



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

ALINE SANTOS MONTE

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO SEXO E DO EFEITO PREVENTIVO DA N-
ACETILCISTEÍNA EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE ESQUIZOFRENIA
INDUZIDO POR DESAFIO IMUNE NEONATAL COMBINADO A ESTRESSE NA
ADOLESCÊNCIA**

FORTALEZA

2017

ALINE SANTOS MONTE

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO SEXO E DO EFEITO PREVENTIVO DA N-ACETILCISTEÍNA EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR DESAFIO IMUNE NEONATAL COMBINADO A ESTRESSE NA ADOLESCÊNCIA

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M766e Monte, Aline Santos.
ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO SEXO E DO EFEITO PREVENTIVO DA N-ACETILCISTEÍNA
EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR DESAFIO
IMUNE NEONATAL COMBINADO A ESTRESSE NA ADOLESCÊNCIA / Aline Santos Monte. – 2017.
144 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Danielle Macêdo Gaspar.

1. Esquizofrenia. 2. N-acetilcisteína. 3. Diferença de sexo. 4. Desafio imune neonatal. I. Título.

CDD 615.1

ALINE SANTOS MONTE

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO SEXO E DO EFEITO PREVENTIVO DA N-ACETILCISTEÍNA EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR DESAFIO IMUNE NEONATAL COMBINADO A ESTRESSE NA ADOLESCÊNCIA

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fábio Miyajima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Gislei Frota Aragão
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Profa. Dra. Edna Maria Camelo Chaves
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa (Suplente)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Eduardo Ribeiro Honório Júnior (Suplente)
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Que a cada passo que eu der
não me falte força,
coragem e fé.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me dado saúde e coragem para ter chegado até aqui.

Ao meu marido, Gustavo, pela compreensão nos dias mais difíceis, pelas palavras de incentivo e motivação proferidas ao longo de todos esses anos de parceria e por tornar minha vida mais leve e alegre todos os dias.

Aos meus pais, Dió e Monte, por todo apoio, preocupação e cuidado comigo, por dedicarem suas vidas em prol da nossa felicidade.

À minha irmã Alana, por ser minha fonte de inspiração, por acreditar na minha capacidade e por me acolher prontamente nos momentos de ansiedade e angústia. Agradeço também ao meu irmão, André, pelo companheirismo de sempre e pelos momentos juntos que o torna único na minha vida.

À minha orientadora, Professora Danielle, por sempre acreditar que somos capazes de ultrapassar os nossos limites. Agradeço a sua compreensão, apoio e incentivo durante todo esse tempo de convivência.

Aos meus amigos do Laboratório de Neurofarmacologia, em especial Germana, Camila, Eliclécio, Taciana, Tatiana, Greicy, Giovanna e Manoel, por toda ajuda, por terem feito essa jornada muito mais prazerosa e pelas inúmeras vezes que ouvi de vocês o famoso “vai dar certo”, isso fez toda a diferença.

À Vilanir, pelo companheirismo desde a época da iniciação científica, monografia, mestrado e doutorado.

À banca examinadora, pela disponibilidade e por todas as contribuições e correções acerca deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que passaram e ficaram na minha vida, meu muito obrigada!

RESUMO

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO SEXO E DO EFEITO PREVENTIVO DA N-ACETILCISTEÍNA EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR DESAFIO IMUNE NEONATAL COMBINADO A ESTRESSE NA ADOLESCÊNCIA

A esquizofrenia é um distúrbio mental grave e crônico que acomete mais de 21 milhões de pessoas no mundo. Os principais sintomas são: positivos (alucinações, delírios e paranoia), negativos (isolamento social, anedonia e alogia) e cognitivos (déficits na memória de trabalho e na atenção). Há importante influência do sexo quanto ao prognóstico desta doença, à gravidade dos sintomas e à resposta aos antipsicóticos, com as mulheres tendo, em geral, um melhor curso da doença do que os homens, provavelmente pelo efeito protetor que o estrógeno exerce. A hipótese neurodesenvolvimental que suporta a fisiopatologia da esquizofrenia vem ganhando destaque. Baseado nela, foi desenvolvido um modelo animal de esquizofrenia induzido por “dois desafios”, sendo o primeiro “desafio” uma ativação imune na fase neonatal e o segundo “desafio” composto por eventos estressores na peripuberdade. A N-acetilcisteína (NAC), uma droga precursora do antioxidante glutatona (GSH), tem sido utilizada como adjuvante no tratamento convencional da esquizofrenia. Dessa forma, nosso estudo avaliou se o tratamento com NAC, nas doses de 110 e 220 mg/kg, na puberdade (dia pós-natal (DPN) 30 a 59) foi capaz de prevenir os sintomas comportamentais e neuroquímicos do tipo esquizofrenia em ratos Wistar machos e fêmeas que sofreram ativação imune neonatal (DPN5-7) induzida pela partícula viral poly(I:C) e passaram por eventos estressores durante a puberdade (DPN40-48), evidenciando as possíveis diferenças de sexo encontradas. Analisamos os sintomas tipo positivos (testes de Inibição pré-pulso e Atividade locomotora), negativos (teste da Interação social e ansiedade) e cognitivos (teste do Labirinto em Y). Além disso, analisamos o estresse oxidativo (níveis de GSH, nitrito e peroxidação lipídica), a expressão de proteínas de sinalização celular (Akt-fosforilada/total, GPR30, NR2Bfosforilado/total, parvalbumina e α 7-nAChR) e o tamanho do hipocampo. Os resultados mostraram que o modelo de dois desafios induziu comportamento tipo-esquizofrenia em ambos os sexos, com os machos apresentando piores “sintomas negativos” e as fêmeas piores “sintomas positivos” e um aumento do estresse oxidativo no corpo estriado, área cerebral associada a esses sintomas. A NAC preveniu os sintomas tipo positivos, negativos, cognitivos, e promoveu uma melhora nos níveis de peroxidação lipídica e nitrito de ambos os sexos. Entretanto, não preveniu o comportamento tipo ansioso nem o déficit de GSH de machos e fêmeas submetidos aos dois desafios. Além disso, a NAC reduziu os níveis de GSH e aumentou a peroxidação lipídica de machos e fêmeas controles. Quanto à influência do sexo, as fêmeas submetidas aos dois desafios responderam melhor ao tratamento com a NAC, como evidenciado no teste de IPP, na expressão hipocampal de GPR30, parvalbumina e α 7-nAChR, e no tamanho do hipocampo. Não houve diferenças significativas em relação à atividade de Akt e NR2B. Nossos resultados apontam para uma interação entre desafio imune neonatal e eventos estressores na adolescência contribuindo para o desenvolvimento de alterações comportamentais e neuroquímicas tipo esquizofrenia na idade adulta, os quais podem ser prevenidos, em parte, pelo tratamento com a NAC. Reforçando a necessidade de selecionar com cautela os indivíduos que eventualmente serão submetidos ao tratamento preventivo com NAC, sugerimos que o uso deste antioxidante pode ser uma alternativa interessante para a condução de pesquisas com modelos animais com validade translacional em psiquiatria.

Palavras-chaves: Esquizofrenia, N-acetilcisteína, diferença de sexo, desafio imune neonatal.

