

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

THIAGO GARCIA FREIRE

**EFEITOS DA DIETA DEFICIENTE OU SUPLEMENTADA COM
ÁCIDO FÓLICO EM RATAS WISTAR DURANTE A FASE
GESTACIONAL EM PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E
NEUOTRÓFICOS NAS MÃES E NA PROLE ADULTA: RISCO
PARA O DESENVOLVIMENTO DA ESQUIZOFRENIA**

Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde
para a obtenção do título de Mestre
em Ciências da Saúde.

Orientador(a): Prof^ª. Dr^ª.
Alexandra Zugno

CRICIÚMA, 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F862e Freire, Thiago Garcia.

Efeitos da dieta deficiente ou suplementada com ácido fólico em ratas wistar durante a fase gestacional em parâmetros inflamatórios e neurotróficos nas mães e na prole adulta : risco para o desenvolvimento da esquizofrenia / Thiago Freire Garcia. – 2017.

74 p : il. ; 21 cm.

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

Orientação : Alexandra Ioppi Zugno

1. Ácido fólico. 2. Nutrição na gestação. 3. Cetamina. 4. Suplementação de Folato na gestação. 5. Defeito do tubo neural.
I. Título.

CDD. 22^a ed. 615.1



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 Dissertação de MESTRADO apresentada pelo candidato **Thiago Garcia Freire** sob o título “EFEITO PROTETOR DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO DURANTE A GESTAÇÃO NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DAS RATAS MÃES E NOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E NEUROTRÓFICOS NA PROLE ADULTA INDUZIDA AO MODELO DE ESQUIZOFRENIA”, para obtenção do grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

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

Criciúma, SC, 11 de abril de 2017.


Prof. Dr. EDUARDO PACHECO RICO
Membro Relator


Prof. Dr. ALEXANDRE PASTORIS MÜLLER
Membro Interno


Prof.ª Dra. CRISTIANE DAMIANI TOMASI
Membro Externo


Prof.ª Dra. Alexandra Ioppi Zugno
Orientadora


Prof.ª Dra. Maria Inês da Rosa
Coordenadora do PPGCS

Folha informativa

A dissertação foi escrita seguindo o estilo Vancouver e será apresentada de forma tradicional.

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

Resumo

A nutrição materna, em particular o aporte adequado de ácido fólico (AF), exerce um papel determinante para o desenvolvimento cerebral e pode influenciar na susceptibilidade a doenças na prole, inclusive a esquizofrenia. Com base nisso, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da dieta AIN 93, também conhecida como dieta controle, da dieta controle suplementada com AF em diferentes doses (5, 10 e 50 mg/kg) e da dieta deficiente em AF durante a gestação e lactação sobre os parâmetros inflamatórios em ratas Wistar mães, bem como avaliar o efeito das dietas maternas nestes marcadores inflamatórios e nos níveis cerebrais de neurotrofinas na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia induzida por cetamina. Ratas Wistar foram divididas em 5 grupos conforme a dieta administrada: dieta controle; dieta controle suplementadas com AF nas doses de 5, 10 e 50 mg/kg e dieta deficiente em AF. Após o desmame, a prole foi submetida à sexagem e os filhotes machos foram agrupados conforme as dietas maternas para ser utilizados na idade adulta. As ratas mães foram decapitadas e o sangue coletado para análise dos níveis plasmáticos de interleucinas (IL): IL-4 e IL-6 e fator de necrose tumoral α (TNF- α). A prole adulta proveniente das ratas mães foi subdividida para a indução do modelo de esquizofrenia através da administração intraperitoneal (i.p) de cetamina (25 mg/kg) ou salina durante 7 dias. Após a última administração, os animais foram decapitados e as estruturas cerebrais, córtex frontal e hipocampo, dissecadas para análise dos níveis de citocinas (IL-4, IL-6 e TNF- α) e neurotrofinas: fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator de crescimento nervoso (NGF). Verificou-se um aumento da citocina anti-inflamatória (IL-4) e uma redução nos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) nas ratas mães que foram submetidas às dietas suplementadas com AF 5, 10 e 50 mg/kg, apontando um possível efeito anti-inflamatório do AF na fase gestacional. Na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, em geral, o AF demonstrou uma ação neuroprotetora nos níveis de IL-4, IL-6 e TNF- α , o que sugere um efeito persistente desta vitamina sobre a resposta inflamatória dos animais, confirmando ainda o efeito anti-inflamatório, conforme também observado nas ratas mães. A suplementação materna com AF demonstrou uma ação duradoura e neuroprotetora nos níveis de BDNF e NGF, em especial, no córtex frontal da prole adulta. Diante destes achados, deve-se mencionar a

importância do AF durante a gestação e a lactação, não somente para a prole, mas para a saúde materna. Por fim, os resultados deste estudo contribuem para a compreensão da patogênese da esquizofrenia, além de reforçar o papel do AF materno como uma abordagem protetora para os transtornos neurodesenvolvimentais. Salienta-se, entretanto, a necessidade de mais estudos investigarem a ação da cetamina sobre parâmetros inflamatórios e nos fatores neurotróficos, bem como avaliarem os padrões de metilação do DNA, pois sabe-se que os mecanismos epigenéticos estão diretamente envolvidos em condições psiquiátricas, inclusive na esquizofrenia, enfatizando a continuidade desta pesquisa.

Palavras-chaves: ácido fólico, ratas fêmeas mães, gestação, prole adulta, cetamina, parâmetros inflamatórios e neurotróficos.

Abstract

Maternal nutrition, in particular the adequate supply of folic acid (FA), plays a key role in brain development and may influence susceptibility to offspring diseases, including schizophrenia (SZ). Based on this, the aim of this study was to investigate the effect of diet AIN 93, also known as control diet, the control diet supplemented with different doses of FA (5, 10 and 50 mg/kg) and the FA deficient diet during pregnancy and lactation on inflammatory parameters in female mother rats (Dam's), as well as to evaluate the effect of maternal diets on the same inflammatory markers and on levels of brain neurotrophins in the adult offspring which were subjected to an animal model of SZ induced by ketamine (Ket). Mothers' rats were divided into 5 groups according to the diet administered: control diet, diets supplemented with AF (5, 10 and 50 mg/kg) and FA deficient diet. After weaning, the offspring were subjected to sexing and male offspring were grouped according to maternal diets to be used in adulthood. Dam's were decapitated and the blood was collected for analysis of plasma levels of interleukins: IL-4, IL-6 and tumor necrosis factor (TNF- α). Adult offspring were subdivided for induction of animal model of SZ by intraperitoneal (i.p) administration of Ket (25 mg/kg) or saline (Sal) for 7 days. After the last administration, the animals were decapitated and his brain structures, frontal cortex and hippocampus, dissected for analysis of cytokine levels (IL-4, IL-6 and TNF- α) and neurotrophins: brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF). There was an increase the levels of anti-inflammatory cytokine (IL-4) and a reduction in the plasma levels of proinflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) in the Dam's that were exposed to the diets supplemented with FA (5, 10 and 50 mg/kg), indicating a possible anti-inflammatory effect of FA in the gestational phase. In general, the results showed in the adult offspring subjected to an animal model of SZ that FA demonstrated a neuroprotective effect on levels of IL-4, IL-6 and TNF- α , which suggest a persistent action of this vitamin on the inflammatory response of the animals, confirming the anti-inflammatory effect previously observed in the Dam's. Maternal supplementation with FA demonstrated a long-lasting and neuroprotective action on levels of BDNF and NGF, especially in the frontal cortex of adult offspring. In view of these findings, the importance of FA during gestation and lactation should be mentioned, not only for offspring, but for maternal health. Finally, the results of this study contribute to the understanding of the pathogenesis

of SZ, in addition to reinforcing the role of FA maternal as a protective approach to neurodevelopmental Ket on inflammatory parameters and neurotrophic factors, as well as to evaluate DNA methylation patterns, since it is known that the epigenetic mechanisms are directly involved in psychiatric conditions, including in SZ, emphasizing the continuity of this research.

Key words: folic acid, female mother rat, pregnancy, adult offspring, ketamine, inflammatory and neurotrophic parameters.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AF – Ácido fólico
- AIN 93 - American institute of nutrition-93 (do inglês)
- AMPA - alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA), do inglês α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor.
- ANOVA - Análise de Variância.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro, do inglês Brain Derived Neurotrophic Factor.
- BH4 - Tetrahidrobiopterina.
- CEUA - Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais.
- CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.
- DHA – Ácido Docosaheptaenóico.
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico.
- DSM-V - Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais.
- EPM - Erro Padrão da Média.
- Hcy – Homocisteinemia.
- HHcy – Hiperhomocisteinemia.
- IFN- γ - Interferon-Gama.
- IL – Interleucina.
- IL-1 β - Interleucina-1 β .
- IL-4 - Interleucina-4.
- IL-6 - Interleucina-6.
- LPS - Lipopolissacarídeo.
- MAPK – Mitógenos.
- MTHFR - Metileno-Tetrahidrofolato Redutase.
- NFKB - Fator Nuclear-Kappa B.
- NMDA - N-metil-D-aspartato.
- NGF - Fator de Crescimento Nervoso, do inglês Nervous Growth Factor.
- NFkB - Fator de Transcrição Nuclear- κ B.
- PUFAs - Ácidos Graxos Polinsaturados.
- RNA_m – RNA mensageiro.
- SAM - S-adenosilmetionina.
- SBNeC - Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento.
- SNC – Sistema Nervoso Central.
- THF - Tetrahidrofolato.
- TBS - Tampão Fosfato Salino

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α .

TrkB - Receptor Tirosina Quinase, do inglês Receptor Tyrosine Kinase.

UNESC - Universidade do Extremo Sul Catarinense.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Metabolismo de um carbono.	26
Figura 2: Desenho experimental.	41
Figura 3: Análise dos níveis plasmáticos de citocinas maternas.....	45
Figura 4: Análise dos níveis de IL-4 nas estruturas cerebrais.....	47
Figura 5: Análise dos níveis de IL-6 nas estruturas cerebrais.....	48
Figura 6: Análise dos níveis de TNFa nas estruturas cerebrais.....	50
Figura 7: Análise dos níveis de BDNF nas estruturas cerebrais	51
Figura 8: Análise dos níveis de NGF nas estruturas cerebrais	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais maternos	38
Tabela 2: Divisão da prole em grupos experimentais	40

Sumário

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 ÁCIDO FOLICO E SUAS FUNÇÕES	25
1.2 NUTRIÇÃO NA GESTAÇÃO, CITOCINAS MATERNA E NA PROLE E SAUDE MENTAL	27
1.3 NUTRIÇÃO MATERNA E NEUROTROFINAS NA GESTAÇÃO E A SAÚDE DA PROLE	29
1.4 NUTRIÇÃO MATERNA E ESQUIZOFRENIA	30
1.5 ESQUIZOFRENIA E MODELO ANIMAL.....	32
2 OBJETIVOS	36
2.1 GERAL.....	36
2.2 ESPECÍFICOS	36
3 METODOLOGIA	37
3.1 RATAS <i>WISTAR</i> DURANTE A FASE DE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO.....	37
3.2 COMPOSIÇÃO DAS RAÇÕES (DIETAS) ESPECIAIS OFERECIDAS ÀS RATAS <i>WISTAR</i>	38
3.3 SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO PARA AS RATAS <i>WISTAR</i> DURANTE A FASE DE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO	39
3.4 PROLE MASCULINA ADULTA DAS RATAS <i>WISTAR</i> MÃES .	39
3.5 ADMINISTRAÇÃO DE CETAMINA.....	40
3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	41
3.6.1 Preparo das amostras	41
3.6.2 Níveis de citocinas das ratas mães	42
3.6.3 Níveis de citocinas e neurotrofinas cerebrais da prole adulta	42
3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	43
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
4. RESULTADO	44
4.1 NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CITOCINAS MATEERNAS.....	44
4.2 NÍVEIS CEREBRAIS DE CITOCINAS NA PROLE ADULTA....	45
4.3 NÍVEIS CEREBRAIS DE NEUROTROFINAS NA PROLE ADULTA	50
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÃO	65
REFÊRENCIAS	66
ANEXO	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 ÁCIDO FÓLICO E SUAS FUNÇÕES

O ácido fólico (AF), também conhecido como folato é uma vitamina do complexo B (vitamina B9) que atua como cofator de enzimas que participam das transferências de carbono (radicais metílicos) (Ho et al., 2013). Tanto a vitamina B12 como o AF são essenciais para a metilação da homocisteína (Hcy) à metionina, mantendo os níveis de Hcy normais, uma vez que em concentrações elevadas, este aminoácido tem efeito citotóxico (Kale et al., 2010). Em geral, ambas as vitaminas estão envolvidas na formação de S-adenosil-metionina (SAM), o principal doador de grupos metil para a síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA), neurotransmissores, proteínas e fosfolípidos da membrana, particularmente neuronal (Mattson e Shea, 2003; Wadhvani et al., 2012) (Figura 1).

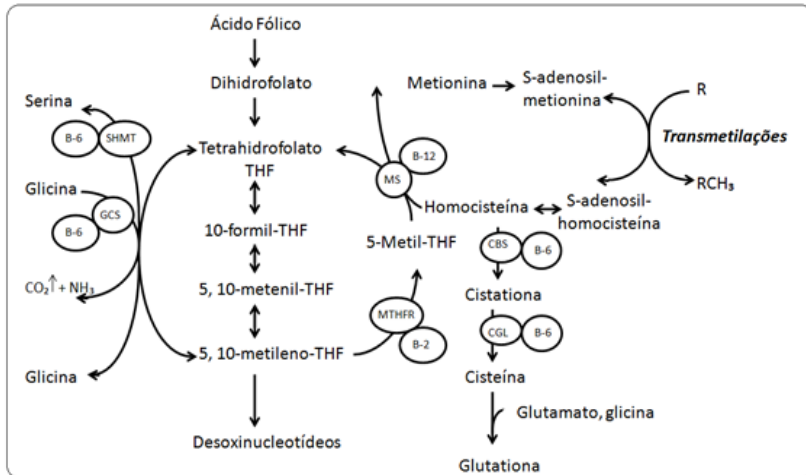


Figura 1: Metabolismo de um carbono – O THF é convertido em 5,10-MTHF e reduzido a 5-MTHF pela ação da enzima MTHFR, transferindo um grupo metil para a formação da metionina, etapa catalisada pela enzima MS. A homocisteína é metilada a metionina, um aminoácido importante para a síntese de SAM, principal agente nas reações de transmetilações. Dessa forma, alterações na taxa de SAM e SAH podem resultar na diminuição da atividade de metiltransferases como, por exemplo, as DNMTs uma vez que a SAH atua como um potente inibidor das reações demetilação dependentes de SAM. THF: tetrahidrofolato; 5,10-MTHF: 5,10 metileno-tetrahidrofolato; 5-MTHF: 5-metil-tetrahidrofolato; MTHFR: metileno-tetrahidrofolato redutase; MTRF: 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase; SAM: S-adenosil-metionina; Hcy: Homocisteína; SAH: S-adenosil-homocisteína; CBS: cistationina- β -sintetase; CGL: cistationina γ liase; GCS: Sistema da clivagem da glicina; R: compostos que recebem grupos metilas; RCH₃: composto metilado; SHMT: serina hidroximetiltransferase. Fonte: Adaptado de Lamers, 2011.

Neste sentido, o AF e a vitamina B12 são os principais determinantes do metabolismo ou ciclo de um carbono (reações de metilação), o qual é capaz de alterar tanto os níveis de Hcy como induzir estresse oxidativo. Uma das principais funções do ciclo de um carbono é regular os níveis de fosfolípidos da membrana, especialmente os ácidos graxos polinsaturados (PUFAs), como o ácido docosahexaenóico (DHA- ômega-3) neuronal, via transferência de grupos metil. Portanto, alterações na ingestão ou metabolismo de micronutrientes maternos podem comprometer as reações de metilação e interferir, inclusive, nos níveis de DHA, predispondo o aparecimento de transtornos

neurodesenvolvimentais na vida jovem-adulta da prole (Bottiglieri, 1996; Roy et al., 2012; Sable et al., 2013).

