



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

TATIANE DA SILVA ARAUJO

**PAPEL DE MODULADORES DA VIA DAS QUINURENINAS NA REVERSÃO
DE SINTOMAS E ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS TIPO-
ESQUIZOFRENIA INDUZIDOS PELA ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE
CETAMINA EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA/CE

2015

TATIANE DA SILVA ARAUJO

**PAPEL DE MODULADORES DA VIA DAS QUINURENINAS NA REVERSÃO
DE SINTOMAS E ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS TIPO-
ESQUIZOFRENIA INDUZIDOS PELA ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE
CETAMINA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Neurofarmacologia

Orientadora: Dra. Danielle Macêdo Gaspar

FORTALEZA/CE

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- A692p Araújo, Tatiane da Silva.
Papel de moduladores da via das quinureninas na reversão de sintomas e alterações neuroquímicas tipo- esquizofrenia induzidos pela administração repetida de cetamina em camundongos. / Tatiane da Silva Araújo. – 2015.
72 f.: il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Neurofarmacologia.
Orientação: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.

1. Esquizofrenia. 2. Melatonina. 3. Ketamina. 4. Risperidona. I. Título.

CDD 616.8982

TATIANE DA SILVA ARAUJO

**PAPEL DE MODULADORES DA VIA DAS QUINURENINAS NA REVERSÃO DE
SINTOMAS E ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS TIPO-ESQUIZOFRENIA
INDUZIDOS PELA ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE CETAMINA EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Neurofarmacologia

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Vanessa Costhek Abílio
Escola Paulista de Medicina (UNIFESP)

Prof. Dr. David Freitas de Lucena
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais e irmãos. As maiores
riquezas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo.

À Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar, minha orientadora, por ser uma profissional excepcional, dedicada e paciente. Muito obrigada pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, por todos os ensinamentos e por me inspirar a querer buscar sempre crescer e melhorar profissionalmente.

Aos meus pais, José Alfredo e Katia Maria, por todo amor e dedicação.

Aos meus irmãos, Taiane e Thiago, sempre presentes dando-me apoio e incentivo.

Aos amigos e companheiros de laboratório, Ana Isabelle, Michel Machado, Mariana Feitosa, Patrícia Xavier, Roberta Costa e Adriano Chaves, por todos os momentos compartilhados, por tornarem os longos dias de experimentos mais agradáveis e prazerosos.

Aos companheiros da neurofarmacologia pelo incentivo e contribuições: Rafaela Cordeiro, Aline Monte e Germana Vasconcelos.

Aos professores do programa de pós-graduação em Farmacologia, pelos ensinamentos e contribuições.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

RESUMO

PAPEL DE MODULADORES DA VIA DAS QUINURENINAS NA REVERSÃO DE SINTOMAS E ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS TIPO-ESQUIZOFRENIA INDUZIDOS PELA ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE CETAMINA EM CAMUNDONGOS.

A esquizofrenia é um transtorno mental grave e incapacitante com fisiopatologia pouco conhecida e limitações na terapia farmacológica. Este transtorno mental é considerado uma síndrome pela presença de vários sintomas, como sintomas positivos (delírios e alucinações), negativos (isolamento social) e cognitivos (déficits de memória de trabalho), sendo os dois últimos com terapia farmacológica ainda não satisfatória. Evidências apontam para a participação de alterações oxidativas e imunológicas na fisiopatologia da esquizofrenia. Em modelo animal pela administração repetida de cetamina, um antagonista de receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) ocorrem alterações como redução de glutatona reduzida (GSH) e aumento de peroxidação lipídica, bem como aumento de citocinas pró-inflamatórias em áreas cerebrais como córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e corpo estriado (CE). Uma das alterações presentes na esquizofrenia e ainda pouco estudada está relacionada ao desequilíbrio no metabolismo no triptofano pela via das quinureninas com aumento na produção de ácido quinurênico, um inibidor dos receptores do tipo NMDA. Duas enzimas chave nesta via são a indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) e a triptofano dioxigenase (TDO). Assim, nosso estudo investigou o papel do inibidor de IDO, 1-metil-d-triptofano e do inibidor de TDO, melatonina na reversão de alterações comportamentais e neuroquímicas tipo-esquizofrenia induzidas por cetamina em camundongos. Camundongos Swiss machos adultos receberam solução salina ou cetamina por 14 dias e, do 8º ao 14º dia, receberam adicionalmente 1-metil-d-triptofano (20 ou 40mg/kg, i.p.), melatonina (15mg/kg, p.o.) ou risperidona (0,25mg/kg, i.p.), usada como antipsicóticos padrão, 30 minutos após salina ou cetamina. Sintomas tipo-esquizofrenia foram avaliados através dos teste de inibição pré-pulso e atividade locomotora (sintomas positivos), preferência social (sintomas negativos) e labirinto em y (sintomas cognitivos). Alterações oxidativas pelos testes de GSH, peroxidação lipídica e níveis de nitrito, alterações inflamatórias através da atividade de mieloperoxidase e níveis de citocinas IL-6 e IL-4 foram medidos no CPF, HC e no CE. Os resultados dos testes comportamentais mostraram que a cetamina promoveu um déficit no filtro sensorio-motor, aumento da atividade locomotora, diminuição da interação social e prejuízo na memória de trabalho compatíveis com um fenótipo comportamental tipo-esquizofrenia. Praticamente todos esses parâmetros foram revertidos pela administração de 1-metil-d-triptofano ou melatonina. A risperidona, por sua vez, não conseguiu reverter as alterações no teste do labirinto em Y. Com relação às alterações neuroquímicas a cetamina também promoveu um aumento da peroxidação lipídica, diminuição dos níveis de GSH, aumento dos níveis de nitrito (em CE), aumento na atividade da mieloperoxidase e aumento de citocinas de Th2 como IL-6 e IL-4. Seguindo a mesma linha dos resultados comportamentais, 1-metil-d-triptofano, melatonina e risperidona foram capazes de reverter tais alterações. Os resultados encontrados sugerem que possivelmente essas drogas imunomoduladoras do metabolismo do triptofano na via nas quinureninas podem vir a ser promissoras no tratamento da esquizofrenia.

Palavras-chave: Esquizofrenia, quinureninas, melatonina, 1-metil-d-triptofano, cetamina, risperidona.

ABSTRACT

THE ROLE OF KYNURENINES PATHWAY MODULATORS IN THE REVERSAL OF SCHIZOPHRENIA-LIKE BEHAVIORAL AND NEUROCHEMICAL CHANGES INDUCED BY KETAMINE IN MICE.

Schizophrenia is a serious and disabling mental disorder. The pathophysiology is little known and has limitations in drug therapy. Evidence suggests that alterations in the immune system would be associated with schizophrenia by an imbalance in the metabolism of tryptophan through kynurenine pathway and an increase in the production of kynurenic acid. This study investigated the effect of kynurenines pathway modulators in the reversal of schizophrenia-like behavioral and neurochemical changes induced by ketamine in mice. Adult male mice received saline or ketamine for 14 days, and the 8th to the 14th day, additionally received 1-methyl-d-tryptophan (20 or 40 mg / kg), risperidone (0.25 mg / kg) both intraperitoneally, or melatonin (15mg / kg) orally administered 30 minutes later. Schizophrenia-like symptoms were assessed by pre-pulse inhibition (PPI) and locomotor activity, social preference and Y-maze. Oxidative changes (reduced glutathione (GSH) and lipid peroxidation), nitrite levels, inflammatory alterations (myeloperoxidase) and cytokines levels (IL-6 and IL-4) were measured in the prefrontal cortex, hippocampus and the striatum. The result of behavioral tests showed that ketamine promoted the deficit in sensorimotor filter, increased locomotor activity, social interaction, decreased and prejudice work memory. All of these parameters were prevented and reversed by the administration of 1-methyl-D-tryptophan (20 or 40 mg/kg), risperidone (0.25mg/kg) and melatonin (15 mg/kg). Ketamine has also promoted an increase in lipid peroxidation, decrease in GSH levels, increased levels of nitrite, inflammatory changes indicated by myeloperoxidase and alterations in levels of proinflammatory (IL-6) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines. Accordingly, 1-methyl-d-tryptophan, melatonin and risperidone were able to reverse those changes, except in IL-4 levels. The results suggest that these drugs act like immunomodulators of tryptophan metabolism in kynurenines pathway.

Key words: schizophrenia, kynurenine, melatonin, 1-methyl-d-tryptophan, ketamine

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Um resumo das rotas de metabolização do triptofano.....	17
Figura 2 - A ativação de micróglia e astrócitos leva a produção de metabólitos distintos do triptofano pela via das quinureninas	19
Figura 3 - Estrutura química da melatonina.....	21
Figura 4 - Estrutura química do 1-metil-d-triptofano.....	23
Figura 5 - Esquema simplificado do mecanismo de inibição pré-pulso (IPP).....	25
Figura 6 - Representação esquemática do procedimento experimental.....	31
Figura 7 - Porcentagem de inibição pré-pulso e amplitude de sobressalto	39
Figura 8 - Número de Cruzamentos (A) e <i>rearings</i> (B)	41
Figura 9 - Porcentagem de alterações corretas no teste de labirinto em Y (A) e porcentagem de interação social (B).....	43
Figura 10 - Níveis de glutathiona reduzida (GSH)	45
Figura 11 - Níveis de peroxidação lipídica	47
Figura 12 - Níveis de nitrito.....	49
Figura 13 - Atividade de mieloperoxidase (MPO).....	51
Figura 14 - Níveis de interleucina 6 (IL-6).....	53
Figura 15 - Níveis de interleucina 4 (IL-4).....	55
Figura 16 - Resumo esquemático dos resultados obtidos na presente pesquisa.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1-MDT	1-metil-D-triptofano
3-HK	3-hidroxiquinurenina
5-HT	Setoronina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
AMPc	adenosina monofosfato cíclica
ANOVA	Análise de Variância
APC	Célula apresentadora de antígeno
CE	Corpo estriado
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CPF	Córtex pré-frontal
dB	Decibéis
GSH	Glutathiona Reduzida
HC	hipocampo
HHA	hipotálamo-hipófise-adrenal
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IDO	indoleamina 2,3 dioxigenase
IFN γ	interferon gama
IL	Interleucina
IPP	Inibição Pré-pulso
KET	Cetamina
KYNA	Ácido quinurênico
KYN-HOSE	quinurenina-3-hidroxilase
MDA	Malondialdeído
MEL	Melatonina
MPO	Mieloperoxidase
NK	<i>natural killer</i>
NMDA	N-metil-d-aspartato
NMDAR	Receptor de N-metil-d-aspartato
NO	Óxido nítrico
NO ⁻²	Nitrito
NO ⁻³	Nitrato
OH	Radical hidroxila

ONOO ⁻	Peroxinitrito
P	Pulso sozinho
PP	Pré-pulso + pulso
RISP	Risperidona
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TDO	triptofano 2,3 dioxigenase
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Esquizofrenia	12
1.2 Fisiopatologia da esquizofrenia.....	13
1.2.1 O papel do metabolismo do triptofano/quinureninas na esquizofrenia.....	16
1.2.2 Estresse Oxidativo e Esquizofrenia.....	19
1.3 Possíveis benefícios da modulação da via das quinureninas na esquizofrenia.....	20
1.3.1 Melatonina	20
1.3.2 1-Metil-d-triptofano.....	22
1.4 Modelos animais de esquizofrenia.....	23
1.4.1 Testes comportamentais para o estudo da esquizofrenia.....	25
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Animais.....	30
4.2 Drogas.....	30
4.3 Procedimento experimental.....	30
4.4 Testes comportamentais.....	32
4.5 Determinação de parâmetros de estresse oxidativo.....	34
4.6 Avaliação da resposta inflamatória.....	35
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
6. RESULTADOS.....	38
6.1 Reversão das alterações comportamentais induzidas por cetamina pelos inibidores das enzimas IDO e TDO	38
6.2 1-metil-d-triptofano (1-MDT) e melatonina (MEL) são capazes de reverter as alterações pró-oxidativas e dos níveis de nitrito induzidas pela administração repetida de cetamina.....	44
6.3 Identificação de alterações inflamatórias causadas pela administração repetida de cetamina em camundongos	50
7. DISCUSSÃO	57
8. CONCLUSÃO	64
REFERENCIAS	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia é um transtorno mental crônico e incapacitante que afeta aproximadamente 1% da população em geral, com perturbações das funções cognitivas, sociais e comportamentais (MONTE et al., 2013; MORERA-FUMERO; ABREU-GONZALEZ, 2013)

Os sintomas geralmente começam no final da adolescência ou início da idade adulta. A prevalência da doença é de aproximadamente 0,5 – 1,0% da população mundial e apenas metade dos pacientes são susceptíveis ao tratamento (MEYER; FELDON, 2010) O início da esquizofrenia geralmente é precedida por uma fase prodromica, caracterizada por sintomas psicóticos subliminares, alta probabilidade de um histórico familiar de esquizofrenia e um declínio nas tarefas do cotidiano (DE LA FUENTE-SANDOVAL et al., 2011)

A expectativa de vida na esquizofrenia é cerca de 20% menor que a da população em geral. O número de mortes está aumentando de 1,6 a 3 vezes, sendo o suicídio a principal causa de morte prematura em pessoas com esquizofrenia. Quase 50% dos pacientes com esquizofrenia tentam suicídio, uma taxa pelo menos 10 vezes maior que da população em geral (HOR; TAYLOR, 2010).

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

A esquizofrenia é uma síndrome caracterizada por sintomas positivos, negativos e cognitivos. Os sintomas positivos são características que normalmente não estão presentes no indivíduo, tais como delírios, alucinações, psicose, paranoia, pensamento desordenado e fala desorganizada. Já os sintomas negativos referem-se a características que estão normalmente presentes no indivíduo, mas são reduzidas ou ausentes, tais como comportamento emocional violento, anedonia, embotamento afetivo e avolição. Os sintomas cognitivos da esquizofrenia envolvem déficit de atenção, de memória operacional e de aprendizagem (LEWIS; LIEBERMAN, 2000; MEYER; FELDON, 2010). Atualmente existe um crescente interesse nos sintomas negativos e

cognitivos, uma vez que os antipsicóticos disponíveis para tratamento da esquizofrenia mostram uma eficácia clínica limitada sobre esses sintomas (MEYER; SCHWARZ; MÜLLER, 2011).

Por ser uma doença altamente debilitante de desenvolvimento neurológico grave e afetar o indivíduo num período crítico da vida, normalmente na fase jovem, a prevenção e o diagnóstico precoce para a esquizofrenia tem sido uma das metas para melhorar os resultados a longo prazo (AMMINGER et al., 2010).

Alguns estudos sugerem que há uma maior incidência e prevalência do surgimento da esquizofrenia em homens. Já em mulheres os sintomas se manifestam mais tardiamente (THOMAS et al., 2010). Além disso, nos homens há uma maior severidade, alterações cerebrais mais pronunciadas e uma maior refratariedade ao tratamento (WONG; VAN TOL, 2003).

Múltiplas alterações estruturais no sistema nervoso central e do neurodesenvolvimento em pacientes com esquizofrenia tem sido descritas, tais como: aumento ventricular (terceiro ventrículo e ventrículos laterais), redução no lobo temporal medial e giro temporal superior, assim como redução das regiões pré-frontais (ROSS et al., 2006). Estudos de neuroimagem indicam alterações desde o neurodesenvolvimento pré-natal até o pós-puberal, fase frequentemente ligada ao primeiro surto psicótico. Estudos neuropatológicos demonstram anormalidades citoestruturais leves, com neurônios aberrantes na substância branca do córtice pré-frontal, migração neuronal cortical desordenada e redução no volume dos neurônios corticais. Estudos apontam uma correlação entre danos neurológicos no período pré-natal, principalmente por infecções virais, alterações no sistema imune, complicações obstétricas e esquizofrenia (ROSS et al., 2006).