ABSTRACT

STUDY OF SEX INFLUENCE AND THE PREVENTIVE EFFECT OF N-ACETYL CYSTEINE IN RATS SUBJECT TO A TWO-HIT MODEL OF SCHIZOPHRENIA INDUCED BY NEONATAL IMMUNE ACTIVATION AND PERIPUBERTAL STRESS

Schizophrenia is a severe and chronic mental disorder that affects over 21 million people in worldwide. The main symptoms are classed as positive (hallucinations, delusions and paranoia), negative (absence of social behaviors, anhedonia and avolition) and of cognitive nature (working memory deficit and inability to maintain attention). There is an important sex influence on the prognosis, severity of symptoms and response to the antipsychotics for this illness, with women generally displaying a better course of illness than men, probably owing the protective effects exerted by the estrogen hormone. The neurodevelopmental hypothesis that supports the pathophysiology of schizophrenia is becoming increasingly recognized. Based on it, an animal model of schizophrenia induced by "two hits" (challenges) was developed, where the first "hit" consisted of an immune activation in the neonatal phase and the second "hit" of stressors events in the peripubertal stage. N-acetylcysteine (NAC), a drug precursor of the antioxidant glutathione (GSH) has been previously used as an adjuvant in the conventional treatment of schizophrenia. Thus, our study assessed whether treatment with NAC, with dosages of 110 and 220 mg/kg, at puberty (Postnatal Day (PND) 30 to 59) was able to ameliorate behavioral and neurochemical schizophrenia-like symptoms in both male and female Wistar rats, who were also subject to neonatal immune activation (PND 5-7) induced by the viral particle poly (I:C) and underwent stressors events during puberty (PND 40-48), in order to demonstrate potential sex-specific differences. We analyzed aspects of positive-like symptoms (pre-pulse inhibition (PPI) and locomotor activity tests), negative-like (social interaction and anxiety tests) and cognition (Y Maze test). Furthermore, we investigated oxidative stress (levels of GSH, nitrite and lipid peroxidation), expression of cellular signaling proteins (AKT-phosphorylated/total, GPR30, NR2B- phosphorylated/total, parvalbumin and $\alpha 7$ -nAChR) and the size of the hippocampus. The results showed that our two-hit model induced schizophrenia-like symptoms in both sexes, with males presenting worse "negative symptoms", while females displaying worse "positive symptoms" and an significant increase in oxidative stress in the striatum, a brain area associated with these type of symptoms. NAC improved positive, negative, cognitive symptoms, and promoted an decreased in lipid peroxidation and nitrite levels for both sexes. However, it did not prevent the anxiety-like behavior, nor rescued the GSH deficit seen in both males and females subject to the double hits. Additionally, NAC reduced the GSH levels and increased the lipid peroxidation of both male and female controls. In relation to the sex influence, the females subject to the two-hit approach responded better to the NAC treatment, as evidenced by the PPI test, the hippocampal gene expression of GPR30, parvalbumin and $\alpha 7$ -NACHR, as well as by the size of the hippocampus. There were no significant differences in the level of Akt and NR2B activity. Our findings showed an interaction between neonatal immune activation and stressor events in adolescence leading to the development of behavioral and neurochemistry changes characteristic of adulthood schizophrenia, which can at least in part be prevented by NAC administration. This in turn reinforces the need of carefully selecting individuals and groups who would most benefit from the preventive treatment with NAC. We therefore suggest that the use of this antioxidant may be an interesting avenue for conducting further *in vivo* research towards its translational application for clinical neuropsychiatry practice.

Keywords: Schizophrenia, N-acetylcysteine, sex differences, neonatal immune activation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Alvos de tratamento e sintomas da esquizofrenia	18
Tabela 2	Divisão dos grupos experimentais. DPN: dia pós-natal, M: machos, F: fêmeas, NAC: N-acetilcisteína.	45

LISTA DE FIGURAS

Fig.1	As vias dopaminérgicas da esquizofrenia	20
Fig.2	Ativação da via das quinureninas por estresse e/ou infecção	24
Fig.3	Síntese de Glutathione	28
Fig.4	Vias de sinalização da Akt	30
Fig.5	Modelo de “dois-desafios”	32
Fig.6	Fatores de risco ambientais e desordens mentais	34
Fig.7	Trocador cistina/glutamato	37
Fig.8	Vias de sinalização ativadas pelo GPR30 e por receptores clássicos de estrógenos	39
Fig.9	Protocolo experimental	46
Fig.10	Teste de Interação Social	48
Fig.11	Inibição pré-pulso (IPP)	49
Fig.12	Aparelho de Inibição pré-pulso	50
Fig.13	Teste do Labirinto em Y	51
Fig.14	Avaliação da Atividade Locomotora e do Comportamento de Ansiedade através do software SMART	52
Fig.15	Efeito do estresse, de poly(I:C) e de poly(I:C) + estresse na média da % de IPP (A) e na amplitude da resposta de sobressalto (ASR) (B) de ratos machos e fêmeas.	60
Fig.16	Efeito do estresse, de poly(I:C) e de poly(I:C) + estresse na distância total percorrida no campo aberto por ratos machos e fêmeas.	61
Fig.17	Efeito do estresse, de poly(I:C) e de poly(I:C) + estresse no número de entradas na zona central do campo aberto por ratos machos e fêmeas.	62
Fig.18	Efeito do estresse, de poly(I:C) e de poly(I:C) + estresse no tempo de interação social por ratos machos e fêmeas.	63
Fig.19	Efeito do estresse, de poly(I:C) e de poly(I:C) + estresse na porcentagem de alterações corretas no teste do Labirinto em Y pelos ratos machos e fêmeas.	64
Fig.20	Efeito do estresse, de poly(I:C) e de poly(I:C) + estresse nos níveis de GSH no córtex pré-frontal (A) e corpo estriado (B) de ratos machos e fêmeas.	66
Fig.21	Efeito do estresse, de poly(I:C) e de poly(I:C) + estresse nos níveis de conteúdo de nitrito no córtex pré-frontal (A) e corpo estriado (B) de ratos machos e fêmeas.	68
Fig.22	Efeito do estresse, de poly(I:C) e de poly(I:C) + estresse nos níveis de peroxidação lipídica mensurados através da quantidade de TBARS no córtex pré-frontal (A) e corpo estriado (B) de ratos machos e fêmeas.	70

Fig.23	Efeito da NAC110 e NAC220 na média da % de IPP de animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E ⁺) (B).	80
Fig.24	Efeito da NAC110 e NAC220 na distância total percorrida pelos animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E ⁺) (B).	82
Fig.25	Efeito da NAC110 e NAC220 no número de entradas na zona central do campo aberto pelos animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E ⁺) (B).	84
Fig.26	Fig. 26. Efeito da NAC110 e NAC220 na interação social de animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E ⁺) (B).	86
Fig.27	Efeito da NAC110 e NAC220 na % de alterações corretas (Labirinto em Y) de animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E ⁺)	88
Fig.28	Efeito da NAC110 e NAC220 nos níveis de GSH no córtex pré-frontal de animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E ⁺) (B).	90
Fig.29	Efeito da NAC110 e NAC220 nos níveis de GSH no corpo estriado de animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E ⁺) (B).	91
Fig.30	Efeito da NAC110 e NAC220 nos níveis de Nitrito no córtex pré-frontal de animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E ⁺) (B)	93
Fig.31	Efeito da NAC110 e NAC220 nos níveis de Nitrito no corpo estriado de animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E ⁺) (B).	94
Fig.32	Efeito da NAC110 e NAC220 nos níveis de TBARS no córtex pré-frontal de animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E ⁺) (B).	96
Fig.33	Efeito da NAC110 e NAC220 nos níveis de Nitrito no corpo estriado de animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E ⁺) (B).	97
Fig.34	Efeito da NAC110 e NAC220 na fosforilação da AKT no hipocampo de animais submetidos a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E ⁺).	104
Fig.35	Efeito da NAC220 na expressão de GPR30 no hipocampo de machos e fêmeas submetidos a poly(I:C) + estresse.	105
Fig.36	Efeito da NAC220 na expressão de NR2B fosforilado no hipocampo de machos e fêmeas submetidos a poly(I:C) + estresse.	106
Fig.37	Efeito da NAC220 na expressão de parvalbumina no hipocampo de machos e fêmeas submetidos a poly(I:C) + estresse.	107

- Fig.38 Efeito da NAC220 na expressão de $\alpha 7$ -nAChR no hipocampo de machos e fêmeas submetidos a poly(I:C) + estresse. 108
- Fig.39 Efeito da NAC220 no volume do hipocampo de machos e fêmeas submetidos a poly(I:C) + estresse. 109

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
Akt	Proteína quinase B
AMPA-R	Receptor AMPA
ARS	Amplitude da resposta do sobressalto
ATP	Trifosfato de adenosina
ATV	Área tegmentar ventral
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CE	Corpo estriado
CEPA	Comitê de Ética e Pesquisa Animal
CPF	Córtex pré-frontal
DA	Dopamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPN	Dia pós-natal
DSM-5	Manual Diagnóstico e Estatístico de Distúrbios Mentais
E ⁺	Estresse
EGFR	Fator de crescimento epidermal
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
PI3K	fosfoinosítídeo 3-quinase
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GCL	γ -glutamilcisteína ligase
GPER1	Receptor acoplado à proteína G sensível ao estrógeno
GPR30	Receptor acoplado à proteína G sensível ao estrógeno
GPx	Glutationa peroxidase
GS	Glutationa sintetase
GSH	Glutationa reduzida
HC	Hipocampo
HPA	Hipotálamo - hipófise - adrenal

