, Bedingfield JB, Thai DK, Calder LD. The role of the frontal cortex in the mouse in behavioral sensitization to amphetamine. Brain Res. 1997; 757(2):228-35.

**ANEXOS**

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



ANEXO A



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

**CERTIFICADO**

*Certificamos que o projeto intitulado “AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA MELATONINA SOBRE PARÂMETROS MOLECULARES E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA”, Protocolo nº 045/2015-2 sob a responsabilidade de Alexandra Zugno equipe: Josiane Budni, Patrícia Fernanda Schuck, Samira Valvassori, Vanessa Moraes de Andrade, Lara Canever, Felipe Damázio Pacheco, Alexandra Stephanie Almeida Heylmann, Gustavo Mastella e Louyse Sulzbach Damázio, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense.*

Vigência do Projeto	10/12/2015 a 10/08/2017
Espécie/linhagem	Rato heterogênico - Wistar
Nº. De animais	180
Peso/Idade	170 – 200g - 45 dias
Sexo	M/F
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

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

**Protocol number: 045/2015-2**

**Principal Investigator:** Alexandra Zugno

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

**Project title:** “EVALUATION OF MELATONIN EFFECTS ON MOLECULAR PARAMETERS AND OXIDATIVE STRESS IN RATS SUBJECTED TO AN ANIMAL MODEL OF SCHIZOPHRENIA”.

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

Criciúma, 17 de novembro de 2015.

  
JAIRO JOSÉ ZOCHE  
Coordenador da CEUA

**ANEXO B – FICHA DE AUTORIZAÇÃO**

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão  
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de  
03.06.2005

**AUTORIZAÇÃO**

Nome do autor: Arlindo da Costa Afonso

RG, RNE.: V723548-Z

Trabalho: ( ) Dissertação ( x ) Tese

Autorizo a *UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense*, por meio da *Biblioteca Central Prof. Eurico Back*, a disponibilizar, gratuitamente, em sua base de dados, sem ressarcimento dos direitos autorais, o texto integral do documento acima destacado de minha autoria, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão pela Internet, a partir desta data.

( x ) SIM ( ) NÃO

Agência de fomento:

( ) CAPES

( ) CNPq

( x ) Outro (especifique) Instituto Nacional de gestão de bolsas de Angola - INAGB

Criciúma, 01 de agosto de 2017.

---

Assinatura