1.2 Fisiopatologia da esquizofrenia

A fisiopatologia da esquizofrenia ainda não foi completamente desvendada. Vários estudos apontam um desequilíbrio nos sistemas de neurotransmissores e com isso algumas hipóteses foram levantadas na tentativa de explicar a neurobiologia da esquizofrenia.

A hipótese mais conhecida e primeiramente estudada foi a “hipótese dopaminérgica” que correlaciona os sintomas da esquizofrenia com uma desregulação na neurotransmissão de dopamina no cérebro (LODGE; GRACE, 2011). Tal hipótese é baseada na evidência de que todos os medicamentos antipsicóticos usados na terapêutica atuam como antagonistas dos receptores de dopamina, mais especificamente

receptores do tipo D2 e que fármacos tais como as anfetaminas aumentarem dopamina no cérebro causando episódios psicóticos em indivíduos normais (MEYER; SCHWARZ; MÜLLER, 2011).

A hipótese dopaminérgica sugere que o desencadeamento dos sintomas positivos da esquizofrenia surge por causa de uma hiperfunção dopaminérgica em razão de um aumento da ocupação dos receptores D2, levando ao surgimento dos sintomas positivos (SEEMAN, 1987). Enquanto que os sintomas negativos e alterações cognitivas aparentemente são causados por uma redução dos níveis de dopamina no cortex pré-frontal (STONE; MORRISON; PILOWSKY, 2007). Porém, a teoria dopaminérgica sozinha não explica completamente a fisiopatologia da esquizofrenia, uma vez que não é capaz de desvendar as razões subjacentes ao início dos sintomas deste transtorno no início da vida adulta, as alterações cognitivas e em estruturas cerebrais e o fato dos antipsicóticos não serem igualmente eficazes sobre sintomas negativos (JOHNSTONE; FRITH; KREEL, 1976).

Devido ao fato do sistema dopaminérgico ser modulado pelo glutamatérgico e este sistema estar envolvido em importantes funções como função cognitiva (memória e aprendizagem), foi postulada a hipótese glutamatérgica da esquizofrenia. Esta hipótese é reforçada pelo fato do tratamento com drogas, tais como fenciclidina e cetamina, ambas antagonistas dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), exacerbarem os sintomas psicóticos em pacientes esquizofrênicos e induzirem sintomas positivos e negativos em indivíduos saudáveis, ao contrário da anfetamina, que só gera sintomas positivos. Assim, a partir dessa observação, a hipótese glutamatérgica defende que uma hiperfunção nos receptores NMDA está diretamente relacionada com a fisiopatologia da esquizofrenia (BRESSAN; PILOWSKY, 2003). Dentre os antagonistas dos receptores NMDA, a cetamina tem recebido atenção numa série de trabalhos na literatura científica (MIYAMOTO et al., 2001).

Outras evidências sugerem que um desequilíbrio no sistema imune estaria envolvido na patogênese da esquizofrenia (MULLER; J. SCHWARZ, 2010). O sistema imunológico tem a função de defender o organismo humano contra microrganismos e para isso possui uma estrutura diferenciada em linhas de defesa envolvendo a participação de componentes celulares e humorais (AGUIAR et al., 2010; STROUS; SHOENFELD, 2006). Neste contexto, monócitos/macrófagos, granulócitos, células *natural killer* (NK) integram o componente celular da primeira linha de defesa celular, ou imunidade inata, enquanto que proteínas de fase aguda e sistema complemento representam o componente humoral. Uma segunda linha de defesa, também chamado de

sistema imune adaptativo, possui uma memória imune extremamente seletiva, sendo portanto altamente específico. Este é constituído por um componente celular de linfócitos T e B. As células T possuem funções de citotoxicidade, regulação e memória antigênica, enquanto que as células B tem por função produzir anticorpos altamente seletivos que fazem parte do componente humoral da defesa adaptativa (ROTHERMUNDT; AROLT; BAYER, 2001; STROUS; SHOENFELD, 2006). O sistema imune adaptativo também possui células T auxiliares Th1 e Th2, relacionadas com a produção de interleucinas (IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon- γ (IFN- γ) (AGUIAR et al., 2010).

A micróglia, célula de origem monocítica, é o macrófago do SNC relacionada ao sistema imune. Estas células quando são ativadas, em resposta a estímulos inflamatórios, secretam citocinas e prostaglandinas (KHANDAKER et al., 2015)

As citocinas regulam todos componentes celulares do sistema imune inato e adaptativo. Assim, dependendo na sua atividade biológica, as citocinas podem ser classificadas como pró-inflamatórias quando relacionadas a um perfil de resposta imune Th1 (IL-2, IFN- γ) ou anti-inflamatória se estiver relacionada a um perfil de resposta imune Th2 (IL-4, IL-10) (MÜLLER et al., 2013).

Nesse sentido, um desequilíbrio nos perfis Th1 e Th2 de resposta imune, bem como um aumento nos níveis de citocinas parecem desempenhar um papel importante na esquizofrenia (AGUIAR et al., 2010). De fato, indivíduos com doenças autoimunes e infecções graves têm níveis persistentes ou agudamente elevados de biomarcadores inflamatórios em seu plasma, e em tais indivíduos foi encontrado um risco aumentado de esquizofrenia em um recente estudo prospectivo com 3,6 milhões de indivíduos (ANDERSON; MAES, 2013).

Diversos estudos realizados no soro e no plasma de pacientes esquizofrênicos descrevem níveis aumentados de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , sendo estes portanto, importantes marcadores imunológicos de atividade pró-inflamatória (MEYER; SCHWARZ; MÜLLER, 2011). Também foram encontrados níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, e IL-2, no fluido cérebro-espinhal (CSF) de pacientes com esquizofrenia (GARVER; TAMAS; HOLCOMB, 2003; SÖDERLUND et al., 2009). Em outros estudos foi analisado o papel de marcadores anti-inflamatórios e imunossupressores na esquizofrenia. Assim, foi encontrado níveis reduzidos de IL-4 durante episódios agudos da doença (KIM et al., 2004; O'BRIEN; SCULLY; DINAN, 2008). Curiosamente, a citocina IL-4 também induziu a apoptose

em células microgлияis (SORIA et al., 2011). Todavia, também foram encontrados níveis aumentados de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-8, IL-10) no soro de pacientes esquizofrênicos (KUNZ et al., 2011; MAES et al., 2002; YANG et al., 2002).

Uma redução no perfil de citocinas anti-inflamatórias parece indicar que o sistema imunológico dos pacientes esquizofrênicos possui uma incapacidade de limitar uma resposta inflamatória. Embora a atividade anti-inflamatória seja necessária para evitar os efeitos deletérios causados por uma hiperatividade de marcadores pró-inflamatórios, o excesso de uma ativação anti-inflamatória pode reduzir a resistência a agentes infecciosos e a induzir possíveis anomalias fisiológicas (MEYER; SCHWARZ; MÜLLER, 2011). Estas alterações estão relacionadas aos sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia.

1.2.1 O papel do metabolismo do triptofano/quinureninas na esquizofrenia

O triptofano é um aminoácido essencial cuja principal via de metabolização ocorre pela via das quinureninas. A rota principal de sua metabolização gera o ácido quinolínico (QUIN) e nicotinamida. As rotas secundárias levam a formação do ácido quinurênico (KYNA) e xanturênico. A metabolização do triptofano também ocorre pela via serotoninérgica que leva a produção de serotonina (5-HT), que pode gerar melatonina e outros metabólitos (STONE; DARLINGTON, 2002) (Fig. 1). O interesse pelo metabolismo triptofano/quinureninas surgiu a partir da descoberta do papel excitatório de QUIN sobre neurônios do sistema nervoso central (SNC) atuando como um agonista dos receptores NMDA de glutamato. Assim, surgiram hipóteses sobre o possível envolvimento da via em processos de neurodegeneração e plasticidade sináptica. Posteriormente a descoberta do papel inibitório do ácido quinurênico sobre os receptores NMDA reforçou tal hipótese (PERKINS; STONE, 1982). O metabólito KYNA atua como um bloqueador do sítio glicina dos receptores NMDA e atua também como um inibidor não competitivo do receptor nicotínico $\alpha 7$. Já o metabólito QUIN atua como um agonista dos receptores NMDA, aumenta a produção de radicais livres e neurotoxicidade (MULLER; SCHWARZ, 2010).

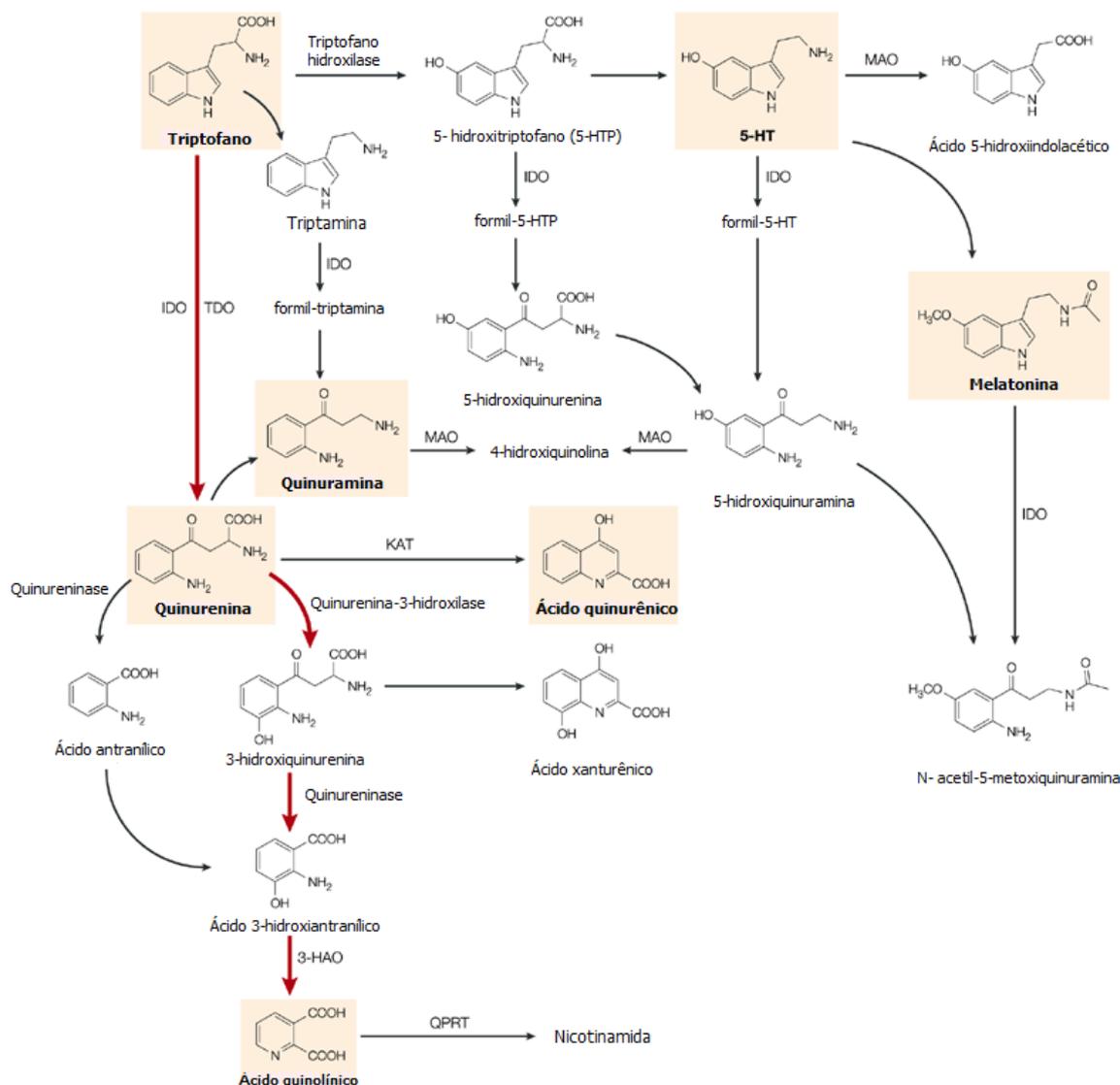


Fig. 1 - Um resumo das rotas de metabolização do triptofano (STONE; DARLINGTON, 2002)

A produção dos metabólitos quinureninas (KYN) é parcialmente regulada pelas enzimas indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) e triptofano 2,3 dioxigenase (TDO). Ambas as enzimas catalisam o primeiro passo na via, a degradação do triptofano para quinurenina (GROHMANN; FALLARINO; PUC CETTI, 2003; MULLER; SCHWARZ, 2010).

As enzimas TDO e IDO exercem seus efeitos inibitórios de maneira mutua, ou seja, quando ocorre uma redução na atividade de TDO há concomitantemente uma indução de IDO levando a alterações na rota de degradação do triptofano e nos tipos celulares envolvidos no processo. É sabido que IDO é expressa em diferentes células do SNC, porém por muitos anos foi pensado que a expressão de TDO era restrita ao tecido do fígado. No entanto, estudos mais recentes afirmam que TDO também é expressa em

células do SNC, mas restrita aos astrócitos (MILLER et al., 2004; TAKIKAWA et al., 1986).

O metabolismo do triptofano/quinureninas é realizado primeiramente em macrófagos e células microgliais, mas também ocorre em astrócitos, estes são a principal fonte de produção de KYNA e desempenham um papel chave na metabolização do mesmo. Já QUIN é produzido nas células da micróglia (Fig. 2) (HEYES et al., 1997; KISS et al., 2003).

Os astrócitos e células da micróglia estão envolvidos no equilíbrio entre os perfis Th1 e Th2 de resposta de imunológica. Um perfil Th1 no SNC ocorre principalmente em células microgliais e nos astrócitos há uma preferência por um perfil imunológico Th2 (ALOISI; RIA; ADORINI, 2000; XIAO; LINK, 1999).

Um desequilíbrio Th1/Th2 parece estar associado com alterações no metabolismo do triptofano pela via das quinureninas causadas por um desequilíbrio na atividade das enzimas IDO/TDO na esquizofrenia (MÜLLER; SCHWARZ, 2006). Um estudo analisou amostras de tecido do córtex de pacientes esquizofrênicos e identificou um aumento na expressão de TDO em comparação com os níveis de IDO, sendo observado esse aumento de TDO nos astrócitos, mas não na micróglia (MILLER et al., 2004).