IDO	Indolamina 2,3-dioxigenase
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
IPP	Inibição Pré-Pulso
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malonaldeído
NAC	N-acetilcisteína
nAChRs	Receptores colinérgicos nicotínicos
NMDA-R	Receptor N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NR2B	Subunidade do receptor NMDA
P	Pulso
PEP	Primeiro episódio psicótico
PKB	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase C
PMAPs	Padrões moleculares associados a patógenos
Poly (I:C)	Polyinosinic:polycytidylic acid
PP	Pré-pulso
PV	Parvalbumina
SNC	Substância negra pars compacta
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF- β 1	Fator transformador de crescimento

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. ASPECTOS GERAIS DA ESQUIZOFRENIA.....	17
1.2. FISIOPATOLOGIA	18
1.2.1. Hipótese dopaminérgica	18
1.2.2. Hipótese glutamatérgica	21
1.2.3. Hipótese colinérgica	22
1.2.4. Hipótese neuroinflamatória	23
1.2.5. Hipótese neurodesenvolvimental.....	25
1.2.6. Estresse oxidativo e esquizofrenia.....	26
1.3. SINALIZAÇÕES CELULARES NA ESQUIZOFRENIA	28
1.4. A IMPORTÂNCIA DO PRÓDROMO NA ESQUIZOFRENIA.....	31
1.5. MODELO ANIMAL DE “DOIS DESAFIOS”	32
1.6. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA ESQUIZOFRENIA.....	34
1.7. N-ACETILCISTEÍNA	36
1.8. INFLUÊNCIA DO GÊNERO NA ESQUIZOFRENIA	38
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	43
3.1. OBJETIVO GERAL.....	43
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4. METODOLOGIA	44
4.1. ANIMAIS	44
4.2. DROGAS	44
4.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	44
4.4. EXPOSIÇÃO A ESTÍMULOS ESTRESSORES	46
4.5. DETERMINAÇÕES COMPORTAMENTAIS	47
4.5.1. Interação Social	47
4.5.2. Inibição Pré-Pulso	48
4.5.3. Labirinto em Y	50
4.5.4. Campo Aberto	51
4.6. DETERMINAÇÕES DO ESTRESSE OXIDATIVO	52
4.6.1. Glutationa reduzida (GSH).....	52
4.6.2. Nitrito	52
4.6.3. Peroxidação lipídica	53
4.7. DETERMINAÇÕES BIOMOLECULARES E NEUROQUÍMICAS	53
4.7.1. Expressão de Akt-fosforilada e Akt-total	53
4.7.2. Expressão proteica de GPR30, parvalbumina, α 7-nAChR e NR2B.....	54
4.7.2.1. Extração de proteínas	54
4.7.2.2. Método Bradford para dosagem de proteínas	54
4.7.2.3. Western Blotting	55
4.8. AVALIAÇÃO DO PESO DOS HIPOCAMPOS	56

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
6. CAPÍTULO I.....	59
6.1. RESULTADOS DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....	59
6.2. RESULTADOS DAS ALTERAÇÕES OXIDATIVAS CEREBRAIS	65
6.3. DISCUSSÃO	71
7. CAPÍTULO II.....	79
7.1 RESULTADOS DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....	79
7.2. RESULTADOS DAS ALTERAÇÕES OXIDATIVAS CEREBRAIS	89
7.3. DISCUSSÃO	98
8. CAPÍTULO III.....	104
8.1. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE AKT-FOSFORILADA/TOTAL.....	104
8.2. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DO RECEPTOR GPR30.....	105
8.3. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE NR2B FOSFORILADO/ TOTAL.....	106
8.4. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE PARVALBUMINA	107
8.5. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR A7-NACHR.....	108
8.6. RESULTADO DA AVALIAÇÃO DO PESO DO HIPOCAMPO	109
8.7. DISCUSSÃO	110
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
10. CONCLUSÃO.....	117
11. LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	118
12. REFERÊNCIAS	119
APÊNDICE A – ARTIGO REFERENTE AO CAPÍTULO I PUBLICADO EM REVISTA DE IMPACTO B1.....	143
APÊNDICE B - APROVAÇÃO DO TRABALHO PELO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA ANIMAL (CEPA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ.....	144

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da esquizofrenia

Esquizofrenia é um transtorno mental grave e crônico que acomete mais de 21 milhões de pessoas ao redor do mundo afetando o modo de pensar, sentir e se comportar (NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH, 2016). Quando comparadas com a população em geral, pessoas com esquizofrenia têm duas a 2,5 mais chances de morrer, geralmente por doenças cardiovasculares, metabólicas e infecciosas (WHO | Schizophrenia, 2016), além de terem de 11 a 20 anos de vida a menos que a população normal (LAURSEN et al., 2013). O início precoce e a tendência à cronicidade da esquizofrenia fazem com que ela seja uma desordem de prevalência relativamente alta (AYANO, 2016).

A sintomatologia é agrupada em sintomas positivos, negativos e cognitivos. Os sintomas positivos ou psicóticos são assim chamados pois são aditivos à função normal e saudável e incluem alucinações visuais e auditivas, delírios, paranoia e pensamentos incoerentes. Os sintomas negativos caracterizam-se pela ausência de comportamentos sociais, anedonia, alogia e avolição. Finalmente, os sintomas cognitivos da esquizofrenia envolvem distúrbios em funções executivas, como déficits na memória de trabalho e incapacidade de manter a atenção (MEYER; FELDON, 2010; TANDON et al., 2013). A remissão dos sintomas psicóticos pode ser alcançada pela maioria dos pacientes esquizofrênicos. No entanto, o prejuízo social e profissional geralmente permanece (HARVEY, 2014; KAHN; KEEFE, 2013). Isto porque, embora haja uma pequena melhora dos sintomas negativos e cognitivos em pacientes adultos, déficits graves nesses quesitos são difíceis de superar (LEPAGE; BODNAR; BOWIE, 2014; MUELLER; SCHMIDT; RODER, 2015).

O diagnóstico da esquizofrenia é feito utilizando os critérios estabelecidos no Manual Diagnóstico e Estatístico de Distúrbios Mentais (DSM-5). Os critérios de "checklist" do DSM-5 requerem apenas dois ou mais sintomas entre: pensamentos desordenados manifestados por comportamento e fala desorganizados, reduções proeminentes na expressão da emoção e diminuição das atividades úteis auto-motivadas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Frequentemente o início do pico deste distúrbio coincide com a idade de desenvolvimento da maturidade, em torno de 22 anos, com as mulheres apresentando uma idade média de início mais tardia e um segundo pico entre 55 e 64 anos (PEDERSEN et al., 2014; VAN DER WERF et al., 2014). A esquizofrenia precoce, definida como ocorrendo antes dos

18 anos de idade, e a esquizofrenia infantil, antes dos 13 anos, compartilham os mesmos sintomas de diagnóstico com a esquizofrenia de início adulto, mas seus prognósticos e comorbidades diferem. Ainda não está claro por que o transtorno de início precoce frequentemente tem sintomas mais severos (DRIVER; GOGTAY; RAPOPORT, 2013).

Dessa forma, a psicose evidente (sintomas positivos) não é o começo, nem a característica central da esquizofrenia e, conseqüentemente, não deve ser o alvo principal para intervenção precoce e prevenção (SOMMER et al., 2016). Percebeu-se, então, que, para promover uma melhoria na terapêutica da esquizofrenia, deve-se impedir o desenvolvimento de graves perturbações sociais e cognitivas antes que estas estejam fortemente estabelecidas (LEPAGE; BODNAR; BOWIE, 2014; MUELLER; SCHMIDT; RODER, 2015).

1.2. Fisiopatologia

Os avanços na compreensão da fisiopatologia da esquizofrenia obtidos nos últimos anos nos permitem definir sistematicamente potenciais alvos terapêuticos e utilizar biomarcadores mais acionáveis. Além disso, a relação entre descobertas neurobiológicas e sintomas clínicos da esquizofrenia pode levar ao desenvolvimento de novos tratamentos visando diferentes fases da doença. Yang e Tsai, (2017) propõem que novos alvos de tratamento para a esquizofrenia estão relacionados às seguintes hipóteses e estratégias observadas na Tabela 1.