Adicionalmente, o AF aumenta a biossíntese de tetrahydrobiopterina (BH4), a qual é coenzima das hidroxilases, fundamentais para a síntese de monoaminas e serotonina (Stahl, 2007) e exerce um papel neuroprotetor em danos ao sistema nervoso central (SNC) por promover reparo e crescimento neuronal (Iskandar et al., 2004; Budni et al., 2011). Estudos apontam ainda que esta vitamina apresenta propriedades antioxidantes, podendo atuar sobre os mecanismos oxidativos envolvidos em muitos transtornos mentais (Sarna et al., 2012; Zhao et al., 2014). O AF parece também desempenhar um efeito anti-inflamatório, em especial in vivo, reduzindo os níveis circulantes de vários mediadores inflamatórios em indivíduos obesos e com doenças inflamatórias (Feng et al., 2011).

Com base nisso, o metabolismo de um carbono é dependente do equilíbrio nutricional, em particular de AF, influenciando a atividade sináptica, a regulação da expressão gênica e a síntese de DNA, fosfolipídeos, neurotransmissores e hormônios (Mattson e Shea, 2003; Parletta et al., 2013). Tais características conferem a este ciclo uma importante posição ao integrar mudanças ambientais, desenvolvimento do indivíduo e plasticidade neuronal (Bottiglieri et al., 2005). De fato, considerando-se as inúmeras funções do AF, qualquer anormalidade que ocorra no metabolismo desta vitamina, particularmente durante períodos críticos do neurodesenvolvimento como na fase pré-natal pode afetar o SNC e influenciar na patogênese de transtornos mentais e neurodegenerativos, como a esquizofrenia (Miller, 2008; Krebs et al., 2009).

1.2 NUTRIÇÃO NA GESTAÇÃO, CITOCINAS MATERNA E NA PROLE E A SAÚDE MENTAL

Sabe-se que fatores estressores durante a gestação (deficiências nutricionais, infecções, uso de drogas) aumentam o risco de parto prematuro, podem comprometer a saúde materna, o neurodesenvolvimento fetal e ainda predispor o aparecimento de doenças neurológicas e transtornos neurodesenvolvimentais na vida jovem-tardia da prole (Dammann et al., 2002). Assim, ativadores imunológicos e inflamatórios, tais como interferon-gama (IFN- γ) e os lipopolissacarídeos (LPS) que são induzidos por eventos estressores, especialmente em períodos críticos (fase gestacional) e por acontecimentos diversos ao longo da vida, ativam a microglia no SNC. A

ativação microglial tem sido associada com doenças do cérebro (Najjar et al., 2013), visto que a microglia é uma célula imune residente do SNC ativada em resposta à lesão cerebral (Stertz et al., 2013). Assim, a ativação microglial libera citocinas pró-inflamatórias e radicais livres, os quais são conhecidos por causar degeneração neuronal, anormalidades na substância branca e diminuição da neurogênese. Estas interações neurônio-microglia podem levar a lesão e perda neuronal e, inclusive, ser um dos fatores importantes na fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos como a esquizofrenia (Monji et al., 2009; Zhao et al., 2014; Réus et al., 2015).

Está bem descrito que as citocinas são peptídeos produzidos e liberados pelas células imunes, capazes de interferir no metabolismo de sistemas de neurotransmissores, nas atividades neuroendócrina e neuronal, na regulação do crescimento e da proliferação das células da glia (Hava et al., 2006). As citocinas são produzidas por inúmeros tipos de células no sítio da lesão, bem como por células do sistema imunológico, através da ativação de proteoquinases ativadas por mitógenos (Oliveira et al., 2011). Em geral, estes peptídeos atuam no organismo a fim de combater diversos patógenos, sendo que no sistema imune reconhecem partículas invasoras e ainda participam de respostas adaptativas ou reações homeostáticas (Avitsur e Yirmiya, 1999; Aderem e Ulevitch, 2000).

Desse modo, a ativação das citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- α), a interleucina-1 β (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6) pode estar associada à deficiência nutricional materna, infecção intrauterina, parto prematuro, infecções neonatais e dano cerebral neonatal. No cérebro, essas proteínas são expressas ambas nas células gliais e nos neurônios. Em adição a sua função na resposta imune, estes mediadores modulam a função e o desenvolvimento neuronal, representando um papel crucial no neurodesenvolvimento (Hava et al., 2006). A IL-1 β , IL-6 e TNF- α são consideradas pró-inflamatórias por aumentar a resposta imunitária à infecção e à inflamação, por promover o recrutamento de leucócitos até os locais de inflamação e / ou pela ativação inflamatória celular (Potvin et al., 2008). O TNF- α está envolvido na regulação do crescimento dos neuritos (Golan et al., 2004), afeta a sobrevivência neuronal (Barker et al., 2001) e regula a expressão do receptor AMPA (Beattie et al., 2002). A IL-1 β e o TNF- α também estão relacionados à regulação da plasticidade sináptica (Butler et al., 2004), enquanto a IL-4 e a IL-10 destacam-se

por ser citocinas anti-inflamatórias que contribuem para atenuar a resposta imune e inflamatória (Potvin et al., 2008).

De modo geral, as citocinas regulam a inflamação e coordenam as respostas inata e adaptativa do sistema imunológico (Miller et al., 2011; Müller et al., 2015), sendo importantes mediadores da comunicação entre o SNC e o sistema imune, o que pode ter implicações para a psiquiatria clínica (Kapczinski et al., 2010, 2011). É sabido que a esquizofrenia caracteriza-se como um transtorno neurodesenvolvimental, resultante de anormalidades que ocorrem durante os estágios iniciais do desenvolvimento neural (Lieberman, 1999). Assim, além da desregulação da plasticidade sináptica, das alterações na sinalização das neurotrofinas, do comprometimento da defesa antioxidante e aumento do estresse oxidativo (Gama et al., 2006, 2007, 2008a,b), muitas linhas de evidência fortalecem a hipótese de que vias relacionadas à inflamação também estão envolvidas na fisiopatologia dos distúrbios psiquiátricos (Dean, 2011). De fato, os processos imunológicos inflamatórios têm sido fortemente implicados nos mecanismos fisiopatológicos da esquizofrenia (Reddy e Yao, 1996; Drexhage et al., 2011; Francesconi et al., 2011; Kunz et al., 2011).

Estudo indica que a exposição materna ao LPS durante a gravidez estimula a produção de citocinas inflamatórias (Xu et al., 2007). É sabido que o AF apresenta efeito anti-inflamatório, sendo capaz de reduzir a liberação de citocinas a partir de células mononucleares de sangue periférico em indivíduos com hiperhomocisteinemia (HHcy) (Holden et al., 2002). Feng e colegas (2011) mostraram que o AF inibiu a ação do LPS em liberar citocinas inflamatórias nos macrófagos, o que confirma que a ação protetora desta vitamina na toxicidade induzida pelo LPS pode, pelo menos parcialmente, ser atribuída aos seus efeitos anti-inflamatórios (Zhao et al., 2013). Diante disso, faz-se necessário investigar a ação da dieta deficiente ou suplementada com AF em diferentes doses durante a gestação tanto nas mães como na prole adulta, visto que esta vitamina pode apresentar uma ação pró (deficiência) ou anti-inflamatória (suplementação), inclusive duradoura, indicando tanto um efeito protetor como uma ação contrária se deficiente ou em doses elevadas, em ambas, saúde materna ou da prole.

1.3 NUTRIÇÃO MATERNA E NEUROTROFINAS NA GESTAÇÃO E A SAÚDE DA PROLE

O desenvolvimento e crescimento adequado da placenta durante a gravidez é determinado pela condição nutricional materna e têm um

efeito crucial na saúde do feto, uma vez que a placenta representa o elo entre as circulações materno-fetais sendo fundamental para a nutrição e oxigenação fetal (Dhobale, 2014). Estudos pré-clínicos e clínicos realizados por Dhobale e colaboradores (2013, 2014) mostraram que os micronutrientes, AF, vitamina B12 e PUFA's, em particular o DHA, atuam em conjunto no metabolismo de um carbono. Assim, qualquer alteração em um destes componentes poderá causar mudanças nos padrões de metilação que afetam a expressão gênica, principalmente em períodos críticos de desenvolvimento, resultando em complicações durante a gestação e repercutindo na saúde da prole. Tudo isso pode predispor o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos em algum momento da vida destes filhos (Dhobale et al., 2013; Dhobale, 2014).

Já foi descrito que os fatores neurotróficos, tais como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o fator de crescimento nervoso (NGF) estão envolvidos no desenvolvimento cérebro placentário e fetal (Dhobale et al., 2013). Desse modo, alterações nos níveis de neurotrofinas podem produzir efeitos duradouros sobre processos neurotróficos (número de neurônios, sinapses) que influenciam a maturação neuronal e a plasticidade na vida tardia (Vicario-Abejón et al., 2002). Com base nisso, a sinalização intracelular do BDNF e seu receptor TrkB é essencial para a sobrevivência neuronal, plasticidade e morfogênese (Numakawa et al., 2010). Já o NGF tem sido associado com a atividade funcional das células que inclui os sistemas imune e endócrino e atua como um mediador inflamatório (Berry et al., 2012). De acordo com Dhobale (2014) alterações na expressão e nos níveis de neurotrofinas durante a gestação podem estar relacionadas à sua interação com os micronutrientes (AF, vitamina B12 e DHA). Neste sentido, novos estudos correlacionando dieta materna, seus efeitos nos parâmetros inflamatórios e fatores neurotróficos na saúde, em especial da prole adulta, e sua relação com a esquizofrenia são primordiais para confirmar os achados acima.

1.4 NUTRIÇÃO MATERNA E ESQUIZOFRENIA

Pesquisas demonstram que níveis alterados de AF e Hcy podem afetar processos fundamentais de neuroplasticidade desenvolvimental e adulta, incluindo a proliferação e diferenciação celular em neurônios e células gliais, bem como a sobrevivência neuronal. Desse modo, a plasticidade sináptica pode ser sensível à Hcy, uma vez que este aminoácido é capaz tanto de alterá-la, como promover a degeneração neuronal, contribuindo de fato para a patogênese de transtornos

psiquiátricos como a esquizofrenia (Mattson e Shea, 2003; Parletta et al., 2013).

A nutrição pré-natal exerce um papel determinante na prevenção de diversas doenças (cardiovasculares, psiquiátricas e neurodegenerativas) na vida jovem-tardia da prole, além de contribuir positivamente para o desenvolvimento cerebral (Peleg-Raibstein et al., 2012; Van Abeelen et al., 2012). Com efeito, os micronutrientes maternos, especialmente os que participam do metabolismo de um carbono podem influenciar na susceptibilidade a doenças na prole (Hill et al., 2011; Yajnik e Deshmukh, 2012). Sable et al. (2012), inclusive, sugerem que uma dieta materna desequilibrada em AF e vitamina B12 pode alterar o metabolismo dos PUFAs, reduzindo os níveis de DHA cerebral na prole.

Os ácidos graxos são vitais para o desenvolvimento e funcionamento cerebral, influenciando o desempenho cognitivo, particularmente a memória e a aprendizagem. Além dos PUFAs, as neurotrofinas, como o BDNF (Cunha et al., 2010) e o NGF (Conner et al., 2009) são essenciais para a neurogênese e o bom desenvolvimento cognitivo. O BDNF estimula a proliferação celular e melhora a cognição, por ativar vias como PI3-Akt, MAP quinase e STAT-3 (Li et al., 2012). Do mesmo modo, o NGF parece ativar estas vias desempenhando efeito na manutenção das projeções colinérgicas (Nguyen et al., 2009). Sendo assim, estudo indica que os mecanismos epigenéticos regulam os níveis das neurotrofinas (Heberlein et al., 2011). Além disso, os micronutrientes maternos também podem regular os níveis de proteína e RNAm das neurotrofinas na prole ao nascer (Sable et al., 2011), sugerindo que a natureza das mudanças que ocorrem na prole pode ser dependente do tempo e da duração do evento estressor durante a fase neurodesenvolvimental (Vickers, 2011; Howie et al., 2012).

Neste sentido, a presença de um agente estressor (deficiência nutricional materna) associado à ativação microglial durante a gestação pode contribuir para a patogênese da esquizofrenia na prole adulta, visto que ambos os fatores podem aumentar as citocinas pró-inflamatórias e contribuir para um estado pró-inflamatório duradouro. Ademais, alterações imunológicas influenciam o sistema dopaminérgico, serotoninérgico, noradrenérgico e a neurotransmissão glutamatérgica, afetando assim os sistemas neuronais envolvidos na fisiopatologia da esquizofrenia (Müller et al., 2015). Ressalta-se ainda que, embora a microglia corresponda há apenas 10% das células cerebrais, esta responde rapidamente a pequenas alterações patológicas sendo capaz de

contribuir diretamente para a degeneração neuronal pela produção desses mediadores pró-inflamatórios e radicais livres (Ashdown et al., 2006). Em contraste, a interação neurônio-microglia foi relacionada ao equilíbrio entre a sinaptogênese e a morte neuronal, em particular, durante a fase de neurodesenvolvimento e dano cerebral (Hanisch, 2002).

Em geral, uma dieta deficiente em AF durante a gestação mostrou afetar o fenótipo da prole em modelos animais, bem como influenciar a predisposição de doenças na vida tardia da prole. A quantidade de doadores de grupamentos metil na dieta materna é especialmente crítica durante o desenvolvimento embriário por afetar a metilação de DNA (McKay et al., 2004). Diante disso, o AF, principal responsável pela transferência de grupos metil para a metilação do DNA, influencia tanto a síntese de DNA, como a síntese de fosfolípidos e neurotransmissores durante o neurodesenvolvimento, o qual é particularmente vulnerável a disponibilidade reduzida de grupamentos metil (Kim et al., 2008; 2009). Portanto, especula-se que a deficiência materna de AF é capaz de interferir na saúde da mãe, mas em especial, na saúde da prole na idade adulta (Shea e Rogers, 2014).

Assim, os processos epigenéticos são apontados como o mecanismo base, pelos quais a alteração nutricional materna interfere o desenvolvimento da prole. As alterações epigenéticas incluem vários mecanismos que influenciam a estrutura da cromatina e a expressão gênica, como a metilação do DNA e acetilação de histonas. Estudos que relacionam AF, metabolismo de um carbono e nutrição pré-natal com a esquizofrenia ainda são escassos. Há, no entanto, indícios de que deficiência materna de AF atua como um fator estressor durante períodos críticos de desenvolvimento do cérebro, em especial na fase pré-natal, podendo alterar o neurodesenvolvimento nos filhos (Kirkbride et al., 2012).

1.5 ESQUIZOFRENIA E MODELO ANIMAL

A esquizofrenia caracteriza-se como um transtorno psiquiátrico crônico e debilitante que afeta cerca de 1% da população mundial (Javitt, 2010). Além de afetar gravemente a vida dos pacientes e seus familiares, representa um grande custo para a sociedade e o sistema público, tanto em termos de perda da produtividade, como pelo tratamento contínuo com antipsicóticos (Koyama et al., 2008; Chien et al., 2008). A etiologia do transtorno permanece elusiva, porém a hiperfunção dopaminérgica no sistema límbico e a hipofunção

dopaminérgica no córtex frontal, bem como a hipofunção glutamatérgica são conhecidas por desempenhar importantes papéis na fisiopatologia da esquizofrenia (Monji et al., 2009). Tais fatores influenciam, inclusive, na presença de sintomas positivos (alucinações, delírios, episódios psicóticos e desconfianças que levam o paciente à fuga da realidade); negativos (embotamento afetivo, isolamento social, avolia, anedonia e discurso empobrecido) e cognitivos (prejuízo na memória de trabalho, desorganização, desorientação e falta de atenção) (Larson et al., 2010; Shamsi et al., 2011), os quais são bastante característicos destes pacientes.

O diagnóstico da esquizofrenia é baseado na descrição dos sinais e sintomas, os quais devem estar presentes durante seis meses e incluir pelo menos um mês de sintomas ativos, conforme o Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (DSM-V), (Apa, 2013; Bagdy e Juhasz, 2013). O transtorno tem origem multifatorial, sendo que fatores genéticos e ambientais representam um grande impacto na sua etiologia (Brown, 2011; Shorter e Miller, 2015). Todavia, a falta de achados consistentes apontando um fator genético específico na patogênese do transtorno tem levado ao estudo da influência dos fatores ambientais (Rapoport et al., 2012; Matrisciano et al., 2013). É sabido que alterações epigenéticas podem estar envolvidas em diversas doenças crônicas, cardiovasculares, câncer, distúrbios neurocomportamentais, destacando-se o autismo e a esquizofrenia. Assim, a regulação epigenética é particularmente suscetível aos efeitos ambientais ocorridos durante o período pré e pós-natal (Jirtle e Skinner, 2007).