Estudos realizados no cérebro *post-mortem* de pacientes esquizofrênicos encontraram níveis aumentados de KYNA, provavelmente causado por um desequilíbrio Th1/Th2 e ativação de astrócitos no SNC (ERHARDT et al., 2001; SCHWARCZ et al., 2001). Os astrócitos estão ativados em excesso na esquizofrenia e não possuem a enzima quinurenina-3-hidroxilase (KYN-OHSE), conseqüentemente não são capazes de produzir o metabólito 3-hidroxiquinurenina (3HK), porém são capazes de produzir grandes quantidades de KYNA que se acumula no SNC, enquanto a via metabólica das células da micróglia está bloqueada. Dessa forma, uma inibição na enzima KYN-OHSE provoca aumento considerável na produção de KYNA no SNC. Tais observações respaldam a afirmativa de que um desequilíbrio na ativação da micróglia e astrócitos estaria associado com atividade aumentada de TDO e níveis elevados de KYNA no SNC (GUILLEMAIN et al., 2003; SCHWARCZ et al., 2001; MULLER; SCHWARZ, 2010)

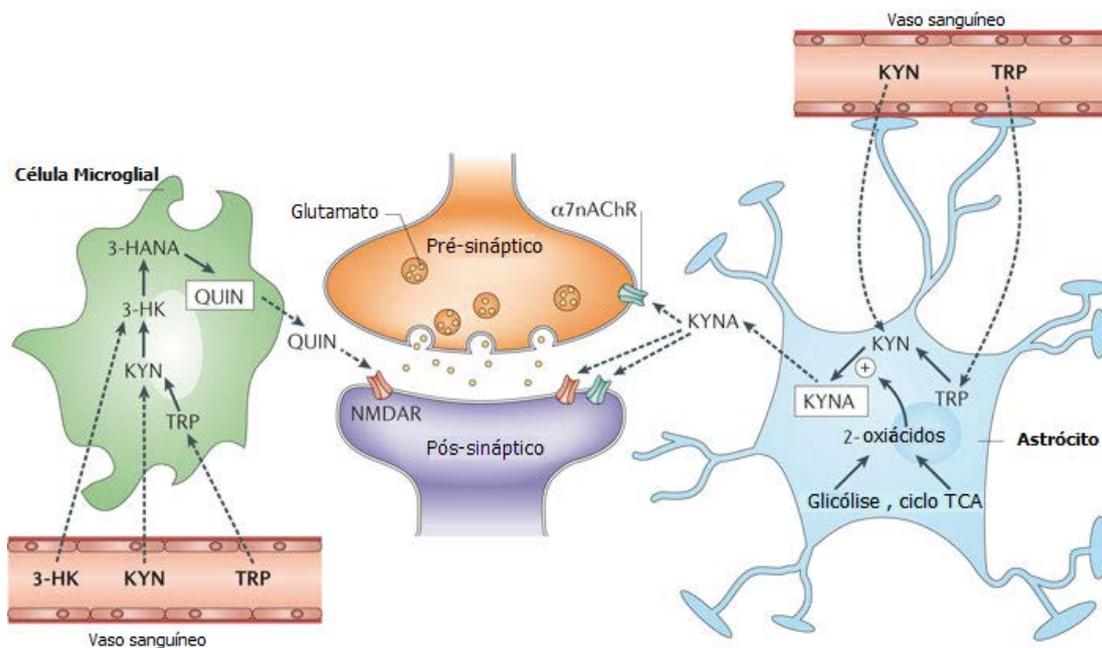


Fig. 2: A ativação de micróglia e astrócitos leva a produção de metabólitos distintos do triptofano pela via das quinureninas (SCHWARCZ et al., 2012)

O metabólito KYNA atua como um bloqueador do sítio glicina dos receptores NMDA e atua também como um inibidor não competitivo dos receptores nicotínicos $\alpha 7$, ou seja, um aumento nos níveis de KYNA pode explicar sintomas psicóticos e deterioração cognitiva (MULLER; SCHWARZ, 2010). Assim, um desequilíbrio imunológico provoca alterações da modulação glutamatérgica-dopaminérgica que podem resultar em um quadro clínico de esquizofrenia. Portanto, inibidores que atuam no processo inflamatório podem melhorar os sintomas psicóticos (MÜLLER; MYINT; SCHWARZ, 2011).

1.2.2 Estresse Oxidativo e Esquizofrenia

O estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre a produção em excesso de espécies reativas de oxigênio (ou radicais livres) e uma deficiência nos mecanismos de proteção antioxidantes fisiológicos (SULLIVAN; O'DONNELL, 2012) importante na fisiopatologia da esquizofrenia e de outras alterações mentais, uma vez que o cérebro é particularmente vulnerável ao dano oxidativo devido à sua alta utilização de oxigênio e ao seu alto teor de ácidos graxos polinsaturados oxidáveis (CHITTIPROL et al., 2009; PADURARIU et al., 2010; DO et al., 2009).

Estudos realizados com pacientes esquizofrênicos mostraram um aumento nos níveis de malondialdeído (MDA) no soro e de óxido nítrico no plasma, enquanto a atividade da superóxido dismutase (SOD) foi diminuída (DAKHALE et al., 2005 e LI et

al., 2006). Outro estudo mostrou alterações pró-oxidantes, uma diminuição nos níveis de GSH e um aumento na peroxidação lipídica, usando o modelo animal de esquizofrenia induzida pela administração repetida de cetamina (MONTE *et al.*, 2013). Baixos níveis de GSH e um desequilíbrio no complexo de enzimas antioxidantes no cérebro de ratos tratados perinatalmente com fenciclidina, que representa um dos modelos animais atuais da esquizofrenia, também foram demonstrados (RADONJIĆ *et al.*, 2010 ; STOJKOVIĆ *et al.*, 2012).

Um aspecto notável do NO com considerável relevância biológica é a sua aparência como radical livre, devido a seus elétrons desemparelhados (-NO). A citotoxicidade mediada por -NO em altas concentrações é devida, pelo menos em parte, a conjugação do radical -NO com superóxido, gerando peroxinitrito (ONOO-) (BERNSTEIN *et al.*, 2005). O peroxinitrito reage com uma grande variedade de moléculas biológicas, tais como antioxidantes celulares (glutathiona e ascorbato) podendo iniciar a peroxidação lipídica, danos a proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos. Isso pode levar à inibição da enzima e auto-oxidação do neurotransmissor dopamina (DRAPIER; HIBBS, 1988; ANTUNES *et al.*, 2005). Além disso, ONOO- representa, no pH fisiológico, um oxidante forte (BECKMAN; KOPPENOL, 1996; NOACK *et al.*, 1999), porém decai rapidamente para formar o metabólito estável nitrato (TOHGI *et al.*, 1998)

O nitrito é frequentemente usado como marcador dos níveis de óxido nítrico (NO) (FLATOW *et al.*, 2013), pois, em solução aquosa, o NO reage com o oxigênio molecular e se acumula no plasma/soro como os íons nitrito (NO^{-2}) e nitrato (NO^{-3}) (KOLTUKSUZ *et al.*, 2000). Uma revisão sistemática e quantitativa de marcadores de estresse oxidativo encontrou um aumento significativo nos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e NO em pacientes com esquizofrenia em comparação com pacientes controles (ZHANG *et al.*, 2010).

1.3 Possíveis benefícios da modulação da via das quinureninas na esquizofrenia

1.3.1 Melatonina

A melatonina (5-methoxy-N-acetyltryptamina) (Fig. 3) é o principal hormônio secretado pela glândula pineal. Em humanos participa da regulação do sono, regulação do ritmo circadiano e temperatura corporal. Exerce também ações adicionais no sistema nervoso central (SNC), sistema imunológico e estimula a atividade de enzimas antioxidantes (PANDI-PERUMAL *et al.*, 2013).

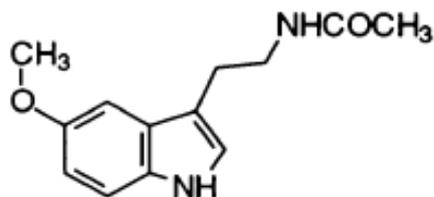


Fig.3: Estrutura química da melatonina (DESCAMPS-FRANÇOIS et al., 2003)

A sintetização da melatonina (MEL) ocorre a partir da metabolização do triptofano que é hidroxilado a 5-hidroxitriptofano (5-HTP), posteriormente é convertido no neurotransmissor serotonina (5-HT) que é então acetilada formando N-acetilserotonina que, por fim é metilada dando origem à melatonina (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003).

A maior parte dos efeitos de MEL no cérebro ocorre através da ativação de receptores de membrana, MT1 e MT2, acoplados à proteína G (MORERA-FUMERO; ABREU-GONZALEZ, 2013; SHAEIB et al., 2015). Receptores do tipo MT1 acoplados a proteína Gi (inibitória) promovem a diminuição da produção de adenosina monofosfato cíclica (AMPC) (LOTUFO et al., 2001).

Diversas evidências sugerem que a melatonina tem um papel importante na fisiopatologia da esquizofrenia (ANDERSON; MAES, 2013). Estudos realizados com pacientes esquizofrênicos sem tratamento medicamentoso detectaram uma diminuição na secreção noturna de melatonina. O uso de antipsicóticos melhora os sintomas positivos da doença, mas não é capaz de reverter os níveis diminuídos de melatonina (MONTELEONE, 1992). Então, durante uma resposta imune, o aumento do transporte de triptofano ao longo da via das quinureninas pode reduzir a formação de melatonina e, portanto, explicar padrões de sono perturbado, que muitas vezes estão associados com processos inflamatórios ou desafio imunológico (STONE; DARLINGTON, 2002). Assim, uma diminuição da atividade da glândula pineal pode ser utilizada como um marcador para traços de esquizofrenia (ANDERSON; MAES, 2013).

Na presença de um processo inflamatório o SNC responde por meio da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e da produção de cortisol, o hormônio do estresse. Alguns estudos identificaram uma resposta anormal do eixo HHA na esquizofrenia incluindo elevados níveis basais de cortisol plasmático. (RAHMOUNE et al., 2013). O cortisol induz a ativação da enzima triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) e, portanto a produção do metabólito ácido quinurênico (KYNA), contribuindo de maneira significativa para o surgimento de déficits cognitivos e inibição glutamatérgica no

córtex pré-frontal de pacientes esquizofrênicos. A atividade da TDO em astrócitos e a produção de KYNA é potencializada via AMPc / PKA, porém, a melatonina é um inibidor significativo do AMPc e possivelmente é capaz de inibir indiretamente a enzima TDO e diminuir os níveis de KYNA, exercendo portanto um efeito positivo na cognição e no curso da esquizofrenia (ANDERSON; MAES, 2013).

A melatonina também tem efeito positivo no estresse oxidativo eliminando espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), tais como radical hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e derivados dos radicais livres de óxido nítrico (NO), protegendo células, tecidos e órgãos. Além disso, MEL estimula a expressão gênica e a atividade de enzimas antioxidantes (MORERA-FUMERO; ABREU-GONZALEZ, 2013).

1.3.2 1-Metil-d-triptofano

Nos últimos anos pesquisas mostraram que a degradação do triptofano atua como um potente mecanismo imunossupressor envolvido na manutenção da tolerância imunológica, estando a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) diretamente envolvida nesse processo (MELLOR; MUNN, 2004; OPITZ et al., 2011).

Várias evidências apontam um aumento na expressão da enzima IDO, em resposta ao interferon gama (IFN γ), em tumores e células apresentadoras de antígenos (APCs), por exemplo macrófagos, facilitando o escape de tumores malignos da vigilância imunológica. Esta enzima causa uma imunossupressão através da metabolização do triptofano e formação de seus catabólitos no microambiente tumoral e nos nódulos linfáticos, inativando as células T efetoras e células dendríticas. Portanto, a inibição de IDO tornou-se uma área promissora para pesquisas na imunoterapia (SOLIMAN; MEDIAVILLA-VARELA; ANTONIA, 2010).

O fármaco 1-metil-triptofano (Fig. 4) foi primeiramente identificado como um inibidor competitivo da IDO na década de 1990 (CADY; SONO, 1991). Estudos iniciais realizados com o estereoisômero levógiro mostraram que uma pré imunização causou redução significativa no volume de tumores em camundongos. Posteriormente, pesquisas realizadas em modelos animais mostraram que o estereoisômero dextrógiro 1-metil-d-triptofano se mostrou mais eficaz na terapia antitumoral (HOU et al., 2007).

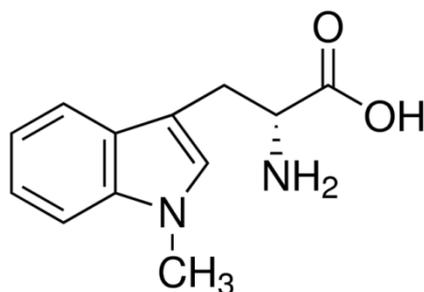


Fig. 4 : Estrutura química do 1-metil-d-triptofano

O uso de fármacos inibidores de IDO, tais como o 1-metil-d-triptofano (1-MDT), estão sendo utilizados com o objetivo de elucidar o papel da via das quinureninas em processos fisiopatológicos de doenças auto-imunes (FATOKUN; HUNT; BALL, 2013).

Estudo recente através da indução de neuroinflamação por injeção intracerebroventricular de LPS em camundongos avaliou a expressão e a atividade da enzima IDO na ausência e presença de 1-MDT sendo observado uma inibição da enzima IDO (DOBOS et. al., 2012). Outros estudos revelou uma normalização no comportamento depressivo com 1-MDT também por meio da inibição de IDO e normalização do metabolismo triptofano/quinureninas no plasma e no cérebro de camundongos (O'CONNOR et al., 2009; XIE et al., 2014).

Com base nesses dados, nós trabalhamos com a hipótese de que o 1-MDT pode ser um potencial neuromodulador para o tratamento da esquizofrenia, uma vez que um desequilíbrio auto-imune e conseqüentemente uma desregulação no metabolismo do triptofano podem estar envolvidos no surgimento dos sintomas desse transtorno mental e patologias semelhantes.

1.4 Modelos animais de esquizofrenia

Nos últimos anos a neurofarmacologia tem utilizado o modelo animal para o estudo da doença psiquiátrica no laboratório. Infelizmente no grupo da esquizofrenia, devido à complexidade da doença, existe uma multiplicidade de fatores que não podem ser reproduzidos na realidade dos animais (GEYER; MOGHADDAM, 2002).

Um modelo animal amplamente utilizado na esquizofrenia envolve a administração repetida ou aguda de cetamina. Essa droga tem sido usada clinicamente como um anestésico dissociativo que atua com múltiplos mecanismos de ação,

incluindo o antagonismo não-competitivo do receptor NMDA do glutamato e como agonista do receptor de dopamina D2 com uma afinidade ligeiramente menor pelos receptores 5-HT2 (KAPUR; SEEMAN, 2002). É sabido que o efeito de substâncias psicoativas em indivíduos humanos, tais como a anfetamina e os antagonistas dos receptores do tipo NMDA (como a fencilina e a cetamina), podem simular sintomas da esquizofrenia (KRYSTAL et al., 2003; SALGADO et al., 2006) e estudos mostraram que estas drogas 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)

Além disso, devido ao bloqueio do influxo de Ca^{2+} , os antagonistas do receptor NMDA promovem uma diminuição dos níveis de óxido nítrico neuronal (ALAGARSAMY et al., 1994; NODA et al., 1996; OSAWA; DAVILA, 1993). Em roedores, o bloqueio repetido do receptor NMDA induz déficits de inibição pré-pulso (IPP), de memória e dificuldades de interação social que se assemelham a sintomas positivos, negativos e cognitivos da esquizofrenia em humanos.

A cetamina também foi usada para restabelecer psicoses individuais em pacientes esquizofrênicos (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 (LI et al., 2003). Estudos sugerem que a fenciclidina (outro antagonista NMDA) e a cetamina exacerbam sintomas psicóticos em pacientes esquizofrênicos e induzem sintomas positivos e negativos semelhantes a este transtorno em indivíduos saudáveis (ADLER et al., 1999).

Um estudo mostrou que o tratamento subcrônico (1 vez por dia, durante 5 dias) com doses subanestésicas (30mg/kg) de cetamina induz alterações relacionadas com a esquizofrenia em ratos, o que poderia ser um modelo animal útil no estudo desta doença (BECKER et al., 2003).

A capacidade que estas drogas têm de induzir muitos, se não a maioria dos sintomas e déficits associados à esquizofrenia, sugere que a disfunção ou desregulação do receptor NMDA, por si só, é suficiente para explicar estas características da doença (KANTROWITZ; JAVITT, 2010).

