

INDIANARA REYNAUD TORETI BECKER

**INIBIÇÃO DA VIA DA QUINURENINA PREVINE
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E ESTRESSE
OXIDATIVO EM CÉREBRO DE RATOS SUBMETIDOS A UM
MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde para o exame de
qualificação em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal
Pizzol

**CRICIÚMA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B395i Becker Indianara Reynaud Toreti.
Inibição da via da quinurenina previne alterações
comportamentais e estresse oxidativo em cérebro de ratos
submetidos a um modelo animal de esquizofrenia / Indianara
Reynaud Toreti Becker. – 2017.
104 p : il. ; 21 cm.

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

Orientador: Felipe Dal Pizzol.

1. Esquizofrenia – Tratamento. 2. Quinurenina – Uso
terapêutico. 3. Estresse oxidativo. 4. Cetamina. I. Título.

CDD. 23.ed. 616.8982

Bibliotecária Rosângela Westrupp – CRB 14º/364
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

Folha informativa

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense e Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Mc Govern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e inúmeras possibilidades de crescimento e aprendizado que cotianamente se apresentam, assim, a cada dia, me torno um ser humano melhor.

À Universidade do Extremo Sul Catarinense pelo auxílio e contribuição para minha formação acadêmica. Orgulho fazer parte!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, por me aceitar como sua orientanda e por compartilhar tamanho conhecimento e experiência.

À Prof. Dra. Luciane Bisogin Ceretta pelo apoio e aprendizado cotidiano. Seu incentivo foi e tem sido, fundamental na minha trajetória acadêmica. Gratidão infinita.

Aos meus colegas do Laboratório de Fisiopatologia da UNESC, em especial à Monique pela carinhosa acolhida.

Aos professores que se disponibilizaram para a avaliação deste trabalho. Suas contribuições foram importantes.

Ao Rodger, meu marido, pela presença amorosa e paciência sem fim. Sem você seria muito mais difícil. Te amo.

À minha família, base de tudo. Meu esteio, meu porto seguro. Devo muito do que sou a vocês.

À Gislane Zilli Réus, por sua dedicação e cumplicidade com este projeto. Aprendi muito com você. Obrigada, por tudo, sempre!

Às minhas amigas queridas, Juliana Lora, Angela Rossato, Luciane Bisognin Ceretta e Cristiane Tomasi. Obrigada pelos incansáveis “desabafos”. Sou privilegiada pelo convívio cotidiano com vocês.

Ao meus colegas de trabalho da Unasau, comprometidos, guerreiros e parceiros: Mira, Marco, Samira, Willians, Grazi, Denise, Renan, Emanuel, Angela, Juliana, Eduardo, Ariete, Glauco, Fábio, Ioná, Neiva, Rita, Maria Inês, Josiane, Lisiane, Fabiane, Franciele, Cássia, Jéssica,

Samiris, Afonso, Cláudia, Marlon. Levo pra vida o carinho que tenho por cada um de vocês.

A todos aqueles que contribuíram e contribuem com minha história de vida, seja ela profissional ou pessoal.

Gratidão define!

*“Saber para melhor sentir, sentir
para melhor saber”.*

Paul Cézanne

RESUMO

A esquizofrenia é um grave transtorno psiquiátrico que acomete em torno de 1% da população mundial, causando prejuízo social e econômico significativo. A fisiopatologia desse transtorno é explicada por uma deficiência nos sistemas de neurotransmissores dopaminérgicos e glutamatérgicos. Porém, como um número significativo de pacientes não respondem ao tratamento com antipsicóticos, outras vias parecem estar relacionadas com os aspectos fisiopatológicos deste transtorno. Evidências relatam que a via da quinurenina desempenha um importante papel no início do estresse oxidativo na esquizofrenia. Assim, o objetivo desse estudo foi utilizar um modelo animal de esquizofrenia induzido pela cetamina para investigar se inibidores da via da quinurenina poderiam prevenir alterações comportamentais e estresse oxidativo em cérebro de ratos. Para isso foram utilizados ratos Wistar e a cetamina foi injetada na dose de 25 mg/kg uma vez por dia por 7 dias. Os inibidores da triptofano 2,3- dioxigenase (TDO, 20 mg/kg), indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO, 500 mg/kg) e quinurenina-3-monooxigenase (KMO, 100 mg/kg) foram injetados juntamente com cetamina. Os grupos experimentais foram: salina+veículo; salina+inibidor TDO; salina+inibidor IDO; salina+inibidor KMO; cetamina+veículo; cetamina+inibidor TDO; cetamina+inibidor IDO; cetamina+inibidor KMO. Após a administração dos fármacos foi avaliada a atividade motora em um monitor de atividade e parâmetros de estresse oxidativo foram analisados no córtex frontal (CF), hipocampo e estriado. A administração de cetamina na dose aumentou a atividade locomotora dos ratos. Porém, os inibidores das enzimas IDO, KMO e TDO foram capazes de prevenir as alterações comportamentais induzidas pela cetamina. Além disso, o inibidor da IDO preveniu peroxidação lipídica e diminuiu os níveis de proteína carbonilada em CF, hipocampo e estriado. O inibidor da IDO também aumentou a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no hipocampo e da enzima catalase no CF e no hipocampo. O inibidor da enzima TDO preveniu dano em lipídeo no estriado e reduziu os níveis de proteína carbonilada no hipocampo e estriado de ratos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia. O inibidor da TDO aumentou a atividade da SOD no estriado e da CAT no hipocampo de ratos administrados com cetamina. O inibidor da KMO não preveniu o dano em lipídeo. Entretanto, o inibidor da KMO aumentou a atividade da SOD no hipocampo e reduziu os níveis de proteínas carboniladas e aumentou a atividade da CAT no estriado de ratos que receberam cetamina. Os resultados desse estudo apontam que

a via da quinurenina pode ser um mecanismo importante pelo qual o modelo animal de esquizofrenia induzido pela cetamina leva a alterações comportamentais e induz estresse oxidativo no cérebro, sugerindo-se que a inibição da via da quinurenina poderia ser uma estratégia para prevenir ou reverter as implicações da esquizofrenia.

Palavras-chaves: Quinurenina. Cetamina. Estresse oxidativo. Modelo animal. Esquizofrenia.

ABSTRACT

Schizophrenia is a severe psychiatric disorder that affects about 1% in the world population, leading to significant social and economic impairment. The pathophysiology of this disorder is explained by a deficiency in the dopaminergic and glutamatergic neurotransmitter systems. However, since a significant number of patients do not respond to antipsychotic treatment, other pathways appear to be related to the pathophysiological features of schizophrenia. Evidence has shown that the kynurenine pathway (KP) plays a role in the onset of oxidative stress and also in the pathophysiology of schizophrenia. The aim of this study was to use a pharmacological animal model of schizophrenia induced by ketamine to investigate if KP inhibitors could protect the brains of rats from behavioral changes and oxidative stress. For this were used adult Wistar rats and ketamine was injected at the dose of 25 mg/kg once by 7 days. The KP inhibitors: tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO, 20 mg/kg), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO, 500 mg/kg) and kynurenine-3-monooxygenase (KMO, 100 mg/kg) were injected concomitant with ketamine. The experimental groups were: saline+vehicle; saline+TDO inhibitor; saline+IDO inhibitor; saline+KMO inhibitor; ketamine+vehicle; ketamine+TDO inhibitor; ketamine+IDO inhibitor; ketamine+KMO inhibitor. After drug administration were evaluated locomotor activity in the monitor of activity and the stress oxidative parameters were evaluated in the frontal cortex (FC), hippocampus and striatum. Ketamine increased spontaneous locomotor activity. However, the inhibitors of TDO, IDO KMO were able to reverse these changes. In addition, the IDO inhibitor prevented lipid peroxidation, and decreased the levels of protein carbonyl in the FC, hippocampus and striatum. It also increased the activity of superoxide dismutase (SOD) in the hippocampus, as well as increasing the levels of catalase activity in the PFC and hippocampus. The TDO inhibitor prevented lipid damage in the striatum and reduced the levels of protein carbonyl in the hippocampus and striatum. Also, the TDO inhibitor increased the levels of SOD activity in the striatum and CAT activity in the hippocampus of ketamine-induced pro-oxidant effects. Lipid damage was not reversed by the KMO inhibitor. The KMO inhibitor increased the levels of SOD activity in the hippocampus, and reduced the levels of protein carbonyl while elevating the levels of CAT activity in the striatum of rats that had been injected with ketamine. Our findings revealed that the KP pathway

could be a potential mechanism by which a schizophrenia animal model induced by ketamine could cause interference by producing behavioral disturbance and inducing oxidative stress in the brain, suggesting that the inhibition of the KP pathway could be a potential target in treating schizophrenia.

Key-words: Kynurenine. Ketamine. Oxidative stress. Animal model. Schizophrenia.

LISTA DE ABREVIATURAS

3-HA - ácido 3-hidroxiantranílico
3-HK - 3-hidroxiquinurenina
3-HO – enzima oxigenase ácido 3-hidroxiantranílico
5-HT – Serotonina
AA – ácido anttranílico
CAT – catalase
D2 – Receptores dopaminérgicos D2
DAYLs – Anos de vida perdidos ajustados por incapacidade
EROS - espécies reativas de oxigênio
GABA – Ácido gama aminobutírico
GPx - glutathione peroxidase
GSH – glutathione
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
IDO – enzima indolamina 2,3-dioxigenase
IDO-1 - enzima indoleamina-2,3-dioxigenase-1
IDO-2 - enzima indoleamina-2,3-dioxigenase-2
IL-6 – interleucina-6
iNOS – oxido nítrico sintetase induzível
KAT - quinurenina qmitrotransferase
KMO - enzima quinurenina monooxigenase
KYN – quinurenina
KYNA - ácido quinurênico
nAChR $\alpha 7$ - receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$
NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NMDA - N-metil-D-aspartato
NMDAR – Receptor de N-metil-D-aspartato
nNOS - oxido nítrico sintetase neuronal
NOS - óxido nítrico sintetase
O₂- - radicais superóxido
OMS – Organização Mundial de Saúde
PIC – ácido picolínico
PV – Parvalbumina
PVIs – interneurônios parvalbumina
QUIN - ácido quinolínico
SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – enzima superóxido dismutase
TDO2 - enzima triptofano dioxigenase

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Via da quinurenina.	36
Figura 2 - Segregação dos dois braços da via da quinurenina no cérebro.	38
Figura 3 - Relações entre hipofunção do receptor NMDA e estresse oxidativo.....	42
Figura 4 - Desenho experimental do tratamento com inibidores daIDO, D-1MT (A), TDO, alopurinol (B) e KMO, Ro61-8048 (C) em ratos Wistar submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina.	52
Figura 5 - Representação esquemática dos grupos experimentais utilizados neste estudo. (Elaborada pelo autor).....	53
Figura 6 - Distância percorrida em centímetros (cm) de ratos submetidos a injeção de cetamina e tratados com D-1MT (A), distância percorrida em centímetros (cm) de ratos submetidos a injeção de cetamina e tratados com alopurinol (B), distância percorrida em centímetros (cm) de ratos submetidos a injeção de cetamina e tratados com Ro61-8048 (C).	57
Figura 7 - Níveis de MDA (A), proteína carbonil (B), atividade da SOD (C), e atividade da catalase (D) em córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos submetidos a administração de cetamina e tratados com D-1MT.....	59
Figura 8 - Níveis de MDA (A), proteína carbonil (B), atividade da SOD (C), e atividade da catalase (D) em córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos submetidos a administração de cetamina e tratados com alopurinol.	60
Figura 9 - Níveis de MDA (A), proteína carbonil (B), atividade da SOD (C), e atividade da catalase (D) em córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos submetidos a administração de cetamina e tratados com Ro61-8048.....	61
Figura 10 - Resumo esquemático dos resultados obtidos no presente estudo.	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
1.1 ESQUIZOFRENIA	29
1.2 NEUROTRANSMISSORES E ESQUIZOFRENIA.....	32
1.3 O PAPEL DAS QUINURENINAS NA ESQUIZOFRENIA.....	34
1.3.1 A Via das Quinureninas	34
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E ESQUIZOFRENIA.....	41
1.5 MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA	44
1.6 JUSTIFICATIVA.....	46
2 OBJETIVOS	49
2.1 OBJETIVO GERAL	49
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
3 MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	51
3.2 ANIMAIS.....	51
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO.....	51
3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	54
3.5 AMOSTRAS CEREBRAIS E ANÁLISES BIOQUÍMICAS	54
3.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO	54
3.6.1 Peroxidação lipídica	54
3.6.2 Carbonilação de proteínas	55
3.6.3 Atividade da catalase	55
3.6.4 Atividade com superóxido dismutase	55
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
4 RESULTADOS	57
4.1 EFEITOS DOS INIBIDORES DA VIA QUINURENINA NA ATIVIDADE LOCOMOTORA DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA.....	57
4.2 EFEITOS DO INIBIDOR DA IDO, D-1MT, NOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉREBRO DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA.....	58
4.3 EFEITOS DO INIBIDOR DA TDO, ALOPURINOL, NOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉREBRO DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA.....	59
4.4 EFEITOS DO INIBIDOR DA KMO, RO61-8048, NOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉREBRO DE	

RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA.....	60
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÃO	71
REFÊRENCIAS	73
ANEXO	102
ANEXO A: PARECER DA COMISSÃO ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESQUIZOFRENIA

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico grave com sintomas que variam desde pensamento e fala desorganizados a alucinações, delírios e disfunções cognitivas. Frequentemente os pacientes apresentam dificuldade em distinguir o que é real do que não é real (Picchioni e Murray, 2007). A esquizofrenia está associada a disfunções sociais ou ocupacionais significativas e reduz a qualidade de vida do paciente e a capacidade de se envolver em atividades cotidianas. Um estudo europeu incluindo seis países descobriu que mais de 80% dos adultos com esquizofrenia apresentavam problemas persistentes relacionados a interação social, embora nem todos fossem graves (NCCMH, 2014). A taxa de mortalidade para indivíduos com esquizofrenia é 2-3 vezes maior do que na população em geral (Auquier et al., 2006; Saha et al, 2007). Além do número de óbitos diretamente atribuídos à esquizofrenia, há uma série de pessoas que cometem suicídio como resultado da doença (Nakamura e Mahlich, 2017). O suicídio é a maior causa de morte em indivíduos esquizofrênicos. Um estudo prospectivo demonstrou que 40% do indivíduos com esquizofrenia relataram ideação suicida, 23% relataram tentativas de suicídio e 6,4% morreram de suicídio (Healy et al., 2012).

Além da taxa de morbidade e mortalidade associada a esquizofrenia, os custos de saúde e assistência social, incluindo custos diretos e indiretos por perda de produtividade, são substanciais para a doença. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que os custos diretos da esquizofrenia nos países ocidentais variam de 1,6% a 2,6% do total de gastos com cuidados de saúde, que por sua vez representam entre 7% e 12% do produto nacional bruto (PNB) (Barbato, 1998). Os custos totais de cuidados para indivíduos com esquizofrenia no Reino Unido totalizam 16,7 bilhões de euros por ano, enquanto que para a Europa estes valores chegam a 93,9 bilhões de euros (Gustavsson et al., 2011; Ekman et al., 2013). Estima-se que custe ao sistema de saúde dos EUA mais de \$ 60 bilhões por ano (McEvoy, 2007). No Brasil, o custo direto total da esquizofrenia para o setor público, no Estado de São Paulo, em 1998, foi de R\$ 222 milhões. A internação representa a maior parte dos custos diretos (48,7% de internações temporárias e 30,5% de internações permanentes) (Mari e Leitão, 2000; Leitão et al, 2006).

A prevalência mundial de esquizofrenia estimada é de 1,1% da população com mais de 18 anos, ou seja, aproximadamente 26 milhões de pessoas. Afeta homens e mulheres de todos os grupos socioeconômicos e causa imensa perda de qualidade de vida (Picchioni e Murray, 2007; Eaton et al., 2008; Van Os e Kapur, 2009). Estudo epidemiológico realizado no Brasil origina estimativas de incidência e prevalência compatíveis com as observadas em outros países (Mari e Leitão, 2000). A esquizofrenia está entre as 10 principais causas de anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (DALYs) em todo o mundo (Collins et al., 2011).

Vários fatores de risco estão relacionados ao desenvolvimento da esquizofrenia, tais como complicações pré-natais e perinatais, idade paterna avançada, gênero masculino, viver em ambiente urbano, abuso de drogas (especialmente Cannabis, anfetaminas, metanfetamina e cocaína) e exposição ao estresse (abuso físico, abuso sexual, maus-tratos e bullying) (Kahn et al., 2015). Como em outros transtornos mentais complexos, presume-se que o desenvolvimento da esquizofrenia está associado a interações complexas entre vários fatores de risco genéticos, fatores ambientais e exposição a experiências traumáticas precoces. Estes fatores em conjunto modulam ou influenciam as mudanças duradouras do desenvolvimento neurológico nos circuitos e vias neurais do sistema nervoso central (SNC) e alteram sua homeostase. Quando esses fatores superarem mecanismos de defesa resilientes, a esquizofrenia se desenvolverá em indivíduos vulneráveis. Portanto, a predisposição genética de acordo com estímulos ambientais negativos pode desencadear o desenvolvimento da esquizofrenia. Por outro lado, sem estímulos ambientais adversos, a predisposição genética por si só não é responsável pelo desenvolvimento da doença (Halldorsdottir e Binder, 2017).

Os sinais e sintomas da esquizofrenia são complexos e diversos, e comumente divididos em três grupos (Green, 1996). Os sintomas positivos incluem alucinações (auditivas e visuais), delírios (geralmente de natureza paranoica), comportamento estranho, pensamento desordenado e fala desorganizada. Os sintomas negativos incluem alogia, avolia, apatia, anedonia, comportamento emocional violento e embotamento afetivo. Pacientes com esquizofrenia também apresentam comprometimento em várias funções cognitivas, como déficits de memória, atenção e aprendizagem, julgamento e funções executivas (Green et al., 2000; Meyer e Feldon, 2010). Enquanto os sintomas negativos e positivos estão presentes durante o final da adolescência ou início da idade adulta (Lewis e Lieberman, 2000), os déficits cognitivos

geralmente aparecem anos antes do diagnóstico clínico (Lesh et al., 2011).

O desenvolvimento do cérebro durante a adolescência, momento em que muitos sintomas de esquizofrenia aparecem ou pioram, é caracterizado por ajuste fino de sistema de neurotransmissores excitatórios, inibitórios e monoaminérgicos, estabilização das sinapses para aumentar a eficiência da função neural e início da integração entre amadurecimento tardio e estruturas cerebrais precoces (Keshavan et al., 2014). Portanto, a predisposição genética e os distúrbios ambientais que levam a alterações e desequilíbrios no momento desses processos de desenvolvimento podem aumentar o risco de desenvolver esquizofrenia. O risco relativo para esquizofrenia é 6-17 vezes maior entre parentes de primeiro grau e 40 a 50 vezes maior no gêmeo monozigótico de um irmão afetado em comparação a população em geral (Cardno et al., 1999).

Os medicamentos antipsicóticos são o principal suporte do tratamento para a esquizofrenia, porém são inadequados para um número expressivo de pacientes (Andrews, 2003). Os antipsicóticos convencionais (típicos ou de primeira geração) são antagonistas dos receptores D2 e inibem a neurotransmissão dopaminérgica, enquanto que os agentes atípicos (ou de segunda geração) causam antagonismo do receptor de serotonina e dopamina D2 (Meltzer HY, 1999) (Ashcroft et al., 2002). A maioria dos pacientes interrompe os tratamentos farmacológicos devido a efeitos adversos, incluindo efeitos colaterais extrapiramidais (distonia, acatisia, parkinsonismo, bradicinesia, tremor e discinesia tardia) induzidos por antipsicóticos típicos de primeira geração e efeitos colaterais metabólicos, como ganho de peso, diabetes tipo II e hiperlipidose, induzida por antipsicóticos atípicos de segunda geração (Lieberman, et al., 2005; Meltzer, 2013; Lally e McCabe, 2015). O desenvolvimento de antipsicóticos de segunda geração produziu alguns avanços em termos de eficácia, com melhoria modesta no tratamento de sintomas negativos e na tolerabilidade aos efeitos colaterais extrapiramidais. No entanto, nenhum antipsicótico exibe efeitos robustos sobre os déficits cognitivos ou comportamento social prejudicado que são componentes importantes deste transtorno (Balu, 2016) (Mailman e Murthy, 2010). Estudos que comparam a eficácia de antipsicóticos de primeira geração com a eficácia de antipsicóticos de segunda geração encontram poucas diferenças na capacidade para redução sintomas positivos (Lieberman et al., 2005).