Devido a estes fatores, estudos classificam a esquizofrenia como uma doença neurodesenvolvimental (Rapoport et al., 2005; Brown et al., 2007; Kaur e Cadenhead, 2010). Diferentes agentes, conhecidos por produzir danos no desenvolvimento do SNC durante a fase gestacional, têm sido implicados na esquizofrenia e incluem o sofrimento pré-natal e / ou perinatal (Baguelin-Pinaud et al., 2010) como a exposição materna ao estresse (Lee et al., 2007); infecção e / ou ativação do sistema imunológico e da microglia (Clarke et al., 2009); deficiências nutricionais (AF, vitamina B12, ômega 3) e / ou altos níveis maternos de Hcy (Krebs et al., 2009); complicações obstétricas (Haukvik et al., 2009), além do estresse oxidativo (Bitanhirwe e Woo, 2011).

A esquizofrenia se manifesta na fase jovem-adulta, sendo marcada por uma mudança abrupta no perfil social e afetivo destes indivíduos (Apa, 1994; Marsman et al., 2013; Kaur e Cadenhead, 2010). Além do desequilíbrio nos sistemas de neurotransmissores, a sua

fisiopatologia poderia ser resultante da desregulação da plasticidade sináptica, de alterações nas neurotrofinas, além do prejuízo na defesa antioxidante e anti-inflamatória (Gama et al., 2008a,b). Dean e colaboradores (2011) apoiam a hipótese de que vias relacionadas à inflamação estão envolvidas na patogênese de transtornos psiquiátricos. De fato, o processo imune-inflamatório tem sido fortemente implicado nos mecanismos fisiopatológicos da esquizofrenia (Reddy e Yao, 1996; Kunz et al., 2011; Miller et al., 2011; Francesconi et al., 2011). Sabe-se que as citocinas regulam a inflamação e coordenam a resposta inata e adaptativa do sistema imunitário (Miller et al., 2011), o que pode ter implicações para a psiquiatria (Kapczinski et al., 2010, 2011).

Ademais, o estresse oxidativo neuronal é um mecanismo de lesão celular presente em uma série de condições (câncer, estados inflamatórios e doenças neurodegenerativas e psiquiátricas) (Kapczinski et al., 2011) e produz efeitos deletérios sobre a transdução de sinal, plasticidade estrutural e resistência celular, em especial por induzir peroxidação lipídica nas membranas celulares neuronais, além de dano em proteínas, DNA e, conseqüentemente, em genes (Gama et al., 2008 a,b). Desta forma, os neurônios e as células gliais são particularmente vulneráveis aos processos inflamatórios e ao estado redox e, são dependentes da manutenção da atividade neurotrófica, a qual pode ser afetada pelo estresse oxidativo e pela ativação microglial (Kapczinski et al., 2010, 2011; Kunz et al., 2011).

Como já mencionado, o processo neurodesenvolvimental pode influenciar a manifestação da esquizofrenia e estar associado à ativação microglial. A hipofunção glutamatérgica e a sinalização comprometida do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) são situações subjacentes à fisiopatologia da esquizofrenia (Lieberman, 1999; Perez-Neri I et al., 2006). Neste sentido, antagonistas não-competitivos do receptor NMDA, tais como a fenciclidina (PCP), a cetamina e o MK-801 são capazes de induzir um modelo animal apropriado de esquizofrenia. Além disso, estes antagonistas são conhecidos por induzir a ativação da microglia no cérebro de roedores, possivelmente, levando a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Nakki et al., 1995; Nakki et al., 1996).

Com base nisso, este estudo utilizou a cetamina para induzir o modelo animal de esquizofrenia na prole adulta de mães expostas à dieta deficiente ou suplementada com AF durante a gestação e lactação. A cetamina é um anestésico que obstrui o canal NMDA, impedindo a entrada de cálcio através da membrana plasmática do neurônio, o que induz um estado psicótico transitório e reversível, inclusive em pessoas

saudáveis (Javitt et al., 2000; Mechri et al., 2001). Este modelo relaciona-se à teoria da hipofunção do receptor NMDA, onde ao bloquear este receptor, há um aumento da liberação de dopamina no sistema mesolímbico e igualmente aumenta-se a atividade dos demais receptores de glutamato (Anand et al., 2000). Ademais, resultados preliminares deste laboratório (Canever et al., 2010; Gama et al., 2012; Zugno et al., 2013a,b; Zugno et al., 2016) confirmam a validade da cetamina em mimetizar o modelo animal de esquizofrenia, mediante alterações comportamentais (hiperlocomoção, déficit no comportamento social, prejuízo cognitivo), bem como por causar mudanças bioquímicas (estresse oxidativo, alterações nas neurotrofinas) no cérebro de roedores. Em adição, estudo realizado por Zugno e colaboradores (2013a), corrobora a teoria de que agressões precoces durante a gestação interferem no sistema glutamatérgico, sendo capaz de refletir em maior sensibilidade aos efeitos da cetamina na idade adulta no modelo animal de esquizofrenia.

Considerando os efeitos protetores do AF durante a fase gestacional e conseqüentemente na vida tardia da prole, o desenvolvimento desta pesquisa utilizando diferentes doses de AF durante a gestação e lactação como uma abordagem profilática, tanto para a manutenção da saúde materna como da prole adulta, apresenta extrema relevância. Adicionalmente, o fato de que danos ambientais no período pré-natal afetam o desenvolvimento do SNC na prole, podendo permanecer na vida adulta e, que os exatos mecanismos pelos quais estas alterações ocorrem ainda não estão bem compreendidos, o presente estudo contribui para o avanço de uma maior compreensão sobre a fisiopatologia da esquizofrenia, uma vez que agentes protetores são essenciais para prevenção dos transtornos neurodesenvolvimentais.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o efeito da dieta controle, da suplementação com AF em diferentes doses (5, 10 e 50 mg/kg) e da dieta deficiente em AF durante as fases de gestação e lactação sobre os parâmetros inflamatórios em ratas Wistar mães, bem como avaliar o efeito das dietas maternas nos mesmos marcadores inflamatórios e nos níveis cerebrais de neurotrofinas na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia induzida por cetamina.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis plasmáticos de IL-4, IL-6 e TNF- α em ratas Wistar mães submetidas à dieta controle, à suplementação com diferentes doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg) e à dieta deficiente em AF durante as fases de gestação e lactação;

- Avaliar o efeito das dietas maternas, dieta controle, das dietas suplementadas com diferentes doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg) e dieta deficiente em AF, sobre os marcadores inflamatórios, IL-4, IL-6 e TNF- α , nas estruturas cerebrais córtex frontal e hipocampo, da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia induzida pela administração de cetamina;

- Avaliar o efeito das dietas maternas, dieta controle, dietas controle suplementadas com diferentes doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg) e dieta deficiente em AF, sobre os níveis de neurotrofinas, BDNF e NGF, nas estruturas cerebrais córtex frontal e hipocampo, da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia induzida pela administração de cetamina.

3 METODOLOGIA

Este estudo caracterizou-se como experimental, utilizando um modelo animal de esquizofrenia. A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) sob o protocolo 100-2014-01 (Anexo A). Os procedimentos foram executados de acordo com o Instituto Nacional de Guia de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) projetado para minimizar o sofrimento e limitar o número de animais utilizados. Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas adultos com aproximadamente 60 dias de vida, pesando em média 250 g a 300 g. Os animais foram obtidos do Biotério da Universidade e mantidos em gaiolas em ciclos de 12h dia-noite, com alimentação específica, água disponível e temperatura controlada entre $22 \pm 1^\circ \text{C}$.

3.1 RATAS WISTAR DURANTE A FASE DE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

O presente estudo utilizou 60 ratas Wistar adultas virgens que foram mantidas cada uma com um rato Wistar macho adulto para acasalamento durante sete dias. A partir do primeiro dia de contato com o macho, as ratas foram separadas aleatoriamente em cinco grupos experimentais maternos ($n=12$) e começaram a receber dois tipos de dieta (ração) especial: dieta AIN 93, também denominada dieta controle, e dieta deficiente em AF. As fêmeas que receberam a dieta controle ainda foram subdividas em três grupos para que, além desta ração, recebessem a suplementação com AF nas doses de 5, 10 e 50 mg/kg, totalizando assim, cinco grupos experimentais maternos (Tabela 1).

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

Ressalta-se que as ratas não grávidas foram desconsideradas deste estudo após 21 a 28 dias de acompanhamento.

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

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

N = 12 animais por grupo. N = 5-6 para análises bioquímicas. Fonte: Dados do pesquisador, 2017.

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

Neste estudo, utilizaram-se dois tipos de ração (dieta) especial: dieta controle (ração AIN 93) e dieta deficiente em AF. Estas rações foram confeccionadas e fornecidas pela empresa Pragsoluções Biociências (www.pragsolucoes.com.br), sendo oferecidas às ratas dos grupos experimentais maternos durante todo período de gestação e lactação. Nesta pesquisa não se optou pela ração comum do Biotério como dieta controle por três motivos. Primeiramente, o fato da dieta deficiente em AF ser elaborada somente a partir da dieta AIN 93 que contém ingredientes purificados. Em segundo, o fato da ração comum do Biotério não ser purificada, apresentando um padrão nutricional diferente, inclusive em relação à fonte proteica que é de origem vegetal quando comparada a proteína da ração AIN 93 (origem animal). Adicionalmente, a ração comum é preparada com ingredientes integrais como o milho em grão que contém frações de amido, óleo de milho, além de proteína, vitaminas e minerais misturados no mesmo grão e, assim, ocorre com os demais ingredientes da ração. Desta forma, torna-se difícil elaborar uma dieta livre de AF a partir da ração comum, visto que esta vitamina além de adicionada na ração pode estar presente nos demais ingredientes utilizados (grãos integrais) em maior ou menor

concentração, dificultando ainda mais a eliminação total do AF para obter-se a ração deficiente nesta vitamina.

3.3 SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO PARA AS RATAS *WISTAR* DURANTE A FASE DE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

As ratas Wistar que receberam a dieta controle foram divididas em três grupos, conforme já demonstrado na Tabela 1, para suplementação com AF. Essa vitamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) foi suplementada nas doses de 5, 10 e 50 mg/kg, sendo preparada antes da administração e solubilizada em água em um volume de 1ml/100g. O AF foi administrado por via oral (v.o.) uma vez ao dia, durante toda a fase de gestação e lactação. As doses de suplementação foram administradas conforme respectivo peso de cada rata, no volume de 1ml/kg. As doses de AF foram escolhidas com base em estudos anteriores realizados por Brocardo et al.(2008a); Brocardo et al. (2008b); Brocardo et al.(2009) e Budni et al.(2012) e Zugno et al. (2016).

Salienta-se que após o nascimento da prole, todos os filhotes (machos e fêmeas) permaneceram junto à mãe para amamentação por 21 dias e as mães continuaram recebendo a mesma dieta oferecida durante a gestação, até o final da lactação. Logo após o desmame, a prole foi submetida à sexagem e os filhotes machos e fêmeas foram agrupados de acordo com a dieta materna. Imediatamente após o último dia de amamentação, as ratas mães foram decapitadas e o sangue coletado para posterior análise dos níveis de citocinas maternas.

3.4 PROLE MASCULINA ADULTA DAS RATAS *WISTAR* MÃES

Os filhotes machos proveniente das ratas Wistar submetidas às diferentes dietas maternas foram utilizados na fase adulta. Após o desmame foi imediatamente introduzida ração padrão do Biotério e ofertado água ad libidum para estes animais até completarem 60 dias. Salienta-se que a prole feminina adulta das ratas Wistar foi destinada a outro grupo de pesquisa do mesmo Laboratório para realização de outros experimentos.

Ao chegar à fase adulta, os filhotes machos foram subdivididos em grupos conforme a dieta materna administrada para a indução do modelo animal de esquizofrenia através da administração de cetamina (25 mg/kg). No total, formaram-se 10 grupos (Tabela 2).

Tabela 2: Divisão da prole em grupos experimentais: machos adultos

GRUPOS
1. Dieta controle+salina (grupo controle)
2. Dieta controle +cetamina (grupo cetamina)
3. Dieta deficiente AF+salina
4. Dieta deficiente AF+cetamina
5. Dieta controle +suplementação AF 5mg/kg+salina
6. Dieta controle +suplementação AF 5mg/kg+cetamina
7. Dieta controle +suplementação AF 10mg/kg+salina
8. Dieta controle +suplementação AF 10mg/kg+cetamina
9. Dieta AIN 93+suplementação AF 50mg/kg+salina
10. Dieta AIN 93+suplementação AF 50mg/kg+cetamina

N = 4-6 animais por grupo. Fonte: Dados do pesquisador, 2017.

3.5 ADMINISTRAÇÃO DE CETAMINA

A partir da divisão dos grupos acima apresentados, iniciou-se o protocolo de indução de esquizofrenia, no qual os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de cetamina (25 mg/kg) ou salina, uma vez ao dia, durante 7 dias (tratamento repetido). A dose de cetamina foi preparada em solução salina no volume de 1ml/100g (Becker e Grecksch, 2004; Imre et al., 2006; Tomiya et al., 2006; Canever et al., 2010).

Após a última administração de salina ou cetamina, os animais foram decapitados e as estruturas cerebrais, córtex frontal e hipocampo dissecadas, mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C para posteriores análises bioquímicas dos níveis de citocinas inflamatórias e neurotrofinas (Figura 2).

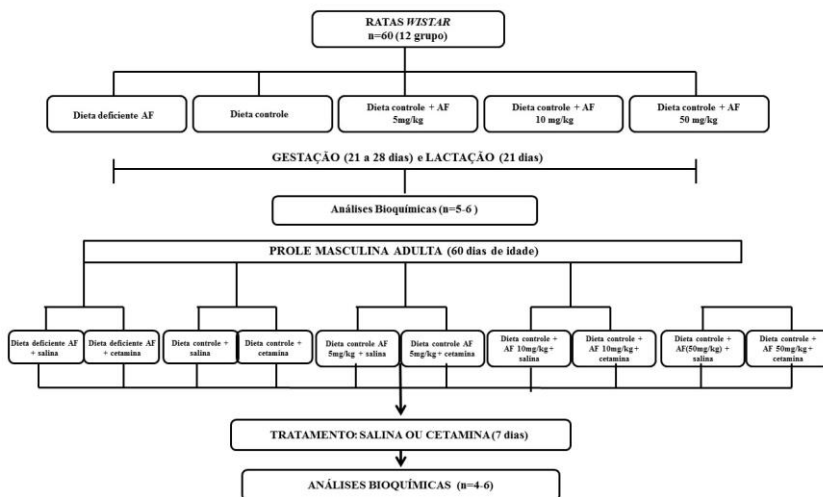


Figura 2: Desenho experimental – Ratas Wistar foram separadas em cinco grupos experimentais maternos (n=12) e receberam dois tipos de dieta (ração) especial - dieta controle (dieta AIN 93) e dieta deficiente em AF - durante todo período gestacional (21 a 28 dias) e lactacional (21 dias). As fêmeas que receberam dieta controle ainda foram subdivididas em três grupos para além desta ração, receberem a suplementação com AF nas doses de 5, 10 e 50 mg/kg (v.o.), totalizando assim, os cinco grupos experimentais maternos. Após a fase de amamentação, as ratas mães foram decapitadas e o sangue imediatamente coletado para posterior análise dos níveis de citocinas (n=5-6). Ao completar 60 dias de vida, a prole masculina foi dividida em grupos (n=4-6) conforme a dieta materna para a indução do modelo animal de esquizofrenia através da administração de cetamina (25 mg/kg) via (i.p.) durante 7 dias. Após a última administração de salina ou cetamina, os animais foram decapitados e as estruturas cerebrais, córtex frontal e hipocampo dissecadas e mantidas em freezer -80°C para posterior análise bioquímica dos níveis de citocinas e neurotrofinas. Fonte: Dados do pesquisador, 2017.

3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As análises dos níveis plasmáticos de citocinas maternas e dos níveis cerebrais de citocinas e neurotrofinas da prole foram realizadas no Laboratório de Neurociências (NeuroLab).

3.6.1 Preparo das amostras

3.6.1.1 Coleta de sangue

A coleta de sangue das ratas mães foi realizada imediatamente após a morte dos animais. Coletaram-se 3ml de sangue em tubos contendo ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA) como anticoagulante. O sangue foi centrifugado a 3000rpm por 6 minutos (min) e, o plasma, aliqotado em vials de 1ml e acondicionado em freezer -80°C até a determinação dos níveis de citocinas: IL-4, IL-6 e TNF- α .