A indução de sintomas tipo esquizofrenia através de antagonistas NMDA é considerada um modelo altamente válido, e, por isso, a cetamina vem sendo usada como agente na pesquisa para o desenvolvimento de novos antipsicóticos e para determinar a correlação neuroquímica da psicose (LEVKOVITZ *et al.*, 2007), já que o bloqueio de receptores NMDA interfere com a neurotransmissão dopaminérgica, a qual está envolvida com a esquizofrenia (VASCONCELOS *et al.*, 2005).

1.4.1 Testes comportamentais para o estudo da esquizofrenia

Um dos modelos comportamentais mais utilizados para a avaliação dos sintomas da esquizofrenia, reconhecidamente um endofenótipo para a esquizofrenia, é o modelo da inibição pré-pulso (IPP) do sobressalto, que oferece uma medida operacional do filtro sensório-motor refletido pela capacidade de inibição de um reflexo de sobressalto, quando um estímulo sensorial é precedido por outro de menor intensidade (HOFFMAN; ISON, 1980). A habilidade de discriminar estímulos externos de relevância fisiológica ou cognitiva, fornecida pelo filtro sensório-motor, está comprometida em indivíduos com determinados transtornos psiquiátricos (SALUM *et al.*, 2008).

A IPP é uma forma de plasticidade do reflexo do sobressalto, caracterizada por uma redução normal no sobressalto em resposta a um estímulo auditivo intenso (pulso), quando este é precedido imediatamente (30-500 ms) por um estímulo mais fraco (pré-pulso) (Fig.5) (BRAFF *et al.*, 1978 ; WEISS; FELDON, 2001).

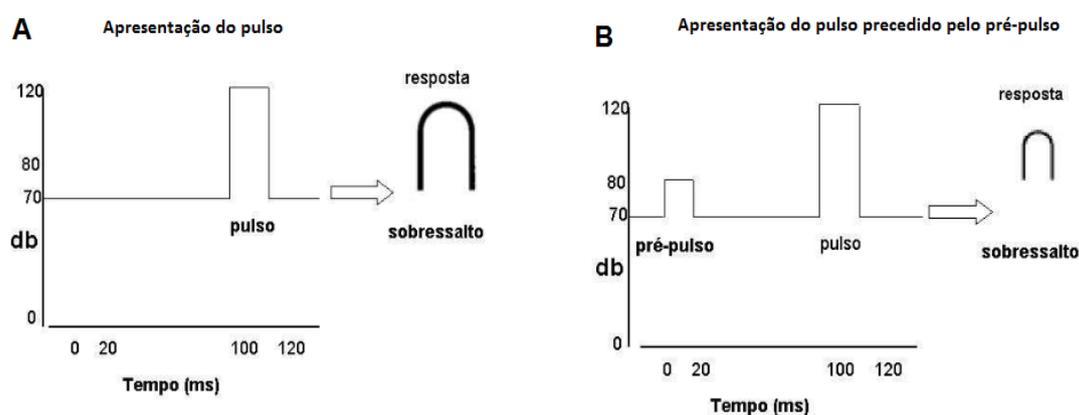


Fig. 5: Esquema simplificado do mecanismo de inibição pré-pulso (IPP). Fonte: Modificados de SALUM *et al.*, 2008.

A ativação de processos cerebrais é aumentada em resposta ao estímulo fraco, o que impede a responsividade a eventos sensoriais posteriores durante uma

rápida janela temporal. Este período protege a informação contida no estímulo inicial, para que seja adequadamente processado, durante o qual, somente estímulos suficientemente grandes serão capazes de ultrapassar este filtro protetor (SALUM *et al.*, 2008).

Drogas que induzem sintomas da esquizofrenia em humanos, como a feniciclina, anfetamina, cocaína e a apomorfina reduzem a IPP. Porém, esse efeito pode ser diminuído pelo tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos, mas nem sempre é abolido (ISSY; SALUM; DEL BEL, 2009).

A inibição pré-pulso ocorre naturalmente em humanos e na maioria dos animais experimentais, mas é diminuída ou ausente em esquizofrênicos (MANSBACH *et al.*, 1988). Existem numerosos trabalhos mostrando os déficits da IPP em pacientes esquizofrênicos não medicados (BRAFF *et al.*, 2001; SWERDLOW *et al.*, 2008; MOLINA *et al.*, 2011), além de pacientes com transtornos psiquiátricos, como mania psicótica aguda no transtorno bipolar (PERRY *et al.*, 2001) e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (HAWK *et al.*, 2003).

Um estudo realizado mostrou que a diminuição da IPP em camundongos Swiss provocada pelo metilfenidato foi bloqueada pelos antagonistas dopaminérgicos haloperidol e clozapina (ISSY *et al.*, 2009). Outra pesquisa indicou que antipsicóticos típico (haloperidol) e atípico (clozapina) foram capazes de aumentar as respostas de IPP de ratos que naturalmente apresentam baixos níveis de IPP. A olanzapina e risperidona efetivamente melhoraram a IPP em pacientes esquizofrênicos (WYNN *et al.*, 2007; MARTINEZ-GRAS *et al.*, 2009). Assim, a IPP tem sido sugerida como um útil endofenótipo em potencial para a esquizofrenia.

Além do teste de IPP, a hiperlocomoção farmacologicamente induzida é um importante indicador dos sintomas positivos associados à esquizofrenia (BUBENÍKOVÁ-VALESOVÁ *et al.*, 2008; VAN DEN BUUSE, 2010). Assim, o objetivo do teste de campo aberto é medir mudanças comportamentais quando os ratos são colocados em um novo ambiente como no meio de um espaço aberto. À medida que os animais sentem ansiedade, medo ou tem problemas de adaptação em um novo ambiente as atividades exploratórias tendem a aumentar (TSUCHIE *et al.*, 2013).

O labirinto em Y é um teste para medir a memória de trabalho espacial (memória de curto prazo) e é baseado na tendência inata de roedores de explorar novos ambientes (DELLU *et al.*, 2000). Na esquizofrenia, a disfunção cognitiva não é global e generalizada, mas sim específica e seletiva, incluindo problemas de atenção e percepção, resolução de problemas, memória de curto e longo prazo e em particular a

memória de trabalho (BEGOU *et al.*, 2008). Dessa forma, o teste do labirinto em Y foi utilizado no presente estudo para verificar os sintomas cognitivos da esquizofrenia, mais especificamente na memória de trabalho.

Existem inúmeros comportamentos sociais que são relevantes para a esquizofrenia e muitos deles são utilizados para estabelecer testes comportamentais pré-clínicos de sintomas negativos em uma variedade de espécies, variando entre roedores e primatas não humanos. O modelo que é mais amplamente utilizado neste contexto é o de interação social (NEILL *et al.*, 2010).

O teste de interação social mede uma variedade de comportamentos exibidos por um sujeito (normalmente ratos) quando exposto a um sujeito estranho. Esse teste avalia as respostas sociais ou associativas do sujeito para o estranho. A resposta é quantificada de forma diferente dependendo do grupo de pesquisa (NEILL *et al.*, 2010).

Entretanto, há uma razão para o uso extensivo desse teste para imitar os sintomas negativos da esquizofrenia em animais. Em primeiro lugar, a mensuração de interação social em animais é relativamente simples em comparação com outros sintomas negativos, como embotamento afetivo ou apatia. Esses sintomas são difíceis de mimetizar e até mesmo de identificar em animais, já que a falta de resposta à emoção evocada por estímulos em animais pode ser completamente independente da falta de emoção. Em segundo lugar, diferente de muitas tentativas frustradas de modelar os aspectos mencionados anteriormente dos sintomas negativos, vários grupos foram capazes de mostrar com sucesso a inibição da interação social, induzida por antagonistas do receptor NMDA em animais (BECKER; GRECKSCH, 2004; BRUINS SLOT *et al.*, 2005; ELLENBROEK; COOLS, 2000; SAMS-DODD, 1999; SNIGDHA; NEILL, 2008a,b).

2. JUSTIFICATIVA

A esquizofrenia é um transtorno grave e incapacitante com fisiopatologia pouco conhecida e limitações na terapia farmacológica. Neste transtorno, processos inflamatórios e comprometimento no sistema imunológico possuem um papel importante uma vez que citocinas têm apresentado níveis alterados. Estas vias inflamatórias parecem estar subjacentes aos sintomas negativos e cognitivos do transtorno. Vale salientar que estes sintomas são os de mais difícil tratamento (MULLER; SCHWARZ, 2010)

As alterações imunes na esquizofrenia parecem influenciar um desequilíbrio no metabolismo do triptofano/quinurenina e a ativação de enzimas limitantes da via (TDO e IDO) levando ao aumento da produção de ácido quinurênico no cérebro, estando este associado com um desequilíbrio na neurotransmissão glutamatérgica, causando um antagonismo nos receptores NMDA e o desenvolvimento de alterações sociais e cognitivas. (MULLER; SCHWARZ, 2010; MÜLLER; MYINT; SCHWARZ, 2011).

Apesar de décadas de intensa pesquisa e desenvolvimento, os tratamentos atuais para esquizofrenia encontram-se não apenas com eficácia limitada, mas também são frequentemente associados com efeitos colaterais graves, justificando o maior interesse no desenvolvimento de terapias alternativas (SHUNGU, 2012).

Existe, portanto a necessidade de uma avaliação mais profunda sobre o papel das citocinas, o desequilíbrio nos perfis regulatórios imune e a influência dos mesmos no metabolismo do triptofano e ativação de enzimas regulatórias na fisiopatologia da esquizofrenia. Fármacos capazes de bloquear a via das quinureninas poderão ser futuras possibilidades promissoras no tratamento da esquizofrenia. Portanto, este estudo, de forma inédita determinou o papel de um inibidor de IDO (1-MDT) e de TDO (melatonina).

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Estudar o efeito de moduladores da via das quinureninas na reversão de sintomas e alterações neuroquímicas tipo-esquizofrenia induzidos pela administração repetida de cetamina em camundongos.

3.2 Objetivos Específicos:

- Observar as alterações comportamentais relacionadas aos sintomas da esquizofrenia, a saber, inibição pré-pulso e campo aberto (avaliação de sintomas positivos), labirinto em Y (avaliação de sintomas cognitivos) e interação social (avaliação de sintomas negativos) em animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzida pela administração repetida de cetamina sozinha e tratados com 1-metil-d-triptofano ou melatonina;
- Determinar alterações oxidativas nos níveis de GSH e TBARS, bem como nitrérgicas (nitrito) em animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzida pela administração repetida de cetamina sozinha ou tratados com 1-metil-d-triptofano ou melatonina utilizando os seguintes testes realizados em córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e corpo estriado (CE):
- Avaliar a resposta inflamatória através do teste da atividade da mieloperoxidase (MPO) e dosagem de citocinas IL6 e IL4 em córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e corpo estriado (CE) dos animais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos Swiss adultos (25 - 30g) machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), foram alojados em gaiolas de polipropileno com 414 x 344 x 168 mm de dimensão, com alimentos (ração) e água (oriunda da torneira) *ad libitum*. Os animais foram mantidos a um ciclo claro/escuro de 12 h e ambientados em grupos de 8 por gaiola. A pesquisa foi aprovada pelo Comissão de Ética e Pesquisa Animal (CEPA) da UFC através do protocolo 139/14 e os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América.

4.2 Drogas

Os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de 1-metil-d-triptofano (20 ou 40 mg/kg) dissolvida em salina 0,9% e tween 80. Cloridrato de Cetamina (20 mg/kg) diluída em salina 0,9%. Risperidona (0,25 mg/kg) dissolvida em salina 0,9%. Melatonina (15mg/kg) dissolvida em salina 0,9% e 10% de etanol do volume total foi administrada via oral por gavagem. Os controles receberam i.p. de salina 0,9%. Todas as soluções foram administradas em um volume de 0,1ml a cada 10g de peso corporal. Para a escolha das concentrações utilizadas foram realizados cálculos de conversão de doses para camundongos com base nas doses ideais para humanos (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2008)

4.3 Procedimento Experimental

O presente estudo utilizou um modelo de reversão com o objetivo de reproduzir os sintomas agudos da esquizofrenia (HATTA et al., 2009; MONTE et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2015). Resumidamente, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos (n = 8-10) e cada grupo recebeu uma injeção i.p. diária de cetamina (KET) 20 mg/kg ou salina 0,9% (grupo controle) por 14 dias. A partir do 8º dia de tratamento, 30 minutos depois da administração de cetamina, os animais receberam adicionalmente uma administração diária i.p. de 1-metil-d-triptofano (20 ou

40 mg/kg) ou risperidona 0,25 mg/kg ou administração v.o. de melatonina 15mg/kg. A risperidona foi utilizada como antipsicótico padrão (Fig. 6).

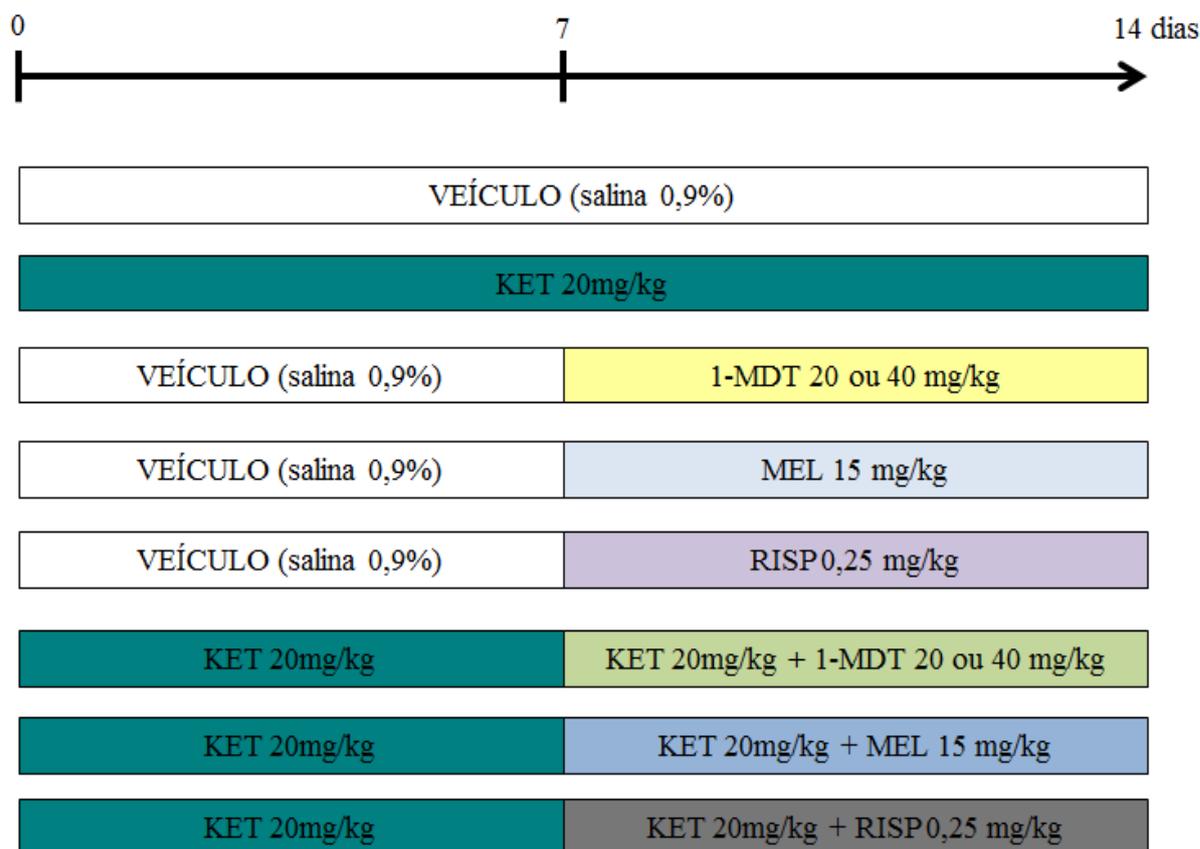


Fig. 6: Representação esquemática do procedimento experimental. KET: cetamina, MEL: melatonina , 1- MDT: 1-metil-d-triptofano, RISP: risperidona.