Apesar dos avanços farmacológicos nos últimos anos, há uma discrepância entre os efeitos (Lieberman et al., 2005) dos medicamentos

psicotrópicos e a baixa resposta satisfatória dos pacientes com esquizofrenia (Kessler et al., 2005; Insel, 2012). Embora os tratamentos farmacológicos para a esquizofrenia possam aliviar os sintomas psicóticos, esses fármacos geralmente não conduzem a melhorias substanciais no funcionamento social, cognitivo e ocupacional (Kahn et al., 2015). Assim, é necessário uma melhor compreensão da neurobiologia do transtorno para melhorar o uso de fármacos existentes e possibilitar o desenvolvimento de novos medicamentos.

1.2 NEUROTRANSMISSORES E ESQUIZOFRENIA

Acredita-se que a etiologia da esquizofrenia seja multifatorial, em que múltiplos processos patológicos convergem para um conjunto de sintomas associados. Cada vez mais a esquizofrenia é compreendida como distúrbio do desenvolvimento neurológico, onde múltiplas alterações se acumulam durante períodos críticos do desenvolvimento do SNC (Riecher et al., 1989; Hafner et al., 1998).

A fisiopatologia da esquizofrenia ainda não foi completamente elucidada. Vários estudos apontam um desequilíbrio no sistema de neurotransmissores e com isso algumas hipóteses foram levantadas na tentativa de explicar a neurobiologia deste transtorno. As hipóteses mais influentes envolvem a dopamina e glutamato. A hipótese dopaminérgica sugere que a causa da esquizofrenia esta relacionada a hiperatividade da dopamina, principalmente no receptor D2 no estriado (Laruelle e Abi-Dargham, 1999; Abi-Dargham et al., 2000). Tal hipótese surgiu a partir de estudos que evidenciaram que a administração de anfetamina aumenta as concentrações extracelulares de dopamina e podem induzir sintomas psicóticos semelhantes aos observados na esquizofrenia (Lieberman et al., 1987). Ainda na década de 1970 observou-se que a eficácia clínica dos fármacos antipsicóticos estava diretamente relacionada a sua afinidade por receptores de dopamina (Seeman e Lee, 1975; Creese et al., 1976; Seeman et al., 1976).

Apesar das evidências de que existe uma anormalidade dopaminérgica relacionada à esquizofrenia, esta teoria sozinha não explica completamente a fisiopatologia do transtorno. Evidências demonstram que um terço dos indivíduos com esquizofrenia não respondem aos antipsicóticos (Mortimer et al., 2010), apesar dos altos níveis de ocupação de receptores D2 (Kapur et al., 2000). Além disso, eles não respondem a manipulações que depletam dopamina pré-

sináptica, sugerindo que outras vias de sinalização estão envolvidas com a causa do transtorno.

Uma vez que o sistema dopaminérgico é modulado pelo glutamatérgico e este está envolvido com importantes funções, como a função cognitiva (memória e aprendizagem) foi postulada a hipótese glutamatérgica. Esta hipótese defende que uma hipofunção dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR) está diretamente relacionada com a fisiopatologia da esquizofrenia (Coyle, 2006); Moghaddam e Javitt, 2012).

Os primeiros achados envolvendo os NMDARs demonstraram que doses subclínicas de fenciclidina e cetamina (antagonistas NMDAR) poderiam mimetizar sintomas positivos e negativos, bem como déficits cognitivos em indivíduos saudáveis (Kemp et al., 1987; Krystal et al., 1994). Estudo posterior confirmou uma hipofunção de NMDAR em pacientes com esquizofrenia sem tratamento (Pilowsky et al., 2006). Essas descobertas foram apoiadas por outros estudos em que o bloqueio de NMDAR por anticorpos autoimunes em encefalite levam a psicose e déficits cognitivos (Dalmau et al., 2011; Schawrcz et al., 2012). A inativação de NMDAR está relacionada com hiperatividade de receptores D2 nas projeções mesolímbicas e corticais (Howes e Kapur, 2009).

Evidências mostram o envolvimento do hipocampo na esquizofrenia. Estudos de imagem mostram que o hipocampo anterior (que é funcionalmente equivalente ao hipocampo ventral de roedores) é hiperativo em indivíduos com esquizofrenia (Heckers, 2001; Medoff et al., 2001) e que esta hiperatividade se correlaciona com a presença de psicose (Silbersweig et al., 1995). A hiperatividade correlaciona-se com uma importante hipótese sobre a origem dos sintomas de esquizofrenia onde estes estariam relacionados com a disfunção em interneurônios GABAérgicos que expressam parvalbumina (PVI), particularmente através de hipofunção de NMDAR. A hipofunção do NMDAR causa redução na expressão da PV e regulação ascendente de receptores do ácido gama aminobutírico (GABA) em neurônios piramidais no córtex. A desinibição de neurônios piramidais causa disfunção cognitiva e sintomas negativos, além de estimular liberação excessiva de dopamina subcortical causando psicose (Hoftman et al., 2016).

A sinalização glutamatérgica e dopaminérgica mostram-se cada vez mais entrelaçadas, com a sinalização dopaminérgica melhorando a sinalização de NMDAR, enquanto que esta pode inibir a sinalização dopaminérgica (Cepeda et al., 2009).

1.3 O PAPEL DAS QUINURENINAS NA ESQUIZOFRENIA

1.3.1 A Via das Quinureninas

O triptofano é um aminoácido essencial que serve como precursor tanto para a via serotonina-melanina como para a via da quinurenina (KYN). A via da serotonina (5-HT) e KYN representam as principais vias de catabolismo do triptofano sendo que esta última é responsável por mais de 95% do metabolismo deste aminoácido essencial em condições fisiológicas (Oxenkrug, 2010; Murakami et al., 2013). Está cada vez mais claro que em um ambiente de ativação imune, inflamação crônica e estresse oxidativo ocorre aumento da transcrição e atividade da enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) levando a ativação anormal da via da KYN e diminuição concomitante da atividade serotoninérgica por esgotamento de seu precursor, o triptofano (Ormstad et al., 2013; Murakami et al., 2013; Anderson e Maes, 2014; Wang et al., 2015).

Evidências demonstram que anormalidades na via da KYN estão envolvidas na patogênese de uma série de condições médicas caracterizadas pela ativação imune e inflamação crônica, tais como síndrome metabólica (Oxenkrug, 2010), resistência a insulina (Oxenkrug et al., 2013; Oxenkrug, 2013), síndrome do intestino irritável (Schefold et al., 2009) e vários outros transtornos neuropsiquiátricos e doenças mentais ou neurodegenerativas, tais como depressão (Maes et al., 1994; Bonaccorso et al., 2002), esclerose múltipla (Hartai et al., 2005; Radja et al., 2007; Reus et al., 2015), acidente vascular cerebral (Mo et al., 2014), Parkinson (Nemeth et al., 2006; Rakoszi et al., 2009; Kincses e Vecsei, 2010), Doença de Alzheimer (Baran et al., 1999; Widner et al., 2000) e esquizofrenia (Barry et al., 2009; Erhardt et al., 2017).

A via da KYN inicia com a conversão do triptofano em KYN pelas enzimas triptofano dioxigenase (TDO-2), indoleamina-2,3-dioxigenase-1 (IDO-1) ou indoleamina-2,3-dioxigenase-2 (IDO-2) (Chen e Guillemin, 2009). Aproximadamente 40% da KYN cerebral é produzida no SNC, enquanto que 60% é proveniente da periferia atravessando a barreira hematoencefálica (Gal e Scherman, 1978; Wu et al., 2013). A KYN, primeiro metabólito da via da KYN, é um ponto de ramificação. O subsequente metabolismo da KYN ocorre por 3 mecanismos, ou braços da via (Figura 1) (Schawrcz et al., 2012; Bie et al., 2016).

O primeiro braço da via metaboliza a KYN em ácido quinurênico (KYNA) através da KYN amitrotransferase (KAT I, II, III) (Schawrcz et al., 2012). O ácido quinurênico (KYNA), presente no cérebro humano em altas concentrações, atua tanto como bloqueador do sítio co-agonista da glicina do receptor NMDA (Vécsei et al., 1992), como um inibidor competitivo do receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ (nAChR $\alpha 7$) (Hilmas et al., 2001).

O segundo braço da via inicia com a conversão da KYN em 3-hidroxiquinurenina (3-HK) pela enzima KYN monooxigenase (KMO). Esta enzima apresenta alta afinidade a KYN quando comparada com todas as enzimas dos três braços da via, indicando que, em condições fisiológicas, KYN é metabolizada principalmente por este braço (Bender e McCreanor, 1982; Amaral et al., 2013). Em sua atividade normal a KMO favorece a produção de ácido quinolínico (QUIN) sobre KYNA (Amaral et al., 2013). Entretanto, um aumento nos níveis de KYN conduzem a saturação da enzima KMO levando a um aumento da síntese de KYNA por astrócitos (Ishii et al., 1992; Wonodi e Schwarcz, 2010). Uma vez formado, o 3-HK sofre espontaneamente auto-oxidação, levando a formação espécies reativas de oxigênio (EROS) (Vazquez et al., 2000).

No passo seguinte da via, o 3-HK sofre catálise pela enzima quinureninase produzindo 3-hidroxi-antranílico (3-HA), ou ainda, pode ser catalizada pela enzima antralinato 3-monooxigenase à ácido antranílico (AA). O 3-HA é facilmente auto-oxidado, levando a formação de radicais superóxidos (Fazio et al., 2012). Além disso, pode provocar apoptose e possível necrose dos macrófagos (Quagliariello et al., 1964), e agir como potente inibidor da cadeia de transferência de elétrons (Reyes Ocampo et al., 2014).

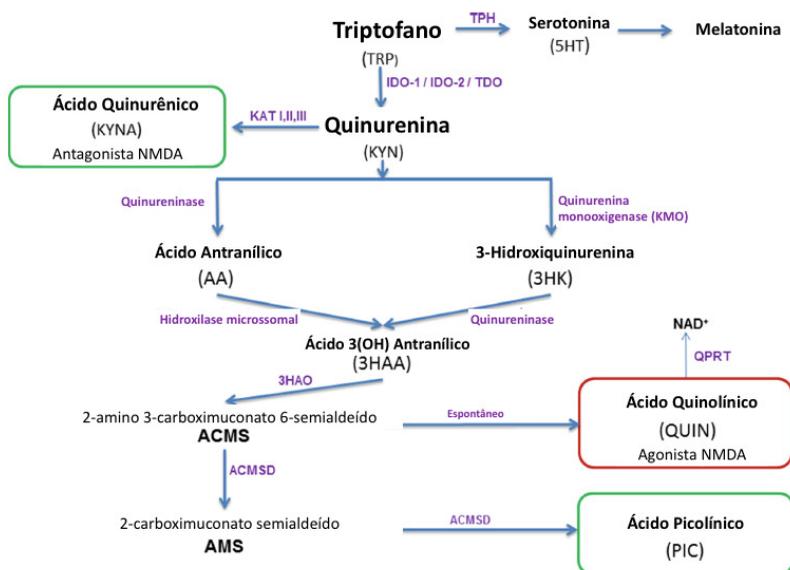


Figura 1 - Via da quinurenina. A via da quinurenina (KYN) inicia com a conversão do triptofano em KYN pelas enzimas triptofano dioxigenase (TDO-2), indoleamina-2,3-dioxigenase-1 (IDO-1) ou indoleamina-2,3-dioxigenase-2 (IDO-2). O primeiro braço da via metaboliza a KYN em ácido quinurênico (KYNA) através da KYN amitrotransferase (KAT I, II, III). O segundo braço da via inicia com a conversão da KYN em 3-hidroxiquinurenina (3-HK) pela enzima KYN monooxigenase (KMO). No passo seguinte da via, o 3-HK sofre catálise pela enzima quíruneninase produzindo 3-hidroxi-antranílico (3-HA), ou ainda, pode ser catalizada pela enzima antranilato 3-monooxigenase à ácido antranílico (AA). O 3-HK também pode ser convertido em 2-amino-3-carboximuconato semialdeído pela enzima oxigenase ácido 3-hidroxi-antranílico (3-HAO) e posteriormente produzir ácido picolínico (PIC) por ação da carboxilase picolínica ou ainda, produzir QUIN com subsequente formação de NAD⁺ por ciclização enzimática (adaptado de Bie et al, 2016).

O 3-HK também pode ser transamidado por KAT para produzir ácido xanturênico, com propriedades pró e anti-oxidantes (Murakami et al., 2007). Pode ainda ser convertido em 2-amino-3-carboximuconato semialdeído pela enzima oxigenase ácido 3-hidroxi-antranílico (3-HAO) e posteriormente produzir ácido picolínico (PIC) por ação da carboxilase picolínica ou ainda, produzir QUIN com subsequente formação de

NAD⁺ por ciclização enzimática (Schawrcz et al., 2012; Bie et al., 2016).

O PIC demonstra ter propriedades neuroprotetoras, entretanto seus mecanismos ainda não foram totalmente elucidados (Guillemin et al., 2005; Grant et al., 2009; Muller et al., 2011). O QUIN é produzido por células monocíticas ativadas (Guillemin et al., 2005), enquanto que KYNA é sintetizada por astrócitos (Guillemin et al., 2001). Ambos, KYNA e QUIN demonstram importante relevância na esquizofrenia em decorrência de suas ações sobre receptores NMDA (Muller et al., 2011).

Os metabólitos ativos da via da KYN apresentam propriedades diversas que podem causar efeitos contrastantes em neurônios. O braço do metabolismo catabolizado por KMO produz os metabólitos neurotóxicos 3-HK, 3-HA e QUIN. QUIN ativa seletivamente receptores NMDA (Stone e Perkins, 1981) e causa insulto neuronal por diferentes mecanismos como a estimulação neuronal de glutamato, inibição astrogliar da recaptação de glutamato (Tavares et al., 2002) e redução da atividade da glutamina sintetase (que facilita a produção de glutamina a partir de glutamato e amônia) (Ting et al., 2009). Concentrações elevadas de glutamato extracelular e ativação persistente de neurônios excitatórios causam excitotoxicidade devido ao influxo aumentado de íons Ca²⁺ através do complexo de canais iônicos, levando a disfunção mitocondrial, liberação de citocromo C, ativação de proteases e caspases, bem como ativação de óxido nítrico sintetase (NOS) (Perez-De La Cruz et al., 2012). QUIN promove peroxidação lipídica de maneira dependente de Ferro II. Além disso, os complexos QUIN-Ferro produzem EROS após oxidação. Em cultura de neurônios e astrócitos humanos, o tratamento com QUIN resultou em um aumento dose-dependente na atividade da NOS induzível e neuronal (iNOS e nNOS), levando a aumento da toxicidade celular e depleção de NAD⁺ (Perez-De La Cruz et al., 2012).

No cérebro, a KYN dá origem a dois ramos da via da KYN fisicamente segregados, a produção de 3HK e seus metabólitos (3HA e QUIN) em células microgliais e a produção de KYNA em astrócitos (Guillemin et al., 2001) (Figura 2). A formação excessiva dos compostos microgliais podem desempenhar papel significativo na esquizofrenia uma vez que são neurotoxinas e geradores de radicais livres altamente reativos (Dykens et al., 1987; Rios e Santamaria, 1991; Goldstein et al., 2000; Schwarcz e Pellicciari, 2002). O KYNA derivado de astrócitos, ao contrário, tem propriedades neuroprotetoras pela sua capacidade de bloquear excitação neuronal e eliminar radicais livres (Schwarcz e Pellicciari, 2002). A redução na atividade da KMO

diminuirá o fluxo da via da KYN em direção ao QUIN e, portanto, pode fornecer indiretamente um grau de neuroproteção (Schwarcz et al., 2010). É provável que o comprometimento da atividade da enzima KMO na esquizofrenia seja seletivo, possivelmente devido a variação na sequência funcional genética de KMO (Aoyama et al., 2006; Sathyaikumar et al., 2009).

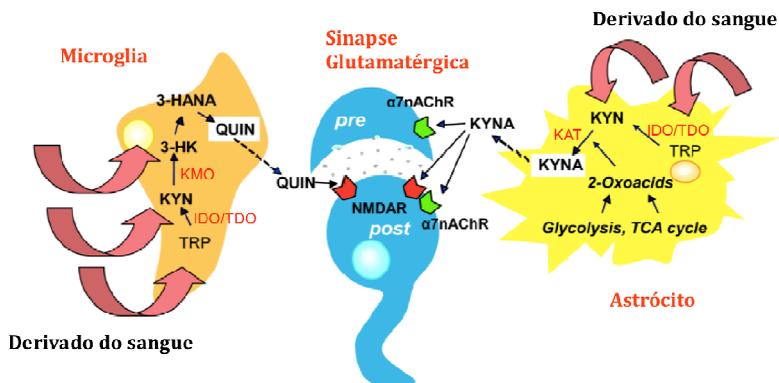


Figura 2 - Segregação dos dois braços da via da quinurenina no cérebro. Sob condições fisiológicas, as enzimas da via quinurenina no cérebro de mamífero são preferencialmente, embora não exclusivamente, localizadas em células não neuronais. Os dois ramos da via são fisicamente segregados no cérebro. Os astrócitos, que possuem KATs, mas não contêm KMO e, portanto, não podem produzir 3-HK e KYN, são responsáveis pela produção de ácido quinurênico (KYNA). 3-HK e seus principais metabólitos são sintetizados em células microgliais e outras de origem monocítica. Uma vez sintetizado dentro de células gliais, ácido quinolínico (QUIN) e KYNA são prontamente liberados para o meio extracelular. 3-HANA: ácido 3-hidroxiantranílico, $\alpha 7nAChR$: receptor de acetilcolina nicotínica $\alpha 7$, TCA: Ácido tricarbóxico (adaptado de Schwarcz et al., 2012).

KYNA possui propriedades antioxidantes devido a sua capacidade de eliminar radicais livres, como hidroxilas e ânions superóxidos (Lugo-Huitron et al., 2011). Em níveis fisiológicos, também atua como um antagonista não competitivo de $\alpha 7nAChR$ reduzindo posteriormente a sinalização de acetilcolina, dopamina e glutamato (Hilmas et al., 2001). Em altas concentrações, KYNA é um antagonista não seletivo de receptores NMDA (Perkins e Stone, 1982). O aumento dos níveis cerebrais de KYNA reduzindo a função de um ou

ambos os receptores podem levar a condições hiponicotinérgicas e hipoglutamatérgicas. Através desta modulação da sinalização de glutamato e da atividade antioxidante, provavelmente KYNA pode neutralizar a neurotoxicidade provocada por QUIN, 3-HK e 3-HA. Em condições fisiológicas normais, o fluxo relativo dos dois braços do metabolismo de KYN deve, portanto, ser rigorosamente regulado para garantir que a proporção destes metabólitos seja mantida em um nível que evite a toxicidade celular (Schawrcz et al., 2012)

Na esquizofrenia, KYNA pode estar envolvida com disfunções do córtex pré-frontal. O bloqueio induzido por KYNA em $\alpha 7nAChR$ mostrou redução nos níveis de glutamato extracelular no córtex pré-frontal (Konradsson-Geuken et al., 2010; Wu et al., 2010). Redução nos níveis cerebrais de KYNA aumentam as concentrações extracelulares de glutamato e acetilcolina, indicando que KYNA pode funcionar como um modulador da neurotransmissão glutamatérgica e nicotinérgica (Zmarowski et al., 2009; Konradsson-Geuken et al., 2010; Wu et al., 2010). A redução de KYNA cerebral promove melhorias cognitivas significativas, que podem ser demonstradas por parâmetros comportamentais e eletrofisiológicos (Potter et al., 2010).

Os níveis de KYNA no córtex pré-frontal são elevados em indivíduos com esquizofrenia (Schwarzc et al., 2001). Um estudo que avaliou a atividade das enzimas da via da KYN em amostras de córtex pré-frontal pos-mortem revelou redução significativa na atividade enzimática do ramo microglial da via nos indivíduos com esquizofrenia, enquanto que a atividade de KAT II permaneceu normal. Indivíduos com esquizofrenia apresentaram uma diminuição significativa na atividade de KMO, que não foi acompanhada pela diminuição da quinureninase, a próxima enzima da cascata metabólica. Ao contrário, a atividade da quinureninase, embora não mostrou diferença significativa, apresentou tendência em maior atividade em pacientes com esquizofrenia. Observou-se tendência para atividade mais baixa de 3-HAO (Sathyasaikumar et al., 2011). A diminuição na atividade 3-HAO pode afetar o estado redox de neurônios e células gliais na área analisada. Além disso, a redução da atividade de 3-HAO se traduz em diminuição na formação de QUIN e pode contribuir com a hipofunção dos NMDAR (Sathyasaikumar et al., 2011).