3.6.1.2 Preparo das amostras cerebrais

Após a decapitação dos animais em guilhotina, os cérebros foram removidos e dissecados em córtex frontal e hipocampo. As amostras foram dissecadas em uma superfície gelada, posteriormente mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C para posteriores análises bioquímicas. As amostras cerebrais foram preparadas de acordo com a técnica bioquímica a ser realizada.

3.6.2 Níveis de citocinas das ratas mães

Os níveis plasmáticos das citocinas IL-4 (R & D Systems, Inc. – USA, Rat IL-4, DY504), IL-6(R & D Systems, Inc. – USA, Rat IL-6, DY506) e TNF α (R & D Systems, Inc. – USA, Rat TNF α DY510) maternas foram determinados através de kits comerciais ELISA específicos, seguindo as recomendações do fabricante.

3.6.3 Níveis de citocinas e neurotrofinas cerebrais da prole adulta

Para a determinação dos níveis cerebrais das citocinas e neurotrofinas, as amostras de córtex frontal e hipocampo foram homogeneizadas em solução tampão fosfato com um coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), centrifugado a 2300 x g por 5 min e o sobrenadante será utilizado para as determinações. Os níveis das citocinas IL-4 (R & D Systems, Inc. – USA, Rat IL-4, DY504), IL-6 (R & D Systems, Inc. – USA, Rat IL-6, DY506) e TNF α (R & D Systems, Inc. – USA, Rat TNF α DY510) da prole adulta foram determinados por meio de kits comerciais ELISA específicos para estas análises, conforme as recomendações do fabricante. Os níveis de BDNF e NGF nas mesmas estruturas cerebrais, também foram determinados através de kits ELISA específicos para BDNF (R & D Systems, Inc. – USA, Human BDNF, DY248) e para NGF (R & D Systems, Inc. –

USA, Rat Beta-NGF, DY556), seguindo as recomendações do fabricante.

3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

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

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados referentes aos níveis plasmáticos de citocinas maternas foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, acompanhado do teste de *Tukey*, quando F foi significativo. Já os resultados dos níveis cerebrais de citocinas e neurotrofinas da prole adulta foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de *Newman-Keuls*, quando F foi significativo.

Os efeitos, dietas maternas, salina e cetamina e a interação entre os fatores, foram descritos utilizando-se ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de *Newman-Keuls*, quando F foi significativo. Quando não houve interação entre as variáveis, ANOVA de uma via foi utilizada para avaliar a diferença entre os grupos, seguida pelo teste de *Newman-Keuls*.

Os dados foram expressos como média (\pm) e erro padrão da média (média \pm E.P.M). Em todas as análises, valores de $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para a realização das análises estatísticas foi usado o software Estatística 8.0 e para a elaboração dos gráficos utilizou-se o programa *GraphPad Prism 5*.

4. RESULTADO

4.1 NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CITOCINAS MATERNAS

Na Figura 3, são apresentados os níveis plasmáticos de citocinas maternas. ANOVA de uma via seguida pelo post hoc Tukey foi utilizada para avaliar a diferença entre os grupos [$F(4,14) = 9,92, p \leq 0.01$]. A análise dos níveis de IL-4 no plasma (Figura 3A) apontou que as ratas mães expostas à dieta deficiente em AF e à dieta controle não apresentaram diferença nos níveis de IL-4. No entanto, houve um aumento significativo desta citocina (IL-4) nas ratas mães que receberam suplementação de AF nas doses de 5 mg/kg ($p \leq 0.01$), 10 mg/kg ($p \leq 0.05$) e 50 mg/kg ($p \leq 0.05$) quando comparado às ratas submetidas à dieta deficiente em AF e à dieta controle, indicando uma possível ação protetora do AF na resposta anti-inflamatória materna.

Para a IL-6 nas ratas mães (Figura 3B), ANOVA de uma via mostrou diferença significativa entre os grupos [$F(4,14) = 9,92, p \leq 0.01$]. Observou-se um aumento nos níveis plasmáticos de IL-6 nos animais que receberam dieta deficiente em AF ($p \leq 0.05$) comparado às ratas mães do grupo controle, além de uma diminuição desta citocina pró-inflamatória nas mães expostas à dieta controle ($p \leq 0.05$) e à dieta suplementada com AF na dose de 50 mg/kg ($p \leq 0.05$) em relação ao grupo deficiente em AF.

Também foi observado uma diferença significativa entre os grupos para os níveis plasmáticos de TNF α maternos, de acordo com ANOVA de uma via [$F(4,17) = 6,12, p \leq 0.01$]. Na Figura 3C, pode-se verificar um aumento nos níveis de TNF α nas ratas mães expostas à dieta deficiente em AF ($p \leq 0.01$) e uma diminuição significativa nos níveis de TNF- α em animais submetidos à dieta controle ($p \leq 0.01$), bem como nas mães suplementadas com AF nas doses de 5 mg/kg ($p \leq 0.01$), 10 mg/kg ($p \leq 0.05$) e 50 mg/kg ($p \leq 0.01$) quando comparado ao grupo deficiente em AF.

Em resumo, estes achados sugerem que a deficiência materna de AF contribuiu para o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) nas ratas mães, enquanto a suplementação de AF na gestação e lactação, particularmente a dose de 50 mg/kg, foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos de ambas as citocinas nestes animais quando comparado ao grupo deficiente em AF. Além disso, observou-se que as três doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg) suplementadas durante a fase gestacional foram capazes de aumentar os níveis de IL-4, sugerindo um possível efeito anti-inflamatório desta vitamina nas mães.

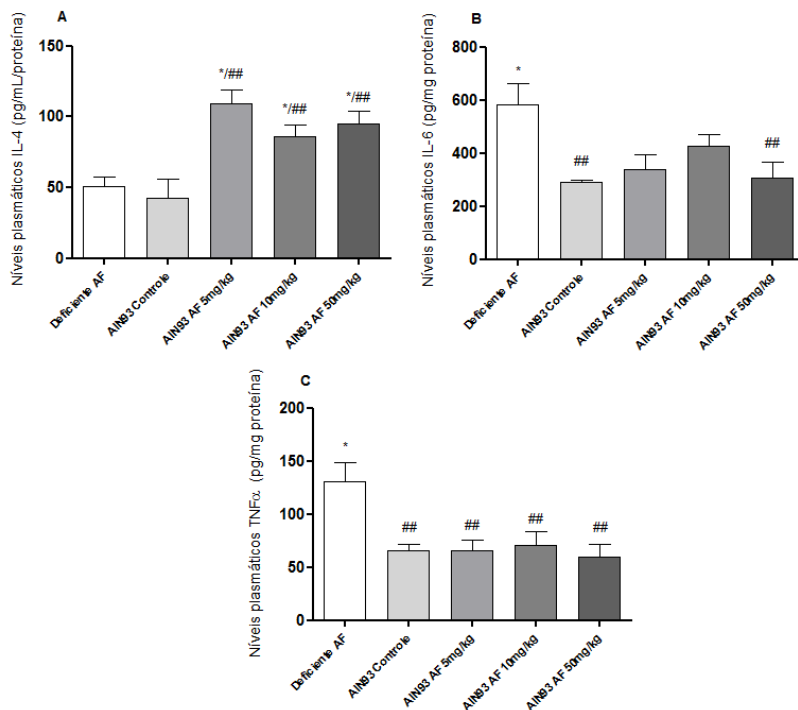


Figura 3: Análise dos níveis plasmáticos de citocinas maternas. IL-4 (painel A), IL-6 (painel B) e TNF- α (painel C) no plasma de ratas mães que foram submetidas à dieta deficiente em AF, à dieta controle e à dieta controle suplementada com diferentes doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação. N=5-6. Dados são expressos como média \pm EPM. * $p \leq 0.05$ comparado ao grupo controle; ## $p \leq 0.05$ comparado ao grupo deficiente (dieta deficiente em AF).

4.2 NÍVEIS CEREBRAIS DE CITOCINAS NA PROLE ADULTA

As Figuras 4A e 4B representam os níveis de IL-4 no córtex frontal e hipocampo, respectivamente, da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF, dieta controle e suplementação com AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação. ANOVA de duas vias revelou interação significativa entre as variáveis: dietas maternas, salina e cetamina [$F(4,35) = 9,27$, $p \leq 0.01$] no córtex frontal (Figura 4A). Nesta estrutura cerebral foram observados níveis aumentados de IL-4 nos animais tratados com salina na vida adulta e cujas mães receberam dieta suplementada com AF nas doses de 5 mg/kg ($p \leq 0.05$) e 10 mg/kg ($p \leq 0.05$) e 50 mg/kg ($p \leq 0.05$) e 10 mg/kg ($p \leq 0.05$) e 50 mg/kg ($p \leq 0.05$).

≤ 0.01) comparado ao grupo controle. Já a prole adulta que recebeu cetamina (25 mg/kg) e suas mães foram expostas à dieta suplementada com AF 50 mg/kg, mostrou um aumento significativo nos níveis de IL-4 em relação ao grupo controle ($p \leq 0.05$) e ao grupo cetamina ($p \leq 0.01$), o que pode sugerir um efeito anti-inflamatório duradouro do AF (50 mg/kg) no córtex frontal na prole adulta submetida ao modelo de esquizofrenia.

No hipocampo (Figura 4B), ANOVA de duas vias não revelou interação entre as variáveis: salina, cetamina e dietas maternas [$F(4,35) = 1,73$, $p = 0.16$]. Em contraste, ANOVA de uma via demonstrou que houve diferença entre os grupos [$F(9,35) = 12,31$, $p \leq 0.01$]. Os animais adultos tratados com salina cujas mães foram suplementadas com AF nas doses de 5, 10 e 50 mg/kg ($p \leq 0.01$) apresentaram redução nos níveis de IL-4 em relação ao grupo controle, indicando que a provável ação anti-inflamatória do AF materno não persistiu na prole adulta, ao menos no hipocampo. A cetamina administrada nos animais, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF ($p \leq 0.01$), dieta controle ($p \leq 0.05$) e dietas suplementadas com AF nas doses de 5, 10 e 50 mg/kg ($p \leq 0.01$) foi capaz de reduzir os níveis de IL-4 em relação ao grupo controle. Estes dados sugerem um possível efeito pró-inflamatório da cetamina nos animais adultos, uma vez que este anestésico diminuiu ainda mais os níveis de IL-4 na prole de mães deficiente em AF (dieta deficiente AF+cetamina) e mães controle (grupo cetamina), além da prole adulta proveniente de mães suplementadas com AF. Os níveis de IL-4 também diminuíram nos animais tratados com cetamina, cujas mães receberam dieta deficiente em AF ($p \leq 0.05$) quando comparado ao grupo deficiente (dieta deficiente AF+salina). Já a prole adulta que recebeu cetamina, cujas dietas maternas foram suplementadas com AF 10 mg/kg ($p \leq 0.05$) e AF 50 mg/kg ($p \leq 0.01$) apontou uma redução significativa nos níveis de IL-4 quando comparado ao grupo cetamina.

Tomados em conjunto, no hipocampo, os resultados retratam que a ação anti-inflamatória do AF suplementado durante a fase gestacional não demonstrou um efeito protetor persistente para esta citocina (IL-4) na prole adulta, ambas tratadas com salina ou cetamina. Pode-se enfatizar que o AF per se (5, 10 e 50 mg/kg+salina) foi capaz de reduzir os níveis de IL-4. De qualquer forma, sugere-se uma ação predominante da cetamina na prole adulta, uma vez que tanto associada à dieta controle como ao AF (em especial, AF 10 e 50 mg/kg materno), os animais adultos apresentaram redução nos níveis de IL-4, o que indica

um provável efeito pró-inflamatório da cetamina na vida tardia dos animais.

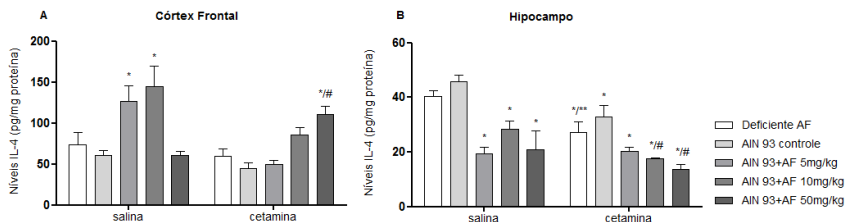


Figura 4: Análise dos níveis de IL-4 nas estruturas cerebrais: córtex frontal (painel 4A) e hipocampo (painel 4B), respectivamente, da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação. N = 5-6. Dados são expressos como média \pm EPM. * $p \leq 0.05$ comparado ao grupo controle; # $p \leq 0.01$ comparado ao grupo cetamina; ** $p \leq 0.05$ comparado ao grupo deficiente em AF (dieta deficiente AF+salina).

Nas Figuras 5A e 5B são apresentados os resultados dos níveis de IL-6 no córtex frontal e hipocampo, respectivamente, da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a fase gestacional. ANOVA de duas vias demonstrou interação significativa entre as seguintes variáveis: dietas maternas, salina e cetamina [$F(4,28) = 5,36$, $p \leq 0.01$] no córtex frontal (Figura 5A). Os níveis de IL-6 foram significativamente elevados nos animais tratados com salina na vida adulta, cujas mães receberam dieta deficiente em AF e suplementação com AF na dose de 10 mg/kg ($p \leq 0.01$) em relação ao grupo controle. Esse dado indica que a deficiência materna de AF contribuiu para o aumento desta citocina na prole adulta e que, ao contrário do esperado, a suplementação de AF (10 mg/kg) nas ratas mães aumentou os níveis de IL-6 na prole, demonstrando uma possível ação pró-inflamatória da AF na vida adulta da prole. Já a administração de cetamina na prole de mães expostas à dieta deficiente em AF ($p \leq 0.05$) reduziu os níveis de IL-6 no córtex frontal em relação ao grupo deficiente em AF (dieta deficiente AF+salina).

No hipocampo, ANOVA de duas vias não apontou interação entre as variáveis: dietas maternas, salina e cetamina [$F(4,28) = 2,49$, $p = 0.06$]. ANOVA de uma via revelou diferença significativa entre os

grupos [F(9,28) = 26,14, $p \leq 0.01$]. Os animais tratados com salina na idade adulta e provenientes de mães suplementadas com AF nas doses de 5, 10 e 50 mg/kg ($p \leq 0.01$) mostraram uma redução nos níveis de IL-6 quando comparado ao grupo controle, demonstrando que o provável efeito anti-inflamatório do AF materno foi capaz de persistir na vida adulta da prole, particularmente no hipocampo. Do mesmo modo, a prole adulta tratada com cetamina, cujas mães receberam dietas suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg) ($p \leq 0.01$) apresentaram níveis reduzidos de IL-6 em relação ao grupo controle e ao grupo cetamina. Estes resultados propõem que as diferentes doses de AF suplementadas durante a fase gestacional parecem ter apresentado um efeito anti-inflamatório duradouro nos animais adultos. Em contrapartida, a administração de cetamina na vida adulta da prole associada à deficiência materna de AF ($p \leq 0.01$) reduziu os níveis de IL-6 quando comparado aos grupos deficiente em AF, grupo controle e grupo cetamina.

Em síntese, os resultados retratam diferenças quanto à ação anti-inflamatória do AF suplementado na fase gestacional no córtex frontal e hipocampo da prole adulta. Verificou-se no hipocampo um efeito protetor duradouro das diferentes doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg) nos animais tratados com salina ou cetamina, sugerindo uma ação anti-inflamatória do AF para esta citocina. Além disso, em ambas as estruturas cerebrais, as proles tratadas com cetamina, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF mostraram redução nos níveis de IL-6, o que pode ser atribuído a uma possível ação anti-inflamatória da cetamina.

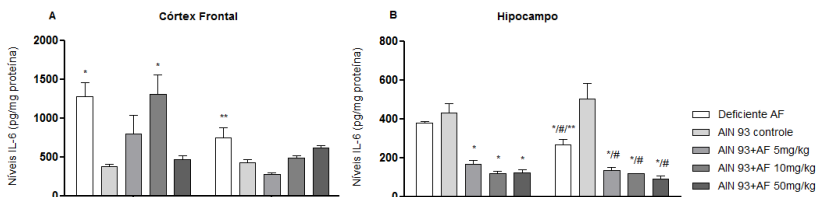


Figura 5: Análise dos níveis de IL-6 nas estruturas cerebrais: córtex frontal (painel 5A) e hipocampo (painel 5B), respectivamente, da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram submetidas à dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação. N = 5-6. Dados são expressos como média \pm EPM. * $p \leq 0.05$ comparado ao grupo controle; # $p \leq 0.01$ comparado ao grupo cetamina; ** $p \leq 0.05$ comparado ao grupo deficiente em AF (dieta deficiente AF+salina).