Determinações comportamentais de inibição pré-pulso IPP, atividade locomotora avaliada pelo teste de campo aberto, memória de trabalho avaliada pelo teste do labirinto em Y e interação social foram registradas no 14º dia de tratamento, 30 minutos após a administração da última droga, quando por i.p. e 60min, quando por via oral. Logo após a realização dos testes comportamentais, os camundongos foram sacrificados por decapitação e o córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado foram dissecados, rapidamente congelados e armazenados a -70°C até a realização dos ensaios neuroquímicos. A escolha das amostras para a realização dos testes neuroquímicos ocorreu de maneira aleatória para que não ocorressem possíveis avaliações entre o comportamento analisado e o teste neuroquímico.

4.4 Testes Comportamentais

4.4.1 Inibição Pré-pulso (IPP)

Inibição Pré-pulso (IPP) é caracterizada pela redução do reflexo de sobressalto a um estímulo acústico intenso (pulso), quando imediatamente precedido por um estímulo de menor intensidade (pré-pulso) (HOFFMAN; ISON, 1980; SWERDLOW et al., 2001). A reação corporal dos camundongos a um estímulo acústico foi monitorada em uma câmara (INSIGHT equipamentos científicos – Brasil modelo EP-175) conectada a um tubo (diâmetro 8,2 cm, comprimento 20 cm) montada em uma caixa fechada ventilada.

Os camundongos foram colocados em um contensor (4,5 × 5,0 × 5,5 cm) consistido de barras de aço inoxidável de 3,0 mm de diâmetro com espaçamento de 0,8 centímetros de distância. O contensor foi mantido preso sobre uma balança, chamada de plataforma de resposta, através de quatro parafusos pequenos. Um alto-falante localizado a 15 cm do contensor foi usado para fornecer os estímulos de pulso, pré-pulso e ruído de fundo. O contensor, a plataforma e o alto-falante ficam localizados dentro de uma câmara acústica ventilada (64 × 60 × 40 cm). Procedimentos de calibração foram realizados antes dos experimentos para garantir sensibilidades equivalentes das plataformas de resposta ao longo do período de teste.

A sessão de testes começa ao colocar um animal no contensor para a aclimação, este procedimento consiste em uma exposição de 5 minutos ao ruído de fundo (65 dB). Após o período de aclimação os animais foram apresentados a uma série de 10 estímulos de treino (pulso sozinho – 120dB, 40 ms de duração), com um ensaio de inter-intervalo de 20s. O objetivo desta fase é permitir a habituação da resposta de sobressalto do animal. Posteriormente, a modulação IPP de sobressalto foi testada no seguinte protocolo: 50 ensaios pseudorandomizados divididos em 3 categorias diferentes, apresentados com um intervalo inter-estímulos de 20 s: 10 apresentações de pulso sozinho (120 dB, 40 ms de duração), 10 apresentações de cada intensidade de pré-pulso (70, 75 e 80 dB, frequência 3000 Hz, 20 ms de duração) + pulso (com intervalo de 80ms entre pré-pulso e pulso) e 10 apresentações de ausência de estímulo, nesse bloco o animal só receberá o estímulo de ruído de fundo (adaptado de (KINKEAD et al., 2006).

A média da amplitude de resposta de sobressalto aos ensaios de pulso sozinho (P) e pré-pulso + pulso (PP + P) foi calculada para cada animal. O nível de IPP em cada camundongo foi definido como a porcentagem da redução da amplitude do sobressalto nos ensaios de PP + P em comparação com a amplitude do sobressalto nos ensaios de P, de acordo com a seguinte fórmula: $\% \text{ PPI} = 100 - [100 \times (\text{PP} + \text{P} / \text{P})]$. Usando esta fórmula, um valor de IPP de 0% denota que não houve diferença entre a amplitude da resposta de sobressalto do pulso sozinho e do pré-pulso + pulso, consequentemente, não houve IPP (LEVIN *et al.*, 2011).

Esperou-se que o grupo de animais tratados repetidamente com cetamina (controle positivo) apresente déficits de IPP neste teste comportamental e que os animais tratados com o antipsicótico padrão, risperidona, não apresente alterações neste parâmetro.

4.4.2 Teste de campo aberto

A atividade locomotora foi avaliada através do teste de campo aberto (ARCHER, 1973). Este teste foi realizado em um campo de 30 cm × 30 cm rodeado por paredes de 15 cm de altura feitas de acrílico, dividido em nove partes iguais. Os animais foram cuidadosamente colocados no centro do campo e exploraram livremente o cenário por 1 min (período de habituação). O parâmetro observado foi o número de quadrados cruzados (com as quatro patas) e atividade exploratória vertical (*rearings*) por um período de 5 minutos.

4.4.3 Teste do Labirinto em Y

A memória de trabalho foi avaliada por meio de um teste de Labirinto em Y, que permite avaliar o comportamento cognitivo exploratório. O labirinto consiste em 3 braços idênticos de 40 cm de comprimento, 25 cm de altura e 6 cm de largura cada convergindo a um ângulo igual. Antes do teste, os braços foram numerados, sendo o camundongo colocado na extremidade de um deles e deixado para explorar o ambiente por 8 minutos. A sequência dos braços em que os animais entraram foi registrada e as informações foram analisadas de forma a determinar o número de entradas no braço sem repetição. Uma alternância foi considerada correta quando o animal visitou um novo braço e não retornou ao braço anteriormente visitado. Assim, a porcentagem das alternâncias será calculada como a razão entre as alternâncias corretas (n) e o número de visitas realizadas durante o período de observação (n-2), multiplicado por 100 (DALL'IGNA *et al.*, 2007; YAMADA *et al.*, 1996).

4.4.4 Teste de Interação Social

Sintomas negativos foram avaliados pelo teste de interação social. Os animais foram colocados em uma caixa de acrílico 60 × 40 cm dividida em três compartimentos. Nas câmaras das extremidades foram colocadas gaiolas de ferro, uma com um camundongo desconhecido e do mesmo sexo (câmara social) e outra vazia (câmara oposta), o meio da caixa era deixado livre. Os animais eram colocados cuidadosamente no compartimento central e durante 5 minutos exploravam livremente todos os compartimentos da caixa através de uma pequena abertura (6 × 6 cm) que permitia o acesso. Nesse teste foi avaliado o tempo que o animal teste permaneceu explorando o compartimento com animal e sem animal, bem como o percentual de tempo que ele ficou explorando o compartimento com o animal em relação ao tempo total do teste. Foi tempo gastado em cada uma das três câmaras, e a preferência social definida como: (% o tempo gastado na câmara social) – (% o tempo gastado na câmara oposta).

4.5 Determinação de parâmetros de estresse oxidativo

4.5.1 Determinação de Glutathiona Reduzida (GSH)

Os níveis de GSH foram avaliados para estimar defesas endógenas contra o estresse oxidativo. O método é baseado na reação de reagente de Ellman (DTNB), com grupos tiol livres. As áreas do cérebro foram diluídas em tampão de 0,02 M de EDTA (10% w / v) e adicionadas a uma solução de ácido tricloroacético a 50%. Após centrifugação (3000 rpm/15 min), o sobrenadante do homogeneizado será recolhido e os níveis de GSH determinados (SEDLAK *et al.*, 1968). Resumidamente, as amostras serão misturadas com 0,4 M de tampão tris-HCl, pH 8,9 e 0,01 M de DTNB. Níveis de GSH foram determinados por espectrofotometria a 412 nm, calculada com base numa curva padrão de glutathiona e expressos como ng de GSH/g de tecido úmido.

4.5.2 Níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi avaliada pela mensuração de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS) nos homogenatos. As amostras foram homogenizadas com tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM pH 7,4, 63µL do homogenato foi misturado a 100 µL de ácido perclórico 35%, sendo estas centrifugadas

(7000 rpm/15 min), no qual 150 μ L do sobrenadante foram recuperados e misturados com 50 μ L de ácido tiobarbitúrico 1,2%, e em seguida, estas amostras foram aquecidas em um banho de água fervente por 30 min. Após o resfriamento, a peroxidação lipídica será determinada por absorvância a 535 nm e expressa como mmol tecido malonaldeído (MDA) / mg de proteína (OHKAWA *et al.*, 1979).

4.5.3 Determinação dos níveis de Nitrito

Para avaliar os efeitos de tratamentos com as respectivas drogas na produção de NO, foram determinados níveis de nitrito em homogenatos dos cérebros dos camundongos imediatamente após a decapitação em todos os grupos. Após centrifugação (800 \times g/10 min), o sobrenadante do homogeneizado foi coletado e a produção determinada com base na reação de Griess (GREEN *et al.*, 1981, RADENOVIC *et al.*, 2005). Para esse experimento 100 μ L do reativo de Griess (sulfanilamida a 1% / cloridrato de N-(1-naftil)- etilenediamina 0.1% / ácido fosfórico a 5% / água destilada, na proporção de 1:1:1:1) foi adicionado a 100 μ L do sobrenadante do homogenato tecidual e incubado a temperatura ambiente por 10 min. A curva padrão foi elaborada com várias concentrações de NaNO₂ (variando de 0,75 a 100 mM) sob as mesmas condições. Os brancos foram preparados pela adição de 100 μ L do reativo de Griess a 100 μ L do tampão usado para o homogenato e a absorvância foi medida em leitor de microplacas em 560 nm , expressa em nM de nitrito/g de tecido úmido.

4.6 Avaliação da resposta inflamatória

4.6.1 Ensaio para Mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos de neutrófilos. Essa enzima é utilizada como indicador de processo inflamatório, mais especificamente, como marcador de migração de neutrófilos dos tecidos. Neste ensaio, a H₂O₂ é clivada por meio da MPO presente nas amostras de tecido. O radical oxigênio (O°) resultante se combina com diidrocloreto de θ -dianisidina que é convertido a um composto colorido. O aparecimento deste composto, ao longo do tempo, é medido por espectrofotômetro para determinar o conteúdo de MPO do ensaio (BRADLEY, 1982).

Imediatamente após a decapitação, as áreas cerebrais foram homogeneizadas (50mg/ml) em uma solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB) em tampão fosfato 50mM , ph 6,0. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados (14000 rpm, 4°C) por 2 minutos. Foram retirados 30 μ L do sobrenadante

da amostra e adicionados a placa de ELISA juntamente com 200 μ L da solução contendo 0,167 mg/ml de hidrocloreto de θ - dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. A absorbância foi medida nos tempos 0 e 3 minutos com comprimento de onda de 460nm (BRADLEY, 1982).

4.6.2 Dosagem das citocinas IL-6 e IL-4

Esse ensaio foi realizado de acordo com as instruções do manual dos kits R&D DuoSet DY406 e DY404 para camundongos. Os resultados foram expressos como pg/g de tecido úmido.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism, versão 6.0 para Windows. Os resultados comportamentais, parâmetros do estresse oxidativo, avaliação nitrgica e análise de mieloperoxidase foram analisados por two-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Os resultados dos experimentos para análise de citocinas IL6 e IL4 foram analisados através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey como teste *post hoc* para comparações múltiplas, sendo previamente analisada a fidelidade dos dados. Valores significativos para as análises foram considerados quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Reversão das alterações comportamentais induzidas por cetamina pelos inibidores das enzimas IDO e TDO

Os testes de Inibição Pré-Pulso, atividade locomotora, labirinto em Y e interação social foram realizados, a fim de avaliar, nesta ordem, os sintomas positivos, cognitivos e negativos induzidos pela administração repetida de cetamina (VASCONCELOS et al., 2015).

No presente estudo a análise de dados por *two way* ANOVA revelou efeitos significativos de "intensidades de pré-pulso" [$F(2, 234) = 6,355, p = 0,0021$] e "grupos experimentais" [$F(9, 234) = 30,23, p < 0,0001$]. A análise post hoc pelo teste de Tukey revelou os animais tratados com KET apresentaram uma diminuição nas intensidades de pré-pulso de 70 ($p < 0.001$), 75 ($p < 0.001$) e 80 dB ($p < 0.001$) quando comparados ao grupo tratado apenas com solução salina. A administração de 1-MDT 20, 1-MDT 40, MEL ou RISP após a administração de KET reverteu significativamente as alterações induzidas por KET nas intensidades de pré-pulso de 70 ($p < 0.0001$), 75 ($p < 0.0001$) e 80 dB ($p < 0.0001$).

No que diz respeito à amplitude de sobressalto (Fig. 7B) foram observados níveis aumentados nos animais tratados com 1-MDT 40 e nos animais tratados com RISP quando comparado com os camundongos que foram tratados apenas com solução salina ($p < 0,05$)

Fig. 7. Porcentagem de inibição pré-pulso (IPP) (A) e Amplitude de Sobressalto (B) dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzida por KET e tratados posteriormente com 1-MDT 20 ou 40mg , MEL ou RISP. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (SEM) (n=8-10 animais por grupo) do percentual de IPP. *p<0,05 quando comparado ao grupo controle; #p <0,05 quando comparado ao grupo KET de acordo com *two way* ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey. SAL=Salina; KET= Cetamina; 1-MDT= 1metil-d-triptofano 20 ou 40mg/kg; MEL= Melatonina; RISP= Risperidona.

A administração repetida de KET causou hiperlocomoção no teste de campo aberto (Fig. 8A) quando comparados com os camundongos tratados com solução salina [F (4, 97) = 14,71 ; $p < 0,0001$]. A hiperlocomoção induzida pela administração de KET foi revertida pelo tratamento com 1-MDT 20, 1-MDT 40, MEL ou RISP ($p < 0,0001$). Os animais tratados com RISP também apresentaram uma significativa redução da atividade locomotora, quando comparados aos animais tratados com 1-MDT 20 ou MEL ($p < 0,0001$). A administração repetida de KET também aumentou o número de *rearings* [F (4, 88) = 6,843; $p < 0,0001$] (Fig. 8B) de maneira semelhante ao observado no número de cruzamentos. Todos os tratamentos conseguiram reverter de maneira significativa esse aumento ($p < 0,0001$).

Fig.8. Número de Cruzamentos (A) e rearings (B) dos animais dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzida por KET e tratados posteriormente com 1-MDT 20 ou 40mg, MEL ou RISP. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (SEM) (n = 8-10 animais por grupo) do número de cruzamentos ou rearings. *p<0,05 quando comparado ao grupo controle; #p <0,05 quando comparado ao grupo KET; +p<0,05 quando comparado ao grupo KET+ 1-MDT20 ; &p<0,05 quando comparado ao grupo KET+MEL de acordo com *two way* ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey. SAL=Salina; KET= Cetamina; 1-MDT= 1metil-d-triptofano 20 ou 40mg/kg; MEL= Melatonina; RISP= Risperidona.

Na avaliação de desempenho da memória de trabalho (Fig. 9A), os animais tratados apenas com KET tiveram seu percentual de alterações corretas no teste do labirinto em Y significativamente diminuídos quando comparados aos animais que foram tratados apenas com salina [$F(4, 87) = 4,318$; $p < 0,0001$]. A administração de 1-MDT 20, 1-MDT 40 ou MEL reverteu significativamente as alterações causadas pela administração de KET ($p < 0,0001$). Porém, os animais tratados com RISP tiveram seu percentual de alterações corretas diminuídos em relação ao grupo salina e o grupo no qual foi administrada risperidona sozinha também mostrou um percentual de alterações corretas diminuído em relação ao grupo controle salina.