Hipótese	Alvo	Estratégia
Dopamina	Estabilizadores dopaminérgicos	Melhorar a aderência ao medicamento.
Glutamato	Agonista de NMDA-R, AMPA-R ou receptores metabotrópicos	Melhorar sintomas negativos e cognitivos.
Serotonina	Agonistas 5-HT1A, inibidores da recaptação 5-HT, agonistas e antagonistas 5-HT2C e antagonistas de 5-HT3, 5-HT6 e 5HT7	Melhorar sintomas negativos e cognitivos.
GABA	Agonistas seletivos GABA-A	Melhorar o tratamento dos sintomas psicóticos.
Acetilcolina	Agonista de $\alpha 7$ nicotínico	Melhorar sintomas cognitivos.
	Agonista de M1 muscarínico	Melhorar sintomas positivos.
Inflamação	Citocinas	Melhorar sintomas psicóticos no início da doença.

Tabela 1: Alvos de tratamento e sintomas da esquizofrenia (YANG; TSAI, 2017).

1.2.1. Hipótese dopaminérgica

A hipótese dopaminérgica da esquizofrenia foi proposta na década de 60 quando o primeiro antipsicótico, clorpromazina, tratou com sucesso os sintomas positivos de pacientes

esquizofrênicos (KIM; NA, 2017). A hipótese da hiperatividade dopaminérgica baseia-se em evidências de que neurolépticos que antagonizam receptores de dopamina (DA) do tipo D2, os quais são pertencentes à classe dos receptores acoplados à proteína G, são eficazes no tratamento de sintomas positivos (CARLSSON; LINDQVIST, 1963). Além disso, drogas que aumentam a atividade da dopamina, como anfetaminas, pioram os sintomas positivos da esquizofrenia (ANGRIST; KAMMEN, 1984).

As quatro principais vias dopaminérgicas são: (a) A via nigroestriatal, com os corpos celulares na substância negra pars compacta (SNc) e os terminais dopaminérgicos no estriado dorsal; (b) A via mesolímbica, com fibras que se projetam da área tegmentar ventral (ATV) para o estriado ventral, o que inclui o núcleo accumbens, o núcleo caudado e estruturas do sistema límbico como o hipocampo e a amígdala; (c) a via mesocortical que tem projeções da ATV para o córtex pré-frontal; e finalmente, (d) a via tuberoinfundibular, cujas fibras nervosas se projetam do hipotálamo para a hipófise anterior (STAHL, 2013).

Sabe-se que as vias nigroestriatal e tuberoinfundibular na esquizofrenia estão associadas mais especificamente ao surgimento de reações adversas ao uso dos antipsicóticos. O bloqueio de receptores dopaminérgicos D2 pelos antipsicóticos na via nigroestriatal contribui para o desenvolvimento de sinais motores de parkinsonismo como a rigidez muscular, acinesia ou bradicinesia, acatisia e distonia. Na via tuberoinfundibular, normalmente, esses neurônios dopaminérgicos estão ativos e inibem a liberação de prolactina. No pós-parto, no entanto, a atividade destes neurônios é diminuída. O bloqueio dessa via causa efeitos colaterais como a ginecomastia e a galactorréia (ROTH; ROGAN, 2009; STAHL, 2013).

As vias mesolímbica e mesocortical estão criticamente relacionadas com o processamento e regulação de estímulos emocionais e à flexibilidade comportamental (KRINGELBACH; BERRIDGE, 2009). No indivíduo esquizofrênico, a hipoatividade da transmissão mesocortical chega tanto ao córtex pré-frontal dorsolateral, provocando, ali, uma insuficiente estimulação de receptores D1, responsável pelos sintomas negativos e déficit cognitivo, quanto ao córtex pré-frontal ventromedial, envolvidos nos sintomas negativos e afetivos associados à esquizofrenia (STAHL, 2013). Enquanto isso, a hiperatividade da neurotransmissão dopaminérgica mesolímbica promove um aumento do receptor D2, responsável pelos sintomas positivos da esquizofrenia (ARICIOGLU et al., 2016).

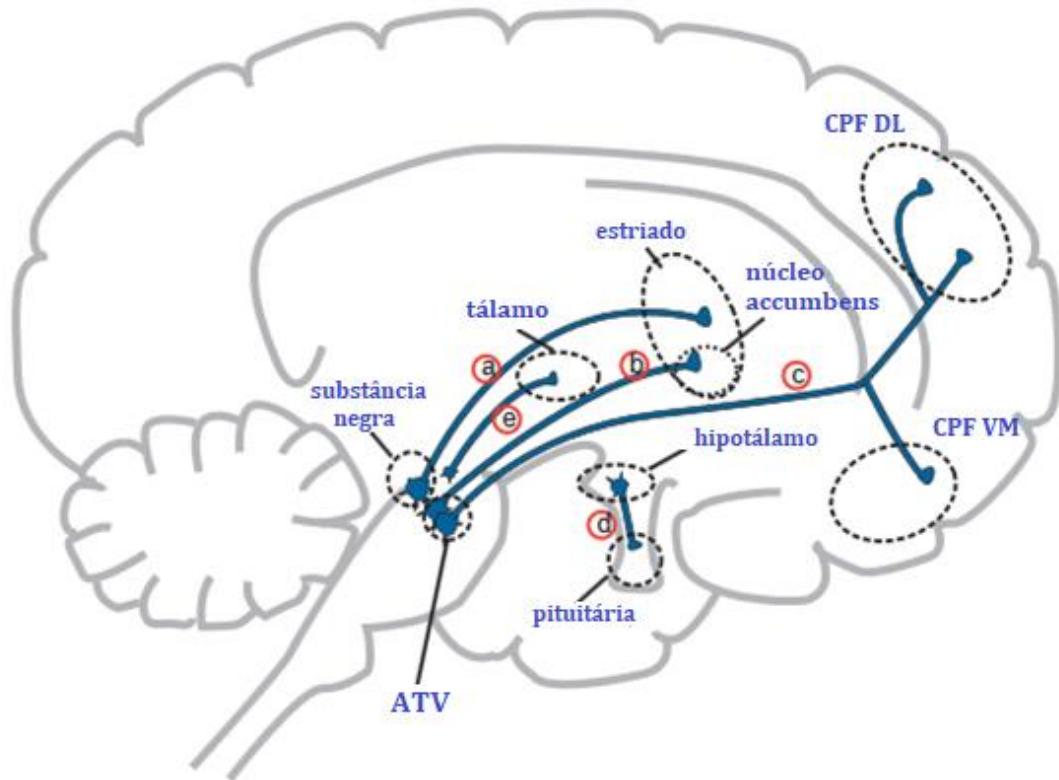


Figura 1 As vias dopaminérgicas da esquizofrenia. a) via nigroestriatal. b) via mesolímbica. c) via mesocortical. d) via tuberoinfundibular. ATV: área tegmentar ventral. CPF DL: córtex pré-frontal dorso-lateral. CPF VM: córtex pré-frontal ventro-medial. Traduzido de Stahl, 2013.

Entretanto, essa hipótese traz restrições que fazem com que esse modelo não possa explicar todo o espectro da esquizofrenia. Primeiramente, apesar de o aumento nos níveis de dopamina estar relacionado à fisiopatologia da esquizofrenia, mais precisamente aos sintomas positivos, os antagonistas dopaminérgicos têm poucos efeitos sobre os sintomas negativos e cognitivos (GAEBEL, 2011; LONDERO; MASSUDA; GAMA, 2015). Outra restrição, sugerida por Laruelle et al., 1999, mostra que durante episódios agudos o sistema dopaminérgico de pacientes permanecia em estado ativado, mas não em períodos de remissão. Tal fato provavelmente ocorra devido o sistema dopaminérgico de esquizofrênicos ser hiperresponsivo, porém, como sugere o estudo de Abi-Dargham e Moore, 2003 esta hiperresponsividade é transitória já que nas fases de remissão dos sintomas psicóticos o sistema dopaminérgico se comporta como o dos voluntários sadios.

Assim, tendo em vista os efeitos limitados dos antipsicóticos no controle dos sintomas negativos e do prejuízo cognitivo, outros neurotransmissores começaram a serem investigados na fisiopatologia da esquizofrenia, como serotonina, noradrenalina, endocanabinóides, GABA (ácido gama-aminobutírico), acetilcolina e glutamato (MARQUE, 2011).