As Figuras 6A e 6B ilustram os níveis de TNF α no córtex frontal e hipocampo, respectivamente, da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães receberam dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a fase gestacional. No córtex frontal e hipocampo, respectivamente, ANOVA de duas vias não revelou interação significativa entre as variáveis: dietas maternas, salina e cetamina: [F(4,28) = 1,97, p =0.12] e [F(4,30) = 1,45, p =0.24]. Por conseguinte, no córtex frontal, ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos [F(9,28) = 4,39, p \leq 0.01]. A prole adulta que recebeu salina e cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF mostrou um aumento significativo nos níveis de TNF α (p \leq 0.01) em comparação ao grupo controle, suportando a ideia de que a deficiência pré-natal de AF foi capaz de interferir neste marcador inflamatório. A cetamina não teve qualquer efeito nos níveis de TNF α na prole adulta que foi submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães receberam dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a fase gestacional no córtex frontal (Figura 6A).

No hipocampo (Figura 6B), ANOVA de uma via revelou uma diferença significativa entre os grupos [F(9,30) = 18,28, p \leq 0.01]. Foi observada uma considerável redução nos níveis de TNF α em ambos os animais adultos tratados com salina ou cetamina, cujas mães foram suplementadas com AF em diferentes doses (5, 10 e 50 mg/kg) na fase gestacional, quando comparado ao grupo controle (p \leq 0.01) e ao grupo cetamina (p \leq 0.01). Tais achados indicam que o efeito anti-inflamatório do AF suplementado nas ratas mães durante a gestação e lactação foi capaz de persistir na vida adulta da prole, tanto em animais tratados com salina como nos ratos tratados com cetamina. Isso sugere um efeito neuroprotetor duradouro do AF na vida tardia da prole, ao menos neste parâmetro inflamatório e nesta estrutura cerebral.

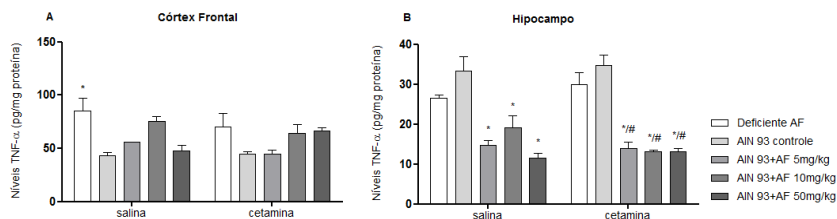


Figura 6: Análise dos níveis de TNF- α nas estruturas cerebrais: córtex frontal (painel 6A) e hipocampo (painel 6B), respectivamente, da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a fase gestacional. N = 5-6. Dados são expressos como média \pm EPM. * $p \leq 0.05$ comparado ao grupo controle; # $p \leq 0.01$ comparado ao grupo cetamina.

4.3 NÍVEIS CEREBRAIS DE NEUROTROFINAS NA PROLE ADULTA

Nas Figuras 7A e 7B estão representados os níveis de BDNF no córtex frontal e hipocampo, respectivamente, da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação. ANOVA de duas vias não revelou interação entre as variáveis: dietas maternas, salina e cetamina [$F(4,25) = 1,50$, $p = 0.23$] no córtex frontal (Figura 7A). Já ANOVA de uma via indicou diferença estatística entre os grupos [$F(9,25) = 14,90$, $p \leq 0.01$], visto que a prole adulta tratada com salina, cujas mães receberam dieta suplementada com AF 10 mg/kg ($p \leq 0.05$) e AF 50 mg/kg ($p \leq 0.01$) apontou um aumento significativo nos níveis de BDNF em relação ao grupo controle. A prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia pela administração de cetamina ($p \leq 0.05$) apresentou uma redução nos níveis de BDNF quando comparado ao grupo controle, enquanto que nos animais tratados com cetamina e cujas mães foram suplementadas com AF (10 e 50 mg/kg) ($p \leq 0.01$), os níveis de BDNF mantiveram-se aumentados na vida tardia da prole em comparação ao grupo cetamina, sugerindo uma ação neurotrófica protetora persistente do AF no córtex frontal.

No hipocampo (Figura 7B), ANOVA de duas vias apontou interação entre as variáveis acima relacionadas: [$F(4,29) = 3,29$, $p \leq 0.05$]. A prole adulta tratada com salina, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF ($p \leq 0.05$) e dietas suplementadas com AF 5 mg/kg (p

≤ 0.01) e 10 mg/kg ($p \leq 0.05$) demonstrou níveis reduzidos de BDNF em relação ao grupo controle. De modo similar, quando a prole recebeu cetamina na vida adulta e suas mães dieta deficiente em AF ($p \leq 0.05$) e dietas suplementadas com AF nas doses de 10 mg/kg ($p \leq 0.05$) e 50 mg/kg ($p \leq 0.01$), observou-se uma redução nos níveis de BDNF quando comparado ao grupo controle. O primeiro achado sugere que a deficiência materna de AF refletiu tardiamente nos níveis de BDNF na prole adulta, ambas tratadas com salina ou cetamina, as quais apresentaram redução neste parâmetro neurotrófico no hipocampo. Já o AF suplementado nas mães durante a fase gestacional não apresentou um efeito neuroprotetor na prole adulta, independentemente do tratamento com salina ou cetamina, visto que as três doses desta vitamina (5, 10 e 50 mg/kg), de modo geral, reduziram os níveis de BDNF hipocampal nos animais adultos.

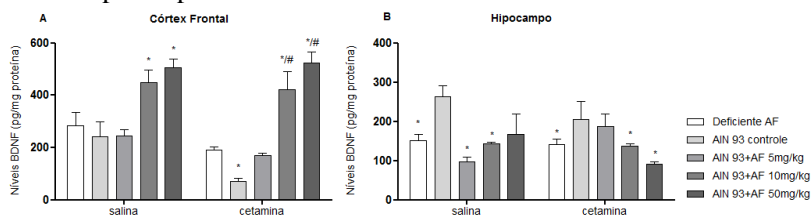


Figura 7: Análise dos níveis de BDNF nas estruturas cerebrais: córtex frontal (painel 7A) e hipocampo (painel 7B), respectivamente, da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a fase gestacional. N = 4-6. Dados são expressos como média \pm EPM. * $p \leq 0.05$ comparado ao grupo controle; # $p \leq 0.01$ comparado ao grupo cetamina.

As Figuras 8A e 8B ilustram os níveis de NGF no córtex frontal e hipocampo, respectivamente, da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a gestação e lactação. ANOVA de duas vias não revelou interação entre as variáveis: dietas maternas, salina e cetamina [$F(4,25) = 2,13$, $p = 0.10$] no córtex frontal (Figura 8A). ANOVA de uma via retrata que houve diferença significativa entre os grupos [$F(9,25) = 6,28$, $p \leq 0.01$]. A prole adulta tratada com salina, cujas mães foram suplementadas com AF 5 mg/kg ($p \leq 0.05$) mostrou uma redução significativa nos níveis de NGF quando comparado ao grupo controle. Por conseguinte, a administração de cetamina na vida adulta da prole

associada à deficiência materna de AF, à dieta controle (grupo cetamina) e à suplementação de AF 5 mg/kg ($p \leq 0.01$) durante a fase gestacional, levou à redução dos níveis de NGF quando comparado ao grupo controle, sugerindo uma ação predominante da cetamina, a qual pode ter contribuído para reduzir esta neurotrofina nestes animais. Já a prole adulta tratada com cetamina, cujas mães foram expostas à suplementação com AF 10 mg/kg ($p \leq 0.01$) e 50 mg/kg ($p \leq 0.05$) apresentaram um aumento significativo nos níveis de NGF no córtex frontal, o que indica uma ação predominante do AF sobre a cetamina, o qual apresentou um efeito persistente nos animais adultos.

No hipocampo (Figura 8B), ANOVA de duas vias apontou interação entre as variáveis: dietas maternas, salina e cetamina [$F(4,32) = 3,85$, $p \leq 0.05$]. Observou-se uma redução considerável nos níveis de NGF na prole adulta tratada com salina, cujas mães receberam dieta deficiente em AF ($p \leq 0.05$) e dieta suplementada com AF 5 mg/kg ($p \leq 0.01$) em relação ao grupo controle. A cetamina administrada na vida adulta da prole, cujas mães foram submetidas à dieta deficiente em AF ($p \leq 0.05$), à dieta controle (grupo cetamina) ($p \leq 0.01$) e às dietas suplementadas com AF nas três doses (5, 10 e 50 mg/kg) ($p \leq 0.01$) foi capaz de reduzir os níveis de NGF hipocampal em relação ao grupo controle, apontando uma provável ação predominante da cetamina na prole adulta. Este resultado sugere que o possível efeito neuroprotetor do AF materno suplementado durante a fase pré-natal, pelo menos neste parâmetro neurotrófico e nesta estrutura cerebral, não persistiu na vida adulta da prole, podendo inclusive ser atribuído à ação da cetamina, uma vez que o AF materno (10 e 50 mg/kg) na prole tratada com salina, apesar de não ter demonstrado diferença estatística em relação ao grupo controle, demonstrou uma tendência em manter os níveis de NGF aumentados na vida tardia destes animais.

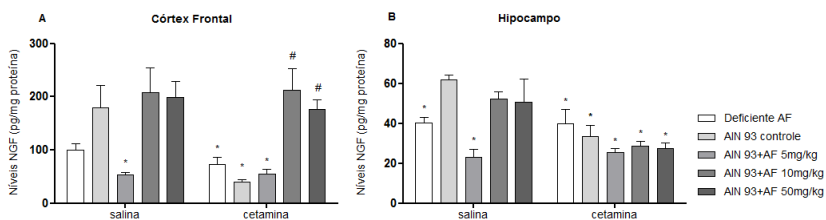


Figura 8: Análise dos níveis de NGF nas estruturas cerebrais: córtex frontal (painel 8A) e hipocampo (painel 8B), respectivamente, da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF, dieta controle e dietas suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg) durante a fase gestacional. N = 4-6. Dados são expressos como média \pm EPM. * $p \leq 0.05$ comparado ao grupo controle (dieta AIN 93 controle+salina); # $p \leq 0.01$ comparado ao grupo cetamina.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, pôde-se verificar um aumento nos níveis plasmáticos da citocina IL-4 nas ratas mães expostas às dietas suplementadas com AF nas três doses utilizadas (5, 10 e 50 mg/kg), o que sugere um possível efeito anti-inflamatório desta vitamina nas ratas mães. Em contraste, as mães submetidas à dieta deficiente em AF e à dieta controle mantiveram níveis semelhantes de IL-4, uma vez que estes grupos não apresentaram diferença estatística entre si. Para as citocinas pró-inflamatórias, observou-se que a dieta materna deficiente em AF foi capaz de elevar os níveis de IL-6 e TNF α , indicando que a deficiência de AF pré-natal pode refletir no aumento destes marcadores inflamatórios nas mães. Já os níveis plasmáticos de IL-6 nas ratas mães do grupo controle e nas mães suplementadas com AF 50 mg/kg, assim como os níveis de TNF α nas mães do grupo controle e suplementadas nas três doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg), foram significativamente reduzidos nestes animais, suportando a ideia do provável efeito protetor do AF durante a gravidez na resposta inflamatória materna.

Conforme demonstrado por Xu et al. (2007), ativadores inflamatórios e imunológicos, como o LPS são induzidos por eventos estressores, especialmente em períodos críticos como na fase gestacional, sendo capazes de ativar a microglia no SNC e estimular a produção de citocinas inflamatórias durante a gravidez. É sabido que o AF apresenta efeito anti-inflamatório por reduzir a liberação de citocinas a partir de células mononucleares de sangue periférico em indivíduos com HHcy (Holden et al., 2002). Feng et al. (2011) apontam que o AF inibiu acentuadamente a produção excessiva de mediadores inflamatórios (IL-1 β e TNF α) nos macrófagos induzida pelo LPS via inibição de proteínas-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e do fator nuclear-kappa B (NFkB). Do mesmo modo, Zhao e colegas (2013) verificaram que a suplementação materna com esta vitamina (0,6, 3 e 15 mg/kg) atenuou o efeito do LPS, inibindo as citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , IL-6 e TNF α placentárias. Ainda, a suplementação de AF durante a gestação significativamente reduziu os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF α no soro e fluido amniótico materno. Com efeito, estes resultados sugerem uma ação protetora do AF na toxicidade induzida pelo LPS que pode, pelo menos parcialmente, ser atribuída aos efeitos anti-inflamatórios desta vitamina (Zhao et al., 2013).

Em geral, os dados acima estão em conformidade com os resultados do presente estudo, uma vez que foi observada uma provável

ação protetora do AF, representada pelo aumento dos níveis plasmáticos de IL-4 e pela redução dos níveis de IL-6 e TNF α nas ratas mães do grupo controle e suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg). Já a dieta materna deficiente em AF aumentou os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF α), confirmando que a deficiência prolongada desta vitamina na fase gestacional é capaz de alterar marcadores inflamatórios maternos. Ademais, o possível efeito benéfico do AF nas ratas mães pode ser atribuído a sua ação anti-inflamatória, conforme também relatado por Zhao et al. (2013) e Feng et al. (2011).

Estudos em animais demonstraram que a HHcy na gestação, geralmente devido à deficiência de AF materna, pode comprometer a função placentária através da ativação de fatores de coagulação, liberação de mediadores inflamatórios, lesão endotelial e apoptose, sendo capaz de aumentar o risco de esquizofrenia na vida tardia da prole, comprometendo inclusive o fornecimento de oxigênio para o feto (Hofmann et al., 1998; Kamudhamas et al., 2004). Além disso, a hipóxia fetal tem sido implicada na patogênese deste transtorno e os níveis elevados de Hcy estão associados a várias complicações obstétricas relacionadas à esquizofrenia na prole (Dalman et al., 2001; Cannon et al., 2002; Brown et al., 2007). Similarmente, Canever e colegas (2017) verificaram que a deficiência materna de AF foi capaz de aumentar os níveis plasmáticos de Hcy, enquanto a suplementação de AF (5, 10 e 50 mg/kg) nas ratas mães preveniu significativamente o aumento deste aminoácido.

O desenvolvimento e crescimento da placenta durante a gestação é determinado pela condição nutricional materna e tem um papel crucial na saúde do feto, uma vez que a placenta corresponde ao elo entre as circulações materno-fetal (Dhobale, 2014). Além disso, deficiências nutricionais maternas estão associadas à ativação microglial, podendo contribuir para a patogênese de transtornos neurodesenvolvimentais na vida jovem-tardia da prole, como a esquizofrenia, pelo fato de ambos os fatores aumentarem a liberação de citocinas pró-inflamatórias e contribuir para um estado pró-inflamatório duradouro. Em adição, as alterações imunológicas influenciam os sistemas dopaminérgicos e serotoninérgicos, bem como a neurotransmissão noradrenérgica e glutamatérgica, afetando os sistemas neurais envolvidos na fisiopatologia deste transtorno (Müller et al., 2015).

O presente estudo também avaliou o efeito das dietas maternas deficiente em AF, dieta controle e dietas suplementadas com diferentes doses de AF (5, 10 e 50 mg/kg) em parâmetros inflamatórios nas estruturas cerebrais, córtex frontal e hipocampo, da prole adulta

submetida ao modelo animal de esquizofrenia. Os resultados apontaram, no córtex frontal, níveis aumentados de IL-4 nos animais tratados com salina e cujas mães foram submetidas a dieta suplementada com AF (5 e 10 mg/kg). A prole adulta tratada com cetamina, cujas mães foram expostas à dieta suplementada com AF (50 mg/kg) também mostrou um aumento significativo nos níveis de IL-4, o que indica uma resposta anti-inflamatória persistente do AF apenas na dose mais elevada (50 mg/kg) nos animais adultos submetidos ao modelo de esquizofrenia. Isso apóia a hipótese de que o AF pode ter efeito tanto na redução do risco de transtornos psiquiátricos, como na melhora do desenvolvimento imune-fetal (Marques et al., 2013). Em contraste, no hipocampo verificou-se que os animais tratados com salina ou cetamina, cujas mães foram suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg) apresentaram níveis diminuídos de IL-4, sugerindo que AF materno não teve uma ação persistente na vida tardia da prole. Este achado também pode ser atribuído ao efeito predominante da cetamina na prole adulta, a qual isoladamente (grupo cetamina) foi capaz de reduzir os níveis de IL-4, refletindo um provável efeito pró-inflamatório deste anestésico no modelo animal de esquizofrenia. Diante disso, evidências suportam uma relação importante entre esquizofrenia e inflamação (Meyer et al., 2011; Na et al., 2014; Watkins e Andrews, 2016).