No teste de interação social (Fig. 9B) os animais tratados apenas com KET apresentaram uma diminuição significativa na sua percentagem quando comparados com os animais tratados com SAL [$F(4, 100) = 10,21$; $p < 0,0001$]. O tratamento com 1-MDT 20, 1-MDT 40, MEL ou RISP, após a administração de KET, reverteu o déficit de interação social induzida por KET ($p < 0,0001$).

Fig. 9. Porcentagem de alterações corretas no teste de labirinto em Y (A) e porcentagem de interação social (B) dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzida por KET e tratados posteriormente com 1-MDT 20 ou 40mg, MEL ou RISP. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (SEM) (n = 8-10 animais por grupo) do percentual de alternâncias corretas e preferência social. *p<0,05 quando comparado ao grupo controle; #p <0,05 quando comparado ao grupo KET de acordo com *two way* ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey. SAL= Salina; KET= Cetamina; 1-MDT= 1metil-d-triptofano 20 ou 40mg/kg; MEL= Melatonina; RISP= Risperidona.

6.2 1-metil-d-triptofano (1-MDT) e melatonina (MEL) são capazes de reverter as alterações pró-oxidativas e dos níveis de nitrito induzidas pela administração repetida de cetamina.

A fim de determinar as alterações oxidativas induzidas pela administração de cetamina, os níveis de TBARS (usada para a determinação da peroxidação lipídica) e GSH das áreas cerebrais CPF, HC e CE de todos os grupos foram determinados, no caso do nitrito este foi utilizado como medida indireta dos níveis de óxido nítrico, conforme descrito na metodologia.

Os animais que receberam repetidamente KET apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis de GSH no CPF [F (4, 71) = 9,812 ; $p < 0,0001$], HC [F (4, 66) = 6,621 ; $p < 0,0001$] e CE [F (4, 71) = 8,533 ; $p < 0,0001$] quando comparados com o grupo que recebeu apenas salina (grupo controle). Porém, os animais que foram tratados com 1-MDT 20, 1-MDT 40 ou RISP após a administração de KET, apresentaram um aumento significativo nos níveis de GSH (Fig. 10) no CPF ($p < 0,0001$), HC ($p < 0,0001$) e CE ($p < 0,0001$) quando comparados com os animais que receberam apenas KET. Porém, animais tratados com MEL após a administração de KET apresentaram um aumento significativo de GSH somente no CE ($p < 0,0001$), quando comparado com o grupo tratado apenas com KET.

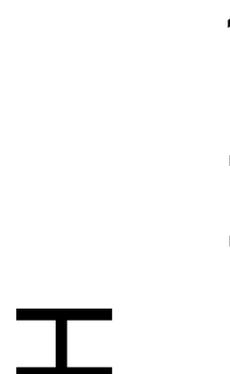


Fig. 10. Níveis de glutathiona reduzida (GSH) dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzida por KET e tratados posteriormente com 1-MDT 20 ou 40mg, MEL ou RISP. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (SEM) (n = 8-10 animais por grupo). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo KET de acordo com *two way* ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey. SAL=Salina; KET= Cetamina; 1-MDT= 1metil-d-triptofano 20 ou 40mg/kg; MEL= Melatonina; RISP= Risperidona.

Em relação ao dano oxidativo lipídico (Fig. 11), um aumento nos níveis de MDA (marcador da peroxidação lipídica) foi observado após a administração de KET no CPF [F (4, 73) = 19,18 ; $p < 0,0001$], HC [F (4, 69) = 8,150 ; $p < 0,0001$] e CE [F (4, 64) = 11,84 ; $p < 0,0001$] quando comparadas ao grupo tratado apenas com SAL. A administração de 1-MDT 20 após KET só foi capaz de reverter essas alterações no CE ($p < 0,0001$). Por outro lado, a administração de 1-MDT 40 não foi capaz de reverter essas alterações em nenhuma das áreas cerebrais estudadas. Já os animais tratados com MEL apresentaram uma diminuição nos níveis de MDA no CPF ($p < 0,0001$) e CE ($p < 0,0001$). A risperidona quando administrada após KET foi capaz de diminuir os níveis de MDA em todas as áreas cerebrais quando comparado com o grupo de animais tratado apenas com KET ($p < 0,05$). A administração sozinha de 1-MDT40 causou um aumento significativo de MDA quando comparado com o grupo salina ($p < 0,05$).

antes

Fig. 11. Níveis de peroxidação lipídica dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzida por KET e tratados posteriormente com 1-MDT 20 ou 40mg, MEL ou RISP. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (SEM) (n = 8-10 animais por grupo). *p<0,05 quando comparado ao grupo controle; #p <0,05 quando comparado ao grupo KET de acordo com *two way* ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey. SAL=Salina; KET= Cetamina; 1-MDT= 1metil-d-triptofano 20 ou 40mg/kg; MEL= Melatonina; RISP= Risperidona.

Os níveis de nitrito (Fig.12) foram aumentados significativamente apenas no CE de animais tratados com KET [F (4, 55) = 15,14; $p < 0,0001$]. O tratamento com 1-MDT 20, 1-MDT 40 , MEL ou RISP , após a administração de KET foram capazes de reverter significativamente esta alteração ($p < 0,0001$). Porém a administração sozinha de 1-MDT 40 causou aumento nos níveis de nitrito quando comparado ao grupo salina ($p < 0,05$).

Fig. 12. Níveis de nitrito dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzida por KET e tratados posteriormente com 1-MDT 20 ou 40mg, MEL ou RISP. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (SEM) (n = 8-10 animais por grupo). *p<0,05 quando comparado ao grupo controle; #p <0,05 quando comparado ao grupo KET de acordo com *two way* ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey. SAL=Salina; KET= Cetamina; 1-MDT= 1metil-d-triptofano 20 ou 40mg/kg; MEL= Melatonina; RISP= Risperidona.

6.3 Identificação de alterações inflamatórias causadas pela administração repetida de cetamina em camundongos .

A fim de determinar possíveis alterações inflamatórias foi analisado a atividade da enzima MPO (Fig.13) e realizado dosagens de citocinas IL 6 (pró-inflamatória) (Fig.14) e IL 4 (anti-inflamatória) (Fig. 15).

Os animais que receberam apenas KET durante os quatorze dias de tratamento apresentaram um aumento na atividade de MPO no CPF [F (4, 63) = 4,758 ; $p = 0,0020$], HC [F (4, 65) = 7,747 ; $p < 0,0001$] e CE [F (4, 64) = 16,17 ; $p < 0,0001$] quando comparados com os animais que receberam apenas SAL. 1-MDT 20 ou 1-MDT 40 , após a administração de cetamina, só foram capazes de reverter os níveis de MPO no HC e CE ($p < 0,0001$). Já os animais tratados com MEL após a administração de cetamina apresentaram uma redução significativa ($p < 0,0001$) na atividade da enzima MPO no CPF, HC e CE. A administração da MEL sozinha também apresentou níveis reduzidos MPO no CPF e HC quando comparados ao grupo salina ($p < 0,0001$). O tratamento com RISP reduziu a atividade de MPO no CE , quando comparado com os animais tratados apenas com KET ($p < 0,0001$). Porém, o tratamento com RISP não foi capaz de reverter às alterações causadas pela administração repetida de KET no CPF e HC.

tecido

Fig. 13. Atividade da mieloperoxidase (MPO) dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzida por KET e tratados posteriormente com 1-MDT 20 ou 40mg, MEL ou RISP. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (SEM) (n = 8-10 animais por grupo).. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo KET de acordo com *two way* ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey. SAL=Salina; KET= Cetamina; 1-MDT= 1metil-d-triptofano 20 ou 40mg/kg; MEL= Melatonina; RISP= Risperidona.

Os níveis de IL6 foram encontrados aumentados ($p < 0,05$) no HC dos animais tratados apenas KET quando comparado com os animais tratados apenas com salina. Os animais que receberam 1-MDT 40, RISP ou MEL após a administração de cetamina, apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis de IL 6 no HC e CE. Já a administração de 1- MDT 20 só foi capaz de reduzir os níveis de IL 6 no CE ($p < 0,05$).

Fig. 14. Níveis de interleucina 6 (IL-6) no cérebro dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzida por KET e tratados posteriormente com 1-MDT 20 ou 40mg, MEL ou RISP. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (SEM) (n = 8-10 animais por grupo). *p<0,05 quando comparado ao grupo controle; #p <0,05 quando comparado ao grupo KET de acordo com *one way* ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey. SAL=Salina; KET= Cetamina; 1-MDT= 1metil-d-triptofano 20 ou 40mg/kg; MEL= Melatonina; RISP= Risperidona.

Os níveis de IL 4 foram encontrados aumentados ($p < 0,05$) no HC dos animais tratados apenas KET quando comparado com os animais tratados apenas com salina. Os animais que receberam RISP ou MEL após a administração de cetamina, apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis de IL 4 no HC e CE. Já a administração de 1- MDT 40 só foi capaz de reduzir os níveis de IL 4 no HC ($p < 0,05$). A administração de 1- MDT 20 não foi capaz de modificar as alterações nos níveis de IL 4 causadas por KET.

Fig. 15. Níveis de interleucina 4 (IL-4) no cérebro dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzida por KET e tratados posteriormente com 1-MDT 20 ou 40mg, MEL ou RISP. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (SEM) (n = 8-10 animais por grupo). *p<0,05 quando comparado ao grupo controle; #p <0,05 quando comparado ao grupo KET de acordo com *one way* ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey. SAL=Salina; KET= Cetamina; 1-MDT= 1metil-d-triptofano 20 ou 40mg/kg; MEL= Melatonina; RISP= Risperidona.

TESTE	KET	MDT20	MDT40	MEL	RISP
PP70	↓	↑	↑	↑	↑
CAMPO ABERTO	↑	↓	↓	↓	↓
Y-MAZE	↓	↑	↑	↑	↓
INTERAÇÃO SOCIAL	↓	↑	↑	↑	↑
GSH	↓	↑	↑	CE ↑	↑
TBARS	↑	CE ↓	∅	CPF CE ↓	↓
NITRITO	CE ↑	CE ↓	CE ↓	CE ↓	CE ↓
MPO	↑	HP↓ CE↓	HP↓ CE↓	↓	CPF ↑ CE ↓
IL-6	HP ↑	CE ↓	HP↓ CE↓	HP↓ CE↓	HP↓ CE↓
IL-4	HP ↑	∅	HP ↓	HP↓ CE↓	HP↓ CE↓

Fig. 16. Resumo esquemático dos resultados obtidos na presente pesquisa.

7. DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos que a administração de 1-metil-d-triptofano e melatonina reverteram as alterações comportamentais induzidas pela administração repetida de cetamina em camundongos. Mais especificamente foram revertidos os déficits de IPP, déficits cognitivos (Y-maze), interação social e a hiperlocomoção induzida por KET, que são parâmetros comportamentais relacionados com sintomas positivos e negativos da esquizofrenia (MONTE et al., 2013).

Reversão das alterações comportamentais e sintomas da esquizofrenia induzidos por cetamina

Os sintomas positivos e negativos, bem como o prejuízo cognitivo induzido por cetamina foram parcialmente atribuídos ao bloqueio dos receptores NMDA (NMDARs). Em consonância com esta evidência, o bloqueio dos NMDARs, localizado nos neurônios inibitórios GABAérgicos das regiões límbica e subcortical do cérebro, produz um aumento da atividade neuronal no circuito límbico-estriatal, devido aumento da liberação de glutamato e de dopamina, sendo este evento relacionado aos sintomas positivos da esquizofrenia. Além disso, o bloqueio dos NMDARs na área tegumentar ventral (ATV) induz uma diminuição da liberação de dopamina no CPF, pois a produção basal de neurônios dopaminérgicos que se projetam para o CPF está sob o controle excitatório dos receptores glutamatérgicos NMDA e AMPA na ATV, bem como dos receptores AMPA no CPF, sendo, portanto, esse bloqueio parcialmente responsável pelos sintomas negativos e cognitivos (JAVITT; ZUKIN, 1991; MOGHADDAM et al., 1997; CHATTERJEE et al., 2012; GASS et al., 1993; LORRAIN et al., 2003; BALLA et al., 2009).

A administração repetida de cetamina é reconhecidamente um modelo farmacológico importante para indução de sintomas tipo esquizofrenia, pois apresenta validade de face, constructo e preditiva (CHINDO et al., 2012). Contudo, a validade de face dos sintomas positivos em modelos animais é questionável, devido às limitações em imitar em animais fenômenos observados apenas em humanos, como alucinações auditivas e delírios. Assim, a literatura sobre modelos animais que avaliam estes sintomas se concentra em duas categorias principais de alterações comportamentais: hiperatividade locomotora e déficits da IPP (VAN DEN BUUSE, 2010). A hiperatividade locomotora pode ser induzida por doses moderadas de cetamina (VAN DEN BUUSE, 2010), já a deficiência de IPP é indicativa de um prejuízo nos

mecanismos associados ao correto funcionamento do filtro sensorio-motor, um processo antecipatório que impede a sobrecarga sensorial e a fragmentação cognitiva (GEYER et al., 2002; GEYER, 1999; POWELL et al., 2009). Assim, o modelo de IPP representa a "interface entre a psicose e cognição" (DESBONNET; WADDINGTON; O'TUATHAIGH, 2009).

Nesse contexto nosso estudo mostra que a administração de 1-metil-d-triptofano (1-MDT) em ambas as doses utilizadas (20mg/kg e 40mg/kg) e administração de melatonina (MEL) na dose de 15mg/kg foram capazes de reverter os sintomas positivos e cognitivos induzidos por cetamina, ou seja, corrigiu as alterações na atividade locomotora e nos níveis de IPP induzidas por cetamina, com resultados comparáveis aos da risperidona, um antipsicótico atípico.

Nosso estudo também mostrou, através do teste do labirinto em Y, que as drogas inibidoras das enzimas IDO e TDO, 1-metil-d-triptofano e melatonina respectivamente, revertem as alterações da memória de trabalho induzidas por KET. Porém o tratamento com RISP não reverteu alterações causadas pela administração repetida de cetamina. De fato, um estudo recente mostrou que a risperidona não foi capaz de promover uma melhoria na memória de trabalho e fluência verbal em pacientes (REMBERK et al., 2012).

Quanto aos sintomas negativos da esquizofrenia, o isolamento social é um dos sintomas principais desta desordem mental (LYSAKER et al., 2012). Em nosso estudo tanto MEL 15mg/kg como 1-MDT em ambas as doses (20 e 40 mg/kg) foram capazes de reverter o isolamento social induzido por KET. Alguns estudos relacionam os sintomas negativos e cognitivos observados na esquizofrenia com alterações inflamatórias e oxidativas (MONJI *et al.*, 2009; LIEBERMAN, 1999; PEREZ-NERI *et al.*, 2006; MULLER; SCHWARZ, 2010).

Reversão das alterações nos níveis de estresse oxidativo e nitrito

Os efeitos benéficos do 1-MDT e MEL nas alterações comportamentais induzidas por cetamina foram acompanhados por alterações no equilíbrio oxidativo.

O glutamato pode ser metabolizado a ácido gama-aminobutírico (GABA) ou pode ser convertido em glutatona (GSH). Evidências experimentais associam deficiência de GSH e aumento de estresse oxidativo na fisiopatologia da maioria dos grandes transtornos psiquiátricos (BERK et al., 2008). De fato, estudos genéticos e funcionais revelaram que uma deficiência na síntese de GSH pode estar associada com a esquizofrenia (GYSIN et al., 2007). Outros estudos usando espectroscopia de

ressonância magnética e em estudos post-mortem indicaram que pacientes esquizofrênicos apresentaram redução de GSH no líquido cefalorraquidiano e no córtex pré-frontal (DO et al., 2000; YAO; LEONARD; REDDY, 2006).