1.2.2. Hipótese glutamatérgica

Adicionalmente, o sistema glutamatérgico também é apontado como envolvido na etiologia deste distúrbio. Essa teoria postula que uma função diminuída do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA-R) pode ser um fator de predisposição à esquizofrenia (COYLE, 1996). O que ocorre nas conexões neuronais que explica esta hipótese é uma interação anatômica e funcional entre neurônios dopaminérgicos, glutamatérgicos e até mesmo gabaérgicos (Stephen, 2007).

O circuito neuronal glutamatérgico está envolvido diretamente com o dopaminérgico no córtex, ou seja, o neurocircuito glutamatérgico interage com o dopaminérgico, funcionando como um ativador deste último. Assim, em condições fisiológicas, quanto mais glutamato interage em receptores NMDA na via mesocortical, mais dopamina é liberada nesta mesma via. Na esquizofrenia ocorre uma hipofunção glutamatérgica nesta via, que promove, conseqüentemente, pouca liberação de dopamina no córtex, o que resulta em sintomas negativos e cognitivos (ARARIPE NETO; BRESSAN; BUSATTO FILHO, 2007; DEUTSCH et al., 1989; STAHL, 2007).

Já na via mesolímbica, em condições fisiológicas normais, os neurônios glutamatérgicos regulam a atividade de interneurônios gabaérgicos que inibem a liberação de dopamina. Dessa forma, a hipofunção de receptores NMDA na via mesolímbica encontrada na esquizofrenia promove pouca estimulação dos interneurônios gabaérgicos, que, desta forma, não conseguem inibir o suficiente a liberação de dopamina nesta região, ou seja, a dopamina interage com receptores D2 muito mais preponderantemente do que o normal e isto precipita sintomas positivos (ARARIPE NETO; BRESSAN; BUSATTO FILHO, 2007; STAHL, 2007).

Alguns autores sugerem que a indução de sintomas psicóticos na verdade acontece devido ao aumento da liberação de glutamato na fenda sináptica que ocorre em consequência do antagonismo/hipofunção de receptores NMDA. O fato é que a hipofunção glutamatérgica reduz a excitação de interneurônios gabaérgicos inibitórios, resultando em uma desinibição dos neurônios glutamatérgicos piramidais e conseqüente aumento de glutamato. Esse excesso de glutamato irá promover a superestimulação dos receptores glutamatérgicos não-NMDA que estão disponíveis, AMPA e cainato, o que culmina na ativação de processos de caráter neurotóxicos e concentrações anormais de íons e radicais livres que podem levar a excitotoxicidade e apoptose neuronal (MARSMAN et al., 2014; MOGHADDAM et al., 1997).

Os receptores NMDA são compostos por um conjunto heterométrico de subunidades, sendo pelo menos a subunidade NR1 obrigatória combinada com arranjos distintos da

subunidade NR2 e/ou NR3. O domínio N-terminal extracelular das subunidades NR2 contém um sítio de ligação para o glutamato, o ativador primário do receptor NMDA (GEDDES, 2015). NR2B é espacialmente predominante no córtex, estriado e hipocampo (WENZEL et al., 1997). Estudos mostraram que a ativação de NMDA contendo a subunidade NR2B desativa vias de sobrevivência celular e modula negativamente a neurogênese, levando à morte neuronal (HARDINGHAM; FUKUNAGA; BADING, 2002; HU et al., 2008). Além disso, o gene que codifica a subunidade NR2B, chamado de GRIN2B (do inglês “*glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-d-aspartate 2B*”) parece estar particularmente associado à esquizofrenia, mostrando uma variação genética maior em pacientes esquizofrênicos (MIYATAKE; FURUKAWA; SUWAKI, 2002).

Por outro lado, em modelos animais, o antagonista NR2B, ro 25-6981, promoveu comportamentos tipo esquizofrenia, como: hiperlocomoção, déficit de IPP, aumento do comportamento de ansiedade e um prejuízo na aprendizagem e na memória de ratos adultos (MATHUR et al., 2009). Além disso, fatores ambientais, como o estresse neonatal, que tem mostrado relevância etiológica para a esquizofrenia em modelos de animais, promoveu uma redução dos níveis de NR2B no hipocampo (ZHAO et al., 2013).

1.2.3. Hipótese colinérgica

O sistema colinérgico tem sido foco de estudos sobre a fisiopatologia da esquizofrenia, dada a observação clínica de que o tabagismo por nicotina, o qual a maioria dos pacientes com esquizofrenia fazem uso, tem efeitos pró-cognitivos (YANG; TSAI, 2017), como melhora da inibição pré-pulso (CHEN et al., 2011). Embora vários agentes que visem os receptores colinérgicos estejam atualmente em vários estágios de estudo, os agonistas dos receptores α -7 nicotínicos de receptores M1 muscarínicos são os de maior interesse (DENCKER et al., 2012; DINELEY; PANDYA; YAKEL, 2015).

Receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) são implicados na função cognitiva e no processamento sensorial, sendo, portanto, os agonistas de nicotina principalmente relacionados aos sintomas cognitivos (ROWE et al., 2015). Entre os nAChRs, o subtipo α 7 tem se mostrado um possível alvo terapêutico para esquizofrenia, desde que estudos pré-clínicos, genéticos e de *post-mortem* demonstraram níveis alterados e funções associadas com essa doença (MARTIN; KEM; FREEDMAN, 2004). Agonistas seletivos do receptor α 7 nicotínico (α 7-nAChR), como o 3-(2,4-dimetoxibenzilideno)anabaseína (DMXB-A), têm se mostrado candidatos potenciais para o tratamento de sintomas negativos e prejuízo cognitivo na esquizofrenia (MIYAMOTO

et al., 2012). Um ensaio de fase II com a DMXB mostrou uma melhora significativa na cognição (FREEDMAN et al., 2008).

Existe um corpo de evidências anatômicas e farmacológicas demonstrando o potencial de modulação de neurônios dopaminérgicos e glutamatérgicos por receptores colinérgicos muscarínicos (BYMASTER et al., 1999). Além disso, as drogas que realçam a função do receptor muscarínico seriam esperadas a conduzir a ativação da função inibitória interneuronal gabaérgica (STONE; PILOWSKY, 2007).

1.2.4. Hipótese neuroinflamatória

Em 1982, Stevens introduziu a ideia da hipótese neuroinflamatória ao mostrar a presença de marcadores inflamatórios no líquido cefalorraquidiano de pacientes esquizofrênicos e correlacionar esses achados com a neuropatologia desta desordem. Desde então, a associação entre doenças inflamatórias e esquizofrenia tem sido proposta. Evidências sugerem que determinadas doenças auto imunes e a esquizofrenia compartilham algumas características clínicas, epidemiológicas e genéticas (BENROS et al., 2011; BREY et al., 2002). Mais recentemente, os Estudos de Associação do Genoma Inteiro (GWAS, do inglês, *Genome Wide Association Studies*) reforçaram essas descobertas indicando uma forte relação entre genes que regulam a resposta imune e a esquizofrenia (CORVIN; MORRIS, 2014).

Estudos de perfil molecular sugerem que moléculas relacionadas ao estresse oxidativo e imunorregulação estão alteradas em certas regiões cerebrais na esquizofrenia. Tais pesquisas mostram que há uma expressão alterada de marcadores relacionados ao sistema imune no córtex pré-frontal (FILLMAN et al., 2013) e temporal (WU et al., 2012) bem como no hipocampo (HWANG et al., 2013) de pacientes com esquizofrenia. Estudos evidenciaram um aumento de IL-1, IL-6 e TGF- β 1 em pacientes esquizofrênicos tanto no período do primeiro episódio psicótico quanto na fase aguda, e normalização subsequente pelo tratamento com antipsicóticos (MILLER et al., 2011). Esses efeitos anti-inflamatórios dos antipsicóticos sobre os marcadores periféricos são acompanhados por uma capacidade de reduzirem a ativação microglial no SNC (MONJI; KATO; KANBA, 2009). Além disso, as citocinas IL-12, IFN- γ , TNF- α e receptor solúvel de IL-2 estão aumentadas em pacientes em primeiro surto psicótico, ainda não tratados, e em pacientes com doença crônica nos períodos de agravamento sintomático, sendo, portanto consideradas marcadores de traço da esquizofrenia (MILLER et al., 2011).