Além disso, a IL-4 destaca-se como uma citocina cujo papel ainda não está bem estabelecido, porém é sabido que pode alternativamente ativar a microglia, a qual está envolvida no crescimento de neuritos e processos de reparo depois de um dano no SNC (Fenn et al., 2014). Tudo isso poderia, pelo menos em parte, contribuir para o entendimento da redução dos níveis de IL-4 no hipocampo da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, uma vez que a ação desta citocina permanece questionável. De qualquer forma, estudo conduzido por Field et al. (2006) mostrou que a suplementação de AF em ratos com 11 e 24 meses proporcionou um aumento nos níveis de IL-4, reforçando seu efeito no envelhecimento. Diante disso, observam-se contradições sobre a IL-4, o que sugere a necessidade de mais estudos elucidar a relação desta citocina com a esquizofrenia, além de esclarecimentos sobre a sua ação na resposta inflamatória.

A inflamação é um componente necessário à manutenção da homeostase corporal. Assim, alguns fármacos podem interagir com a resposta inflamatória de uma maneira positiva, negativa ou "dupla". Dentre estas substâncias, a cetamina parece ter um efeito significativo

na regulação da inflamação, uma vez que este antagonista do receptor NMDA atua em diferentes níveis da resposta imune, via recrutamento de células inflamatórias, produção de citocinas e na regulação de mediadores inflamatórios. O efeito resultante dessas interações confere à cetamina propriedades imunomoduladoras por limitar a exacerbação da inflamação sistêmica. Nesse sentido, a ação deste anestésico na resposta imune permanece conflitante, pois dependendo da dose utilizada, a droga pode ativar ou inibir marcadores inflamatórios (Loix et al., 2011). Deste modo, Cao et al (2014) indicam que a cetamina (80 mg/kg) pode inibir a função cognitiva, tem efeitos tóxicos sobre os neurônios hipocâmpais e ainda é capaz de inibir a função imune em ratos jovens. Esses achados, pelo menos parcialmente, são consistentes aos resultados do presente estudo, uma vez a cetamina demonstrou uma resposta pró-inflamatória, ao reduzir os níveis de IL-4 no hipocampo da prole adulta.

Em relação às citocinas pró-inflamatórias, verificou-se uma diminuição significativa nos níveis de IL-6 e TNF α no córtex frontal de animais tratados com salina, cujas mães foram submetidas à dieta controle durante a fase gestacional (grupo controle). Já a prole adulta que recebeu salina, cujas mães foram expostas à dieta deficiente em AF mostrou um aumento nos níveis de ambas as citocinas pró-inflamatórias, comprovando que a deficiência materna desta vitamina foi capaz de impactar na resposta inflamatória na vida tardia dos animais. No hipocampo, em especial, as ratas mães que receberam dietas suplementadas com AF (5, 10 e 50 mg/kg), cuja prole foi tratada com salina ou cetamina, ambos os animais apresentaram uma redução significativa nos níveis de IL-6 e TNF α . Estes resultados demonstraram um efeito protetor duradouro do AF nestes parâmetros inflamatórios, conforme também observado anteriormente nas ratas mães, as quais foram suplementadas com AF durante a fase gestacional, embora nas mães tenham sido avaliados os níveis plasmáticos de citocinas e na prole avaliaram-se os níveis cerebrais.

Em geral, esses resultados confirmam que a alimentação materno-fetal adequada em micronutrientes, em particular com AF, é necessária para o desenvolvimento da resposta imunológica fetal e neonatal e para a proliferação de células imunes (Marques et al., 2013). Ainda, a cetamina administrada na prole adulta de mães expostas à dieta deficiente em AF, foi capaz de reduzir os níveis de IL-6 no córtex frontal e hipocampo dos animais. Esses achados retratam que possivelmente a deficiência materna de AF não teve uma ação duradoura na vida tardia da prole, uma vez que reduziu esta citocina pró-inflamatória. Assim, a administração de cetamina na vida adulta

pode ter apresentado uma ação predominante para a redução dos níveis de IL-6 nestes animais, apoiando a hipótese de que este anestésico parece interagir com a resposta inflamatória de uma maneira positiva, negativa ou "dupla" (Loix et al., 2011).

Sabe-se que as citocinas, particularmente a IL-6 e o TNF α , estão aumentadas na esquizofrenia, assim como os níveis de Hcy geralmente associado à deficiência materna de AF, os quais poderiam promover respostas inflamatórias capazes de modular o genótipo da enzima metileno-tetrahidrofolato redutase (MTHFR) na prole adulta (Feng et al., 2009). Diante disso, García-Miss et al. (2010) observaram que o genótipo da MTHFR não foi um fator de risco determinante para o desenvolvimento da esquizofrenia, entretanto, no presente estudo esta enzima não foi avaliada. De qualquer forma, além do genótipo, fatores ambientais como o consumo inadequado de AF a longo prazo durante a gravidez (Roy et al., 2012; Amani et al., 2006), pode ter um papel crucial na expressão dos efeitos da MTHFR C667T, especialmente quando a via metabólica do folato está comprometida. Está bem descrito que a atividade enzimática da MTHFR é regulada pelos níveis de 5-metil tetrahidrofolato circulantes (Friso e Shoi, 2005), assim, a deficiência de vitaminas do complexo B pode prejudicar o metabolismo de AF e, conseqüentemente, aumentar os níveis de Hcy (Canever et al., 2017). Ademais, uma redução dos níveis de SAM compromete a síntese e a manutenção do DNA e neurotransmissores, desencadeando polimorfismos capazes de contribuir para a patogênese da esquizofrenia ou para a manifestação de seus sintomas em algum momento da vida (García-Miss et al., 2010).

A esquizofrenia tem origem multifatorial e a interação entre fatores genéticos e ambientais representa um grande impacto na sua etiologia (Brown, 2011; Shorter e Miller, 2015). Desse modo, a deficiência de AF durante a gestação e o aumento dos níveis de Hcy materno é capaz de modular alterações nos padrões epigenéticos (metilação de DNA, modificações de histonas), levar a anormalidades na neurotransmissão e induzir estresse oxidativo, o qual pode interferir no ciclo de um carbono, desencadear respostas inflamatórias e alterar fatores neurotróficos na vida tardia da prole, contribuindo, conseqüentemente, para o desenvolvimento da esquizofrenia (Krebs et al., 2009; Brown, 2011; Shorter e Miller, 2015; Zugno et al., 2016). De fato, estudos têm especulado a relação entre o metabolismo do AF e o transtorno, suportando a hipótese de que a deficiência pré-natal desta

vitamina pode ser um fator de risco para a esquizofrenia (Gunawardana et al., 2011; Canever et al., 2017).

Além de influenciar a resposta inflamatória, o desequilíbrio de micronutrientes durante a gestação pode comprometer os fatores neurotróficos na vida tardia da prole. Devido tais considerações, o presente estudo investigou o efeito das dietas maternas (controle, dietas suplementadas com AF nas doses de 5, 10 e 50 mg/kg e dieta deficiente em AF) sobre os níveis de BDNF e NGF, no córtex frontal e hipocampo, da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia induzida pela administração de cetamina. Dhobale (2014) sugere que alterações na expressão e nos níveis de neurotrofinas durante a gestação podem estar relacionadas à sua interação com os micronutrientes (AF, vitamina B12 e DHA). Estudos em animais demonstraram níveis e expressão de BDNF e NGF alterados no cérebro da prole adulta, devido uma dieta materna desequilibrada em micronutrientes (Sable et al., 2011, 2012, 2014).

Os achados acima confirmam os dados da presente pesquisa, uma vez que no hipocampo, ambas as proles tratadas com salina ou cetamina, cujas mães receberam dieta deficiente em AF apresentaram níveis diminuídos de BDNF, o qual tem uma importante ação no neurodesenvolvimento e na plasticidade neuronal. Com efeito, estes resultados reforçam que uma nutrição inadequada desde o início da vida pode predispor o aparecimento de doenças cardiovasculares, diabetes, além de transtornos neurodesenvolvimentais nos filhos, como a esquizofrenia (Dhobale, 2014). Em adição, estudo conduzido por Goulart et al. (2010) demonstrou que a cetamina (4, 8 e 20 mg/kg) impediu o aumento do BDNF hipocampal e foi capaz de comprometer a consolidação da memória de longo prazo no teste de reconhecimento de objetos. Tais resultados sugerem que os efeitos amnésicos da cetamina podem ser, pelo menos parcialmente, mediados por uma influência na sinalização do BDNF no hipocampo (Goulart et al., 2010). Ainda, no presente estudo, a prole adulta que recebeu cetamina (grupo cetamina) apresentou uma redução nos níveis de BDNF no córtex frontal, corroborando estudo realizado por Zugno et al. (2015), em que a cetamina reduziu os níveis de BDNF no córtex pré-frontal 1 hora (h) e 24h após a última administração da droga. Neste sentido, Favalli et al. (2012) concluíram que os níveis desta neurotrofina estão alterados em pacientes esquizofrênicos, o que pode explicar o resultado obtido nos animais do grupo cetamina (modelo de esquizofrenia) em ambos os estudos acima relatados. Por outro lado, Autry e colaboradores (2011) demonstraram que a cetamina foi capaz de aumentar os níveis de BDNF

no hipocampo de animais 30 min após a administração, mas não após 24h, contrariando em parte, os achados acima.

A prole adulta tratada com salina ou cetamina, cujas mães receberam dieta suplementada com AF (10 e 50 mg/kg) apresentaram níveis aumentados de BDNF no córtex frontal. Sabe-se que a nutrição materna, particularmente o folato, a vitamina B12 e os PUFAs (DHA), são os principais determinantes do metabolismo de um carbono, o que sugere que estes compostos encontram-se no centro da programação intrauterina de doenças na vida adulta, devido aos seus efeitos protetores (Dhobale, 2017). Com base nisso, a pesquisa atual confirmou a ação duradoura e neuroprotetora do AF na vida tardia dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia, uma vez que a dieta materna suplementada com AF foi capaz de prevenir o efeito da cetamina sobre os níveis de BDNF na prole adulta, ao menos nesta estrutura cerebral.

Ao contrário do esperado, de modo geral no hipocampo, ambas as proles que receberam salina ou cetamina e suas mães dietas suplementadas com AF nas três doses (5, 10 e 50 mg/kg), em especial 10 mg/kg, apontaram uma redução nos níveis de BDNF quando comparado ao grupo controle. Neste caso, o efeito protetor do AF materno não persistiu na vida adulta da prole, o que pode estar relacionado à estrutura cerebral avaliada na prole ou a alguma alteração no metabolismo do AF nas ratas mães. Sable e colaboradores (2012) verificaram que os níveis de AF foram relativamente baixos na prole de mães suplementadas com AF (2 e 8 mg/kg) durante a gestação, ambas na ausência e presença de vitamina B12, sugerindo que os níveis mais elevados de AF materno (8 mg/kg), possam ter sido excessivos e, assim, ter desencadeado um desequilíbrio no ciclo de um carbono, tornando o AF inativo e resultando na deficiência desta vitamina. Em consequência, isto poderia ter levado à diminuição dos níveis de AF materno e afetado a transferência de folato para a prole, impactando na redução dos níveis de neurotrofinas cerebrais. Na presente pesquisa, não foram avaliados os níveis de AF materno e na prole e também não foi suplementada ou dosada a vitamina B12 durante a gestação das ratas. Todavia, os resultados obtidos, ao menos em parte, poderiam estar relacionados à explicação acima, uma vez que o AF materno (10 e 50 mg/kg) induziu uma ação diferente do esperado na prole e a cetamina isolada (grupo cetamina) não reduziu os níveis de BDNF no hipocampo dos animais.

Além disso, Sable et al. (2013) sugerem que os efeitos da suplementação nutricional materna são determinados não somente pelo tempo e dose do nutriente suplementado, mas também pela combinação

de diferentes micronutrientes (AF, vitamina B12 e DHA), os quais atuam em conjunto. Estes autores concluíram que a dieta materna e pós-natal desequilibrada em micronutrientes (deficiente ou excesso de AF e vitamina B12) reduziu os níveis de DHA e BDNF no córtex e hipocampo da prole adulta. Estas alterações não foram revertidas pela dieta controle no período pós-natal, tendo contribuído inclusive para o declínio cognitivo na prole adulta. Estes achados comprovam, portanto, que agentes estressores durante a fase neurodesenvolvimental são capazes de afetar a expressão gênica via alterações epigenéticas, em particular, mudanças nos padrões de metilação do DNA, influenciando genes relacionados ao BDNF, os quais podem levar a fenótipos psiquiátricos através de manifestações comportamentais alteradas na vida jovem-adulta da prole (Niculescu et al., 2006)

Em relação ao níveis de NGF, em ambas as estruturas cerebrais, a prole adulta tratada com salina ou cetamina, cujas mães foram suplementadas com AF 5 mg/kg apresentou uma redução nos níveis desta neurotrofina. No córtex frontal, a administração de cetamina na vida adulta da prole associada à deficiência materna de AF e a dieta controle (grupo cetamina) durante a fase gestacional, levou à redução dos níveis de NGF, sugerindo neste caso, uma possível ação predominante da cetamina na vida tardia dos animais. Pesquisas clínicas e pré-clínicas têm relatado que o uso da cetamina está associado a alterações nos níveis séricos de BDNF e NGF, embora os resultados diferem entre os estudos. Ke et al. (2014) verificaram níveis séricos diminuídos de BDNF e NGF em pacientes dependentes de cetamina quando comparado aos indivíduos controles e correlacionaram a redução destas neurotrofinas ao uso crônico da cetamina, bem como à manifestação de sintomas positivos e negativos. Estudo conduzido com animais demonstrou um aumento nos níveis de BDNF no lobo frontal e cerebelo de ratos após administração de cetamina (30 mg/kg), enquanto os níveis de NGF aumentaram no cerebelo, mas diminuíram no estriado de animais induzidos ao modelo de esquizofrenia (Becker et al., 2008). Outra pesquisa realizada com ratos filhotes mostrou que a exposição repetida de cetamina (20 mg/kg) levou à neurodegeneração acelerada e ao aumento dos níveis de BDNF nos tecidos cerebrais em desenvolvimento (Ibla et al., 2009). Diante da discrepância nos dados apresentados, os achados do presente estudo podem tanto divergir como ser consistente aos resultados acima, uma vez que os efeitos da cetamina nas neurotrofinas permanecem conflitantes.

Nesta pesquisa, a prole adulta tratada com cetamina, cujas mães foram expostas à suplementação com AF (10 e 50 mg/kg) demonstrou

um aumento nos níveis de NGF no córtex frontal, o que indica uma ação persistente do AF sobre a cetamina nesta região cerebral. Tal achado assemelha-se, ao menos parcialmente, aos dados obtidos por Sable et al. (2011), os quais observaram que a suplementação materna de DHA associada a duas dietas (deficiente em vitamina B12, adequada em AF e deficiente em vitamina B12 com excesso de AF) foi capaz de aumentar os níveis cerebrais de NGF nos filhotes, sugerindo que um aporte adequado de AF durante a gravidez pode contribuir para a manutenção dos fatores neurotróficos, como NGF.

Em contraste, no hipocampo, observou-se uma redução nos níveis de NGF na prole adulta tratada com salina, cujas mães receberam dieta deficiente em AF e dieta suplementada com AF (5 mg/kg). A deficiência materna de AF tem sido relacionada às doenças neurodegenerativas e aos transtornos neurodesenvolvimentais. De fato, estudo conduzido por Eckart et al. (2013) mostrou que a deficiência de AF foi capaz de afetar os níveis de NGF no córtex frontal, amígdala e hipocampo de ratos idosos, contribuindo para um fenótipo tipo-ansioso-depressivo, bem como para a neurodegeneração seletiva hipocampal.