Redução na atividade de KMO eventualmente desencadeia uma alteração no metabolismo cerebral na via da KYN aumentando a formação de KYNA na esquizofrenia. Estudo em animais demonstrou que tal redirecionamento do metabolismo da via da KYN para melhorar produção de KYNA não ocorre no cérebro normal quando a atividade de

KMO é agudamente reduzida por meios farmacológicos. No entanto, a produção de KYNA é aumentada quando o experimento é realizado em tecido cerebral danificado onde as funções gliais são anormais (Amori et al., 2009). Esse mecanismo, portanto, também pode ocorrer na esquizofrenia, no córtex pré-frontal, onde as alterações microgliais e astrocíticas foram descritas (Foster et al., 2006; Steiner et al., 2008).

Especula-se que os astrócitos, células gliais mais abundantes no SNC, desempenhem um importante papel em neuropatologias, incluindo a esquizofrenia. Estudo pós-mortem em indivíduos com esquizofrenia demonstrou aumento das células astrogliais na substância cinzenta periaquedutal (Stevens, 1982). Este aumento pode ser um mecanismo através do qual a via da KYN é alterada neste transtorno. Os astrócitos não possuem a enzima quinureninase, limitando o metabolismo da KYN em 3-HK. No entanto, os macrófagos são capazes de captar a KYN produzida por astrócitos para produzir grandes quantidades de QUIN (Guillemin et al., 2001). A produção de KYNA no metabolismo da via da KYN reverte a produção de QUIN no tecido cerebral em estados de inflamação com ativação microglial e infiltração de macrófagos (Guillemin et al., 2001).

Em uma discussão de possíveis interações funcionais entre os dois ramos da via da KYN no cérebro de indivíduos com esquizofrenia, o metabólito central KYN merece atenção especial. A análise post-mortem revela que os níveis de KYN estão elevados no córtex pré-frontal dos pacientes e este aumento está correlacionado com os níveis de KYNA no mesmo tecido (Schwarcz et al., 2001). Esta elevação, que também é observada no líquido cefalorraquidiano (Linderholm et al., 2010), pode estar diretamente relacionada com a diminuição da atividade de KMO, ou seja, ocorre um acúmulo do substrato da enzima. Além disso, os níveis de KYN no cérebro de pacientes com esquizofrenia podem ser elevados devido ao aumento da atividade das enzimas TDO e IDO (Miller et al., 2004). Essas duas enzimas estão localizadas preferencialmente em células gliais (Guillemin et al., 2001; Miller et al., 2004) e a KYN recém produzida é prontamente liberada para o meio extracelular (Schwarcz et al., 2012).

Independentemente do(s) mecanismo(s) enzimático(s) subjacente(s) existem razões para assumir que o aumento nos níveis de KYNA observado no córtex pré-frontal desempenha um papel na fisiopatologia da esquizofrenia (Schwarcz et al., 2001; Erhardt et al., 2007). Dentro do córtex pré-frontal, a KYNA derivada de astrócitos controla os níveis de acetilcolina e glutamato (Zmarowski et al., 2009; Konradsson-Geuken et al., 2010; Wu et al., 2010) por reduzir a

atividade dos $\alpha 7nAChR$ (Hilmas et al., 2001). O antagonismo do $\alpha 7nAChR$ por KYNA inibe a sinalização glutamatérgica através do NMDAR. QUIN é um agonista NMDAR que é amplamente considerado neurotóxico e gliotóxico (Guillemin 2012). No entanto, considerando a hipótese de hipofunção dos NMDAR na esquizofrenia, uma deficiência de QUIN pode ser prejudicial nesse contexto. Além de ser um agonista NMDAR direto, QUIN também pode inibir a captação de glutamato na vesícula sináptica, interferindo com a sinalização glutamatérgica (Guillemin 2012). Na esquizofrenia, uma diminuição de QUIN e/ou aumento de KYNA contribuem para a sinalização diminuída dos NMDAR levando a uma desinibição da sinalização dopaminérgica, contribuindo para a hiperdomaminergia (Hardingham e Do, 2016).

A demonstração de deficiências distintas no metabolismo da via da KYN cerebral na esquizofrenia, que também é observada nos gânglios basais, levanta a hipótese de que a atuação sob uma ou mais enzimas da via da KYN pode ser direcionada para proporcionar benefícios clínicos no transtorno.

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E ESQUIZOFRENIA

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre níveis de substâncias pró-oxidantes e antioxidantes que resultam em dano macromolecular e ativação de sinais sensíveis às reações de oxidação-redução (redox). A manutenção do equilíbrio redox no cérebro é desafiadora devido ao seu alto teor de lípidios e à taxa metabólica, bem como, a natureza não regenerativa dos neurônios do SNC (Dringen et al., 2005; Hardingham e Lipton, 2011; Fernandez-Fernandez et al., 2012). Os sistemas antioxidantes utilizados para neutralizar as EROS e os danos oxidativos no cérebro funcionam para manter o equilíbrio redox (Dringen et al., 2005; Fernandez-Fernandez et al., 2012).

Os mecanismos de defesa contra o excesso de EROS envolvem a atividade de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. No grupo de defesas antioxidantes enzimáticas encontram-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), entre outras. Enquanto que no grupo de antioxidantes não-enzimáticos estão o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutathione (GSH), carotenóides, flavonóides e outros (Valko et al., 2007). Em condições normais, a produção de EROS é balanceada pelo sistema de defesa antioxidante no organismo. Entretanto, quando a geração de espécies reativas excede a capacidade das defesas antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo (Droge 2002).

Evidências sugerem que a hipofunção do NMDAR e desequilíbrio redox estão mutuamente interligados (Papadia et al., 2008; Bodhinathan v, 2010; Radonjic et al., 2010; Guidi et al., 2015) (Figura 3).

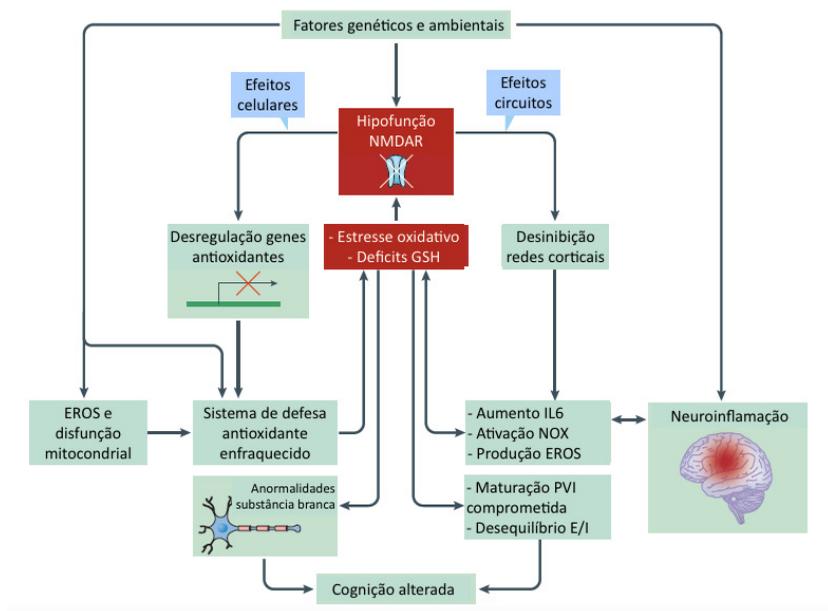


Figura 3 - Relações entre hipofunção do receptor NMDA e estresse oxidativo. A hipofunção do receptor NMDA (NMDAR) desencadeia efeitos celulares (desregulação de genes antioxidantes) e a desinibição de redes corticais, levando a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) da ativação da NADPH oxidase (NOX). Ambos os eventos têm a capacidade de causar estresse oxidativo e depleção de glutatona (GSH), que por sua vez pode reprimir ainda mais a atividade NMDAR. As consequências do estresse oxidativo e do déficit de GSH incluem maturação comprometida de interneurônios que expressam parvalbumina (PVIs) e desequilíbrio excitação/inibição (E / I) e anormalidades da substância branca, que, em conjunto, podem alterar a cognição, comportamento e processamento sensorial na esquizofrenia (adaptado de Hardingham e Do, 2016).

A hipofunção do NMDAR desencadeia efeitos celulares (desregulação de genes antioxidantes) e efeitos a nível de circuitos (desinibição das redes corticais), levando a geração de EROS através da

ativação da NADPH oxidase (NOX). Ambos os eventos têm a capacidade de causar o estresse oxidativo e depleção da GSH, que por sua vez pode reprimir ainda mais a atividade de NMDAR. As consequências do estresse oxidativo e dos déficits de GSH podem comprometer o desenvolvimento e a maturação de interneurônios que expressam PVIs, que levam ao desequilíbrio de inibição-excitação (E/I) e anormalidades da substância branca levando alterações na cognição, comportamento e processamento sensorial na esquizofrenia. Fatores externos, como a neuroinflamação, podem atuar produzindo EROS e citocinas inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6). A disfunção mitocondrial também pode levar ao estresse oxidativo. Além disso, fatores ambientais e genéticos têm a capacidade de influenciar a função do NMDAR, as defesas antioxidantes e a inflamação (Hardingham e Do, 2016).

Uma das abordagens para caracterizar o estresse oxidativo é a quantificação direta de subprodutos advindos do dano aos componentes celulares, tais como proteínas, lipídios e DNA, provocado pelos radicais livres. Muitos estudos têm identificado aumento dos produtos da peroxidação lipídica como malondialdeído (MDA) em plaquetas, eritrócitos, urina e soro/plasma de pacientes com esquizofrenia (Vidovic et al., 2014; Reyazuddin et al., 2014; Gonzalez-Liencrens et al., 2014). Do mesmo modo, níveis de proteína carbonil, o subproduto do dano oxidado em proteínas, encontram-se aumentados no plasma e soro de indivíduos com esquizofrenia (Boskovic et al., 2013; Massuda et al., 2013).

Entre os indivíduos com esquizofrenia a atividade das enzimas antioxidantes, tais como SOD e CAT, nem sempre são consistentes. Essas diferenças podem estar relacionadas a diferentes graus de severidade dos sintomas clínicos ou a duração do transtorno (Smaga et al., 2015). Os níveis de CAT foram encontrados diminuídos em eritrócitos de indivíduos com esquizofrenia crônica (Ranjekar et al., 2003; Ben Othmen et al., 2008), bem como em casos de início recente, não medicados (Raffa et al., 2011). Outros estudos relatam CAT aumentada em eritrócitos (Herken et al., 2001) e níveis inalterados em neutrófilos e plasma (Srivastava et al., 2001; Miljevic et al., 2010), sugerindo que os eritrócitos de indivíduos com esquizofrenia são mais propensos a mostrar diminuições, embora o motivo para isso ainda não está claro.

A SOD é uma enzima neuroprotetora que converte os radicais superóxido (O_2^-), altamente reativos, para o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), menos tóxicos. Diversos pesquisadores avaliaram os níveis de

proteína e a atividade enzimática da SOD em indivíduos com esquizofrenia, porém os resultados foram variados. Estudos semelhantes descobriram diminuição e aumento dos níveis de SOD ou função enzimática em eritrócitos, neutrófilos e plasma de indivíduos com esquizofrenia (Zhang et al., 2009; Padurariu et al., 2010; Raffa et al., 2012; Zhang et al., 2014; Gonzalez-Liencrez et al., 2014).

Alterações do estado redox normal podem ser encontradas em todos os estágios da esquizofrenia, sugerindo um papel fundamental para o estresse oxidativo na etiologia e manutenção do transtorno (Do et al., 2015; Phensy et al., 2017). O bloqueio farmacológico de NMDAR pode interromper os sistemas naturais de defesa antioxidante e induzir comportamentos semelhantes à esquizofrenia em animais e em seres humanos saudáveis (Phensy et al., 2017). A administração perinatal do antagonista do NMDAR produzem deficits comportamentais persistentes em camundongos adultos que mimetizam uma série de sintomas positivos, negativos e cognitivos que caracterizam a esquizofrenia. Tanto o tecido periférico, como os neurônios no SNC de pacientes com esquizofrenia apresentam estresse oxidativo e níveis anormais de antioxidantes, as quais fornecem proteção endógena contra as EROS (Gawryluk et al., 2011; Do et al., 2015). A desregulação das EROS está correlacionada com sintomas negativos e deficits cognitivos do transtorno (Zhang et al., 2012; Rajasekaran et al., 2015).

1.5 MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA

Nos últimos anos a neurofarmacologia tem utilizado o modelo animal para o estudo dos transtornos psiquiátricos. Infelizmente na esquizofrenia, devido a sua complexidade, existe uma multiplicidade de fatores que não podem ser reproduzidos na realidade dos animais. Embora nenhum modelo animal possa replicar todos os aspectos das complexidades de distúrbios neuropsiquiátricos humanos, como a esquizofrenia, estes podem ser desmembrados em endofenótipos mais simplificados que incorporam os principais domínios dos sintomas (Van Den Buuse, 2010; Eyles et al., 2012).

Um modelo animal amplamente utilizado na esquizofrenia envolve a administração repetida ou aguda de cetamina. Trata-se de um fármaco derivado fenciclidina, clinicamente usada como anestésico intravenoso e analgésico crônico (Visser e Schug, 2006; Craven, 2007). A cetamina atua com múltiplos mecanismos de ação, incluindo o antagonismo não-competitivo do NMDAR do glutamato e como agonista do receptor de dopamina D2 com uma afinidade ligeiramente

menor pelos receptores 5-HT₂ (Kapur e Seeman, 2002). Sabe-se que o efeito de substâncias psicoativas em indivíduos, tais como a anfetamina e os antagonistas dos receptores do tipo NMDA, como a fencilina e a cetamina, podem simular sintomas tipo esquizofrenia (Salgado et al., 2006). Estes fármacos foram capazes de produzir hiperlocomoção, comportamento estereotipado aumentado, déficits cognitivos e no filtro sensorio-motor, além de perturbações na interação social em roedores (Sams-Dodd, 1998). Estas substâncias modulam, direta ou indiretamente, atividade do sistema dopaminérgico, cuja disfunção é relevante na esquizofrenia, como demonstrado pela atenuação exercida pelos neurolépticos sobre certas manifestações da doença (Salgado et al., 2006).

A cetamina também foi usada para restabelecer psicoses individuais em pacientes com esquizofrenia (Lahti et al., 1995). Em linha com esta evidência foi demonstrado que a cetamina é capaz de agravar sintomas negativos em alguns pacientes com esquizofrenia e aumentar o comprometimento cognitivo (Kemp et al., 1987; Krystal et al., 1994). Estudo sugere que a fenciclidina (outro antagonista NMDA) e a cetamina exacerbam sintomas psicóticos em pacientes com esquizofrenia e induzem sintomas positivos e negativos semelhantes a este transtorno em indivíduos saudáveis (Adler et al., 1999).

O modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina pode ser considerado mais completo por sua capacidade em mimetizar os sintomas negativos, positivos e cognitivos do transtorno (validade de face). Além disso, os fármacos antipsicóticos utilizados na clínica revertem as alterações comportamentais e fisiopatológicas observadas no modelo animal (validade preditiva) (Becker et al., 2003) e há similaridade entre as alterações fisiopatológicas em humanos e no modelo animal (validade de constructo) (Becker e Grecksch, 2004). Os estudos comprovam que o modelo de cetamina fornece um novo olhar para ambas as teorias de transmissão glutamatérgica e dopaminérgica da esquizofrenia (Vollenweider et al., 2000). A cetamina foi eleita neste estudo para induzir a esquizofrenia pelas propriedades já descritas e por causar estresse oxidativo em modelo animal (De Oliveira et al., 2011).

O modelo comportamental utilizado para avaliação dos sintomas de esquizofrenia neste estudo foi a hiperlocomoção farmacologicamente induzida. Trata-se de um importante indicador dos sintomas positivos associados à esquizofrenia (Bubenikova-Vakesova et al., 2008; Van Den Buuse, 2010). Na sua forma mais simples, o conceito de teste para hiperatividade locomotora baseia-se na premissa de que a atividade

dopaminérgica em roedores resulta na atividade motora aumentada (Paulus e Geyer, 1991; Zugno et al., 2014).

1.6 JUSTIFICATIVA

A esquizofrenia é um transtorno mental persistente e grave caracterizado por fragmentação da estrutura básica dos processos do pensamento e da capacidade de resposta emocional do indivíduo portador, comprometendo sua vida produtiva. Este transtorno grave afeta aproximadamente 1% da população em geral, e com impacto substancial em uma proporção muito maior da população, incluindo membros da família e a sociedade em geral (Van Os e Kapur, 2009). O transtorno está associado a mortalidade prematura e redução da expectativa de vida (Healy et al., 2012). A expectativa de vida de pacientes com esquizofrenia é conhecida por 10 a 25 anos menor do que a população geral (Brown et al., 2000).

O alto custo social e individual da esquizofrenia requer encontrar estratégias de tratamento, diagnóstico e prevenção mais eficazes. Um dos obstáculos neste esforço é o conjunto diversificado de etiologias que compreende a esquizofrenia. Um grande número de evidências cresceu nas últimas décadas para sugerir que a esquizofrenia é uma síndrome heterogênea com sintomas e etiologias sobrepostas (Feigenson et al., 2014).

Apesar de 100 anos de pesquisa, muito sobre esquizofrenia permanece desconhecido, incluindo sua etiologia e a extensão de sua heterogeneidade. Um consenso emergente é que a esquizofrenia é melhor conceituada como uma categoria, assim como demência, epilepsia, câncer ou anemia, com múltiplas causas e tipos. Embora tenha havido muitas tentativas de caracterizar a heterogeneidade da esquizofrenia, poucos levaram a avanços no tratamento e ainda são necessárias melhorias nesse esforço (Corvin et al., 2013).

As evidências têm demonstrado um papel de via da KYN na fisiopatologia de transtornos neuropsiquiátricos, incluindo depressão e esquizofrenia (Reus et al., 2015; Wurfel et al., 2017). O equilíbrio dos metabólitos desta via é essencial para sustentar as funções cerebrais normais (Parasram 2017). De fato, os metabólitos da via da KYN podem se tornar fontes do estresse oxidativo, envolvido com a fisiopatologia deste transtorno (Fraguas et al., 2017; Onaolapo et al., 2017). Em pacientes com esquizofrenia foram encontrados níveis mais elevados de MDA, um marcador de peroxidação lipídica, bem como níveis reduzidos de antioxidantes ou marcadores neuroprotetores, incluindo

GSH e SOD (Gonzalez-Liencrez et al., 2014). No modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina também foi demonstrado um aumento nos níveis de MDA, enquanto o zinco, um modulador do NMDAR, reverteu essas mudanças (Onaolapo et al., 2017).

Com base na hipótese de que as disfunções da via da KYN e o estresse oxidativo estão envolvidos com a fisiopatologia da esquizofrenia, este estudo foi proposto para investigar se a inibição de enzimas da via da KYN, como IDO, TDO e KMO poderiam prevenir o comportamento tipo esquizofrenia induzido por cetamina e o dano provocado pelo estresse oxidativo nas áreas cerebrais envolvidas com a esquizofrenia. A hipótese deste trabalho é que a inibição das enzimas IDO, TDO e KMO da via da KYN previnem o comportamento do tipo esquizofrênico e estresse oxidativo induzido por cetamina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da inibição da via da KYN em parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo em ratos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do tratamento com o inibidor da IDO (D-1MT), com o inibidor da TDO (alopurinol) e com o inibidor da KMO (Ro61-8048) na atividade locomotora de ratos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina;
- Avaliar os efeitos do tratamento com o inibidor da IDO (D-1MT), com o inibidor da TDO (alopurinol) e com o inibidor da KMO (Ro61-8048) na peroxidação lipídica no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina;
- Avaliar os efeitos do tratamento com o inibidor da IDO (D-1MT), com o inibidor da TDO (alopurinol) e com o inibidor da KMO (Ro61-8048) no dano em proteína no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina;
- Avaliar os efeitos do tratamento com o inibidor da IDO (D-1MT), com o inibidor da TDO (alopurinol) e com o inibidor da KMO (Ro61-8048) na atividade da enzima SOD e CAT no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi avaliado e aprovado pelo *Animal Welfare Committee (AWC-14-0097) - Animal Research at UTHealth (ANEXO A)*. Todos os experimentos que envolveram a manipulação de animais foram realizados no Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Mc Govern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston e respeitaram estritamente os princípios éticos da experimentação animal.