O estresse e/ou a infecção ativam a resposta inflamatória resultando na produção de citocinas inflamatórias. Estas citocinas podem desencadear a ativação da via das quinureninas através da estimulação da enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO). Assim, o triptofano é

recrutado para via das quinureninas ao invés de ser metabolizado em serotonina, isso vai resultar na depleção de monoaminas, característica marcante da depressão. Uma vez que a via das quinureninas é desencadeada, o ácido quinurênico nos astrócitos e o ácido quinolínico na micróglia são sintetizados (JO et al., 2015). A hiperativação microglial, por sua vez, secreta mais citocinas pró-inflamatórias, como $TNF\alpha$, IL-1, IL1-6 e $IFN\gamma$ (MEYER; SCHWARZ; MÜLLER, 2011). O ácido quinolínico contribui para a ativação do receptor NMDA e inibe a recaptação de glutamato, resultando em glutamato extracelular excessivo, o que leva a peroxidação lipídica, excitotoxicidade, neurodegeneração e depressão. O ácido quinurênico, por sua vez, promove o bloqueio do receptor colinérgico $\alpha 7$ -nicotínico e reduz a liberação de glutamato e dopamina, contribuindo, portanto para a esquizofrenia (NAJJAR et al., 2013).

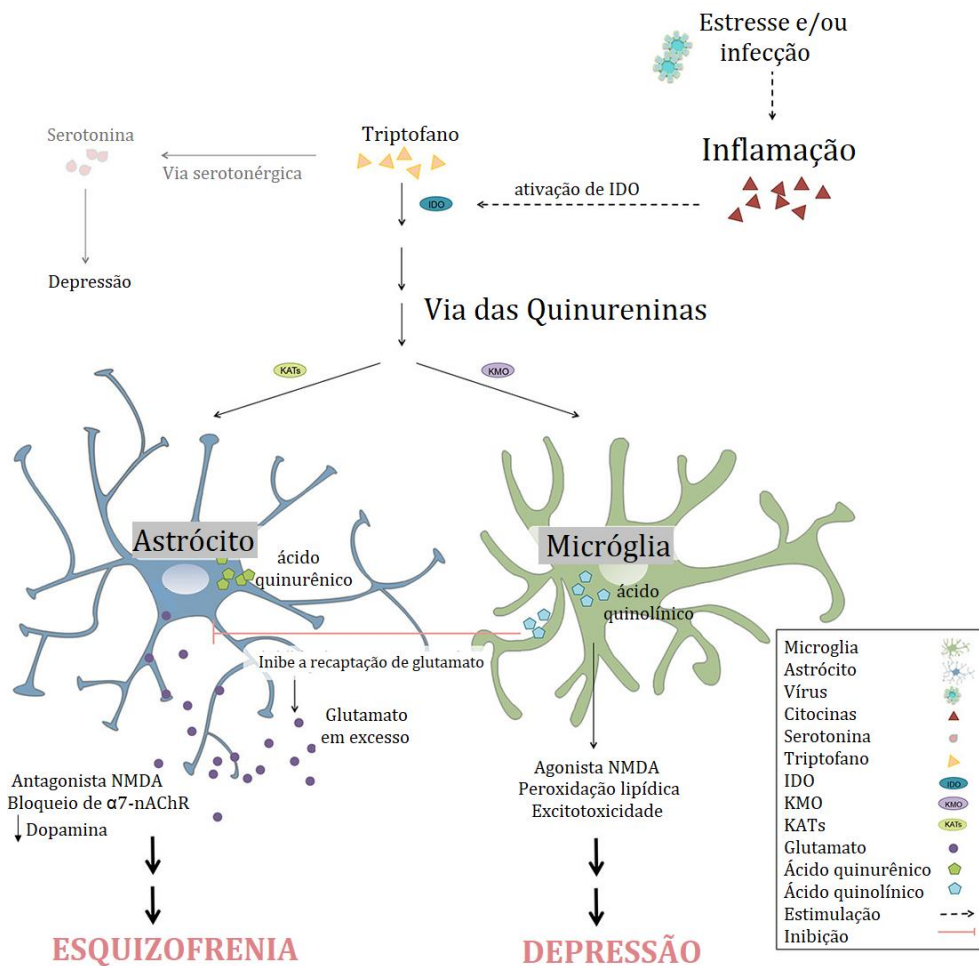


Fig.2: Ativação da via das quinureninas por estresse e/ou infecção. Modificado de Jo et al., 2015.

Além dos marcadores cerebrais, a presença de marcadores periféricos também suportam a hipótese neuroinflamatória da esquizofrenia, já que diversos estudos sugerem que as alterações imunológicas no sistema nervoso central (SNC) podem originar-se da ativação imunológica periférica (KIRCH et al., 1985, 1992). Desde que o aumento da permeabilidade

da barreira hematoencefálica foi descrito na esquizofrenia, é plausível que os mediadores pró e anti-inflamatórios possam entrar no cérebro a partir da periferia ou possam escapar dele para a circulação sistêmica em certos cenários neuropatológicos (URANOVA et al., 2010). Assim, as citocinas periféricas podem desregular a função cerebral através do eixo hipotálamo - hipófise - adrenal (HPA), promovendo mudanças de humor, comportamento e cognição (WATANABE; SOMEYA; NAWA, 2010).

Contudo, a utilidade dos marcadores imunológicos para o diagnóstico e prognóstico da esquizofrenia ainda não foi estabelecida (TOMASIK et al., 2016). Isto porque o sistema imunológico é dinâmico e sensível às mudanças, e, além disso, existem fatores como: predisposição genética, fatores de risco ambiental, fases da doença e efeitos colaterais da medicação antipsicótica que interferem nessa questão (TOMASIK et al., 2016).

Até o momento, o exato mecanismo pelo qual mudanças imunes conduzem à esquizofrenia permanece incerto (KELLER et al., 2013). Uma hipótese descreve que células microgliais ativadas no SNC liberam citocinas pró-inflamatórias que levam à alterações neurais (neurogênese e degradação) que contribuem para a patofisiologia da esquizofrenia (MONJI; KATO; KANBA, 2009). Outra teoria postula que polimorfismos em genes que suportam a função imunológica influenciam o sistema microvascular do cérebro em relação a estímulos ambientais ou pré-natais (ANDERSON; MAES, 2013; HÄNNINEN et al., 2007; HANSON; GOTTESMAN, 2005). Por último, foi proposto um desequilíbrio na resposta imune celular de Th1 e Th2 com uma resposta dominante para Th2 em pessoas com esquizofrenia (SCHWARZ et al., 2001).

1.2.5. Hipótese neurodesenvolvimental

A hipótese neurodesenvolvimental da esquizofrenia vem ganhando destaque. Ela propõe que, embora a fase mais grave da doença geralmente ocorra no período da adolescência e início da fase adulta, suas raízes encontram-se nas fases precedentes do desenvolvimento do cérebro (MEYER; MACCABE, 2016).

Esta hipótese estabelece que os genes relevantes envolvidos no desenvolvimento do cérebro são suscetíveis às interações gene-ambiente, principalmente durante o segundo trimestre da gestação, o que leva à interrupção de trajetórias do desenvolvimento cerebral, à desorganização do sistema límbico e à desequilíbrios neuroquímicos, por exemplo, dopaminérgicos (WEINBERGER, 1995). Assim, diversos insultos que ocorrem durante as fases iniciais de neurodesenvolvimento podem prejudicar a maturação cerebral tardia pós-natal

através da ativação de circuitos neurais patológicos durante a adolescência ou idade adulta jovem, acarretando um aumento da vulnerabilidade à esquizofrenia (FATEMI; FOLSOM, 2009; NESTLER; HYMAN, 2010).

Estudos com autópsia e neuroimagem suportam essa hipótese (LIU et al., 2017; TRZESNIAK et al., 2011). Anomalias na citoarquitetura neuronal são observadas no cérebro de pacientes com esquizofrenia, como a ausência de proliferação glial, sugerindo que os danos durante o desenvolvimento do cérebro contribuem para a fisiopatologia deste transtorno particular (SCHNIEDER; DWORCK, 2011).