Um estudo realizado em ratos utilizando como modelo de esquizofrenia a administração perinatal de fenciclidina (um antagonista glutamatérgico NMDA) mostrou uma redução nos níveis de GSH no córtex pré-frontal e hipocampo, demonstrando um dano oxidativo nessas áreas cerebrais (RADONJIC et al., 2010). Pesquisas recentes realizadas por nosso grupo de pesquisa relatou diminuição nos níveis de GSH no CPF, HC e CE após a administração repetida de KET em camundongos (MONTE et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2015).

Com base na importância de GSH na fisiopatologia da esquizofrenia decidimos estudar as alterações nesse parâmetro em animais tratados com KET e pós-tratados com 1-MDT, MEL ou RISP. A administração destas drogas foi capaz de restaurar os níveis de GSH e melhorar a peroxidação lipídica induzida por cetamina. De fato, MEL tem mostrado que exerce um papel importante no dano oxidativo (MORERA-FUMERO; ABREU-GONZALEZ, 2013). Um estudo feito em ratos analisou o estresse oxidativo causado por radiações gama e mostrou que MEL conseguiu aumentar significativamente os níveis de GSH anteriormente reduzidos pela radiação (EL-MISSIRY et al., 2007). A correção do desequilíbrio oxidativo induzido por KET através da administração de 1-MDT, como relatado no presente estudo, pode ser uma característica importante relacionada aos benefícios desta droga na esquizofrenia.

No presente estudo a risperidona promoveu um aumento significativo nos níveis de GSH corroborando com um estudo recente que mostrou que o tratamento com essa droga restaurou os níveis de GSH e as alterações nas defesas antioxidantes em cérebros de camundongos tratados com minociclina no modelo de indução de esquizofrenia por cetamina (MONTE et al., 2013).

O dano oxidativo de lipídios tem sido frequentemente usado como um biomarcador de estresse oxidativo em diversas doenças, tais como na esquizofrenia (ZHANG et al., 2012).

No presente trabalho o desequilíbrio oxidativo indicado no aumento dos níveis de MDA (marcador de peroxidação lipídica) causado pela administração repetida de cetamina foi significativamente revertido no CPF por melatonina e no CE por melatonina e 1-MDT na dose de 20mg. Em concordância, estudos anteriores

demonstraram uma redução de MDA em animais submetidos a estresse oxidativo e lesão tecidual quando tratados com MEL (EL-MISSIRY et al., 2007; OZYURT et al., 2014).

A avaliação da produção de NO pode ser realizada com base nos níveis de seus produtos de oxidação nitrito (NO^{-2}) e nitrato (NO^{-3}) no SNC. Um aumento nos produtos finais da reação de oxidação do NO juntamente com outros radicais livres podem provavelmente contribuir para a neurofisiopatologia da esquizofrenia (OZYURT et al., 2014).

No presente estudo a avaliação nos níveis de nitrito observou um aumento apenas no CE de camundongos tratados com cetamina, por outro lado todas as drogas utilizadas para reverter os efeitos da cetamina conseguiram reduzir significativamente esses níveis. Resultados semelhantes foram mostrados recentemente, em que a administração repetida de cetamina elevou os níveis de nitrito apenas no CE (MONTE et al., 2013). Outro estudo recente em pacientes com esquizofrenia foi encontrado um acréscimo significativo nos níveis de SOD e NO, em comparação aos controles normais (ZHANG *et al.*, 2012). Corroborando com nossos resultados, um estudo recente encontrou níveis reduzidos de NO no cérebro de ratos submetidos a um modelo experimental de psicose e tratados com MEL (OZYURT et al., 2014).

A melatonina não apenas sequestra radicais livres, tais como o radical superóxido (O_2^-), hidroxila (OH) e o ânion peroxinitrito (ONOO^-), mas também aumenta o potencial antioxidativo da célula, estimulando a síntese de enzimas antioxidantes como a superóxido desmutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e enzimas envolvidas também na síntese de glutatona, além de aumentar a expressão de mRNA de enzimas antioxidantes (SRINIVASAN, 2002).

Os níveis de NO estriatal regulam a atividade basal e a responsividade dos neurônios dopaminérgicos das áreas cortical e estriatal. Por exemplo, estudos com microdiálise demonstraram que a produção endógena de NO estriatal aumenta os níveis de dopamina extracelular estriatal (WEST; GRACE, 2000). Essa propriedade do NO de regular os níveis de dopamina no CE pode, parcialmente, explicar o aumento dos níveis de nitrito induzido por cetamina, especialmente nesta área do cérebro no presente estudo, já que a administração repetida dessa droga aumenta os níveis de dopamina nessa área cerebral, e este mecanismo refere-se principalmente aos sintomas positivos da esquizofrenia (CHATTERJEE et al., 2012).

O NO desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da inflamação crônica e de processos neurodegenerativos (LIBERATORE *et al.*, 1999). Assim,

durante a inflamação há um aumento na produção de NO, gerando produtos como o peroxinitrito, que induz diretamente a neurodegeneração (REDFORD *et al.*, 1997).

Análise das alterações inflamatórias e sua relação com a esquizofrenia

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima conhecida por sua importante atividade pró-oxidativa e pró-inflamatória, sintetizada durante a diferenciação mielóide e está presente principalmente em grânulos azurófilos de neutrófilos (LORIA; DATO *et al.*, 2008). Essa enzima utiliza o íon cloreto (Cl⁻) na presença de H₂O₂ para gerar o ácido hipocloroso (HOCl), um potente oxidante que em condições fisiológicas normais é capaz de funcionar como um importante agente antimicrobiano (SHAEIB *et al.*, 2015). No entanto, em situações de intensa ativação celular, o excesso de MPO que pode ser prejudicial. Diversos estudos apontam o envolvimento de níveis elevados da atividade de MPO à alterações inflamatórias e ROS em doenças, tais como arteriosclerose, esclerose múltipla e Alzheimer (VELLOSA *et al.*, 2013).

Nesse contexto, nosso estudo ao analisar os níveis de MPO buscou verificar possíveis alterações inflamatórias associadas a indução de esquizofrenia pela administração repetida de KET. De fato, os animais que receberam apenas KET por 14 dias apresentaram níveis significativamente elevados de MPO, ou seja, atividade aumentada da enzima, quando comparados aos animais tratados apenas com salina.

As alterações inflamatórias indicadas pelo aumento de MPO foram significativamente revertidas por MEL em todas as áreas cerebrais. Em concordância com nossos resultados outros estudos demonstraram que MEL é um potente inibidor de MPO exercendo um efeito antioxidante e protetor em doenças inflamatórias crônicas com aumento na atividade dessa enzima (GALIJASEVIC; ABDULHAMID; ABUSOUD, 2008; SHAEIB *et al.*, 2015).

A administração de 1-MDT 20 e 1-MDT 40 diminuíram os níveis de MPO no HC e CE dos animais que receberam KET. Os resultados encontrados permitem ao nosso grupo de estudo sugerir que 1-MDT exerce um possível papel inibitório sobre MPO e na reversão de alterações inflamatórias. Contudo, é necessário mais estudos para comprovar tal hipótese.

Nosso estudo encontrou níveis aumentados de IL-6 no cérebro de animais que receberam injeções repetidas de cetamina como modelo de indução para esquizofrenia. Em concordância, diversos estudos descrevem níveis aumentados de IL-6 na esquizofrenia (GARVER; TAMAS; HOLCOMB, 2003; KNEELAND; FATEMI, 2012; KUNZ *et al.*, 2011; MULLER; J. SCHWARZ, 2010). A partir desses achados na

literatura , alguns autores supõem que IL-6 pode ser utilizada como um marcador biológico para esquizofrenia (MÜLLER et al., 2013).

A interleucina-6 atua como uma citocina pró-inflamatória e desempenha um papel essencial na modulação de várias funções cerebrais. Assim, a exposição a um patógeno e/ou estresse, causa uma resposta pró-inflamatória aumentada no SNC que mediante um desequilíbrio na ativação de astrócitos/micróglia induz uma alteração no metabolismo central do triptofano, através da via das quinureninas, levando a uma maior produção do metabólito KYNA que causa uma disfunção glutamatérgica por inibição dos receptores NMDA com alterações afetivas, emocionais e sociais (KNEELAND; FATEMI, 2012; MÜLLER et al., 2013). Nesse contexto, o nosso estudo relatou uma redução dos níveis de IL-6 após a administração de 1-MDT20, 1-MDT40 e MEL, provavelmente porque essas drogas atuam como neuromoduladores inibindo as enzimas IDO e TDO, respectivamente, essenciais da degradação do triptofano em quinureninas, reduzindo portanto a produção do metabólito KYNA (ANDERSON; MAES, 2013; FATOKUN; HUNT; BALL, 2013).

Já a risperidona parece inibir significativamente a liberação de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias pela micróglia ativada (KATO et al., 2007). Em concordância, nossos resultados demonstraram que após o tratamento com RISP houve uma redução de IL-6 e uma melhora no dano oxidativo (indicado por TBARS, GSH e nitrito) causado pela administração repetida de KET.

No presente trabalho, os níveis de IL-4 foram encontrados aumentados no hipocampo dos animais que receberam apenas KET por 14 dias. Em concordância, um estudo recente avaliou as concentrações séricas de citocinas do perfil Th2 em pacientes esquizofrênicos e os resultados revelaram níveis aumentados de IL4 no grupo de pacientes em estado psicótico (BOROVCANIN et al., 2012). Estudos anteriores afirmam que as citocinas presentes no sangue podem penetrar parcialmente a barreira hemato-encefálica e se ligar a receptores presentes nos neurônios e células gliais (YARLAGADDA , HAMPE , CLAYTON, 2010).

Uma atividade anti-inflamatória aumentada na esquizofrenia pode estar presente como uma maneira de neutralizar ou limitar processos pró-inflamatórios em curso e evitar o desenvolvimento de inflamação crônica (BOROVCANIN et al., 2012).

Os animais que receberam tratamento com 1-MDT20, 1-MDT40, MEL e RISP após a indução de esquizofrenia por KET tiveram os níveis de IL-4 inalterados ou diminuídos. Um outro estudo recente ao avaliar a dosagem de citocinas anti-inflamatórias em esquizofrênicos , no primeiro surto psicótico e em recidiva, detectou

níveis mais baixos de IL-4 após o tratamento com antipsicóticos. Assim, citocinas do perfil Th2 podem estar aumentadas na esquizofrenia, porém há uma correlação do tratamento com antipsicóticos com níveis reduzidos de IL-4 em pacientes esquizofrênicos (BOROVCANIN et al., 2013).

Porém, alguns estudos relatam uma redução nos níveis de IL-4 em pacientes em episódios agudos da doença (KIM et al., 2004; MILLER et al., 2011; O'BRIEN; SCULLY; DINAN, 2008), ou alterações não significativas (POTVIN et al., 2008).

A atividade de IL-4 leva a supressão da resposta pró-inflamatória em macrófagos, micróglia, células T e astrócitos. Portanto, uma redução nas citocinas anti-inflamatórias pode indicar uma incapacidade para limitar essa resposta. Embora a atividade anti-inflamatória seja necessária para evitar efeitos deletérios causados por uma resposta imune pró-inflamatória, um excesso de IL-2 e IL-4, por exemplo, pode induzir anomalias fisiológicas e reduzir a resistência de um indivíduo a infecções (KNEELAND; FATEMI, 2012; MÜLLER et al., 2013).

8. CONCLUSÃO

Em conclusão determinamos que a administração de 1-metil-d-triptofano (1-MDT) e melatonina (MEL) foram eficazes na reversão dos sintomas positivos, negativos e cognitivos da esquizofrenia induzida por administração repetida de cetamina (KET). Estes efeitos comportamentais foram acompanhados pela normalização do equilíbrio oxidativo em todas as áreas estudadas e restauração dos níveis de nitrito no CE. Observamos também uma reversão nas alterações inflamatórias. O 1-metil-d-triptofano ao inibir a enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), provavelmente reduziu a produção dos metabólitos ácido quinurênico (KYNA) e ácido quinolínico (QUIN), revertendo os sintomas causados pela disfunção glutamatérgica provocadas por KYNA e efeitos neurotóxicos provocados por QUIN. A melatonina através de seus efeitos positivos sobre o estresse oxidativo provavelmente reduziu as espécies reativas de oxigênio e induziu enzimas antioxidantes. Além disso, MEL também pode ter exercido seus efeitos através da inibição da enzima triptofano 2,3-dioxigenase (TDO), inibindo a produção de KYNA em astrócitos e revertendo os sintomas. Além disso, ao inibir as enzimas IDO e TDO, essas drogas reduziram os efeitos pró-inflamatórios causados pelo aumento de citocinas induzidas por células microgliais e astrócitos ativados. Assim, essas drogas parecem agir com a mesma finalidade, mesmo atuando por rotas distintas. Portanto, possivelmente poderão vir a ser futuras possibilidades promissoras no tratamento da esquizofrenia.

REFERÊNCIAS

- ADLER, C.M.; MALHOTRA, A.K.; ELMAN, I.; CARSON, R.E.; PICKAR, D.; BREIER, A. Effects of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist ketamine on striatal dopamine release in esquizofrenia. **Schizophrenia Res** v.36, p.299, 1999.
- AGUIAR, C. C. T. et al. Esquizofrenia: Uma doença inflamatória? **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 59, n. 1, p. 52–57, 2010.
- ALOISI, F.; RIA, F.; ADORINI, L. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: Different roles for microglia and astrocytes. **Immunology Today**, v. 21, n. 3, p. 141–148, 2000.
- AMMINGER, G. et al. Long-chain ω -3 fatty acids for indicated prevention of psychotic disorders: A randomized, placebo-controlled trial. **Archives of General Psychiatry**, v. 67, n. 2, p. 146–154, 2010.
- ANDERSON, G.; MAES, M. Schizophrenia: Linking prenatal infection to cytokines, the tryptophan catabolite (TRYCAT) pathway, NMDA receptor hypofunction, neurodevelopment and neuroprogression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 42, p. 5–19, 2013.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205–235, 1973.
- BALLA, A.; NATTINI, M.E.; SERSHEN, H.; LAJTHA, A.; DUNLOP, D.S.; JAVITT, D.C. GABAB/ NMDA receptor interaction in the regulation of extracellular dopamine levels in rodent prefrontal cortex and striatum. **Neuropharmacology** v.56, p.915-921, 2009.
- BERK, M. et al. Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 7, p. 346–351, 2008.
- BOROVCANIN, M. et al. Elevated serum level of type-2 cytokine and low IL-17 in first episode psychosis and schizophrenia in relapse. **Journal of Psychiatric Research**, v. 46, n. 11, p. 1421–1426, 2012.
- BOROVCANIN, M. et al. Antipsychotics can modulate the cytokine profile in schizophrenia: attenuation of the type-2 inflammatory response. **Schizophrenia research**, v. 147, n. 1, p. 103–9, 6 jun. 2013.
- BRESSAN, R. A.; PILOWSKY, L. S. Hipótese glutamatérgica da esquizofrenia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. 3, p. 177–183, 2003.
- BROWN, A.; DERKITS, E. Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. **Am J Psychiatry** v.167, p.261 – 80, 2010.

BROWN, A.S.; VINOGRADOV, S.; KREMEN, W.S.; POOLE, J.H.; BAO, Y.; KERN, D.; MCKEAGUE, I.W. Association of maternal genital and reproductive infections with verbal memory and motor deficits in adult schizophrenia. **Psychiatry Research** v.188(2), p.179-186, jul 2011.