3.2 ANIMAIS

Para o estudo foram utilizados ratos Wistar adultos machos pesando entre 250-300 g vindos do laboratório Charles River e mantidos no biotério do Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Mc Govern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado (22°C) com um ciclo claro/escuro de 12 horas. Os ratos ficaram alojados em pares por caixa com comida e água *ad libitum*.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO

Nesse estudo foi utilizado um modelo animal de esquizofrenia induzido pela administração subcrônica de cetamina na dose de 25 mg/kg (Cetamina, Hospira, Inc, Illinois, USA). A cetamina foi administrada uma vez por dia intraperitoneal (i.p.) durante sete dias consecutivos (Zugno et al., 2014). Nos animais em que foram administrados a cetamina para induzir o modelo animal de esquizofrenia também foram utilizados os inibidores da via da KYN com o intuito de inibir os efeitos induzidos pela cetamina. O inibidor da indolamine 2,3 dioxigenase (IDO), 1-metil-D-triptofano (D-1MT, MW 218.25) foi administrado por sete dias concomitante com a administração de cetamina. O inibidor D-1MT foi diluído em óleo de milho e administrado na dose de 500 mg/kg (3000 mg/m²) por gavagem (Jia et al., 2007) (para mais detalhes ver Figura 4A). Os animais que foram injetados com cetamina e D-1MT foram divididos em quatro grupos experimentais: 1) salina/veículo; 2) salina/D-1MT; 3) cetamina/veículo; 4) cetamina/(D-1MT) (Figura 5).

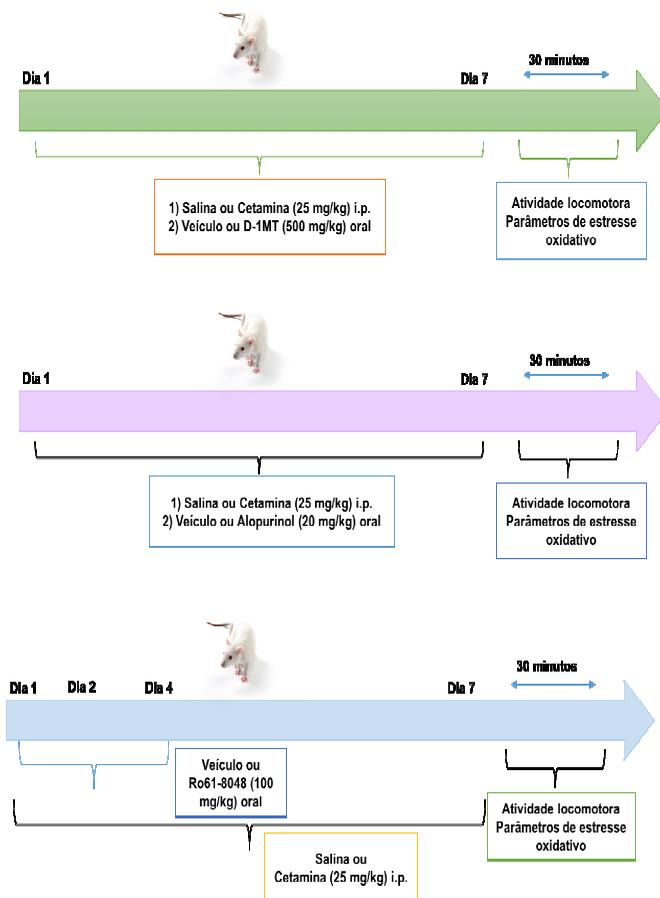


Figura 4 - Desenho experimental do tratamento com inibidores da IDO, D-1MT (A), TDO, alopurinol (B) e KMO, Ro61-8048 (C) em ratos Wistar submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina. A cetamina foi administrada na dose de 25 mg/kg uma vez dia durante 7 dias (via intraperitoneal (i.p.)). D-1MT foi injetado na dose de 500 mg/kg e o alopurinol foi injetado na dose de 20 mg/kg, ambos uma vez por dia durante 7 dias (via oral) concomitante com a administração de cetamina. O Ro61-8048 foi administrado na dose de 100 mg/kg em 3 doses, sendo uma no primeiro dia concomitante com a primeira dose de cetamina, a segunda dose 48 e a terceira 96 horas após a primeira (via oral). Em ambos protocolos após 30 minutos da última dose da cetamina foi avaliado a atividade motora e após retirado as estruturas cerebrais para as análises de estresse oxidativo.

O inibidor da enzima triptofano indoleamina 2,3 dioxigenase (TDO), o alopurinol foi diluído em Tween 80 (0,1%) e administrado por gavagem na dose de 20 mg/kg (Gibney et al., 2014) por sete dias concomitante com a administração de Cetamina (para mais detalhes ver Figura 4B). Os animais que receberam cetamina e alopurinol foram divididos em quatro grupos experimentais: 1) salina/veículo; 2) salina/alopurinol; 3) cetamina/veículo; 4) cetamina/alopurinol (Figura 5)

O inibidor da quinurenina 3 monoxygenase (KMO), 3,4-dimetooxi-N-[4-(3-nitrofeniltiazol-2-yl)] benzenesulfonamida (Ro 61-8048) foi diluído em Tween 80 (0,1%) e administrado por gavagem na dose de 100 mg/kg (Urenjak, 2000). O grupo controle recebeu Tween 80. Ro 61-8048 foi injetado concomitante com a primeira dose de cetamina e 48 e 96 horas após a primeira administração de Cetamina (para mais detalhes ver Figura 4C.. Os animais injetados com cetamina e Ro 61-8048 foram divididos em quatro grupos experimentais: 1) salina/veículo; 2) salina/Ro 61-8048; 3) cetamina/veículo; 4) cetamina/Ro 61-8048 (Figura 5)

Inibidor IDO D-1MT Dose 500mg/kg – Oral Veículo: Óleo de milho (Jia et al., 2007)	Inibidor TDO Alopurinol Dose 20mg/kg – Oral Veículo: Tween 80 (0,1%) (Gibney et al., 2014)	Inibidor KMO Ro61-8048 Dose 100mg/kg – Oral Veículo: Tween 80 (0,1%) (Urenjak, 2000)
Grupo 1 Salina + Veículo	Grupo 1 Salina + Veículo	Grupo 1 Salina + Veículo
Grupo 2 Salina + D-1MT	Grupo 2 Salina + Alopurinol	Grupo 2 Salina + Ro61-8048
Grupo 3 Cetamina + Veículo	Grupo 3 Cetamina + Veículo	Grupo 3 Cetamina + Veículo
Grupo 4 Cetamina + D-1MT	Grupo 4 Cetamina + Alopurinol	Grupo 4 Cetamina + Ro61-8048

Figura 5 - Representação esquemática dos grupos experimentais utilizados neste estudo. (Elaborada pelo autor)

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

Para avaliar a atividade locomotora foi utilizado o teste do campo aberto e a distância percorrida em centímetro foi monitorada por 15 minutos (Zugno et al., 2014) em um monitor de atividades monitorado por um sistema automatizado instalado na arena (n = 12 por grupo). O monitor como dimensão de 40 x 60 cm cercado por paredes de acrílico com aproximadamente 50 cm de altura. Este monitor é circundado por 6 barras paralelas, sendo que cada barra apresenta 16 sensores infravermelhos que detectam a posição exata do rato em movimento avaliando, dessa forma, o comportamento detalhado do animal. As informações detectadas pelos sensores foram transmitidas para um computador através de um software.

3.5 AMOSTRAS CEREBRAIS E ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Após o teste comportamental que ocorreu 30 minutos após a última injeção de cetamina, os animais foram mortos por decapitação e o cérebro foi removido para a dissecação do córtex frontal, hipocampo e estriado de acordo com o atlas histológico de Paxinos e Watson (1986). As estruturas cerebrais foram armazenadas em tubos Eppendorf e colocadas em um freezer com temperatura -80°C para posterior análise dos parâmetros de estresse oxidativo (n = 4-5 por grupo).

3.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

3.6.1 Peroxidação lipídica

O córtex pré-frontal, o hipocampo e o estriado (10 mg) foram homogeneizados em gelo em 300 mL do tampão de MDA lise contendo 3 mL de BHT (100x) e centrifugados a 13.000 x g durante 10 minutos para remover o material insolúvel. Após, os níveis de peroxidação lipídica foram determinados usando um kit comercial (Sigma-Aldrich, St Louis MO, EUA) com base na reação do malondialdeído (MDA) com ácido tiobarbitúrico (TBA), para formar um produto colorimétrico (532 nm) proporcional ao MDA presente.

3.6.2 Carbonilação de proteínas

O córtex pré-frontal, o hipocampo e o estriado (20 mg) foram homogeneizados em gelo em 200 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo EDTA 1 mM e centrifugado a 10.000 x g durante 15 minutos a 4°C para remover o material insolúvel. Após, o dano da proteína oxidada foi determinado usando um kit comercial (Sigma-Aldrich, St Louis MO, EUA) com base na derivação de grupos de proteína carbonilada com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), o qual leva à formação de dinitrofenil estável, que pode ser detectado espectrofotometricamente a 375 nm, proporcionalmente aos as proteínas carboniladas presentes.

3.6.3 Atividade da catalase

O córtex pré-frontal, o hipocampo e o estriado (10 mg) foram homogeneizados em gelo em 300 mL do fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM e centrifugados a 10.000 x g durante 15 minutos a 4°C para remover material insolúvel. Após, mediu-se a atividade da catalase usando-se um kit comercial espectrofotométrico (Sigma-Aldrich, St Louis MO, EUA). Este método de ensaio baseia-se na medição do substrato de peróxido de hidrogénio que permanece após a ação da catalase.

3.6.4 Atividade com superóxido dismutase

O córtex pré-frontal, o hipocampo e o estriado (10 mg) foram homogeneizados em gelo em 300 mL do tampão HEPES 20 mM, pH 7,2, contendo EDTA 1 mM, manitol 210 mM e sacarose 70 mM e centrifugado a 1.500 x g durante 5 minutos a 4°C para remover o material insolúvel. Após, a atividade da SOD foi medida utilizando um kit comercial colorimétrico (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, EUA) em que os radicais superóxido foram gerados por xantina oxidase e hipoxantina e detectados a 450 nm utilizando sal de tetrazólio.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da atividade locomotora e dos parâmetros de estresse oxidativo estão expressos como média \pm erro. Os dados foram analisados pela análise de uma via ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey quando apropriado. Os testes foram realizados no programa

estatístico SPSS versão 21.0. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITOS DOS INIBIDORES DA VIA QUINURENINA NA ATIVIDADE LOCOMOTORA DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA.

A administração de cetamina por sete dias induziu um aumento na distância percorrida, quando comparado com ratos que receberam solução salina. Por outro lado, ratos que foram tratados com inibidores da via tiveram uma redução na distância percorrida, comparado com o grupo que recebeu cetamina. Uma diminuição na atividade locomotora foi observada em ratos que receberam D-1MT ($F(3-56) = 20,256$; $p < 0,0001$; Fig. 4A) e Ro1-8048 ($F(3-56) = 43,121$; $p < 0,0001$; Fig. 6C). Nos ratos que receberam alopurinol ($F(3-56) = 32,446$; $p < 0,0001$; Fig. 6B), houve redução parcial da atividade locomotora.

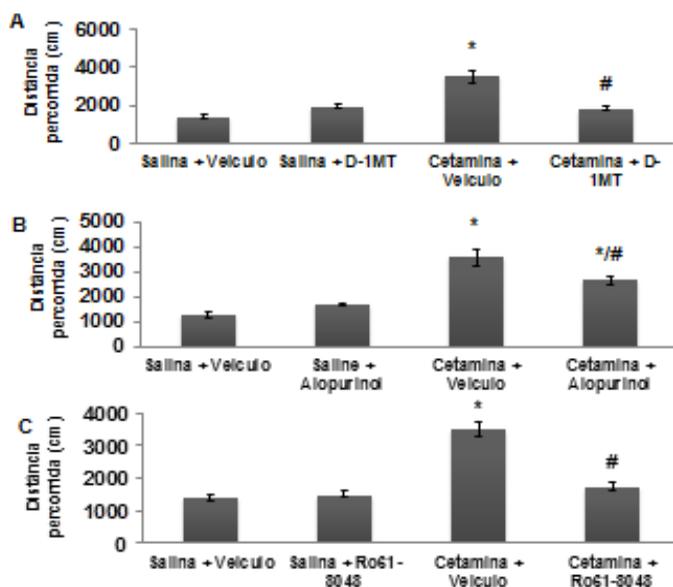


Figura 6 - Distância percorrida em centímetros (cm) de ratos submetidos a injeção de cetamina e tratados com D-1MT (A), distância percorrida em centímetros (cm) de ratos submetidos a injeção de cetamina e tratados com alopurinol (B), distância percorrida em centímetros (cm) de ratos submetidos a

injeção de cetamina e tratados com Ro61-8048 (C). * $p < 0,05$ vs. salina + veículo, # $p < 0,05$ vs. cetamina + veículo, $n=12$ por grupo.

4.2 EFEITOS DO INIBIDOR DA IDO, D-1MT, NOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉREBRO DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA.

Em ratos que receberam injeção de cetamina foi encontrado um aumento nos níveis de MDA no córtex frontal ($F(3-15) = 19,861$; $p < 0,0001$; Fig. 7A), hipocampo ($F(3-16) = 20,941$; $p < 0,0001$; Fig. 7A) e estriado ($F(3-15) = 17,704$; $p < 0,0001$; Fig. 7A). Porém, o tratamento com o inibidor da IDO, D-1MT reduziu os níveis de MDA em todas as regiões cerebrais analisadas de ratos que receberam cetamina.

Os níveis de proteína carbonil foram aumentados em ratos que receberam cetamina no córtex frontal ($F(3-16) = 6,075$; $p = 0,006$; Fig. 5B), hipocampo ($F(3-15) = 18,005$; $p < 0,0001$; Fig. 7B) e estriado ($F(3-16) = 13,352$; $p < 0,0001$; Fig. 7B). Contudo, o tratamento com D-1MT, reverteu esses efeitos por reduzirem os níveis de proteína carbonil.

A atividade da enzima SOD foi reduzida no hipocampo de ratos submetidos a administração de cetamina e o tratamento com D-1MT reverteu esse efeito, aumentando a atividade da SOD ($F(3-14) = 25,339$; $p < 0,0001$; Fig. 7C). No córtex frontal ($F(3-15) = 1,674$; $p = 0,215$; Fig. 5C) e no estriado ($F(3-16) = 2,915$; $p = 0,066$; Fig. 7C) tanto a administração com cetamina quanto o tratamento com D-1MT não alteraram a atividade da SOD.

Em ratos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina a atividade da CAT foi reduzida no córtex frontal ($F(3-16) = 8,650$; $p = 0,001$; Fig. 7D) e no hipocampo ($F(3-16) = 11,118$; $p < 0,0001$; Fig. 7D) e o tratamento com D-1MT foi capaz de reverter essas alterações. No estriado a atividade da catalase não alterou pela cetamina ou D-1MT ($F(3-16) = 1,484$; $p = 0,257$; Fig. 5D).

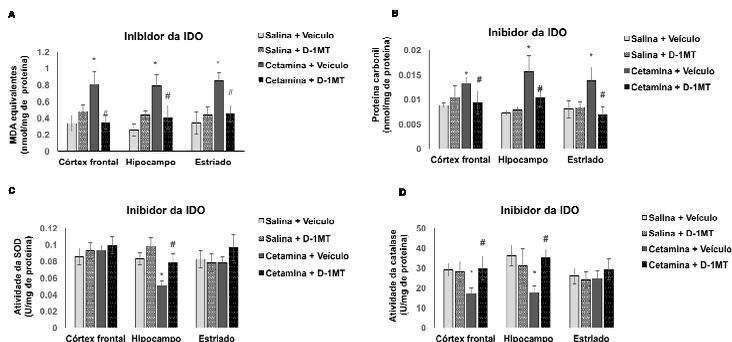


Figura 7 - Níveis de MDA (A), proteína carbonil (B), atividade da SOD (C), e atividade da catalase (D) em córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos submetidos a administração de cetamina e tratados com D-1MT. Os valores estão expressos como média \pm erro., $n = 4-5$. * $p < 0,05$ vs. salina + veículo, # $p < 0,05$ vs. cetamina + veículo.

4.3 EFEITOS DO INIBIDOR DA TDO, ALOPURINOL, NOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉREBRO DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA.

Os níveis de MDA aumentaram no córtex frontal ($F(3-15) = 15,950$; $p < 0,0001$; Fig. 8A), hipocampo ($F(3-16) = 12,295$; $p < 0,0001$; Fig. 8A) e estriado ($F(3-16) = 14,857$; $p < 0,0001$; Fig. 8A) de ratos que receberam a administração de cetamina. O tratamento com alopurinol reduziu os níveis de MDA no estriado de ratos injetados com cetamina. Além disso, o alopurinol aumentou os níveis de MDA no córtex frontal do grupo controle.

Em ratos que receberam administração de cetamina os níveis de proteína carbonil foram aumentados no córtex frontal ($F(3-13) = 8,756$; $p = 0,002$; Fig. 8B), hipocampo ($F(3-16) = 83,857$; $p < 0,0001$; Fig. 8B) e estriado ($F(3-15) = 33,654$; $p < 0,0001$; Fig. 8B). O inibidor da TDO, alopurinol, reduziu os níveis de proteína carbonil no hipocampo e no estriado de ratos que receberam cetamina.

Ocorreu uma redução na atividade da SOD no hipocampo de ratos injetados com cetamina ($F(3-16) = 4,511$; $p = 0,018$; Fig. 8C) e o tratamento com alopurinol reverteu essa alteração. No estriado o tratamento com alopurinol aumentou a atividade da SOD do grupo controle ($F(3-16) = 3,646$; $p = 0,035$; Fig. 6C). No córtex frontal nem a

administração de cetamina nem o tratamento com alopurinol alteraram a atividade da SOD ($F(3-15) = 3,241$; $p = 0,052$; Fig. 8C).

Em ratos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina foi demonstrado uma diminuição na atividade da CAT no córtex frontal ($F(3-15) = 5,502$; $p = 0,009$; Fig. 8D) e no hipocampo ($F(3-16) = 14,822$; $p < 0,0001$; Fig. 8D). Entretanto, somente no hipocampo o tratamento com alopurinol reverteu esse efeito. No estriado a atividade da catalase não alterou em nenhum dos grupos ($F(3-16) = 0,833$; $p = 0,495$; Fig. 8D).

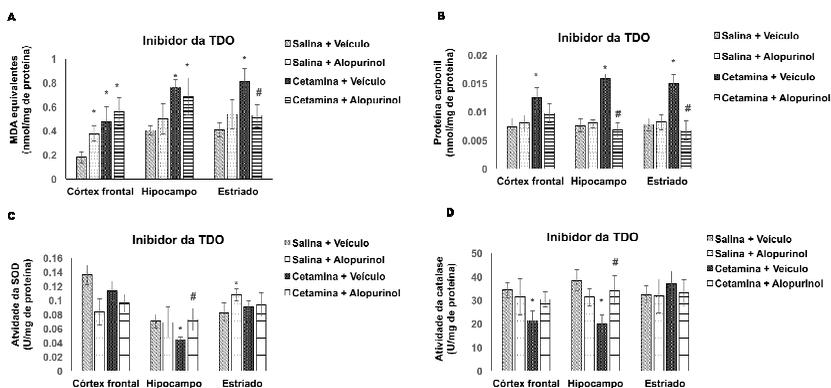


Figura 8 - Níveis de MDA (A), proteína carbonil (B), atividade da SOD (C), e atividade da catalase (D) em córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos submetidos a administração de cetamina e tratados com alopurinol. Os valores estão expressos como média \pm erro., $n = 4-5$. * $p < 0,05$ vs. salina + veículo, # $p < 0,05$ vs. cetamina + veículo.