Dessa forma, nas últimas duas décadas, as pesquisas se direcionaram para a realização de modelos neurodesenvolvimentais de esquizofrenia, que visam identificar processos etiológicos em que o cérebro, após eventos desencadeantes específicos, se desenvolve em um "cérebro tipo esquizofrenia" ao longo do tempo (MEYER; FELDON, 2012a). Nesse sentido, o desafio imune neonatal, particularmente, gerou avanços substanciais, uma vez que pode imitar longitudinalmente vários aspectos comportamentais e neurobiológicos desse transtorno (MEYER et al., 2008).

1.2.6. Estresse oxidativo e esquizofrenia

Ultimamente, as pesquisas sobre marcadores de estresse oxidativo e inflamação na esquizofrenia e outras formas de doença mental crônica vêm crescendo exponencialmente. O número de estudos mencionando estresse oxidativo, oxidação, inflamação, ou inflamatórias aumentou rapidamente na última década para cerca de 300 artigos em 2015, comparados a aproximadamente 3 a 4 artigos por ano antes de 1990 (SAWA; SEDLAK, 2016).

As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) ocorrem quando há um desequilíbrio na produção de energia dos organismos eucariotos via mitocôndria, cujos processos incluem a fosforilação oxidativa/síntese de ATP, oxidação de ácidos graxos e aminoácidos e o Ciclo de Krebs. Esse desequilíbrio no metabolismo promove a geração de subprodutos tóxicos como superóxido (O_2^-) e radicais de hidroxila que são propensos a causar danos no DNA, enzimas, proteínas, entre outros componentes celulares (KOGA; SERRITELLA; SEDLAK, 2016).

O estresse oxidativo ocorre, portanto, quando há um desequilíbrio entre a manifestação sistêmica de EROs e a capacidade do organismo para eliminá-las (WATKINS; ANDREWS, 2016). Quando desreguladas, as enzimas capazes de eliminar as EROs, entre elas: catalase, superóxido dismutase (SOD), tioredoxina, e outras enzimas que utilizem a glutatona como co-fator, acabam favorecendo ao aumento de doenças em que o estresse oxidativo e a inflamação

ocorrem, incluindo as doenças neurodegenerativas (KOGA; SERRITELLA; SEDLAK, 2016). Isto ocorre porque o processo inflamatório e o estresse oxidativo estão intensamente interligados, já que para acabar com as doenças infecciosas o sistema imunológico produz quantidades letais de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (QUINN; AMMONS; DELEO, 2006). Além disso, moléculas oxidativas ativam muitos mediadores inflamatórios (STEULLET et al., 2016).

Existem múltiplas linhas de pesquisa evidenciando o aumento do estresse oxidativo em pessoas com esquizofrenia, seja através da mensuração de compostos oxidantes e antioxidantes (glutathiona, SOD, catalase), de moléculas relacionadas ao estresse oxidativo, de produtos da oxidação (malonaldeído, mensurado pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)) ou através de estudos pré-clínicos e clínicos com antipsicóticos e outras drogas (AL-ASMARI; KHAN, 2014; COUGHLIN et al., 2013; KOGA; SERRITELLA; SEDLAK, 2016).

Um dos fatores que suportam a implicação da desregulação do sistema redox na fisiopatologia da esquizofrenia são estudos relatando que na esquizofrenia ocorre uma diminuição de compostos antioxidantes e aumento de compostos oxidantes. Estudos *post-mortem* usando espectroscopia de ressonância no cérebro de esquizofrênicos mostrou uma diminuição de glutathiona no líquido cefalorraquidiano e no córtex pré-frontal (GAWRYLUK et al., 2011; YAO; LEONARD; REDDY, 2006). Polimorfismos genéticos da glutathiona, incluindo o gene de glutamato-cisteína ligase, também têm sido associados à esquizofrenia (TOSIC et al., 2006). Por outro lado, há um efeito benéfico de drogas precursoras da glutathiona como a N-Acetilcisteína (NAC) em pacientes esquizofrênicos (BERK et al., 2008a; CARMELI et al., 2012; LAVOIE et al., 2008).

A glutathiona é o principal antioxidante celular e é sintetizada e metabolizada através do ciclo gama-glutamil (Fig. 3) (MEISTER; ANDERSON, 1983). A reação de cisteína com glutamato catalisada pela enzima γ -glutamilcisteína ligase (GCL) forma o dipeptídeo γ -Glumilcisteína, o qual se combina com a glicina numa reação catalisada pela glutathiona sintetase (GS) para a geração do tripeptídeo tiol γ -Glutamato-cisteína-glicina, comumente conhecido como glutathiona ou GSH. Nota-se que GSH regula sua própria síntese através da inibição de GCL por *feedback* negativo, o que significa que, nenhum GSH adicional é sintetizado quando sua concentração de tecido é normal (SHUNGU, 2012).

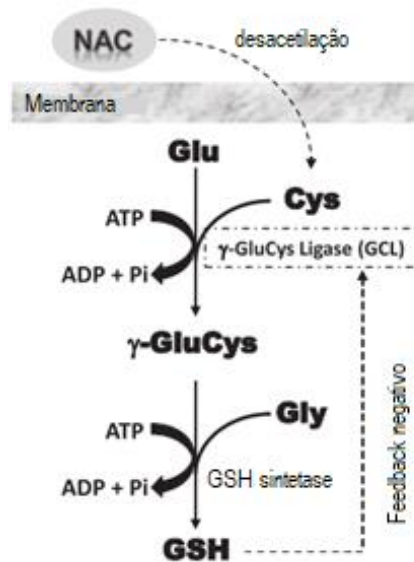


Fig. 3. Síntese de Glutathiona. Traduzido de Shungu (2012).

Nas células, a glutathiona pode encontrar-se em uma conformação monomérica, também chamada de glutathiona reduzida (GSH), na forma dimérica, também denominada de glutathiona oxidada e ainda sob a forma de glutathiona conjugada. A glutathiona encontrada predominantemente nos tecidos saudáveis é a forma reduzida (RODRIGUES NETO, 2010), capaz de remover metabólitos reativos através da sua conjugação com os mesmos (MEISTER, 1974).

No entanto, a glutathiona reduzida apresenta dificuldade em atravessar a maioria das membranas celulares, inclusive a barreira hematoencefálica, por isso, a suplementação direta com GSH não provoca aumento suficiente nos seus níveis corticais ou intracelulares (ZEEVALK; RAZMPOUR; BERNARD, 2008). Já a cisteína, em contrapartida, é capaz de atravessar tanto a barreira hematoencefálica quanto a maioria das membranas celulares (BERK et al., 2008a, 2008b).

1.3. Sinalizações celulares na esquizofrenia

Os mecanismos moleculares precisos subjacentes à esquizofrenia ainda não são totalmente conhecidos. Evidências crescentes mostram que a esquizofrenia é uma desordem poligênica resultante de uma interação entre fatores genéticos e ambientais (TSUANG, 2000). Há também evidências de que as vias de sinalização intracelulares desempenham um papel importante na patogênese da esquizofrenia (COYLE; DUMAN, 2003).

A via de sinalização da Akt está intimamente relacionada com o desenvolvimento e função do SNC (BEAULIEU; GAINETDINOV; CARON, 2007). Akt, também conhecida como proteína quinase B (PKB), é um serina/treonina proteína quinase descoberta em 1991

(BELLACOSA et al., 1991) que está envolvida em diversos processos celulares, como síntese proteica, metabolismo de glicose, proliferação celular, sobrevivência celular, migração de células e plasticidade neural (ZHENG et al., 2012).

Estudos com amostras cerebrais *post-mortem* de pacientes com esquizofrenia, com modelos animais e análises genéticas revelaram distúrbios nas vias da sinalização da Akt na esquizofrenia, levando à hipótese de que as alterações de sinalização de Akt podem ser importantes no patogênese da esquizofrenia (BEAULIEU; GAINETDINOV; CARON, 2007). Sabe-se que a baixa expressão de Akt tem sido relacionada com neurodegeneração, enquanto a ativação de Akt protege contra a morte neuronal (LEE et al., 2006). A regulação da fosforilação, ou seja, da ativação da Akt é realizada por fosfoinositídeo 3-quinase, conhecida como PI3K. Uma vez fosforilada a Akt, por sua vez, fosforila GSK3, causando a sua inibição (BEAULIEU et al., 2011). Dessa forma, em contraste com a Akt, GSK-3 é constitutivamente ativa, necessitando de fosforilação por quinases, como Akt para inativá-lo (FREYBERG; FERRANDO; JAVITCH, 2010).