Ademais, no presente estudo, a cetamina administrada nos animais adultos, cujas mães foram submetidas à dieta deficiente em AF, à dieta controle (grupo cetamina) e às dietas suplementadas com AF nas três doses (5, 10 e 50 mg/kg) foi capaz de reduzir os níveis de NGF no hipocampo, refletindo uma provável ação predominante da cetamina na prole adulta. Este resultado também indica que o efeito neuroprotetor do AF materno, pelo menos neste parâmetro neurotrófico e nesta estrutura cerebral, não persistiu na vida tardia da prole, podendo ser atribuído mais diretamente à ação da cetamina, uma vez que o AF materno (10 e 50 mg/kg) na prole tratada com salina, demonstrou uma tendência em manter os níveis de NGF aumentados na vida adulta dos animais. Ricci e colegas (2011) observaram um aumento nos níveis séricos de BDNF em 17 usuários de cetamina crônica em comparação a 11 indivíduos saudáveis, porém os níveis de NGF não diferiram entre os grupos. Uma vez que o BDNF e o NGF desempenham um importante papel no desenvolvimento dos neurônios e nas funções cognitivas, torna-se intrigante hipotetizar que os níveis séricos reduzidos destas neurotrofinas em pacientes dependentes de cetamina possa desempenhar uma ação crucial nos prejuízos funcionais relacionados ao uso deste anestésico (Eckart et al., 2013), já que a cetamina induz um estado psicótico transitório e reversível, inclusive em pessoas saudáveis (Javitt et al., 2000; Mechri et al., 2001).

Os mecanismos pelos quais a cetamina influencia os níveis de neurotrofinas têm sido investigados, especialmente o BDNF. Um estudo supõe que o bloqueio do receptor NMDA pela cetamina e a ativação dos receptores AMPA intermedeiam o aumento dos níveis de BDNF (Yang et al., 2012). Ao mesmo tempo, pesquisas (Hansen et al., 2004; Semba et al., 2006; Snigdha et al., 2011) relatam que os receptores NMDA podem inibir a síntese de BDNF via atividade deprimida da proteína quinase regulada por sinais extracelulares (ERK 1/2) e por atenuar os níveis da proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPc fosforilado (CREB) (Hansen et al., 2004). Assim, a modulação dos níveis de BDNF desencadeada pelo bloqueio do receptor NMDA através da cetamina, pode ser uma via bidirecional sob diferentes circunstâncias (Eckart et al., 2013).

Em resumo, a insuficiência, o desequilíbrio ou o excesso de micronutrientes durante a gravidez pode comprometer o desenvolvimento e a função cerebral. Evidências especulam à influência dos micronutrientes, em particular DHA, em pacientes jovens esquizofrênicos no início da psicose, confirmando a hipótese neurodesenvolvimental deste transtorno (Kale et al., 2008, 2010). Sabe-se que a deficiência materna de vitaminas do complexo B, especialmente o AF, interfere no ciclo de um carbono, reduzindo a doação de grupos metil aos fosfolípidos de membrana, o que contribui para a diminuição dos níveis de DHA (Kale et al., 2008, 2010), além de comprometer a metilação do DNA e a síntese de neurotransmissores. Em conjunto, a nutrição pré-natal inadequada pode predispor o aparecimento de transtornos psiquiátricos como a esquizofrenia na prole, a qual se torna aparente após o nascimento, mais precisamente na idade jovem-adulta, porém têm sua origem durante a vida fetal mediante fatores estressores maternos (Rehn et al., 2002; Cannon et al., 2008; Roy et al., 2012).

Adicionalmente, Sable et al. (2011, 2012, 2013) apontaram os efeitos adversos de uma dieta materna desequilibrada em micronutrientes nos fatores neurotróficos (BDNF e NGF) na prole ao nascer e aos 21 dias de vida. Nestes estudos, a prole proveniente de mães expostas a diferentes dietas durante a gestação foi acompanhada desde o nascimento até a idade adulta e os achados mostraram que o aporte nutricional inadequado foi capaz de afetar a composição cerebral de PUFAs (DHA), bem como os níveis de neurotrofinas no córtex e hipocampo, regiões que desempenham um papel vital no armazenamento e processamento de informações e são cruciais para os processos cognitivos. Estudo realizado com animais apontou que as

dietas maternas deficientes em vitaminas do complexo B levam ao acúmulo de Hcy e níveis reduzidos de DHA plasmático (Van Wijk et al., 2012). Diante disso, além dos efeitos protetores do AF, a vitamina B12 tem seu valor por desempenhar um papel na regulação do equilíbrio da rede de citocinas e fatores de crescimento no SNC de animais, podendo também estar associada aos prejuízos na prole quando deficiente durante a gestação (Scalabrino et al., 2003).

Do mesmo modo, estudos em humanos confirmam a relação entre os micronutrientes (AF e vitamina B12) maternos alterados, redução de DHA, aumento dos níveis de Hcy e estresse oxidativo nos filhos (Dhobale et al., 2011, 2012a,b). Assim se enfatiza a hipótese de que o aumento do estresse oxidativo e a diminuição de DHA pode alterar os níveis e a expressão de neurotrofinas no cérebro materno-fetal, uma vez que o equilíbrio entre neurotrofinas e estresse oxidativo é fundamental para o crescimento e desenvolvimento normal da prole adulta (Dhobale et al., 2014).

Com efeito, Roy et al. (2012) supõem que a desarmonia nos micronutrientes, inclusive alterações na ingestão ou metabolismo do AF e vitamina B12 é capaz de aumentar o estresse oxidativo devido a geração de radicais livres que interagem com PUFAs das membranas celulares ou lipoproteínas, formando peróxido de lipídios (Roy et al., 2012). De modo geral, as vitaminas do complexo B podem exercer um efeito neuroprotetor através da modulação do estresse oxidativo induzido pela Hcy no cérebro (Boldyrev e Jonhson, 2007; Zhang et al., 2013). Adicionalmente, a deficiência de AF, vitamina B12 e ômega-3 na gestação pode induzir o estresse oxidativo, levando a diminuição dos níveis de PUFAs cerebrais na prole ao nascer e, conseqüentemente, contribuindo para o desenvolvimento de transtornos na vida tardia (Roy et al., 2012; Sable et al., 2012). Por fim, tomados em conjunto os resultados da presente pesquisa, pode-se salientar que a ativação microglial associada ao o estresse oxidativo interferem diretamente em todo o processo de neurodesenvolvimento desde a gestação até a vida adulta da prole, o que suporta a hipótese de que o uso de micronutrientes maternos, em particular AF, pode ser eficaz na prevenção da esquizofrenia por seu efeito antioxidante, anti-inflamatório (Canever et al., 2017) e protetor nos fatores neurotróficos (Pandya et al., 2013).

6 CONCLUSÃO

Como conclusão este estudo retrata a importância da suplementação de AF na fase gestacional para os níveis plasmáticos de IL-4, IL-6 e TNF α , uma vez que esta vitamina mostrou ser uma alternativa eficaz na resposta inflamatória das ratas mães. Em geral, o AF apresentou uma ação persistente na vida tardia da prole submetida ao modelo animal de esquizofrenia, particularmente por reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF α) no hipocampo dos animais. A suplementação materna com AF (10 e 50 mg/kg) também demonstrou um efeito duradouro e neuroprotetor nos níveis de BDNF e NGF, em especial, no córtex frontal da prole adulta. Desta forma, deve-se mencionar o papel crucial da suplementação de AF durante a gestação e a lactação, não somente para a prole, mas para a saúde materna. Tudo isso se deve ao considerável efeito neuroprotetor desta vitamina na função imune, nos fatores neurotróficos e sua provável capacidade de prevenir transtornos neurodesenvolvimentais na prole.

Em geral, os resultados deste estudo contribuem para a compreensão da patogênese da esquizofrenia, além de reforçar o papel crucial do AF materno como uma abordagem protetora para o transtorno na vida tardia da prole. Ainda, salienta-se a necessidade de mais estudos esclarecerem a ação da cetamina sobre parâmetros inflamatórios e nos fatores neurotróficos. Por fim, torna-se essencial avaliar o envolvimento de outros componentes relacionados a via metabólica do AF, bem como investigar os padrões de metilação do DNA, pois sabe-se que os mecanismos epigenéticos estão diretamente envolvidos em várias condições psiquiátricas, inclusive na esquizofrenia, enfatizando a continuidade desta pesquisa.

REFÊRENCIAS

Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000; 406(6797):782-7.

Amani R. Is dietary pattern of schizophrenia patients different from healthy subjects? *BioMed Central Psychiatry* 2006; 7:15–9.

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

Apa. “Diagnostic and Statistical Manual of Mental Diseases”. Fourth edition (DSM-IV). Washington, DC: APA; 1994.

Autry JM, Rubin JE, Pietrini SD, Winters DL, Robia SL, Thomas DD. Oligomeric interactions of sarcolipin and the Ca-ATPase. *J Biol Chem*. 2011; 9;286(36):31697-706.

Avitsur R, Yirmiya R. The immunobiology of sexual behavior: gender differences in the suppression of sexual activity during illness. *Pharmacol Biochem Behav*. 1999; 64(4):787-96.

Ashdown, R.R. Functional, developmental and clinical anatomy of the bovine penis and prepuce. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*. 2006.

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

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

Barker, V., Middleton, G., Davey, F., & Davies, A. TNF α contribute to the death of NGF-dependent neurons during development. *Nature Neuroscience*. 2001; 4, 1194–1198.

Beattie E, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan J, Ha B, Von Zastrow M, Beattie M, Malenka R. Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science* 2002; 295: 2282–5.

- Becker A, Grecksch G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004; 28(8):1267-77.
- Becker A, Grecksch G, Schwegler H, Roskoden T. Expression of mRNA of neurotrophic factors and their receptors are significantly altered after subchronic ketamine treatment. *Med Chem*. 2008; 4(3):256-63.
- Berry A, Bindocci E, Alleva E. NGF, brain and behavioral plasticity. *NeuralPlast* 2012; 784040.
- Bitanhirwe BKY, Woo TUW. Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neurosci Biobehav Rev* 2011; 35:(3) 878-93.
- Boldyrev AA, Johnson P. Homocysteine and its derivatives as possible modulators of neuronal and non-neuronal cell glutamate receptors in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2007; 11(2):219–28.
- Bottiglieri T. Folate, vitamin B12, and neuropsychiatric disorders. *Nutr Rev*. 1996; 54(12):382-90.
- Bottiglieri T. Homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29(7):1103-12.
- Brown AS, Blottiglieri T, Schaefer C, Quesenberry CPJr, Liu L, Bresnahan M, Susser ES. Elevated Prenatal Homocysteine Levels as a Risk Factor for Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2007; 64:31-9.
- Brown CJ, Cheok CF, Verma CS, Lane DP. Reactivation of p53: from peptides to small molecules. *Trends Pharmacol Sci*. 2011; 32(1):53-62.
- Budni J, Romero A, Molz S, Martín-de-Saavedra MD, Egea J, Del Barrio L, Tasca CI, Rodrigues AL, López MG.. Neurotoxicity induced by dexamethasone in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line can be prevented by folic acid. *Neuroscience*. 2011; 190:346-53.
- Butler MP, O'Connor JJ, Moynagh PN. Dissection of tumor-necrosis factor- α inhibition of long-term potentiation (LTP) reveals A p38

mitogenactivated protein kinase-dependent mechanism which maps to early-but not late-phase LTP. *Neuroscience* 2004; 124: 319–26.

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

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

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

Cannon M, Jones PB, Murray RM. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. *Am J Psychiatry*. 2002; 159:1080-1092.

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

Cao YL, Zhang W, Ai YQ, Zhang WX, Li Y. Effect of propofol and ketamine anesthesia on cognitive function and immune function in young rats. *AsianPac J TropMed*. 2014; 7(5):407-11.

Chien MF, Huang CC, Kusano T, Endo G. Facilitates for transcription and mobilization of an exon-less bacterial group II intron nested in transposon TnMER11. *Gene*. 2008; 31;408(1-2):164-71.

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

Conner JM, Franks KM, Titterness AK, Russell K, Merrill DA, Christie BR, Sejnowski TJ, Tuszynski MH. NGF is essential for hippocampal plasticity and learning. *J Neurosci* 2009; 29(35): 10883–9.

Cunha C, Brambilla R, Thomas K. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci* 2010; 9(3):1.

Dalman C, Thomas HV, David AS, Gentz J, Lewis G, Allebeck P. Signs of asphyxia at birth and risk of schizophrenia: population-based case-control study. *Br J Psychiatry*. 2001; 179:403-408.

Dammann O, Kuban KCK, Leviton A. Perinatal infection, fetal inflammatory response, white matter damage and cognitive limitation in children born preterm. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2002; 8: 46–50.

Dean B. Understanding the role of inflammatory-related pathways in the pathophysiology and treatment of psychiatric disorders: evidence from human peripheral studies and CNS studies. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2011;14(7):997e1012.

Drexhage RC, Hoogenboezem TA, Cohen D, Versnel MA, Nolen WA, van Beveren NJ, et al. An activated set point of T-cell and monocyte inflammatory networks in recent-onset schizophrenia patients involves both pro- and anti-inflammatory forces. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2011;14(6):746e55.

Dhobale M, Chavan P, Mehendale S, Pisal H, Joshi S. WITHDRAWN: Maternal cortisol and cord brain derived neurotrophic factor in preterm pregnancy: implications for fetal neurodevelopment. *Int J Dev Neurosci*. 2012a.

Dhobale M1, Mehendale S, Pisal H, D'Souza V, Joshi S. Association of brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor in pregnancy. *Neuroscience*. 2012b; 216:31-7.

Dhobale M, Mehendale S, Pisal H, Nimbargi V, Joshi S. Reduced maternal and cord nerve growth factor levels in preterm deliveries. *Int J Dev Neurosci*. 2012; 30(2):99-103.

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

Dhobale M. Neurotrophic Factors and Maternal Nutrition During Pregnancy. *Vitam Horm.* 2017; 104:343-366.

Eckart S, Hörtnagl H, Kronenberg G, Gertz K, Hörster H, Endres M, Hellweg R. Reduced nerve growth factor levels in stress-related brain regions of folate-deficient mice. *Neuroscience.* 2013;245:129-35

Feng LG, Song ZW, Xin F, Hu J. Association of plasma homocysteine and methylenetetrahydrofolatereductase C677T gene variant with schizophrenia: a Chinese Han population-based case-control study. *Psychiatry Research.* 2009; 168:205–8.

Feng M, Zhang Z, Zhang F, Ge Y, Loy LY, Vellaisamy K, Guo W, Chin PL, King NK, Ang BT, Guan C. iSyNCC: an intelligent system for patient monitoring & clinical decision support in Neuro-Critical-Care. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2011; 2011:6426-9.

Fenn AM, Hall JC, Gensel JC, Popovich PG, Godbout JP. IL-4 signaling drives a unique arginase+/IL-1 β + microglia phenotype and recruits macrophages to the inflammatory CNS: consequences of age-related deficits in IL-4R α after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci.* 2014; 34(26):8904-17.

Field CJ, Van Aerde A, Drager KL, Goruk S, Basu T. Dietary folate improves age-related decreases in lymphocyte function. *J Nutr Biochem.* 2006; 17(1):37-44.

Francesconi LP, Ceresér KM, Mascarenhas R, Stertz L, Gama CS, Belmonte-de- Abreu P. Increased annexin-V and decreased TNF-alpha serum levels in chronicmedicated patients with schizophrenia. *Neuroscience Letters* 2011; 502(3):143e6.

Friso S, Choi SW. Gene-nutrient interactions in one-carbon metabolism. *Current Drug Metabolism* 2005; 6:37–46.

Gama CS, Salvador M, Andrezza AC, Kapczinski F, Belmonte-de-Abreu PS. Elevatedserum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances inschizophrenia: a study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2006;30(3):512e5.

Gama CS, Andreazza AC, Kunz M, Berk M, Belmonte-de-Abreu PS, Kapczinski F. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Neuroscience Letters* 2007; 420(1):45e8.

Gama CS, Berk M, Andreazza AC, Kapczinski F, Belmonte-de-Abreu P. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor and thiobarbituric acid reactive substances in chronically medicated schizophrenic patients: a positive correlation. *Rev Bras Psiquiatria* 2008a;30(4):337e40.

Gama CS, Salvador M, Andreazza AC, Lobato MI, Berk M, Kapczinski F. Elevated serum thiobarbituric acid reactive substances in clinically symptomatic schizophrenic males. *Neuroscience Letters* 2008b; 433(3):270e3.