4.4 EFEITOS DO INIBIDOR DA KMO, RO61-8048, NOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉREBRO DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA.

Após a administração de cetamina no experimento com o inibidor KMO também foi demonstrado um aumento nos níveis de MDA em todas as regiões estudadas em ratos que foram injetados com cetamina: córtex frontal ($F(3-15) = 21,283$; $p < 0,0001$; Fig. 9A), hipocampo ($F(3-16) = 11,559$; $p < 0,0001$; Fig. 9A) e estriado ($F(3-16) = 20,625$; $p <$

0,0001; Fig. 9A). Entretanto, o tratamento com Ro61-8048 não apresentou efeitos nesse parâmetro.

Os níveis de proteína carbonil também foram aumentados no córtex frontal ($F(3-15) = 13,645$; $p < 0,0001$; Fig. 9B), hipocampo ($F(3-15) = 13,150$; $p < 0,0001$; Fig. 9B) e estriado ($F(3-16) = 12,375$; $p < 0,0001$; Fig. 9B) de ratos injetados com cetamina. O tratamento com Ro61-8048 diminuiu os níveis de proteína carbonil somente no estriado.

A atividade da SOD reduziu no hipocampo de ratos injetados com cetamina e o tratamento com Ro61-8048 aumentou a atividade da SOD ($F(3-16) = 6,098$; $p = 0,006$; Fig. 9C). Nem o modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina ou o tratamento com Ro61-8048 alterou a atividade da SOD no córtex frontal ($F(3-13) = 1,235$; $p = 0,337$; Fig. 9C) e estriado ($F(3-15) = 0,975$; $p = 0,430$; Fig. 9C).

No córtex frontal e no hipocampo a atividade da CAT foi reduzida em ratos injetados com cetamina ($F(3-16) = 5,393$; $p = 0,009$; and $F(3-15) = 4,536$; $p = 0,019$; Fig. 9D, respectivamente). O tratamento com Ro61-8048 não reverteu essas alterações. Porém, o tratamento com Ro61-8048 aumentou a atividade da CAT no estriado de ratos que receberam administração de cetamina ($F(3-16) = 5,525$; $p = 0,008$; Fig. 9D).

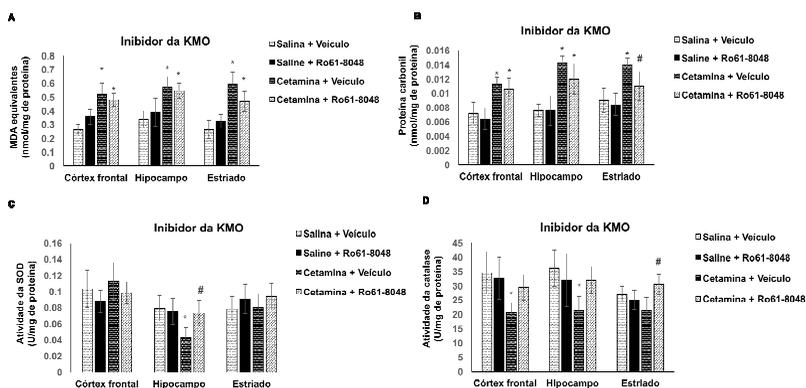


Figura 9 - Níveis de MDA (A), proteína carbonil (B), atividade da SOD (C), e atividade da catalase (D) em córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos submetidos a administração de cetamina e tratados com Ro61-8048. Os valores

estão expressos como média \pm erro., n= 4-5. * $p < 0,05$ vs. salina + veículo, # $p < 0,05$ vs. cetamina + veículo.

Em resumo, este estudo demonstrou que ratos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina que receberam inibidores da via da KYN apresentaram redução na atividade locomotora. Os inibidores das enzimas, IDO e TDO foram capazes de reverter o estresse oxidativo. Porém, o inibidor da enzima KMO, teve menos eficácia em exercer efeitos antioxidantes. Os resultados obtidos podem ser visualizados de maneira esquemática na figura a seguir (Figura 10).

		MDA	PROTEÍNA CARBONIL	SOD	CAT	ATIVIDADE LOCOMOTORA
CETAMINA	Córtex Frontal	↑	↑	⊖	↓	↑
	Hipocampo	↑	↑	↓	↓	
	Entrado	↑	↑	⊖	⊖	
INIBIDOR IDO (D-LMT)	Córtex Frontal	↓	↓	⊖	↑	↓
	Hipocampo	↓	↓	↑	↑	
	Entrado	↓	↓	⊖	⊖	
INIBIDOR TDO (Alopurinal)	Córtex Frontal	⊖	⊖	⊖	⊖	↓
	Hipocampo	⊖	↓	↑	↑	
	Entrado	↓	↓	⊖	⊖	
INIBIDOR KMO (Ro 61-8048)	Córtex Frontal	⊖	⊖	⊖	⊖	↓
	Hipocampo	⊖	⊖	↑	⊖	
	Entrado	⊖	↓	⊖	↑	

Figura 10 - Resumo esquemático dos resultados obtidos no presente estudo.

Legenda: ↑ Houve aumento significativo; ↓ Houve redução significativa; ⊖ Não houve alteração.

5 DISCUSSÃO

A esquizofrenia é um transtorno crônico e debilitante e apesar dos diversos fármacos antipsicóticos para o tratamento dos pacientes, estes não representam melhoras clínicas para grande parte dos pacientes e muitas vezes causam reações adversas (Mortimer et al., 2010). Os sintomas deste transtorno podem ser explicados por disfunções do sistema dopaminérgico e glutamatérgico (Laruelle e Abi-Dargham, 1999; Howes e Kapur, 2009). A esquizofrenia tem sido também associada a alterações no sistema imune e aumento do estresse oxidativo. Sabe-se que um estado inflamatório e o aumento de radicais livres leva a uma ativação da via das quinurenina que tem sido reportada como um dos fatores envolvidos com os processos fisiopatológicos da esquizofrenia (Anderson e Maes, 2013; Morris et al.; 2016). Como o estresse oxidativo está envolvido com a esquizofrenia e pode ser causado por metabólitos da via quinurenina, inibidores da IDO, TDO e KMO podem representar um alvo terapêutico viável para esquizofrenia e outras doenças associadas com neuroinflamação e estresse oxidativo. A compreensão detalhada da via da quinurenina, bem como dos mecanismos que conduzem a ativação ou modulação de receptores a ela relacionados pode levar ao desenvolvimento de fármacos mais seletivos para o tratamento deste transtorno.

Os efeitos dos antagonistas dos receptores NMDA emergem como um dos modelos centrais para o desenvolvimento de fármacos para a esquizofrenia (Coyle et al., 2002; Javitt, 2008; Nikiforuk et al., 2013; Vollenweider e Kometer, 2010). Estudos enfatizam a validade do modelo animal de esquizofrenia, no âmbito da hipótese de hipofunção do NMDAR, para explicar, além dos sintomas psicóticos positivos, os deficits cognitivos e sintomas negativos (Javitt, 2007; Gouzoulis-Mayfrank et al., 2005; Anticevic et al., 2015), que tradicionalmente tem sido o ponto fraco dos modelos anteriores, principalmente de dopamina. A hiperatividade locomotora é usada como substituto comportamental para modelar os sintomas psicóticos da esquizofrenia em animais (Lipska e Weinberger, 2000). A força deste modelo é a simplicidade na produção e a possibilidade de testar rapidamente novas intervenções farmacológicas (Mattei, et al., 2015). Embora o aumento da atividade locomotora tenha validade de face relativamente baixa e validade de constructo para psicose, possui boa validade preditiva em relação aos agentes farmacológicos. Especificamente, os agentes que aumentam a atividade locomotora do roedor tendem a ter propriedades

psicotomiméticas em seres humanos (Swerdlow et al., 2000; Jones et al., 2011).

O presente estudo demonstrou que ratos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina apresentaram um aumento na atividade locomotora. Além disso, no cérebro de ratos injetados com cetamina foi encontrado um aumento no estresse oxidativo, como evidenciado por peroxidação lipídica, altos níveis de proteína carbonilada e diminuição na atividade das enzimas antioxidantes, SOD e CAT. Por outro lado, em ratos que receberam inibidores de enzimas que controlam a via da KYN, houve redução da hiperatividade induzida por cetamina. Os inibidores das enzimas, IDO e TDO foram capazes de reverter o estresse oxidativo. Porém, o inibidor da enzima KMO, teve menos eficácia em exercer efeitos antioxidantes.

Os resultados encontrados estão de acordo com achados da literatura que mostram que a cetamina na dose de 25 mg/kg induz um aumento na distância percorrida na avaliação da atividade locomotora (Fraga et al., 2013; Damazio et al., 2017; Réus et al., 2017). Esse foi o primeiro estudo, a demonstrar uma redução na atividade locomotora, que é um comportamento representativo de sintoma positivo da esquizofrenia, em ratos injetados com cetamina e tratados com inibidor da TDO e KMO. Recentemente, Da Silva Araujo (2017), demonstrou que o inibidor da IDO (D-1MT), nas doses de 20 e 40mg/kg, diminuiu a atividade locomotora em ratos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido pela cetamina. Além disso, no mesmo estudo foi reportado que o tratamento com D-1MT reverteu alterações comportamentais relacionadas a sintomas negativos da esquizofrenia e déficits cognitivos. No presente estudo não foram avaliados parâmetros relacionados aos sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia, podendo ser uma limitação desse trabalho. Futuros estudos que avaliem os efeitos dos inibidores da TDO e da KMO nos sintomas negativos induzidos pela cetamina poderiam ajudar a esclarecer os aspectos comportamentais envolvidos com a via da quinurenina.

Estudos da literatura demonstram que a esquizofrenia é acompanhada de uma ativação dos catabólitos do triptofano induzido pela enzima IDO que é estimulada por citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo, levando então a ativação da via neurotóxica da KYN (Anderson e Maes, 2013; Morris et al., 2016; Kanchanatawan et al., 2017). Em pacientes com esquizofrenia foi encontrado uma associação entre a severidade dos sintomas com déficits periféricos de KYNA e altos níveis de 3-HK (Szymona et al., 2017). Além disso, Wurfel e colaboradores (2017) revelaram em seu estudo níveis reduzidos de

KYNA e da relação de KYNA/3-HK e KYNA/QUIN em pacientes com transtorno esquizoafetivo ou com transtorno do humor bipolar em fases psicóticas. Em fibroblastos de pacientes com esquizofrenia expostos a citocinas foi encontrado um aumento da relação de 3-HK/KYNA (Johansson et al., 2013). Além disso, níveis elevados de KYNA foram encontrados previamente em soro, líquido cefalorraquidiano e em tecido cerebral de pacientes com esquizofrenia (Schwarcz et al., 2001; Nilsson et al., 2005; Kegel et al., 2014).

Em níveis fisiológicos KYNA tem propriedades antioxidantes devido aos seus efeitos como antagonista do $\alpha 7nAChR$ (Hilmas, et al., 2001; Lugo-Huitron et al., 2011). Já em altas concentrações, KYNA atua como antagonista não-seletivo do NMDAR (Perkins e Stone, 1982), reduzindo assim a neurotoxicidade do QUIN e da 3-HK. A via da KYN é essencial para manter as funções cerebrais, uma vez que essa via é importante para manter o balanço antioxidante. De fato, um aumento nos níveis de QUIN aumenta a sinalização glutamatérgica e induz peroxidação lipídica (Bryleva e Brundin, 2017), enquanto que o PIC antagoniza os efeitos do QUIN, pois atua como quelante de ferro (Jhamandas et al., 2000). Um estado inflamatório ou com estresse oxidativo vindo da via da KYN pode levar a alterações no sistema dopaminérgico e glutamatérgico, além de alterações cerebrais que podem levar ao surgimento dos sintomas psicóticos da esquizofrenia (Plitman et al., 2014; Muller et al., 2015). Por outro lado, a inibição da via quinurenina pode ser um importante alvo para proteger contra a ativação microglial e atrofia neuronal (O'Farrell et al., 2017).

Em amostra de córtex pré-frontal de pacientes com esquizofrenia foi encontrado um aumento da expressão da TDO (Miller et al., 2004). Já os estudos que relatam o papel da IDO na esquizofrenia são conflitantes. Por exemplo, o RNAm para IDO no córtex pré-frontal não foi diferente entre indivíduos com esquizofrenia e controles (Miller et al., 2004). Porém, em um modelo animal de esquizofrenia induzido por administração intrauterina de endotoxina no 28º dia do período gestacional foi encontrado um aumento da IDO na placenta e no cérebro fetal (Williams et al., 2017). Também, um outro estudo mostrou que polimorfismos no gene da IDO são associados com a esquizofrenia (Golimbet et al., 2014). Considerando que os resultados encontrados na literatura indicam que aumento na TDO e IDO estão relacionados com a esquizofrenia, presumiu-se no presente estudo que a inibição destas enzimas poderia prevenir os efeitos comportamentais e o estresse oxidativo provocado pelo modelo animal de esquizofrenia induzido pela cetamina.

Estudos experimentais e em humanos vêm demonstrando que um aumento no estresse oxidativo desempenha um importante papel na fisiopatologia da esquizofrenia (Zhang et al., 2012; Reus et al., 2015). Os resultados do presente estudo demonstraram que ratos submetidos à administração de cetamina tiveram um aumento dos níveis de MDA, um marcador de peroxidação lipídica, e um aumento nos níveis de proteína carbonil no córtex frontal, hipocampo e estriado. Além disso, foi observado uma redução na atividade da SOD no hipocampo, e da atividade da CAT no córtex frontal e no hipocampo. Esses dados estão de acordo um prévio estudo que mostrou um aumento no dano a lipídeos e proteínas, além de redução de enzimas antioxidantes após a administração de cetamina na dose de 25 mg/kg (Reus et al., 2015). O dano oxidativo encontrado no presente estudo pode ser associado, pelo menos em parte, a indução do sintoma positivo induzido pela cetamina. De fato, em pacientes com esquizofrenia refratária um aumento de peroxidação lipídica e dano neuronal foi associada com uma piora nos sintomas (Medina-Hernández et al., 2007). Além disso, o estresse oxidativo foi associado ao envelhecimento em pacientes com esquizofrenia (Okusaga, 2013).

Há evidências de que uma hipofunção do NMDAR pode estar associado ao estresse oxidativo (Hardingham e Do, 2016). O mecanismo responsável por tais efeitos pode estar relacionado a uma diminuição dos interneurônios PVI, o que levaria a uma ativação de citocinas pró-inflamatórias e a geração de radicais livres (Wang et al., 2013). Desse modo, a inibição da via da KYN poderia prevenir o estresse oxidativo devido a hipofunção do receptor NMDA induzido pela cetamina. Realmente, os achados do presente estudo revelaram que o inibidor da IDO, o D-1MT, preveniu o aumento dos níveis de MDA e proteínas carboniladas, enquanto que o inibidor da TDO, o alupurinol, reduziu os níveis de MDA somente no estriado e a proteínas carboniladas no hipocampo e no estriado. Essas diferenças podem ser relatadas, pelo menos em parte, por diferenças na distribuição dessas enzimas. A expressão da IDO ocorre no cérebro em células microgliais, neurônios, astrócitos e macrófagos (González et al., 2017). Já a expressão de TDO ocorre também no cérebro, mas principalmente no fígado (Haber et al., 1993). Recentemente, um estudo demonstrou que a administração de D-1MT na dose de 20 mg/kg reduziu os níveis de MDA no estriado, mas não no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos swiss mahos injetados com cetamina como reportado pelo presente estudo (da Silva Araújo et al., 2017). Essas diferenças podem ser associadas pelo tempo de administração do inibidor, desde que no presente estudo o D-1MT foi

administrado concomitante com a cetamina e o outro estudo somente após a aplicação de cetamina (da Silva Araújo, et al., 2017).

A reação da enzima SOD com o radical $O_2^{\bullet-}$ resulta na produção de H_2O_2 e água. O H_2O_2 , por sua vez, é convertido em oxigênio e água pela enzima CAT (Dringen et al., 2005). Assim, uma diminuição na atividade da SOD e da CAT, como encontrado em cérebro de ratos injetados com cetamina, poderia gerar EROs levando a danos em lipídeos e proteínas (Moylan et al., 2014). Isso foi relatado nesse estudo, sugerindo-se que os inibidores daIDO e daTDO aumentaram a atividade das enzimas SOD e CAT reduzindo assim EROS e o dano oxidativo vindo da hipofunção do NMDAR e da ativação da via da KYN induzida pelo modelo animal de esquizofrenia induzido pela cetamina. De fato, a enzima IDO pode ser ativada em resposta ao estresse oxidativo e inflamação (Maes, 2012), bem como a ativação da IDO pode aumentar 3-HK que eleva ROS levando a um ciclo vicioso. A IDO usa $O_2^{\bullet-}$ para ser reduzida da forma férrica para a ferrosa, mas esse processo gera mais radical $O_2^{\bullet-}$ (González et al., 2017). A enzima TDO também representa um mecanismo alternativo através da qual a via da KYN pode ser ativada por estimulação imune (Gibney et al., 2014). Além disso, há relatos que indicam que a ativação da TDO pode ser estimulada pelo radical $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (Little e Smith, 1979), sugerindo-se que a inibição da IDO e da TDO promovem efeitos antioxidantes através da inibição dos metabólitos da KYN.

A enzima KMO é encontrada predominantemente em células microgliais, mas também em menor nível em neurônios (Breton et al., 2000). Esta enzima é muito importante uma vez que faz parte de uma etapa decisiva na produção de metabólitos, tais como o QUIN. O papel da KMO na esquizofrenia não é bem conclusivo. A inibição de KMO é cada vez mais reconhecida como uma abordagem experimental útil para desvendar as características do metabolismo da via da KYN no cérebro e na periferia.

Estudo realizado com camundongos nocautes para KMO (Kmo^{-/-}) demonstrou que a KMO desempenha papel na regulação do metabolismo da via da KYN, com aumento dos níveis de KYN na periferia e no cérebro dos animais mutantes. Níveis de KYNA e ácido antranílico, também foram significativamente elevados, sem alterações significativas nas enzimas KATs e quinureninase, indicando que estas estão operando abaixo da saturação em condições fisiológicas. Embora os níveis de 3-HK, foram substancialmente reduzidos no fígado, no soro e no cérebro destes animais, a deleção específica da enzima não eliminou totalmente 3-HK nos três tecidos examinados (Giorgini, et al.,

2013). O fígado de animais mutantes, em particular, continha considerável 3-HK residual (Giorgini, et al., 2013). Outro estudo realizado por Erhardt e colaboradores (2016) revelou que camundongos nocautes para a KMO ($Kmo^{-/-}$) apresentam déficits cognitivos, interação social prejudicada e fenótipo ansioso, além de reduções corticais de 3-HK e aumento de KYNA.

Polimorfismos na KMO, bem como uma redução na sua expressão no córtex pré-frontal foram associados com prejuízos cognitivos na esquizofrenia (Wonodi et al., 2011; Wonodi et al., 2014). Além disso, no córtex pré-frontal de indivíduos com esquizofrenia foi demonstrado uma diminuição da atividade da KMO (Sathyaikumar et al., 2011). Porém, Holtze e colaboradores (2011) não encontraram associação da KMO com esquizofrenia. Em células microgлияis pré-tratadas com interferon gama ($IFN\gamma$), que é um mediador inflamatório, foi confirmado um aumento da atividade da KMO (O'Farrell et al., 2017), enquanto que o pré-tratamento com o inibidor da KMO Ro-618048 reduziu os efeitos induzidos pelo $IFN\gamma$ nas concentrações de triptofano, KYN e 3-HK (O'Farrell, Fagan, Connor, & Harkin, 2017).

A KMO é ativada por citocinas inflamatórias, mas a presença de EROS também parece modular a KMO. Por exemplo, baixas concentrações de oxigênio reduzem a atividade da KMO enquanto que altas concentrações aumentam a atividade dessa enzima (Dang e Dale, 2000). Os resultados desse trabalho mostraram que o inibidor da KMO Ro-618048 não reverteu a peroxidação lipídica induzida pela cetamina e reduziu os níveis de proteína carbonil somente no estriado. A atividade da SOD aumentou no hipocampo e a atividade da CAT aumentou no estriado de ratos tratados com o inibidor da KMO e que receberam também a cetamina. A esquizofrenia é associada com inflamação e ativação microglial (Reus et al., 2015), esses efeitos podem aumentar o metabolismo da KYN dependente da KMO levando a um acúmulo do QUIN e da 3-HK. Por outro lado, a interrupção da atividade dessa enzima poderia favorecer a produção de KYNA (Parrott e O'Connor, 2015).