CADY, S. G.; SONO, M. 1 -Methyl-DL-tryptophan, beta-(3-Benzofuranyl)-DL-alanine (the Oxygen Analog of Tryptophan), and ,& beta-[3-Benzo(b)thienyl]-kalanine (the Sulfur Analog of Tryptophan) Are Competitive Inhibitors for Indoleamine 2 , 3-Dioxygenase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 291, n. 2, p. 326–333, 1991.

CHATTERJEE, M. et al. Neurochemical and molecular characterization of ketamine-induced experimental psychosis model in mice. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 6, p. 983–991, 2012.

CHINDO, B.A.; ADZU, B.; YAHAYA, T.A.; *et al.* Ketamine-Enhanced Immobility in Forced Swim Test: A Possible Animal Model for the Negative Symptoms of Schizophrenia. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** v.38, p.310-316, 2012.

DALL'IGNA, O. P. et al. Caffeine and adenosine A2a receptor antagonists prevent ??-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. **Experimental Neurology**, v. 203, n. 1, p. 241–245, 2007.

DE LA FUENTE-SANDOVAL, C. et al. Higher levels of glutamate in the associative-striatum of subjects with prodromal symptoms of schizophrenia and patients with first-episode psychosis. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 9, p. 1781–1791, 2011.

DESBONNET, L.; WADDINGTON, J. L.; O'TUATHAIGH, C. M. P. Mutant models for genes associated with schizophrenia. **Biochemical Society transactions**, v. 37, n. Pt 1, p. 308–312, 2009.

DESCAMPS-FRANÇOIS, C. et al. Design and synthesis of naphthalenic dimers as selective MT1 melatonergic ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 1127–1129, 2003.

EL-MISSIRY, M. A. et al. Ameliorative effect of melatonin against gamma-irradiation-induced oxidative stress and tissue injury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, n. 2, p. 278–286, 2007.

FATOKUN, A. A.; HUNT, N. H.; BALL, H. J. Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO2) and the kynurenine pathway: Characteristics and potential roles in health and disease. **Amino Acids**, v. 45, n. 6, p. 1319–1329, 2013.

GALIJASEVIC, S.; ABDULHAMID, I.; ABU-SOUD, H. M. Melatonin is a potent inhibitor for myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 2668–2677, 2008.

GARVER, D. L.; TAMAS, R. L.; HOLCOMB, J. A. Elevated interleukin-6 in the cerebrospinal fluid of a previously delineated schizophrenia subtype. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 8, p. 1515–1520, 2003.

GROHMANN, U.; FALLARINO, F.; PUC CETTI, P. Tolerance, DCs and tryptophan: Much ado about IDO. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 5, p. 242–248, 2003.

HATTA, K. et al. Effectiveness of second-generation antipsychotics with acute-phase schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 113, n. 1, p. 49–55, 2009.

HEYES, M. P. et al. Different kynurenine pathway enzymes limit quinolinic acid formation by various human cell types. **The Biochemical journal**, v. 326 (Pt 2, p. 351–356, 1997.

HOR, K.; TAYLOR, M. Suicide and schizophrenia: a systematic review of rates and risk factors. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 24, n. 4 Suppl, p. 81–90, 2010.

HOU, D. Y. et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. **Cancer Research**, v. 67, n. 2, p. 792–801, 2007.

JOHNSTONE, E. V. E. C.; FRITH, C. D.; KREEL, L. SCHIZOPHRENIA ment emerges principally in those items in the battery. **The Lancet**, v. 2, n. 7992, p. 924–926, 1976.

KAPUR, S.; SEEMAN, P. NMDA receptor antagonists ketamine and PCP have direct effects on the dopamine D(2) and serotonin 5-HT(2)receptors-implications for models of schizophrenia. **Molecular psychiatry**, v. 7, n. 8, p. 837–844, 2002.

KATO, T. et al. Risperidone significantly inhibits interferon-??-induced microglial activation in vitro. **Schizophrenia Research**, v. 92, n. 1-3, p. 108–115, 2007.

KHANDAKER, G. M. et al. Inflammation and immunity in schizophrenia: implications for pathophysiology and treatment. **The Lancet Psychiatry**, v. 2, n. 3, p. 258–270, mar. 2015.

KIM, Y. K. et al. Th1, Th2 and Th3 cytokine alteration in schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, n. 7, p. 1129–1134, 2004.

KINKEAD, B. et al. Algorithmically designed peptides ameliorate behavioral defects in animal model of ADHD by an allosteric mechanism. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 151, n. 1, p. 68–81, 2006.

KISS, C. et al. Kynurenate production by cultured human astrocytes. **Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)**, v. 110, n. 1, p. 1–14, 2003.

KNEELAND, R. E.; FATEMI, S. H. Viral infection, inflammation and schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 42, p. 35–48, 2012.

KRYSTAL, J. H. et al. NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: Toward a paradigm shift in medication development. **Psychopharmacology**, v. 169, n. 3-4, p. 215–233, 2003.

KUNZ, M. et al. Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- α in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance. **Revista brasileira de psiquiatria (São Paulo, Brazil : 1999)**, v. 33, n. 3, p. 268–74, 2011.

LAHTI, A C. et al. **Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, 1995.

LEWIS, D. A; LIEBERMAN, J. A. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. **Neuron**, v. 28, n. 2, p. 325–334, 2000.

LODGE, D. J.; GRACE, A. A. Hippocampal dysregulation of dopamine system function and the pathophysiology of schizophrenia. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 9, p. 507–513, 2011.

LOTUFO, C. M. C. et al. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. **European Journal of Pharmacology**, v. 430, n. 2-3, p. 351–357, 2001.

LYSAKER, P. H. et al. Development of Personal Narratives as a Mediator of the Impact of Deficits in Social Cognition and Social Withdrawal on Negative Symptoms in Schizophrenia. **The Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 200, n. 4, p. 290–295, 2012.

MAES, M. et al. Increased serum interleukin-8 and interleukin-10 in schizophrenic patients resistant to treatment with neuroleptics and the stimulatory effects of clozapine on serum leukemia inhibitory factor receptor. **Schizophrenia Research**, v. 54, n. 3, p. 281–291, 2002.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. **Nature reviews. Immunology**, v. 4, n. 10, p. 762–774, 2004.

MEYER, U.; FELDON, J. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. **Progress in Neurobiology**, v. 90, n. 3, p. 285–326, 2010.

MEYER, U.; SCHWARZ, M. J.; MÜLLER, N. Inflammatory processes in schizophrenia: A promising neuroimmunological target for the treatment of negative/cognitive symptoms and beyond. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 132, n. 1, p. 96–110, 2011.

MILLER, B. J. et al. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: Clinical status and antipsychotic effects. **Biological Psychiatry**, v. 70, n. 7, p. 663–671, 2011.

MILLER, C. L. et al. Expression of the kynurenine pathway enzyme tryptophan 2,3-dioxygenase is increased in the frontal cortex of individuals with schizophrenia. **Neurobiology of Disease**, v. 15, n. 3, p. 618–629, 2004.

MONTE, A. S. et al. Prevention and reversal of ketamine-induced schizophrenia related behavior by minocycline in mice: Possible involvement of antioxidant and nitregic pathways. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 27, n. 11, p. 1032–43, 2013.

MORERA-FUMERO, A. L.; ABREU-GONZALEZ, P. Role of melatonin in schizophrenia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 9037–9050, 2013.

MÜLLER, N. et al. Anti-inflammatory treatment in schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 42, p. 146–153, 2013.

MULLER, N.; J. SCHWARZ, M. The Role of Immune System in Schizophrenia. **Current Immunology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 213–220, 2010.

MÜLLER, N.; MYINT, A.-M.; SCHWARZ, M. J. Kynurenine pathway in schizophrenia: pathophysiological and therapeutic aspects. **Current pharmaceutical design**, v. 17, n. 2, p. 130–136, 2011.

MÜLLER, N.; SCHWARZ, M. Schizophrenia as an inflammation-mediated dysbalance of glutamatergic neurotransmission. **Neurotoxicity Research**, v. 10, n. 2, p. 131–148, 2006.

MULLER, N.; SCHWARZ, M. J. **Immune System and Schizophrenia** *Curr Immunol Rev*, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21057585>>

O'BRIEN, S. M.; SCULLY, P.; DINAN, T. G. Increased tumor necrosis factor-alpha concentrations with interleukin-4 concentrations in exacerbations of schizophrenia. **Psychiatry Research**, v. 160, n. 3, p. 256–262, 2008.

O'CONNOR, J. C. et al. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. **Molecular psychiatry**, v. 14, n. 5, p. 511–522, 2009.

OPITZ, C. A. et al. The indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor 1-methyl-d-tryptophan upregulates IDO1 in human cancer cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011.

OZYURT, H. et al. Potential role of some oxidant / antioxidant status parameters in prefrontal cortex of rat brain in an experimental psychosis model and the protective effects of melatonin. p. 2137–2144, 2014.

PANDI-PERUMAL, S. R. et al. Melatonin antioxidative defense: Therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes. **Neurotoxicity Research**, v. 23, n. 3, p. 267–300, 2013.

PERKINS, M. N.; STONE, T. W. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenes and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. **Brain Research**, v. 247, n. 1, p. 184–187, 1982.

POTVIN, S. et al. Inflammatory Cytokine Alterations in Schizophrenia: A Systematic Quantitative Review. **Biological Psychiatry**, v. 63, n. 8, p. 801–808, 2008.

RADONJIĆ, N. V. et al. Decreased glutathione levels and altered antioxidant defense in an animal model of schizophrenia: Long-term effects of perinatal phencyclidine administration. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 4-5, p. 739–745, 2010.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 22, n. 3, p. 659–661, 2008.

ROSS, C. et al. Neurobiology of Schizophrenia. **Neuron**, v. 52, n. 1, p. 139–153, 2006.

ROTHERMUNDT, M.; AROLT, V.; BAYER, T. A. Review of immunological and immunopathological findings in schizophrenia. **Brain, behavior, and immunity**, v. 15, n. 4, p. 319–339, 2001.

SALGADO, J. V. et al. Modelos experimentais de esquizofrenia – uma revisão Experimental models of schizophrenia – a review. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 28, n. 2, p. 135–141, 2006.

SALUM, C.; RAISMAN-VOZARI, R.; MICHEL, P.P.; ZANARDO GOMES, M.; MITKOVSKI, M.; FERRARIO, J.E.; GINESTET, L.; DEL BEL, E.A. Modulation of dopamine uptake by nitric oxide in cultured mesencephalic neurons. **Brain Res** v.1198, p.27–33, 2008.

SAMS-DODD, F. Effects of continuous D-amphetamine and phencyclidine administration on social behaviour, stereotyped behaviour, and locomotor activity in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 1, p. 18–25, 1998.

SCHUCK, P. F., TONIN, A., DA COSTA, G. F., ROSA, R. B., LATINI, A., BALESTRO, F., PERRY, M. L., WANNMACHER, C. M., SOUZA, A. T. W.,

WAJNER, M. In vitro effect of quinolinic acid on energy metabolism in brain of young rats. **Neurosci. Res**, 57 (2), 277-288, 2007

SCHWARCZ, R. et al. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 7, p. 465–477, 2012.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. **Anal Biochem** v.25, p.192-205, 1968.

SHAEIB, F. et al. Melatonin Prevents Myeloperoxidase Heme Destruction and the Generation of Free Iron Mediated by Self-Generated Hypochlorous Acid. **Plos One**, v. 10, n. 4, p. e0120737, 2015.

SILVA, R. C. Regina Cláudia Barbosa da Silva 1. **Psicologia USP**, v. 17, n. 4, p. 263–285, 2006.

SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacological reviews**, v. 55, n. 2, p. 325–395, 2003.

SÖDERLUND, J. et al. Activation of brain interleukin-1beta in schizophrenia. **Molecular psychiatry**, v. 14, n. 12, p. 1069–1071, 2009.

SOLIMAN, H.; MEDIAVILLA-VARELA, M.; ANTONIA, S. Indoleamine 2,3-Dioxygenase. v. 16, n. 4, 2010.

SORIA, J. A. et al. Interleukin 4 induces the apoptosis of mouse microglial cells by a caspase-dependent mechanism. **Neurobiology of Disease**, v. 43, n. 3, p. 616–624, 2011.

STONE, J. M.; MORRISON, P. D.; PILOWSKY, L. S. Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia--a synthesis and selective review. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 21, n. 4, p. 440–452, 2007.

STONE, T. W.; DARLINGTON, L. G. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 1, n. 8, p. 609–620, 2002.

STROUS, R. D.; SHOENFELD, Y. Schizophrenia, autoimmunity and immune system dysregulation: A comprehensive model updated and revisited. **Journal of Autoimmunity**, v. 27, n. 2, p. 71–80, 2006.

SUGINO H., FUTAMURA T., MITSUMOTO Y., MAEDA K., MARUNAKA Y. Atypical antipsychotics suppress production of proinflammatory cytokines and up-regulate interleukin-10 in lipopolysaccharide-treated mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 2009;33(2):303-7.

SWERDLOW, N.R.; WEBER, M.; QU, Y.; LIGHT, G.A.; BRAFF, D.L. Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research. **Psychopharmacology (Berl)** v.199, p.331–88, 2008.

TAKIKAWA, O. et al. Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 8, p. 3648–3653, 1986.

THOMAS, P. et al. Differences among men and women with schizophrenia: A study of US and Indian samples. **Psychiatry Investigation**, v. 7, n. 1, p. 9–16, 2010.

VAN DEN BUUSE, M. Modeling the positive symptoms of schizophrenia in genetically modified mice: Pharmacology and methodology aspects. **Schizophrenia Bulletin**, v. 36, n. 2, p. 246–270, 2010.

VASCONCELOS, G. S. et al. Alpha-lipoic acid alone and combined with clozapine reverses schizophrenia-like symptoms induced by ketamine in mice: Participation of antioxidant, nitrenergic and neurotrophic mechanisms. **Schizophrenia Research**, v. 165, n. 2-3, p. 163–170, 2015.

VELLOSA, J. C. R. et al. Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 305–312, 2013.

WEST, A. R.; GRACE, A. A. Striatal nitric oxide signaling regulates the neuronal activity of midbrain dopamine neurons in vivo. **Journal of neurophysiology**, v. 83, n. 4, p. 1796–1808, 2000.

WONG, A. H. C.; VAN TOL, H. H. M. Schizophrenia: From phenomenology to neurobiology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 3, p. 269–306, 2003.

XIAO, B. G.; LINK, H. Is there a balance between microglia and astrocytes in regulating Th1/Th2-cell responses and neuropathologies? **Immunology Today**, v. 20, n. 11, p. 477–479, 1999.

XIE, W. et al. Activation of brain indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to epilepsy-associated depressive-like behavior in rats with chronic temporal lobe epilepsy. **Journal of neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 41, 2014.

YAMADA, K. et al. The role of nitric oxide in dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 276, n. 2, p. 460–466, 1996.

YANG, X. et al. serum levels in neuroleptic-free schizophrenia: association with psychopathology. v. 57, p. 247–258, 2002.

YAO, J. K.; LEONARD, S.; REDDY, R. Altered glutathione redox state in schizophrenia. **Disease markers**, v. 22, n. 1-2, p. 83–93, 2006.

YARLAGADDA A., HAMPE C., C. A. The blood brain barrier and the role of ratiometric molecular analysis in schizophrenia. **Psychiatry**, n. 12, p. 5–8, 2010.

ZHANG, X.Y.; ZHOU, D.F.; SHEN, Y.C.; *et al.* Effects of Risperidone and Haloperidol on Superoxide Dismutase and Nitric Oxide in Schizophrenia. **Neuropharmacology** v. 2, p.1928-1934, 2012.