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

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

Golan H, Levav T, Mendelsohn A, Huleihel M. TNF alpha involvement in hippocampus development and function. *Cerebral Cortex* 2004; 14: 97–105.

Goulart BK, de Lima MN, de Farias CB, Reolon GK, Almeida VR, Quevedo J, Kapczinski F, Schroder N, Roesler R. Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience.* 2010; 167:969–973.

Gunawardana L, Smith GD, Zammit S, Whitley E, Gunnell D, Lewis S, Rasmussen F. Pre-conception inter-pregnancy interval and risk of schizophrenia. *Br J Psychiatry* 2011; 199: 338-9.

Hanisch D, Zimmer R, Lengauer T. ProML--the protein markup language for specification of protein sequences, structures and families. *In Silico Biol.* 2002; 2(3):313-24.

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

Hava G1, Vered L, Yael M, Mordechai H, Mahoud H. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. *Dev Psychobiol.* 2006; 48(2):162-8.

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

Hofmann MA, Kohl B, Zumbach MS, Borcea V, Bierhaus A, Henkels M, Amiral J, Schmidt AM, Fiehn W, Ziegler R, Wahl P, Nawroth PP. Hyperhomocyst(e)inemia and endothelial dysfunction in IDDM. *Diabetes Care.* 1998; 21:841-848.

Holden JE, Van Poppel AY, Thomas S. Antinociception from lateral hypothalamic stimulation may be mediated by NK(1) receptors in the A7 catecholamine cell group in rat. *Brain Res.* 2002; 953(1-2):195-204.

Hansen HH, Briem T, Dzierko M, Sifringer M, Voss A, Rzeski W, Zdzisinska B, Thor F, Heumann R, Stepulak A, Bittigau P, Ikonomidou C. Mechanisms leading to disseminated apoptosis following NMDA receptor blockade in the developing rat brain. *Neurobiol Dis.* 2004; 16:440-453.

Heberlein A, Muschler M, Frieling H, Behr M, Eberlein C, Wilhelm J, Großschl M, Kornhuber J, Bleich S, Hillemacher T. Epigenetic down regulation of nerve growth factor during alcohol withdrawal. *Addict Biol* 2013; 18(3):508-10.

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

Howie P, Nash L, Kurukulasuriya N, Bowman A. Children's event reports: factors affecting responses to repeated questions in vignette

scenarios and event recall interviews. *Br J Dev Psychol.* 2012 Nov;30(Pt 4):550-68.

Ibla JC, Hayashi H, Bajic D, Soriano SG. Prolonged exposure to ketamine increases brain derived neurotrophic factor levels in developing rat brains. *Curr Drug Saf.* 2009; 4:11–16.

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

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

Javitt DC, Shelley AM, Silipo G, Lieberman JA. Deficits in auditory and visual context-dependent processing in schizophrenia: defining the pattern. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57(12):1131-7.

Javitt DC, Silipo G, Cienfuegos A, Shelley AM, Bark N, Park M, Lindenmayer JP, Suckow R, Zukin SR. Adjunctive high-dose glycine in the treatment of schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2001; 4(4):385-91.

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

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

Kale A, Joshi S, Naphade N, et al. Opposite changes in predominantly docosahexaenoic acid (DHA) in cerebrospinalfluid and red blood cells from never-medicated first-episode psychotic patients. *Schizophr Res* 2008;98:295–301.

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

Kamudhamas A, Pang L, Smith SD, Sadovsky Y, Nelson DM (2004) Homocysteinethiolactone induces apoptosis in cultured human trophoblasts: a mechanism for homocysteine-mediated placental dysfunction? *Am J ObstetGynecol* 191:563-571.

Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, Pasquali MA, Quevedo J, Gama CS, Post R. A systemic toxicity index developed to assess peripheral changes in mood episodes. *Mol Psychiatry* 2010; 15(8):784-6.

Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, Moreira JC, de Bittencourt Pasquali MA, Fries GR, Quevedo J, Gama CS, Post R. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *J Psychiatr Res.* 2011; 45(2):156-61.

Kaur T, Cadenhead KS. Treatment implications of the schizophrenia prodrome. *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 2010; 4:97-121.

Ke X, Ding Y, Xu K, He H, Zhang M, Wang D, Deng X, Zhang X, Zhou C, Liu Y, Ning Y, Fan N. Serum brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor decreased in chronic ketamine abusers. *Drug Alcohol Depend.* 2014; 142:290-4.

Kim JM, Stewart R, Kim SW, Yang SJ, Shin IS, Yoon JS. Predictive value of folate, vitamin B12 and homocysteine levels in late-life depression. *Br J Psychiatry.* 2008; 192(4):268-74.

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

Kirkbride KC, Hong NH, French CL, Clark ES, Jerome WG, Weaver AM. Regulation of late endosomal/lysosomal maturation and trafficking by cortactin affects Golgi morphology. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2012; 69(9):625-43.

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

Krebs, M.O., Bellon, A., Mainguy, G., Jay, T.M., Frieling, H. One carbon metabolism and schizophrenia current challenges and future directions. *Trends Mol.Med.* 2009; 15 (12), 562e570.

Kunz M, Ceresér KM, Goi PD, Fries GR, Teixeira AL, Fernandes BS, et al. Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- α in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance. *Rev Bras Psiquiatr* 2011; 33(3):268e74.

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

Larson MJ, Good DA, Fair JE. The relationship between performance monitoring, satisfaction with life, and positive personality traits. *Biol Psychol.* 2010; 83(3):222-8.

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

Li M, Dai R, Du X, et al. Infusion of BDNF into the nucleus accumbens of aged rats improves cognition and structural synaptic plasticity through PI3K-ILK-Akt signaling. *Behav Brain Res* 2012; 231(1):146–53.

Lieberman JA. Is schizophrenia a neurodegenerative disorder? A clinical and neurobiological perspective. *Biol. Psychiatry* 1999; 46: 729–739.

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

Marques AH, O'Connor TG, Roth C, Susser E, Bjørke-Monsen AL. The influence of maternal prenatal and early childhood nutrition and maternal prenatal stress on offspring immune system development and neurodevelopmental disorders. *Front Neurosci.* 2013; 7:120.

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

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

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

McKay JA, Williams EA, Mathers JC. Folate and DNA methylation during in utero development and aging. *Biochem Soc Trans.* 2004; 32(Pt 6):1006-7.

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):53-9.

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

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

Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry* 2011;70(7):663-71.

Monji A1, Kato T, Kanba S. Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2009; 63(3):257-65.

Müller N1, Weidinger E1, Leitner B1, Schwarz MJ2. The role of inflammation in schizophrenia. *Front Neurosci.* 2015; 9:372.

Nakki R, Koistinaho J, Sharp FR, Sagar SM. Cerebellar toxicity of phencyclidine. *J. Neurosci.* 1995; 15: 2097–2108.

- Nakki R, Nickolenko J, Chang J, Sagar SM, Sharp FR. Haloperidol prevents ketamine- and phencyclidine-induced HSP70 protein expression but not microglial activation. *Exp. Neurol.* 1996; 137: 234–241.
- Na KS, Jung HY, Kim YK. The role of pro-inflammatory cytokines in the neuroinflammation and neurogenesis of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2014; 48:277-86.
- Najjar S, Pearlman DM, Devinsky O, Najjar A, Zagzag D. Neurovascular unit dysfunction with blood-brain barrier hyperpermeability contributes to major depressive disorder: a review of clinical and experimental evidence. *J Neuroinflammation.* 2013;10:142.
- Niculescu M, Craciunescu C, Zeisel S. Dietary choline deficiency alters global and gene-specific DNA methylation in the developing hippocampus of mouse fetal brains. *FASEB J* 2006;20(1):43–9.
- Nguyen N, Lee S, Lee Y, Lee KH, Ahn JY. Neuroprotection by NGF and BDNF against neurotoxin-exerted apoptotic death in neural stem cells are mediated through Trk receptors activating PI3- kinase and MAPK pathways. *Neurochem Res* 2009; 34(5):942–51.
- Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H. BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol. Histopathol* 2010; 25,237–58.
- Oliveira CMB, Sakata RK, TSA, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas e dor. *Rev Bras Anestesiologia.* 2011; 6: 255-265.
- Pandya CD, Howell KR, Pillai A. Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013; 46:214–23.
- Parletta N, Milte CM, Meyer BJ. Nutritional modulation of cognitive function and mental health. *J Nutr Biochem* 2013; 24(5):725-43.
- Peleg-Raibstein D, Luca E, Wolfrum C. Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood. *Behav Brain Res* 2012; 233(2):398-404.

Perez-Neri I, Ramirez-Bermudez J, Montes S, Rios C. Possible mechanisms of neurodegeneration in schizophrenia. *Neurochem. Res.* 2006; 31: 1279–1294.

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

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

Rapoport A, Shaheed J, Newman C, Rugg M, Steele R. Parental perceptions of forgoing artificial nutrition and hydration during end-of-life care. *Pediatrics.* 2013; 131(5):861-9.

Reddy RD, Yao JK. Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1996;45:43e9.

Rehn AE, Van Den Buuse M, Copolov D, et al. An animal model of chronic placental insufficiency: relevance to neurodevelopmental disorders including schizophrenia. *Neuroscience* 2004;129:381–91.

Réus GZ, Fries GR, Stertz L, Badawy M, Passos IC, Barichello T, , Kapczinski F, Quevedo J. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience* 2015; 300:141-54.

Ricci V, Martinotti G, Gelfo F, Tonioni F, Caltagirone C, Bria P, Angelucci F. Chronic ketamine use increases serum levels of brain-derived neurotrophic factor. *Psychopharmacology (Berl).* 2011; 215:143–148.

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

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

Sable P, Dangat K, Joshi A, et al. Maternal omega 3 fatty acid supplementation during pregnancy to a micronutrient-imbalanced diet protects postnatal reduction of brain neurotrophins in the rat offspring. *Neuroscience* 2012; 217:46–55.

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

Sable P, Kale A, Joshi A, Joshi S. Maternal micronutrient imbalance alters gene expression of BDNF, NGF, TrkB and CREB in the offspring brain at an adult age. *Int J Dev Neurosci*. 2014; 34:24-32.

Sarna LK, Wu N, Wang P, Hwang SY, Siow YL, O K. Folic acid supplementation attenuates high fat diet induced hepatic oxidative stress via regulation of NADPH oxidase. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012; 90(2):155-65.

Semba J, Wakuta M, Suhara T. Different effects of chronic phencyclidine on brain-derived neurotrophic factor in neonatal and adult rat brains. *Addict Biol*. 2006; 11:126–130.

Scalabrino G, Buccellato F, Veber D, Mutti E. New basis of the neurotrophic action of vitamin B12. *Clin Chem Lab Med* 2003;41(11):1435–7.

Shamsi FA, Chen Z, Liang J, Li K, Al-Rajhi AA, Chaudhry IA, Li M, Wu K. Analysis and comparison of proteomic profiles of tear fluid from human, cow, sheep, and camel eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 25; 52(12):9156-65.

Shea TB, Rogers E. Has prenatal folate supplementation established an at-risk population for age-related cognitive decline? *J Alzheimers Dis*. 2014; 41(3):667-9.

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

Snigdha S, Neill JC, McLean SL, Shemar GK, Cruise L, Shahid M, Henry B. Phencyclidine (PCP)-induced disruption in cognitive performance is gender-specific and associated with a reduction in brain-

derived neurotrophic factor (BDNF) in specific regions of the female rat brain. *J Mol Neurosci.* 2011; 43:337–345.

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

Stertz L, Magalhães PV, Kapczinski F. Is bipolar disorder an inflammatory condition? The relevance of microglial activation. *Curr Opin Psychiatry.* 2013;26:19-26.

Tomiya M, Fukushima T, Kawai J, Aoyama C, Mitsunashi S, Santa T, Imai K, Toyooka T. Alterations of plasma and cerebrospinal fluid glutamate levels in rats treated with the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, ketamine. *Biomed Chromatogr* 2006; 20(6-7): 628-33.

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

Van Wijk N, Watkins CJ, Hageman RJ, et al. Combined dietary folate vitamin B-12 and vitamin B-6 intake influences plasma docosahexaenoic acid concentration in rats. *Nutr Metab (Lond)* 2012;9(1):49.

Vicario-Abejón C, Owens D, McKay R, Segal M. Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3, 965–74.

Vickers AJ, Sjoberg D, Basch E, Sculli F, Shouery M, Laudone V, Touijer K, Eastham J, Scardino PT. How do you know if you are any good? A surgeon performance feedback system for the outcomes of radical prostatectomy. *Eur Urol.* 2012 Feb;61(2):284-9.

Wadhvani NS, Manglekar RR, Dangat KD, Kulkarni AV, Joshi SR. Effect of maternal micronutrients (folic acid, vitamin B12) and omega 3 fatty acids on liver fatty acid desaturases and transport proteins in Wistar rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2012; 86(1-2):21-7.

Watkins CC, Andrews SR. Clinical studies of neuroinflammatory mechanisms in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2016; 176 (1): 14–22.

Xu, D.X., Wang, H., Ning, H., Zhao, L., Chen, Y.H. Maternally administered mela-tonin differentially regulates lipopolysaccharide-induced proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in maternal serum, amniotic fluid, fetal liver, and fetal brain. *Journal of Pineal Research*. 2007; 43, 74–79

Yajnik CS, Deshmukh US. Fetal programming: maternal nutrition and role of one-carbon metabolism. *REV Endocr Metab Disord* 2012; 13(2):121-7.

Yang J, Zhou Z, Yang C. AMPA receptor potentially participates in the mediation of the increased brain-derived neurotrophic factor following chronic ketamine use. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012; 220(243) author reply 245.

Zhang XY, Chen da C, Xiu MH, Tan YL, Yang FD, Zhang LY, Zhang LY, Haile CN, Kosten TR. Clinical symptoms and cognitive impairment associated with male schizophrenia relate to plasma manganese superoxide dismutase activity: a case-control study. *J Psychiatr Res* 2013; 47(8):1049-53.

Zhao M, Chen YH, Dong XT, Zhou J, Chen X, Wang H, Wu SX, Xia MZ, Zhang C, Xu DX. Folic acid protects against lipopolysaccharide-induced preterm delivery and intrauterine growth restriction through its anti-inflammatory effect in mice. *PLoS One*. 2013; 6;8(12):e82713.

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

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

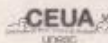
Zugno AI, Fraga DB, De Luca RD, Ghedim FV, Deroza PF, Cipriano AL, Oliveira MB, Heylmann AS, Budni J, Souza RP, Quevedo J. Chronic exposure to cigarette smoke during gestation results in altered cholinesterase enzyme activity and behavioral deficits in adult rat

offspring: potential relevance to schizophrenia. *J Psychiatric Res* 2013b; 47(6):740-6.

Zugno AI, Canever L, Mastella G, Heylmann AS, Oliveira MB, Steckert AV, Castro AA, dal Pizzol F, Quevedo J, Gama CS. Effects of omega-3 supplementation on interleukin and neurotrophin levels in an animal model of schizophrenia. *An Acad Bras Cienc.* 2015; 87(2 Suppl):1475-86.

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

ANEXO



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

Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex e pela Lei Federal 11.794/08, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 100-2014-01

Professor responsável: Alexandra Ioppi Zugno

Equipe: Josiane Budni, Patrícia Fernanda Schuck, Lara Canever, Alexandra S. A. Heylmann, Sullivan A. Citadin, Luiz Antônio De Luca, Mariana B. de Oliveira, Adalberto Alves de Castro

Título: "Efeito da deficiência e/ou suplementação de ácido fólico materno e na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina"

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA. Foi autorizada a utilização do total de 600 Ratos Wistar de 60 dias pesando aproximadamente 300g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.

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, has analyzed the following Project:

Protocol number: 100-2014-01

Principal Investigator: Alexandra Ioppi Zugno

Researchers: Josiane Budni, Patrícia Fernanda Schuck, Lara Canever, Alexandra S. A. Heylmann, Sullivan A. Citadin, Luiz Antônio De Luca, Mariana B. de Oliveira, Adalberto Alves de Castro

Project title: "Effects of deficiency and/or maternal folic acid supplementation and in the adult offspring subjected to the animal model of schizophrenia induced by ketamine".

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 or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 16 de junho de 2014.

VILSON HEINZEN CARDOSO
Coordenador Adjunto da CEUA