A manutenção do dano oxidativo apesar na inibição da KMO pode estar relacionado com a produção de metabólitos tóxicos por outros braços da via da KYN. Estudo demonstra que a formação de ácido antranílico é a via secundária para o catabolismo de quinurenina. Em cérebro de camundongos nocautes ($Kmo^{-/-}$) houve uma redução de aproximadamente 20% dos níveis de QUIN em comparação a camundongos selvagens. A conversão de ácido antranílico para QUIN é provavelmente a via dominante podendo representar um mecanismo

compensatório para formação de QUIN quando a atividade de KMO é comprometida (Giorgini, et al., 2013). Assim, o menor efeito da KMO contra o estresse oxidativo induzido pela cetamina no presente estudo poderia estar relacionado com a formação de QUIN por diferentes braços da via da KYN. O acúmulo de metabólitos neurotóxicos poderia contribuir para o estresse oxidativo e excitotoxicidade glutamatérgica e os sintomas positivos de esquizofrenia (Parrott e O'Connor, 2015; Medina-Hernández et al., 2007).

6 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou os efeitos de inibidores da via da KYN em alterações comportamentais, peroxidação lipídica, dano proteico e na atividade de enzimas antioxidantes em cérebro de ratos submetidos a um modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina. A administração de inibidores daIDO (D-1MT), TDO (alopurinol) e KMO (Ro-8048) foram capazes de prevenir de forma total ou parcial los sintomas positivos da esquizofrenia, observado através de redução da atividade locomotora. Estes efeitos comportamentais foram acompanhados de efeito antioxidante geral, observadas pela redução dos níveis de MDA e proteína cabonil, promovido pelos inibidores de IDO e TDO nas diferentes regiões cerebrais analisadas envolvidas com a esquizofrenia. O inibidor de KMO promoveu redução dos níveis de proteína carbonil no estriado e níveis de MDA não foram revertidos em nenhuma das regiões cerebrais analisadas. Observou-se aumento na atividade da SOD e da CAT após a administração dos inibidores da IDO, TDO e KMO em algumas áreas cerebrais analisadas. Inibidores da IDO, TDO e KMO podem representar um alvo terapêutico viável para esquizofrenia e outras doenças associadas com neuroinflamação e estresse oxidativo, visto que esses inibidores reduziram a atividade locomotora e promoveram de forma geral um efeito antioxidante em regiões cerebrais envolvidas com a esquizofrenia.

REFÊRENCIAS

Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Printz D, Zea-Ponce Y, Gil R, Kegeles LS, Weiss R, Cooper TB, Mann JJ, Van Heertum RL, Gorman JM, Laruelle M. Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; p. 8104-8109.

Adler CM, Malhotra AK, Elman I, Carson RE, Pickar D, Breier A. Effects of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist ketamine on striatal dopamine release in esquizofrenia. *Schizophrenia Res*. 1999; p. 229.

Amaral M, Levy C, Heyes DJ, Lafite P, Outeiro TF, Giorgini F, Leys D, Scrutton NS. Structural basis of kynurenine 3-monooxygenase inhibition. *Nature*. 2013; p. 382-385.

Amori L, Guidetti P, Pellicciari R, Kajii Y, Schwarcz R. On the relationship between the two branches of the kynurenine pathway in the rat brain in vivo. *J Neurochem*. 2009; p. 316– 325.

Anderson G, Maes M. Redox regulation and the autistic spectrum: Role of tryptophan Catabolites, Immuno-inflammation, Autoimmunity and the amygdala. *Curr Neuropharmacol*. 2014; p. 148-167.

Anderson G, Maes M. Schizophrenia: linking prenatal infection to cytokines, the tryptophan catabolite (TRYCAT) pathway, NMDA receptor hypofunction, neurodevelopment and neuroprogression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013; p. 5–19.

Andrews G. Cost-effectiveness of current and optimal treatment for schizophrenia. *Br J Psychiatry*. 2003;(183): p. 427–435.

Anticevic A, Philip R, Corlett P, Cole M, Savic A, Gancsos M, Tang Y, Repovs G, Murray JD, Driesen NR, Morgan PT, Xu K, Wang F, Krystal JH. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist effects on prefrontal cortical connectivity better model early than chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2015; p. 569–580.

Aoyama N, Takahashi N, Saito S, Maeno N, Ishihara R, Ji X, Miura H, Ikeda M, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Yoshida K, Iwata N, Inada T, Ozaki N. Association study between kynurenine 3-

monoxygenase gene and schizophrenia in the Japanese population. *Genes Brain Behav.* 2006: p. 364–368.

Ashcroft DM, Frischer M, Lockett J, Chapman SR. Variations in prescribing atypical antipsychotic drugs in primary care: cross-sectional study. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2002 Jun: p. 285-928.

Auquier P, Lançon C, Rouillon F, Lader M, Holmes C. Mortality in schizophrenia. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2006: p. 873-879.

Balu D. The NMDA Receptor and Schizophrenia: From Pathophysiology to Treatment. *Adv Pharmacol.* 2016: p. 351–382.

Baran H, Jellinger K, Deecke L. Kynurenine metabolism in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 1999. 1999: p. 165-181.

Barbato A. *Schizophrenia and Public Health.* Geneva:; 1998.

Barch DM. Cerebellar-thalamic connectivity in schizophrenia.. *Schizophr Bull.* 2014: p. 1200-1203.

Barry S, Clarke G, Scully P, Dinan TG. Kynurenine pathway in psychosis: evidence of increased tryptophan degradation. *J Psychopharmacol.* 2009: p. 287-294.

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: p. 1267-1277.

Becker A, Peters B, Shroeder H, Mann T, Huether G, Grecksch G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Becker A, Peters B, Shroeder H, Mann T, Huether G, Grecksch G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2003: p. 687-700.

Ben Othmen L, Mechri A, Fendri C, Bost M, Chazot G, Gaha L, Kerkeni A. Altered antioxidant defense system in clinically stable patients with schizophrenia and their unaffected siblings. *Prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2008: p. 155–159.

- Bender DA, McCreanor GM. The preferred route of kynurenine metabolism in the rat.. *Biochim Biophys Acta*. 1982; p. 56-60.
- Bie J, Lim CK, Guillemain J. Kynurenines, Gender and Neuroinflammation; Showcase Schizophrenia. *Neurotox Res*. 2016; p. 285-294.
- Bobes J, Garcia-Portilha MP, Bascaran MT, Saiz PA, Bouzoño M. Quality of life in schizophrenic patients. *Dialogues Clin Neurosci*. 2007; p. 215-226.
- Bodhinathan K, Kumar A, Foster TC. Intracellular redox state alters NMDA receptor response during aging through Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Neurosci*. 2010; p. 1914–1924.
- Bonaccorso S, Marino V, Puzella A, Pasquini M, Biondi M, Artini M, Almerighi C, Verkerk R, Meltzer H, Maes M. Increased depressive ratings in patients with hepatitis C receiving interferon-alpha-based immunotherapy are related to interferon-alpha-induced changes in the serotonergic system. *J Clin Psychopharmacol*. 2002; p. 86-90.
- Boskovic M, Grabnar I, Terzic T, Kores Plesnicar B, Vovk T. Oxidative stress in schizophrenia patients treated with long-acting haloperidol decanoate. *Psychiatry Res*. 2013; p. 761–768.
- Breton N, Avanzi S, Magagnin N, Covini G, Magistrelli L, Cozzi L, Isacchi A. Functional characterization and mechanism of action of recombinant human kynurenine 3-hydroxylase. *Eur. J. Biochem*. 2000; p. 1092-1099.
- Brown S, Inskip H, Barraclough B. Causes of the excess mortality of schizophrenia. *Br J Psychiatry*. 2000 Sep; p. 212-217.
- Bryleva, Brundin. Kynurenine pathway metabolites and suicidality. *Neuropharmacology*. 2017; p. 324–330.
- Bubenikova-Vakesova V, Horacek J, Horacek J, Vrajová M, Hoschl C. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 2008; p. 1014-1023.
- Canever L, Oliveira L, D'Altoe de Luca R, Correa P, BFD. d, Matos MP, Scaini G, Quevedo J, Streck EL, Zugno AI. A rodent model of

schizophrenia reveals increase in creatine kinase activity with associated behavior changes. *Oxid Med Cell Longev*. 2010: p. 421–427.

Cardno AG, Marshall EJ, Coid B, Macdonald AM, Ribchester TR, Davies NJ, Venturi P, Jones LA, Lewis SW, Sham PC, Gottesman II, Farmer AE, McGuffin P, Reveley AM, Murray RM. Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series. *Arch Gen Psychiatry*. 1999 Feb; 56(2): p. 162-168.

Cepeda C, André VM, Jocoy EL, Levine MS. Chapter 3 NMDA and Dopamine: Diverse Mechanisms Applied to Interacting Receptor Systems. In Van Dongen AM, editor. *NMDA and Dopamine: Diverse Mechanisms Applied to Interacting Receptor Systems*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis; 2009.

Chen Y, Guillemin GJ. Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy states. *Int J Tryptophan Res*. 2009: p. 1-19.

Collins PY, Patel V, Joestl SS, March D D. Scientific Advisory Board and the Executive Committee of the Grand Challenges on Global Mental Health Grand challenges in global mental health. *Nature*. 2011: p. 27-30.

Corvin A, Buchanan R, Carpenter W, Kennedy J, Keshavan M, MacDonald A, et al. Which Aspects of Heterogeneity Are Useful to Translational Success? In: Silverstein SM, Moghaddam B, Wykes T, editors. *Schizophrenia: Evolution and Synthesis*. Cambridge: MIT Press; 2013. 2013.

Coyle J, Tsai G, Goff D. Ionotropic glutamate receptors as therapeutic targets in schizophrenia. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2002: p. 183-189.

Coyle JT. Glutamate and Schizophrenia: Beyond the Dopamine Hypothesis. *Cell Mol Neurobiol*. 2006: p. 363–382.

Craven R. Ketamine. *Anaesthesia*. 2007: p. 48-53.

Creese I, Burt D, Snyder S. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* (80-). 1976: p. 481–483.

da Silva Araújo T, Maia Chaves Filho A, Monte A, Isabelle de Góis Queiroz A, Cordeiro R, de Jesus Souza Machado M, de Freitas Lima R, Freitas de Lucena D, Maes M, Macêdo D. Reversal of schizophrenia-like symptoms and immune alterations in mice by immunomodulatory drugs. *J Psychiatr Res.* 2017; p. 49-58.

Dalmau J, Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Lancet Neurol.* 2011; p. 63–74.

Damazio L, Silveira F, Canever L, Castro A, Estrela J, Budni J, Zugno AI. The preventive effects of ascorbic acid supplementation on locomotor and acetylcholinesterase activity in an animal model of schizophrenia induced by ketamine. *An Acad Bras Cienc.* 2017 Aor-Jin: p. 1133-1141.

Dang YWE, Dale OR. Brown Effects of oxygen on kynurenine-3-monooxygenase activity. *Redox Rep.* 2000; p. 81-84.

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

Do KQ, Cuenod M, Hensch TK. Targeting Oxidative Stress and Aberrant Critical Period Plasticity in the Developmental Trajectory to Schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2015; p. 835-846.

Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. *J. Neurosci. Res.* 2005; p. 157–165.

Dringen R. Oxidative and antioxidative potential of brain microglial cells. *Antioxid Redox Signal.* 2005; p. 1223– 1233.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; p. 47-95.

Dykens JA, Sullivan SG, Stern A. Oxidative reactivity of the tryptophan metabolites 3-hydroxyanthranilate, cinnabarinic acid, quinolinic acid and picolinic acid. *Biochem Pharmacol.* 1987; p. 211–217.

Eaton WW, Martins SS, Nestadt G, Bienvenu OJ, Clarke D, Alexandre P. The Burden of Mental Disorders. *Epidemiol Rev.* 2008 November 1: p. 1-14.

Ekman M, Granstrom O, Omerov S, Jacob J, Landen M. The societal cost of schizophrenia in Sweden. *J. Ment. Health Policy Econ.* 2013: p. 13-25.

Erhardt S, Pocivavsek A, Repici M, Liu X, Imbeault S, Maddison D, Thomas MA, Smalley JL, Larsson MK, Muchowski PJ, Giorgini F, Schwarcz R. Adaptive and Behavioral Changes in Kynurenine 3 Monooxygenase Knockout Mice: Relevance to Psychotic Disorders. *Biol Psychiatry.* 2016: p. 33112-2.

Erhardt S, Lilly S, Imbeault S, Engberg G. The kynurenine pathway in schizophrenia and bipolar disorder. *Neurophar.* 2017: p. 297-306.
Erhardt S, Schwieler L, Nilsson L, Linderholm K, Engberg G. The kynurenic acid hypothesis of schizophrenia. *Physiol Behav.* 2007: p. 203–209.

Eyles D, Feldon J, Meyer U. Schizophrenia: do all roads lead to dopamine or is this where they start? Evidence from two epidemiologically informed developmental redent models. *Translational Psychiatry, V. 81, n. 2, p. 1-10, 2012.* 2012: p. 1-10.

Fazio F, Lionetto L, Molinaro G, Bertrand HO, Acher F, Ngomba RT, Notartomaso S, Curini M, Rosati O, Scarselli P, Di Marco R, Battaglia G, Bruno V, Simmaco M, Pin JP, Nicoletti F, Goudet C. Cinnabarinic acid, an endogenous metabolite of the kynurenine pathway, activates type 4 metabotropic glutamate receptors. *Mol Pharmacol.* 2012: p. 643-656.

Feigenson KA, Kusnecov AW, Silverstein SM. Inflammation and the Two-Hit Hypothesis of Schizophrenia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 2014: p. 72–93.

Fernandez-Fernandez S, Almeida A, Bolanos JP. Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochem. J.* 2012: p. 3–11.

Foster R, Kandaneeratchi A, Beasley C, Williams B, Khan N, Fagerhol MK, Everall IP. Calprotectin in microglia from frontal cortex is up-regulated in schizophrenia: evidence for an inflammatory process? *Eur J Neurosci*. 2006; p. 3561–3566.

Fraga D, Réus G, Abelaira H, De Luca R, Canever L, Pfaffenseller B, Colpo GD, Kapczinski F, Quevedo J, Zugno AI. Ketamine alters behavior and decreases BDNF levels in the rat brain as a function of time after drug administration. *Rev Bras Psiquiatr*. 2013; p. 262-266.

Fraguas D, Díaz-Caneja C, Rodríguez-Quiroga A, Arango C. Oxidative Stress and Inflammation in Early Onset First Episode Psychosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2017 Jun 1; p. 435-444.

Frohlich J, HJ. Reviewing the ketamine model for schizophrenia. *J Psychopharmacol*. 2014; p. 287-302.

Fusar-Poli P, Smieskova R, Kempton MJ, Ho BC, Andreasen NC, Borgwardt S. Progressive brain changes in schizophrenia related to antipsychotic treatment? A meta-analysis of longitudinal MRI studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013 Sep; 37(8): p. 1680-1691.

Gal EM, Scherman AD. Synthesis and metabolism of 1-kynurenine in rat brain. *J Neurochem*. 1978; p. 607-613.

Gaubert S, Bouchaut M, Brumas V, Berthon G. Copper-Ligand interactions and the physiological free radical processes. Part 3. Influence of histidine, salicylic acid and anthranilic acid on copperdriven Fenton chemistry in vitro. *Free Radic Res*. 2000; p. 451-461.

Gawryluk JW, Wang JF, Andrezza AC, Shao L, Young LT. Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011 Feb; p. 123-130.

Ghedim F, Fraga D, Deroza P, Oliveira M, Valvassori S, Steckert A, Budni J, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Zugno AI. Evaluation of behavioral and neurochemical changes induced by ketamine in rats: implications as an animal model of mania. *J Psychiatr Res*. 2012; p. 1569–1575..

Gibney S, Fagan E, Waldron A, O'Byrne J, Connor T, Harkin A. Inhibition of stress-induced hepatic tryptophan 2,3-dioxygenase exhibits antidepressant activity in an animal model of depressive behaviour. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014 Jan: p. 1-12.

Giorgini F, Huang SY, KV S, Notarangelo F, Thomas M, Tararina M, Wu HQ, Schwarcz R, Muchowski PJ. Targeted Deletion of Kynurenine 3-Monooxygenase in Mice: A NEW TOOL FOR STUDYING KYNURENINE PATHWAY METABOLISM IN PERIPHERY AND BRAIN. *The Journal of Biological Chemistry.* 2013: p. 36554–36566.

Goghari VM, Truong W, Spilka MJ. A magnetic resonance imaging family study of cortical thickness in schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2015: p. 660-668.

Goldstein LE, Leopold MC, Huang X, Atwood CS, Saunders AJ, Hartshorn M, Lim JT, Faget KY, Muffat JA, Scarpa RC, Chylack LT Jr, Bowden EF, Tanzi RE, Bush AI. 3-Hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote alpha-crystallin cross-linking by metal ion reduction. *Biochemistry.* 2000: p. 7266–7275.

González G, Ramírez-Ortega D, Pineda B, Castro N, Ríos C, Pérez de la Cruz V. Kynurenine pathway metabolites and enzymes involved in redox reactions. *Neuropharmacology.* 2017 Jan: p. 331-345.

Gonzalez-Liencrez C, Tas C, Brown EC, Erdin S, Onur E, Cubukcoglu Z, Aydemir O, Esen-Danaci A, Brüne M. Oxidative stress in schizophrenia: a case inverted question mark control study on the effects on social cognition and neurocognition. *BMC Psychiatry.* 2014: p. 268.

Gouzoulis-Mayfrank E, Heekeren K, Neukirch A, Stoll M, Stock C, Obradovic M, Kovar KA. Psychological effects of (S)-ketamine and N,N-dimethyltryptamine (DMT): a double-blind, cross-over study in healthy volunteers. *Pharmacopsychiatry.* 2005 Nov; 38(6):301-11. 2005: p. 301-311.

Gracee AA. Dopamine system dysregulation by the hippocampus: implications for the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Neuropharmacology.* 2012 Mar: p. 1342-1348.

Grant RS, Coggan SE, Smythe GA. The physiological action of picolinic acid in the human brain. *Int J Tryptophan Res.* 2009: p. 71-79.

Green MF, Kern RS, Braff DL, Mintz J. Neurocognitive deficits and functional outcome in schizophrenia: are we measuring the “right stuff”. *Schizophr. Bull.* 2000: p. 119-136.

Green MF. What are the functional consequences of neurocognitive deficits in schizophrenia? *Am J Psychiatry.* 1996: p. 321-330.

Guidi M, Kumar A, Foster TC. Impaired attention and synaptic senescence of the prefrontal cortex involves redox regulation of NMDA receptors. *J. Neurosci.* 2015: p. 3966–3977.

Guillemin GJ, Kerr SJ, Smythe GA, Smith DG, Kapoor V, Armati PJ, Croitoru J, Brew BJ. Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. *J Neurochem.* 2001: p. 842-853.

Guillemin GJ, Smyte G, Takikawa O, Brew BJ. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. *Glia.* 2005: p. 15-23.

Guillemin GJ. Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *FEBS J.* 2012: p. 1356–1365.

Gustavsson A, Svensson M, Jacobi F, Allgulander C, Alonso J, Beghi E, Dodel R, Ekman M, Faravelli C, Fratiglioni L, Gannon B, Jones DH, Jennum P, Jordanova A, Jönsson L, Karampampa K, Knapp M, Kobelt G, Kurth T, Lieb R, Linde M, Ljungcrantz C, Maercker A, Melin B, Moscarelli M, Musayev A, Norwood F, Preisig M, Pugliatti M, Rehm J, Salvador-Carulla L, Schlehofer B, Simon R, Steinhausen HC, Stovner LJ, Vallat JM, Van den Bergh P, van Os J, Vos P, Xu W, Wittchen HU, Jönsson B, Olesen J. Cost of disorders of the brain in Europe, 2010.. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2011: p. 718-779.

Haber R, Bessette D, Hulihan-Giblin B, Durcan MJ, Goldman D.. Identification of tryptophan 2,3-dioxygenase RNA in rodent brain. *J. Neurochem.* 1993: p. 1159-1162.

- Hafner H H, Maurer K, Loffler W, an der Heiden W, Munk-Jorgensen P, Hambrecht M, Riecher-Rössler A. The abc schizophrenia study: A preliminary overview of the results. *Soc. Psychiatry Psychiatr. Epidemiol.* 1998; p. 380–386.
- Halldorsdottir T, Binder EB. Gene × Environment Interactions: From Molecular Mechanisms to Behavior. *Annu Rev Psychol.* 2017 Jan 3; p. 215-241.
- Hardingham GE, Do KQ. Linking early-life NMDAR hypofunction and oxidative stress in schizophrenia pathogenesis. *Nat Rev Neurosci.* 2016 Feb; p. 125-134.
- Hardingham GE, Lipton SA. Regulation of neuronal oxidative and nitrosative stress by endogenous protective pathways and disease processes. *Antioxid. Redox Signal.* 2011; p. 1421–1424.
- Hartai Z, Klivenyi P, Janaky T, Penke B, Dux L, Vecsei L. Kynurenine metabolism in multiple sclerosis.. *Acta Neurol Scand.* 2005; p. 93-96.
- Haukvik UK, Hartberg CB, Agartz I. Schizophrenia--what does structural MRI show?. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2013; p. 850-853.
- Healy D, Le Noury J, Harris M, Butt M, Linden S, Whitaker C, Zou L, Roberts AP. Mortality in schizophrenia and related psychoses: data from two cohorts, 1875-1924 and 1994-2010. *AP BMJ Open.* 2012; p. e001810.
- Heckers S. Neuroimaging studies of the hippocampus in schizophrenia. *Hippocampus.* 2001; p. 520–528..
- Herken H, Uz E, Ozyurt H, Sogut S, Virit O, Akyol O. Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Mol. Psychiatry.* 2001; p. 66–73.
- Hilmas C, Pereira EF, Alkondon M, Rassoulpour A, Schwarcz R, Albuquerque EX. The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *J Neurosci.* 2001; p. 7463–7473.

Hoftman GD, Datta D, Lewis DA. Layer 3 excitatory and inhibitory circuitry in the prefrontal cortex: Developmental trajectories and alterations in schizophrenia. *Biol. Psychiatry*. 2016: p. 862–873.

Holtze M, Saetre P, Erhardt S, Schwieler L, Werge T, Hansen T, Nielsen J, Djurovic S, Melle I, Andreassen OA, Hall H, Terenius L, Agartz I, Engberg G, Jönsson EG, Schalling M. Kynurenine 3-monooxygenase (KMO) polymorphisms in schizophrenia: an association study. *Schizophr Res*. 2011: p. 270-272.

Howes OD, Kapur S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: Version III—The final common pathway.. *Schizophr. Bull.*. 2009: p. 49–562.

Huckle PL, Palia SS. Managing resistant schizophrenia. *Br J Hosp Med*. 1993: p. 467-471.

Ibrahim MH, Tamminga AC. Treating impaired cognition in schizophrenia. *Curr. Pharm. Biotechnol*. 2012: p. 587–1594.

Insel TR. Next-generation treatments for mental disorders. *Sci. Transl. Med*. 2012: p. 155.

Ishii T, Iwahashi h, Sugata R, Kido R. Formation of hydroxanthommatin- derived radical in the oxidation of 3-hydroxykynurenine. *Arch Biochem Biophys*. 1992: p. 616-622.

Javitt D. Glutamate and schizophrenia: phencyclidine, N-methyl-D-aspartate receptors, and dopamine-glutamate interactions. *Int Rev Neurobiol*. 2007: p. 69-108.

Javitt D. Phenomenology, aetiology and treatment of schizophrenia. *Novartis Found Symp*. 2008: p. 4-16.

Jhamandas KH, Boegman RJ, Beninger RJ, Miranda AF, Lipic KA. Excitotoxicity of quinolinic acid: modulation by endogenous antagonists. *Neurotox Res*. 2000: p. 139–155.

Jia L, Schweikart K, Tomaszewski J, Page J, Noker P, Buhrow SA, Reid JM, Ames MM, Munn DH. Toxicology and pharmacokinetics of 1-methyl-d-tryptophan: absence of toxicity due to saturating absorption.

Food Chem Toxicol. 2008 Jan;46(1):203-11. Epub 2007 Aug 10. 2008 Jan: p. 203-211.

Johansson , Owe-Larsson B, Asp L, Kocki T, Adler M, Hetta J, Gardner R, Lundkvist GB, Urbanska EM, Karlsson H. Activation of kynurenine pathway in ex vivo fibroblasts from patients with bipolar disorder or schizophrenia: cytokine challenge increases production of 3-hydroxykynurenine. *Psychiatr Res*. 2013 Nov: p. 1815-1823.

Kahn RS, Sommer IE, Murray RM, Meyer-Lindenberg A, Weinberger DR, Cannon TD, O'Donovan M, Correll CU, Kane JM, van Os J, Insel TR. Schizophrenia. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 Nov: p. 15067.

Kanchanatawan B, Sirivichayakul S, Ruxrungtham K, Carvalho A, Geffard M, Anderson G6, Maes M. Deficit Schizophrenia Is Characterized by Defects in IgM-Mediated Responses to Tryptophan Catabolites (TRYCATs): a Paradigm Shift Towards Defects in Natural Self-Regulatory Immune Responses Coupled with Mucosa-Derived TRYCAT Pathway Activation. *Mol Neurobiol*. 2017: p. 12035-017-0465-y.

Kapur S S, Remington G. Dopamine D(2) receptors and their role in atypical antipsychotic action: still necessary and may even be sufficient.. 2001;(50): p. 873–883.

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

Kapur S, Zipursky R, Jones C, Remington G, Houle S. Relationship between dopamine D(2) occupancy, clinical response, and side effects: a double-blind PET study of first-episode schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2000: p. 514–520.

Karlsgodt K, Robleto K, Trantham-Davidson H, Jailr C, Cannon TD, Lavin A, Jentsch JD. Reduced dysbindin expression mediates N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction and impaired working memory performance. . *Biological psychiatry*. 2011: p. 28–34.

Kegel M, Bhat M, Skogh E, Samuelsson M, Lundberg K, Dahl ML, Sellgren C, Schwieler L, Engberg G, Schuppe-Koistinen I, Erhardt S. Imbalanced kynurenine pathway in schizophrenia. *Int J Tryptophan Res.* 2014; p. 15-22.

Kemp JA, Foster AC, Wong EHF. Non-competitive antagonists of excitatory amino acid receptors. *Trends Neurosci.* 1987; p. 294-298.

Keshavan MS, Giedd J, Lau JY, Lewis DA, Paus T. Changes in the adolescent brain and the pathophysiology of psychotic disorders. *Lancet Psychiatry.* 2014; 7(1): p. 549-558.

Kessler M, Terramani T, Lynch G, Baudry M. A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists. *J Neurochem.* 1989; p. 11319–1328.

Kessler RC, Delmer O, Frank RG, Olfson M, Pincus HA, Walters EE, Wang P, Wells KB, Zaslavsky AM. Prevalence and treatment of mental disorders, 1990 to 2003. *N. Eng. J. Med.* 2005; p. 2515–2523.

Kincses ZT, Vecsei L. Pharmacological therapy in Parkinson's disease: focus on neuroprotection. *CNS Neurosci Ther.* 2010; p. 345-367.

Koeda M, Takahashi H, Matsuura M, Asai K, Okubo Y. Cerebral responses to vocal attractiveness and auditory hallucinations in schizophrenia: a functional MRI study.. *Front Hum Neurosci.* 2013; p. 221.

Konradsson-Geuken A, Wu HQ, Gash CR, Alexander KS, Campbell A, Sozeri Y, Pellicciari R, Schwarcz R, Bruno JP. Changes in cortical kynurenic acid bi-directionally modulate prefrontal glutamate levels as assessed by microdialysis and rapid electrochemistry. *Neuroscience.* 2010; p. 1848–1859.

Koola M, Buchanan R, Pillai A, Aitchison K, Weinberger D, Aaronson ST, Dickerson FB. Potential role of the combination of galantamine and memantine to improve cognition in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2014; p. 84–89.

Korsakova S, Golimbet V, Korovaitseva G, Gabaeva M, Velikaia N, Snegireva A, Kasparov SV, Kolesina NIu, Ganisheva TK, Savel'eva TM. A study of IL-1B and IDO gene polymorphisms in patients with schizophrenia. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S.* 2014; p. 46-49.

Kraepelin E. *Dementia praecox and paraphrenia.* Melbourne: Publishing Co; 1971 [originally published in 1919].

Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman G, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB Jr, Charney DS. Subanesthetic effects of the noncompetitive nmda antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch. Gen. Psychiatry.* 1994; p. 199–214.

Lahti AC, Koffel B, LaPorte D, Tamminga CA. Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. ; 1995.

Lally J, McCabe JH. Antipsychotic medication in schizophrenia: a review. *Br Med Bull.* 2015; p. 169-179.

Lapin IP. Stimulant and convulsive effects of kynurenines injected into brainventricles in mice. *J Neural Transm.* 1978; p. 37-43.

Laruelle M, Abi-Dargham A. Dopamine as the wind of psychotic fire: new evidence from brain imaging studies.. *Journal of Psychopharmacology.* 1999; p. 358–371.

Leitão RJ, Ferraz M B, Chaves AC, Mari JJ. Cost of schizophrenia: direct costs and use of resources in the State of São Paulo. *Rev. Saúde Pública [Internet].* 2006. 40(2): 304-309.

Leklem J. Quantitative aspects of tryptophan metabolism in humans and other species: a review. *Am J Clin Nutr.* 1971; p. 659-672.

Lesh TA, Niendam TA, Minzenberg MJ, Carter CS. Cognitive control deficits in schizophrenia: mechanisms and meaning. *Neuropsychopharmacology.* 2011; 36(1): p. 316-338.

Lewis DA, a JA. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron.* 2000; 28(2): p. 325-334.

- Lieberman JA, Kane JM, Alvir J. Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987;(91): p. 415–433.
- Lieberman JA, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, Keefe RS, Davis SM, Davis CE, Lebowitz BD, Severe J, Hsiao JK. Effectiveness of Antipsychotic Drugs in Patients with Chronic Schizophrenia. *N Engl J Med*. 2005: p. 1209-1223.
- Lin H, Hsu F, Baumann B, Coulter D, Lynch D. Cortical synaptic NMDA receptor deficits in alpha7 nicotinic acetylcholine receptor gene deletion models: implications for neuropsychiatric diseases. *Neurobiol Dis*. 2014: p. 129–140.
- Linderholm KR, Skogh E, Olsson SK, Dahl ML, Holtze M, Engberg G, Samuelsson M, Erhardt S. Increased levels of kynurenine and kynurenic acid in the CSF of patients with schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2010 August 20: p. 426-432.
- Little J, Smith L. Pulmonary aspiration. *West J. Med*. 1979: p. 122-129.
- Lopresti A, Maker G, Hood S, Drummond P. A review of peripheral biomarkers in major depression: the potential of inflammatory and oxidative stress bio- markers.. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014: p. 102-111.
- Lugo-Huitron R, Blando-Ayala T, Ugalde-Muniz P, Carrillo-Mora P, Pedraza-Chaverri J, Silva-Adaya D. On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *NeurotoxicolTeratol*. 2011: p. 538-547.
- Maes M, Scharpé S, Meltzer HY, Okayli G, Bosmans E, D'Hondt P, Vanden Bossche BV, Cosyns P. Increased neopterin and interferon-gamma secretion and lower availability of L-tryptophan in major depression: further evidence for an immune response. *Psychiatry Res*. 1994: p. 143-160.
- Maes M. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways

and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 2012: p. 764–785.

Mailman RB, Murthy V. Third generation antipsychotic drugs: partial agonism or receptor functional selectivity? *Curr Pharm Des.* 2010: p. 488-501.

Mari JJ, Leitão RJ. A epidemiologia da esquizofrenia. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 2000 May: p. 15-17.

Massuda R, Pedrini M, Reckziegel R, Costanzi M, Ferrari P, Gubert C, Gama CS. Elevated serumprotein oxidative stress in siblings of patients with schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2013: p. 398–399.

Mattei D, Schweibold R, Wolf S. Brain in flames – animal models of psychosis: utility and limitations. *Neuropsychiatric Disease and Treatment.* 2015: p. 1313–1329.

McEvoy JP. The costs of schizophrenia. *J Clin Psychiatry.* 2007: p. 4-7.

Medina-Hernández V, Ramos-Loyo J, Luquin S, Sánchez L, García-Estrada J, Navarro-Ruiz A. Increased lipid peroxidation and neuron specific enolase in treatment refractory schizophrenics. *J Psychiatr Res.* 2007: p. 652-658.

Medoff DR, Holcomb HH, Lahti AC, Tamminga CA. Probing the human hippocampus using rCBF: contrasts in schizophrenia. *Hippocampus.* 2001: p. 543–550.

Meltzer HY HY. The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology.* 1999 Aug: p. 106S-115S.

Meltzer HY. Update on Typical and Atypical Antipsychotic Drugs. *Annu Rev Med.* 2013: p. 393-406.

Meyer U, Feldon J. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Progress in Neurobiology.* 2010: p. 285-326.

Miche H, Brumas V, Berthon G. Copper (II) interactions with nonsteroidal antiinflammatory agents. II. Anthranilic acid as a potential. OH-inactivating ligand. *J Inorg Biochem.* 1997: p. 27-38.

Miljevic C, Nikolic M, Nikolic-Kokic A, Jones DR, Niketic V, Lecic-Tosevski D, Spasic MB. Lipid status, anti-oxidant enzyme defence and haemoglobin content in the blood of long-term clozapine-treated schizophrenic patients. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2010: p. 303–307.

Miller C, Llenos I, Dulay J, Barillo M, Yolken R, Weis S. Expression of the kynurenine pathway enzyme tryptophan 2,3-dioxygenase is increased in the frontal cortex of individuals with schizophrenia. *Neurobiol Dis*. 2004 Apr: p. 618-629.

Mo X, Pi L, Yang J, Xiang Z, Tang A. Serum indoleamine 2,3-dioxygenase and kynurenine aminotransferase enzyme activity in patients with ischemic stroke.. *J Clin Neurosci*. 2014: p. 482-486.

Moghaddam B, Javitt D. From Revolution to Evolution: The Glutamate Hypothesis of Schizophrenia and its Implication for Treatment.. *Neuropsychopharmacology*. 2012: p. 4-15.

Morris G, Berk M, Carvalho A, Caso J, Sanz Y, Walder K, Maes M. The role of the microbial metabolites including trypto-phan catabolites and short chain fatty acids in the pathophysiology of immune-inflammatory and neuroimmune disease. *Mol Neurobiol*. 2016.

Mortimer A, Singh P, Shepherd C, Puthiryackal J. Clozapine for Treatment-Resistant Schizophrenia: National Institute of Clinical Excellence (NICE) Guidance in the Real World. *Clin Schizophr Relat Psychoses*. 2010: p. 49–55.

Mothersill O, Knee-Zaska C, Donohoe G. Emotion and theory of mind in schizophrenia-investigating the role of the cerebellum.. *Cerebellum*. 2016: p. 357-366.

Moylan S, Berk M, Dean O, Samuni Y, Williams L, O’Neil A, Hayley AC, Pasco JA, Anderson G, Jacka FN, Maes M. Oxidative & nitrosative stress in depression: Why so much stress? *Neurosci Biobehav Rev*. 2014: p. 46–62.

Muller N, Myint AM, Schwarz MJ, Muller N, Myint AMJ, Schwarz M. Kynurenine pathway in schizophrenia: pathophysiological and therapeutic aspects. *Curr Pharm Des*. 2011: p. 130-136.

- Muller N, Weidinger E, Leitner B, Schwarz MJ. The role of inflammation in schizophrenia. *Front Neurosci.* 2015; p. 372.
- Murakami H, Haneda M, Qiao S, Naruse M, Yoshino M. Prooxidant action of rosmarinic acid: Transition metal-dependent generation of reactive oxygen species.. *Toxicol In Vitro.* 2007; p. 613-617.
- Murakami Y, Hoshi M, Imamura Y, Yamamoto Y, Saito K. Remarkable role of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolites in infectious diseases: Potential role in macrophagemediated inflammatory diseases. *Mediat Inflamm.* 2013; p. 1-9.
- Nakamura Y, Mahlich J. Productivity and deadweight losses due to relapses of schizophrenia in Japan. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2017; p. 1341–1348.
- Nakazawa K, al. e. GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacol.* 2012; p. 1574-1583.
- NCCMH. Psychosis and schizophrenia in adults: Treatment and management. 2014th ed. London: Commissioned by the National Institute for Health and Care Excellence; 2014.
- Nemeth H, Toldi J, Vecsei L. Kynurenines, Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders: preclinical and clinical studies. *J Neural Transm Suppl.* 2006; p. 285-304.
- Nikiforuk A, Kos T, Fijał K, Hołuj M, Rafa D, Popik P. Effects of the selective 5-HT7 receptor antagonist SB-269970 and amisulpride on ketamine-induced schizophrenia-like deficits in rats. *PLoS One.* 2013; p. e66695.
- Nilsson L, Linderholm K, Engberg G, Paulson L, Blennow K, Lindström LH, Nordin C, Karanti A, Persson P, Erhardt S. Elevated levels of kynurenic acid in the cerebrospinal fluid of male patients with schizophrenia. *Schizophr Res.* 2005; p. 315-322.
- O'Farrell K, Fagan E, Connor T, Harkin A. Inhibition of the kynurenine pathway protects against reactive microglial-associated reductions in the complexity of primary cortical neurons. *Eur J Pharmacol.* 2017 Sep 5; p. 163-173.

- Okusaga O. Accelerated aging in schizophrenia patients: the potential role of oxidative stress.. *Aging Dis.* 2013: p. 256-262.
- Onaolapo A, Aina O, Onaolapo O. Melatonin attenuates behavioural deficits and reduces brain oxidative stress in a rodent model of schizophrenia. *Biomed Pharmacother.* 2017 Aug: p. 373-383.
- Ormstad H, Verkerk R, Aass HCD, Amthor KF, Sandvik L. Inflammation-induced catabolism of tryptophan and tyrosine in acute ischemic stroke. *J Mol Neurosci.* 2013.
- Oxenkrug G, Turski W, Zgrajka W, Weinstock J, Summergrad P. Tryptophan-Kynurenine Metabolism and Insulin Resistance in Hepatitis C Patients. *Hepat Res Treat.* 2013: p. 1-4.
- Oxenkrug G. Insulin Resistance and Dysregulation of Tryptophan-Kynurenine and Kynurenine-Nicotinamide adenine dinucleotide metabolic pathways. *Mol Neurobiol.* 2013: p. 294-301.
- Oxenkrug G. Metabolic syndrome, age-associated neuroendocrine disorders, and dysregulation of tryptophan-kynurenine metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 2010: p. 1-14.
- Padurariu M, Ciobica A, Dobrin I, Stefanescu C. Evaluation of antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation in schizophrenic patients treated with typical and atypical antipsychotics. *Neurosci. Lett.* 2010: p. 317–320.
- Papadia S, Soriano FX, Léveillé F, Martel MA, Dakin KA, Hansen HH, Kaindl A, Sifringer M, Fowler J, Stefovská V, McKenzie G, Craigon M, Corriveau R, Ghazal P, Horsburgh K, Yankner BA, Wyllie DJ, Ikonomidou C, Hardingham GE. Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat. Neurosci.* 2008: p. 476–487.
- Parasram K. Phytochemical treatments target kynurenine pathway induced oxidative stress. *Redox Rep.* 2017 Jun: p. 1-4.
- Parrott J, O'Connor J. Kynurenine 3-Monooxygenase: An Influential Mediator of Neuropathology. *Front Psychiatry.* . 2015: p. 116.

Paulus MP, Geyer MA. A temporal and spatial scaling hypothesis for the behavioral effects of psychostimulants. *Psychopharmacology*. 1991 Jan: p. 6-16.

Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain: Stereotaxic Coordinates*. second ed. ed. Australia; 1986.

Perez-De La Cruz V, Carrillo-Mora P, Santamaria A. Quinolinic acid, an endogenous molecule combining excitotoxicity, oxidative stress and other toxic mechanisms. *Int J Tryptophan Res*. 2012: p. 1-8.

Perkins MN, Stone TW. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenes and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res*. 1982: p. 184-187.

Phensy, A, Duzdabaniyan HE, Brewer S, Panjabi A, Driskill C, Berz A, Peng G, Kroener S. Antioxidant Treatment with N-Acetyl Cysteine Prevents the Development of Cognitive and Social Behavioral Deficits That Result from Perinatal Ketamine Treatment. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2017 Aug: p. 106.

Picchioni MM, Murray RM. *Schizophr. BMJ*. 2007: p. 91-95.
Pilowsky MM, Bressan RA, Stone JM, Erlandsson K, Mulligan RS, Krystal JH, Ell PJ. First in vivo evidence of an NMDA receptor deficit in medication-free schizophrenic patients. *Mol Psychiatry*. 2006: p. 118-119.

Plitman E, Iwata Y, Caravaggio F, Nakajima S, Chung J, Gerretsen P, Kim J, Takeuchi H, Chakravarty MM, Remington G, Graff-Guerrero A. Kynurenic Acid in Schizophrenia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Schizophr Bull*. 2017 Feb: p. 764-777.

Plitman E, Nakajima S, de la Fuente-Sandoval C, Gerretsen P, Chakravarty M, Kobylanski J, Chung JK, Caravaggio F, Iwata Y, Remington G, Graff-Guerrero A. Glutamate-mediated excitotoxicity in schizophrenia: a review. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2014: p. 1591-1605.

Potter MC, Elmer GI, Bergeron R, Albuquerque EX, Guidetti P, Wu HQ, Schwarcz R. Reduction of endogenous kynurenic acid formation

enhances extracellular glutamate, hippocampal plasticity, and cognitive behavior. *Neuropsychopharmacology*. 2010: p. 1734–1742.

Quagliariello E, Papa S, Saccone C, Alifano A. Effect of 3-hydroxyanthranilic acid on the mitochondrial respiratory system. *Biochem J*. 1964: p. 137-146.

Radja C, Bergquist J, Vecsei L. Kynurenines, redox disturbances and neurodegeneration in multiple sclerosis. *J Neural Transm Suppl*. 2007: p. 323-329.

Radonjic NV, Knezević ID, Vilimanovich U, Kravić-Stevović T, Marina LV, Nikolić T, Todorović V, Bumbasirević V, Petronijević ND. Decreased glutathione levels and altered antioxidant defense in an animal model of schizophrenia: long-term effects of perinatal phencyclidine administration. *Neuropharmacology*. 2010: p. 739–745.

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

Raffa M, Barhoumi S, Atig F, Fendri C, Kerkeni A, Mechri A. Reduced antioxidant defense systems in schizophrenia and bipolar I disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 39 (2), 371–375. 2012: p. 371–375.

Rajasekaran A, Venkatasubramanian G, Berk M, Debnath M. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: pathways, mechanisms and implications. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015 Jan: p. 10-21.

Rakoszi K, Klivenyi P, Vecsei L. Neuroprotection in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders: preclinical and clinical findings. *Ideggyogy Sz*. 2009: p. 25-34.

Ranjekar PK, Hinge A, Hegde MV, Ghate M, Kale A, Sitasawad S, Wagh U., Debsikdar VB, Mahadik SP. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Res*. 2003: p. 109–122.

Reus G, Carlessi A, Titus S, Abelaira H, Ignacio Z, da Luz J, Matias BI, Bruchchen L, Florentino D, Vieira A, Petronilho, Quevedo J. A single dose of S-ketamine induces long-term antidepressant effects and decreases oxidative stress in adulthood rats following maternal deprivation. *Dev Neurobiol.* 2015: p. 1268-1281.

Réus G, Fries G, Stertz L, Badawy M, Passos I, Barichello T, Kapczinski F, Quevedo J. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience.* 2015: p. 141-154.

Réus G, Simões L, Colpo G, Scaini G, Osés J, Generoso J, Prossin AR, Kaddurah-Daouk R, Quevedo J, Barichello T. Ketamine potentiates oxidative stress and influences behavior and inflammation in response to lipopolysaccharide (LPS) exposure in early life. *Neuroscience.* 2017: p. 17-25.

Reus GZ, Jansen K, Titus S, Carvalho AF, Gabbay V, Quevedo J. Kynurenine pathway dysfunction in the pathophysiology and treatment of depression: Evidences from animal and human studies. *J Psychiatr Res.* 2015 sep: p. 316-328.

Reyazuddin M, Azmi SA, Islam N, Rizvi A. Oxidative stress and level of antioxidant enzymes in drug-naïve schizophrenics. *Indian J. Psychiatry.* 2014: p. 344–349.

Reyes Ocampo J, Lugo Huitran R, Gonzalez-Esquivel D, Ugalde-Muñiz P, Jiménez-Anguiano A, Pineda B, Pedraza-Chaverri J, Ríos C, Pérez de la Cruz V. Kynurenines with neuroactive and redox properties: Relevance to aging and brain diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2014: p. 646909.

Riecher A, Maurer K, Löffler W, Fatkenheuer B, der Heiden W, Hafner H. Schizophrenia—A disease of young single males? Preliminary results from an investigation on a representative cohort admitted to hospital for the first time. *Eur. Arch. Psychiatry Neurol. Sci.* 1989: p. 210–212.

Rios C, Santamaria A. Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem Res.* 1991: p. 1139–1143.

Roberts B, Seymour P, Schmidt C, al. e. Amelioration of ketamine-induced working memory deficits by dopamine D1 receptor agonists. *Psychopharmacology*. 2010: p. 407–418.

Saha S, Chant D, McGrath J. A systematic review of mortality in schizophrenia: is the differential mortality gap worsening over time? *Arch Gen Psychiatry*. 2007 Oct; p. 1123-1131.

Salgado JV, Hetem, LA, Sandner, G. Modelos experimentais de esquizofrenia – uma revisão Experimental. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2006: p. 135-141.

Sams-Dodd F. Effects of continuous D-amphetamine and phencyclidine administration on social behaviour, and locomotor activity in rats. *Neuropsychopharmacology*. 1998.

Sathyaikumar KV, Stachowski E, Wonodi I, Roberts RC, Thaker GK, Schwarcz R. Impairment of kynurenine 3- monooxygenase in the frontal cortex of individuals with schizophrenia: association with the eye tracking endophenotype. *Soc Neurosci Abstr*. 2009: p. 747.15.

Schwarcz R, Bruno J, Muchowski P, Wu H. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat Rev Neurosci*. 2012: p. 465-477.

Schefold J, Zenden J, Fotopoulou C. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms. *Nephrol Dial Transplant*. 2009: p. 1901-1908.

Schuk PF, Tonin A, da Costa Ferreira G, Viegas CM, Latini A, Duval Wannmacher CM, de Souza Wyse AT, Dutra-Filho CS, Wajner M. Kynurenines impair energy metabolism in rat cerebral cortex. *Cell Mol Neurobiol*. 2007: p. 147-160.

Schwarcz R, Guidetti P, Sathyaikumar KV, Muchowski PJ. Of mice, rats and men: revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. *Prog Neurobiol*. 2010: p. 230–245.

- Schwarcz R, Pellicciari R. Manipulation of brain kynurenes: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002: p. 1–10.
- Schwarcz R, Rassoulpour A, Wu HQ, Medoff D, Tamminga CA, Roberts RC. Increased cortical kynurenate content in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2001: p. 521–530.
- Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, Wong K. Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors.. *Nature.* 1976: p. 717–719.
- Seeman P, Lee T. Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons.. 1975: p. 1217–1219.
- Silbersweig DA Stern E, Frith C, Cahill C, Holmes A, Grootenck S, Seaward J, McKenna P, Chua SE, Schnorr L. A functional neuroanatomy of hallucinations in schizophrenia. *Nature.* 1995: p. 176–179.
- Smaga I, Niedzielska E, Gawlik M, Moniczewski A, Krzek J, Przegalinski E, Pera J, Filip M. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. *Pharmacological Reports.* 2015: p. 569–580.
- Srivastava N, Barthwal MK, Dalal PK, Agarwal AK, Nag D, Srimal RC, Seth PK, Dikshit M. Nitrite content and antioxidant enzyme levels in the blood of schizophrenia patients. *Psychopharmacology (Berlin).* 2001: p. 140–145.
- Steiner J, Bernstein HG, Bielau H, Farkas N, Winter J, Dobrowolny H, Brisch R, Gos T, Mawrin C, Myint AM, Bogerts B. S100B-immunopositive glia is elevated in paranoid as compared to residual schizophrenia: a morphometric study. *J Psychiatr Res.* 2008: p. 868–876.
- Stevens JR. The neuropathology of schizophrenia. *Psychol Med.* 1982: p. 695–700.

- Stone J, Morrison P, Pilowsky L. Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia-a synthesis and selective review. *J Psychopharmacol.* 2007; p. 440-452.
- Stone TW, Perkins MN. Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at aminoacid receptors in CNS. *Eur J Pharmacol.* 1981; p. 411-412.
- Szymona K, Zdzisińska B, Karakuła-Juchnowicz H, Kocki T, Kandefor-Szerszeń M, Flis M, Flis M, Rosa W, Urbańska EM. Correlations of Kynurenic Acid, 3-Hydroxykynurenine, sIL-2R, IFN- α , and IL-4 with Clinical Symptoms During Acute Relapse of Schizophrenia. *Neurotox Res.* 2017; p. 17-26.
- Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS. Schizophrenia, “just the facts” 5. Treatment and prevention: Past, present and future. *Schizophr. Res.* 2010; p. 1–23.
- Tang Y, Chen K, Zhou Y, Liu J, Wang Y, Driesen N, Edmiston EK, Chen X, Jiang X, Kong L, Zhou Q, Li H, Wu F, Wang Z, Xu K, Wang F. Neural activity changes in unaffected children of patients with schizophrenia: a resting-state fMRI study. *Schizophr Res.* 2015; p. 360-365.
- Tani M, Akashi N, Hori K, Konishi K, Kitajima Y, Tomioka H, Inamoto A, Hirata A, Tomita A, Koganemaru T, Takahashi A, Hachisu M. Anticholinergic Activity and Schizophrenia. *Neurodegener Dis.* 2015; p. 168-174.
- Tarabeux J, Kebir O, Gauthier J, Hamdan F, Xiong L, Piton A, Spiegelman D, Henrion É, Millet B; SD team, Fathalli F, Joobar R, Rapoport JL, DeLisi LE, Fombonne É, Mottron L, Forget-Dubois N, Boivin M, Michaud JL, Drapeau P, Lafrenière RG, Rouleau GA, Krebs MO. Rare mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Transl Psychiatry.* 2011; p. 55.
- Tavares RG, Tasca CI, Santos CE, Alves LB, Porciuncula LO, Emanuelli T. Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. *Neurochem Int.* 2002; p. 621-627.

Timms A, Dorschner M, Wechsler J, Choi K, Kirkwood R, Girirajan S, Baker C, Eichler EE, Korvatska O, Roche KW, Horwitz MS, Tsuang DW. Support for the N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia from exome sequencing in multiplex families. *JAMA Psychiatry*. 2013; p. 582-590.

Ting KK, Brew BJ, Guillemin GJ. Effect of quinolinic acid on human astrocytes morphology and functions: implications in Alzheimer's disease.. *J Neuroinflamm*. 2009; p. 2094-2096.

Urenjak J, Obrenovitch T. Kynurenine 3-hydroxylase inhibition in rats: effects on extracellular kynurenic acid concentration and N-methyl-D-aspartate-induced depolarisation in the striatum. *J Neurochem*. 2000 Dec; p. 2427-2433.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; p. 44-84.

Van Den Buuse M. Modeling the positive symptoms of schizophrenia in genetically modified mice: pharmacology and methodology aspects. *Schizophrenia bulletin*. 2010 mar; p. 246-270.

Van Os J, Kapur S. Schizophrenia. *The Lancet*. 2009 August 22; p. 635-645.

Vazquez S, Garner B, Sheil MM, Truscott RJ. Characterisation of the major autoxidation products of 3-hydroxykynurenine under physiological conditions. *Free Radic Res*. 2000; p. 11-23.

Vécsei L, Miller J, MacGarvey U, Flint Beal M. Kynurenine and probenecid inhibit pentylenetetrazol- and NMDLA-induced seizures and increase kynurenic acid concentrations in the brain. *Brain Res Bull*. 1992; p. 233-238.

Vidovic B, Stefanovic A, Milovanovic S, Ethordevic B, Kotur-Stevuljevic J, Ivanisevic J, Ivanišević J, Miljković M, Spasić S. Associations of oxidative stress status parameters with traditional cardiovascular disease risk factors in patients with schizophrenia. *Scand. J. Clin. Lab. Invest*. 2014; p. 184–191.

Visser E, Schug SA. The role of ketamine in pain management. *Biomed, Pharmacother.* 2006: p. 341-348.

Vollenweider F, Kometer M. The neurobiology of psychedelic drugs: implications for the treatment of mood disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2010: p. 642-651.

Vollenweider FX, Vontobel P, Oye I, Hell D, Leenders KL. Effects of (S)-ketamine on striatal dopamine: a raclopride PET study of a model psychosis in humans. *J Psychiatr Res.* 2000: p. 35-43.

Wang , Pinto-Duarte A, Sejnowski T, Behrens M. How Nox2-containing NADPH oxidase affects cortical circuits in the NMDA receptor antagonist model of schizophrenia. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Apr 20: p. 1444-1462.

Wang L, Zou F, Shao Y, Ye E, Jin X, Tan S, Hu D, Yang Z. Disruptive changes of cerebellar functional connectivity with the default mode network in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2014: p. 67-72.

Wang Q, Liu D, Song P, Zou MH. Tryptophan-kynurenine pathway is dysregulated in inflammation and immune activation. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2015: p. 1116-1143.

Wang S, Han C, Lee S, Jun T, Patkar A, Masand PS, Pae CU. Investigational dopamine antagonists for the treatment of schizophrenia. *Expert Opin Investig Drugs.* 2017: p. 687-698. .

White RS, Siegel SJ. Cellular and Circuit Models of Increased Resting State Network Gamma Activity in Schizophrenia. *Neuroscience.* 2016: p. 66–76.

WHO WHO-. Geneva: WHO; 2001.

Widner B, Leblhuber F, Walli J, Tilz GP, Demel U, Fuchs D. Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 2000: p. 343-353.

Williams M, Zhang Z, Nance E, Drewes J, Lesniak W, Singh S, Chugani DC, Rangaramanujam K, Graham DR, Kannan S. Maternal

Inflammation Results in Altered Tryptophan Metabolism in Rabbit Placenta and Fetal Brain. *Dev Neurosci*. 2017 Mai 11.

Wonodi I, McMahon R, Krishna N, Mitchell B, Liu J, Glassman M, Hong LE, Gold JM. Influence of kynurenine 3-monooxygenase (KMO) gene polymorphism on cognitive function in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2014; p. 80-87.

Wonodi I, Schwarcz R. Cortical kynurenine pathway metabolism: A novel target for cognitive enhancement in schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2010; p. 2011-2018.

Wonodi I, Stine O, Sathyaikumar K, Roberts R, Mitchell B, Hong LE, Kajii Y, Thaker GK, Schwarcz R. Downregulated kynurenine 3-monooxygenase gene expression and enzyme activity in schizophrenia and genetic association with schizophrenia endophenotypes. *Arch Gen Psychiatry*. 2011; p. 665-674.

Wu HQ, Pereira EF, Bruno JP, Pellicciari R, Albuquerque EX, Schwarcz R. The astrocyte-derived alpha7 nicotinic receptor antagonist kynurenic acid controls extracellular glutamate levels in the prefrontal cortex. *J MolNeurosci*. 2010; p. 204–210.

Wu W, Nicolazzo J, Wen L, Chung R, Stankovic R, Bao SS, Lim CK, Brew BJ, Cullen KM, Guillemin GJ. Expression of tryptophan 2,3-dioxygenase and production of kynurenine pathway metabolites in triple transgenic mice and human Alzheimer's Disease brain. *PLoS One*. 2013; p. e59749.

Wurfel BE, Drevets WC, Bliss SA, McMillin JR, Suzuki H, Ford BN, Morris HM, Teague, Dantzer R, Savitz JB. Serum kynurenic acid is reduced in affective psychosis. *Translational Psychiatry*. 2017; p. e1115.

Xu K, Lipsky R. Repeated ketamine administration alters N- methyl-D-aspartic acid receptor subunit gene expression: implication of genetic vulnerability for ketamine abuse and ketamine psychosis in humans. *Exp Biol Med*. 2015; p. 145–155..

Xu Y, Zhuo C, Qin W, Zhu J, Yu C. Altered spontaneous brain activity in schizophrenia: a meta-analysis and a large-sample study. *Biomed Res Int*. 2015; p. 204628..

Zhang X, Chen D, Xiu M, Tang W, Zhang F, Liu L, Chen Y, Liu J, Yao JK, Kosten TA, Kosten TR. Plasma total antioxidant status and cognitive impairments in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2012; p. 66-72.

Zhang XY, Chen da C, Xiu MH, Yang FD, Tan Y, Luo X, Zuo L, Kosten TA, Kosten TR. Cognitive function, plasma MnSOD activity, and MnSOD Ala-9Val polymorphism in patients with schizophrenia and normal controls. *Schizophr. Bull.* 2014; p. 592–601

ANEXO

ANEXO A: PARECER DA COMISSÃO ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Animal Welfare Committee

7000 Fossado Street, Suite 1870
Houston, Texas 77030

APPROVAL – ANIMAL PROTOCOL: NON-USDA SPECIES

July 09, 2014

AWC-14-0097 – “Evaluation of behavioral and metabolomics changes induced by ketamine in an animal model of schizophrenia ”

PI: Joao De Quevedo, MD, PhD

SPECIES: Rat

PAIN CLASSIFICATION: E

NUMBER OF ANIMALS APPROVED: 296

FUNDING AGENCY: Psychiatry/Behavioral Sciences

PROVISIONS: NONE

APPROVED: Designated Member Review

ORIGINAL APPROVAL DATE: 07/09/2014

EXPIRATION DATE: 06/30/2017

CHAIRPERSON: Catherine G. Ambrose, Ph.D. *Catherine G. Ambrose, PhD*

Approval is given to initiate this protocol for the use of animals, contingent upon compliance with any other provisions noted above.

REVISIONS REQUIRED BY THE AWC – If the AWC requires that revisions be made to proposed animal manipulations in a grant that is covered by this protocol, the PI must submit the revisions to the funding agency as soon as the revised protocol/materials have been approved by the AWC.

CHANGES – Modifications to this protocol must be submitted for review and approval prior to implementation. Minor changes, e.g. dosing regimens, methods of euthanasia, anesthesia, surgery, new personnel, etc. must be submitted on a Change Request form available on the AWC/CLAMC [website](#). If changes are extensive, or involve another species, a new Animal Protocol must be submitted.

ADVERSE EVENTS/UNANTICIPATED PROBLEMS - It is the responsibility of the PI to report to the veterinarian and the AWC any unexpected outcomes (abnormal phenotypes, increased toxicity of substance, surgical complications, etc.) that have resulted in jeopardizing the welfare of the animals in excess of what was explained in the protocol. An Adverse Event/Unanticipated Problems/Protocol Deviation form is available on the AWC/CLAMC [website](#). Please complete and submit to awc@uth.tmc.edu.

PROTOCOL DEVIATIONS - It is the responsibility of the PI to report any unapproved deviations in the protocol to the AWC as soon as discovered. Such deviations may include; personnel not approved on protocol manipulating animals, breeding strains that were not approved on protocol; changing method of anesthesia without approval. Please complete an Adverse Event/Unanticipated Problem/Protocol Deviation form available on the AWC/CLAMC [website](#) and submit to the awc@uth.tmc.edu.

LOCATIONS FOR HOUSING/MANIPULATION - Locations for the housing and manipulation of animals are contingent upon the health status of the animals, facility barrier level, containment level, and the availability of space. While appropriate housing of all animals is managed by CLAMC, housing decisions for the IMM are made in consultation with the IMM Vivarium Committee. The locations for AWC-approved animal manipulations outside of the barrier but within IMM facility must be endorsed by the IMM Vivarium committee since such activities may compromise the integrity of the barrier.

GRANT RENEWALS/SUBMISSION TO ANOTHER FUNDING AGENCY – Submit a completed Change Request form and a copy of the grant to the AWC office. Include the first page of the new grant, the abstract, and the section describing the animal work. All animal work stated in the grant must be covered by the approved animal protocol.

ANIMAL PROTOCOL REVIEW NUMBER – Animals purchased with the number listed above may be used only for the protocol(s) approved under this number.

PERSONNEL TRAINING- It is your responsibility to ensure that all personnel working with animals are adequately trained. To register individuals for the required training go to Animal Training [website](#).