Além da inativação de GSK-3 a Akt ativada fosforila diversos substratos que eventualmente promovem múltiplas respostas biológicas. Esses substratos incluem: promotor de morte associado a Bcl-2 (Bad), óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), mTOR, NF-kB e CREB (LOPICCOLO et al., 2008). Como mostra a Figura 4, as drogas antidepressivas ativam a via da Akt através da sua ação em receptores serotoninérgicos e por facilitar a atividade de BDNF. Os antipsicóticos atípicos são antagonistas dos receptores de serotonina (5HT_{2A}) e de dopamina (D₂). A ativação desses receptores de monoaminas provoca a ativação ou inibição de Akt, PKC (proteína quinase C) ou Erk (quinase regulada por sinal extracelular) através de diferentes vias de sinalização. Estas cascatas de sinalização regulam direta ou indiretamente a expressão gênica e a neuroplasticidade que têm impacto na regulação do humor (LI; FRYE; SHELTON, 2012).

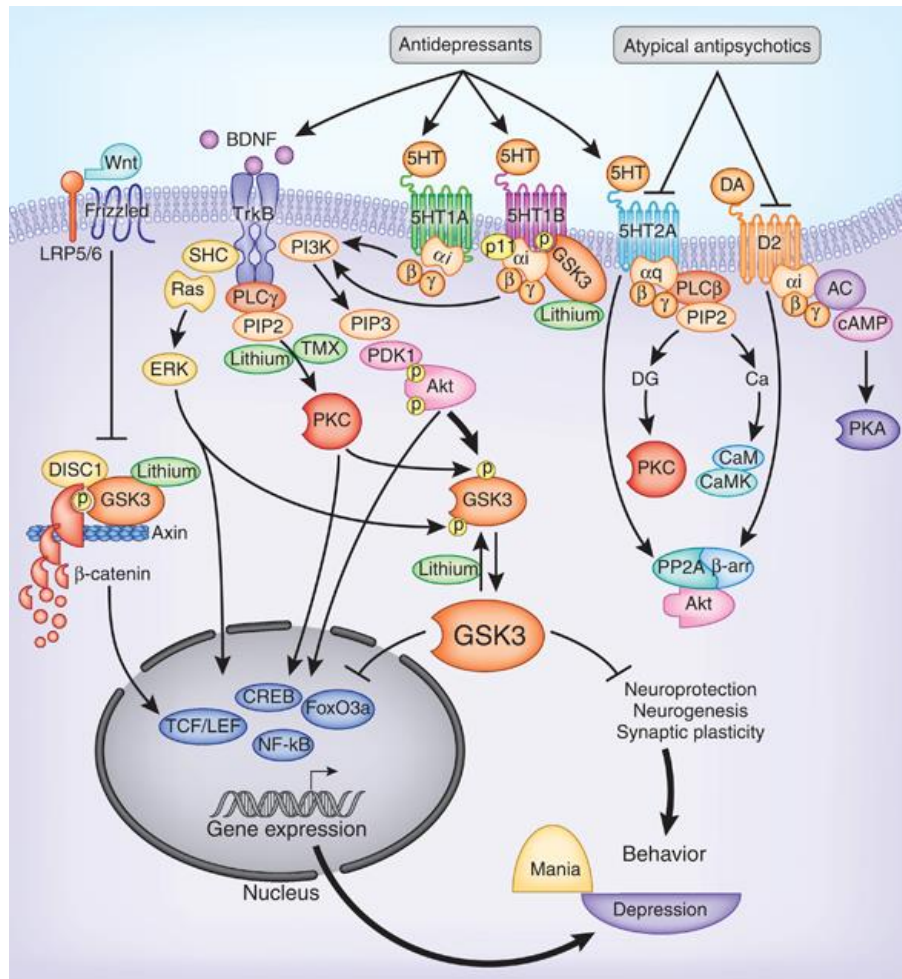


Fig. 4: Vias de sinalização da Akt (LI; FRYE; SHELTON, 2012).

Evidências acumuladas de estudos farmacológicos estão mudando o foco da fisiopatologia da esquizofrenia da dopamina para glutamato e GABA (SADOCK, 2016). Modelos animais baseados na administração aguda e crônica de antagonistas dos receptores NMDA têm mostrado uma diminuição na expressão de parvalbumina (PV), uma proteína de ligação ao cálcio expressa em uma subclasse de interneurônios gabaérgicos (ABDUL-MONIM; NEILL; REYNOLDS, 2007). Os interneurônios gabaérgicos PV-positivos são neurônios gabaérgicos que formam sinapses inibitórias com o corpo celular ou o segmento inicial do axônio de neurônios glutamatérgicos piramidais, constituindo uma rede celular capaz de sincronizar o estado excitatório de grande número de neurônios piramidais (BARTOS; VIDA; JONAS, 2007).

Na formação hipocampal, a PV está localizada em uma população de células que formam um grupo heterogêneo de neurônios não piramidais, particularmente uma população de interneurônios inibitórios com alta taxa de disparo e elevado metabolismo oxidativo (HEIZMANN, 1993). O papel da PV nessas células é manter as concentrações intracelulares de cálcio em equilíbrio, evitando assim a neurotoxicidade produzida pelo excesso de íons cálcio

(BAIMBRIDGE; CELIO; ROGERS, 1992). Desta forma, uma redução na expressão cerebral de PV poderia resultar em maior susceptibilidade a doenças neurológicas. De fato, níveis reduzidos de PV têm sido verificados em transtornos neuropsiquiátricos como a epilepsia, esquizofrenia e transtorno bipolar (PANTAZOPOULOS et al., 2007).

1.4. A importância do pródromo na esquizofrenia

Cada vez mais os estudos têm evidenciado que o curso da esquizofrenia nem sempre apresentará um prognóstico pobre e um dano no funcionamento social e ocupacional inevitável, pois o andamento deste distúrbio não é fixo, mas sim multável. A avaliação dos fatores de risco tem mostrado que muitos destes podem ser reversíveis, sendo a avaliação, portanto, considerada como parte do tratamento para limitar os prejuízos (MCGORRY; GOLDSTONE, 2011).

Desde então há um interesse específico na intervenção precoce, pois evidências sucessivas apontam que o prognóstico da doença pode melhorar significativamente quando diagnosticada e tratada previamente (YUNG et al., 2008). Em função disso, nos últimos 20 anos as pesquisas relacionadas à esquizofrenia focaram-se no período diretamente anterior o primeiro episódio psicótico (PEP), quando se manifestam as características psicóticas subclínicas (SOMMER et al., 2016), ou seja, no pródromo. Os principais sinais prodromáticos são: ansiedade, humor deprimido, isolamento social e alterações do sono, e ocorrem naqueles pacientes que desenvolverão quadros psicóticos (MOCHCOVITCH, 2015). Nesse período, os pacientes estão em estado mental de "risco ultraelevado" (do inglês, "*ultra high-risk*"), e apresentam sintomas psicóticos com intensidade, frequência ou duração insuficientes para receberem o diagnóstico de uma psicose (SOUZA et al., 2013).

De acordo com Yung et al., (2008) os critérios de identificação de pacientes com risco ultraelevado, ou seja, que estejam com risco imediato de sofrerem o PEP, são: sintomas psicóticos positivos subliminares/ atenuados; sintomas psicóticos autolimitados, curtos e com resolução espontânea e história familiar de transtorno psicótico em parentes de primeiro grau. Embora os sintomas negativos não estejam entre os critérios propostos, estudos com pacientes em risco ultraelevado observaram déficits substanciais em domínios cognitivos e pouca interação social em jovens com sintomas psicóticos atenuados (ADDINGTON; HEINSEN, 2012; BORA et al., 2014). Entretanto, o maior desafio ainda é a identificação do pródromo, por isso critérios específicos são necessários para excluir os casos falso-positivos e, assim, evitar tanto o estigma associado com o diagnóstico deste distúrbio quanto o tratamento desnecessário (MCGORRY; GOLDSTONE, 2011).

Um estudo com duração de um ano com 49 pacientes em risco ultraelevado para o desenvolvimento da esquizofrenia mostrou que a taxa de transição para o desenvolvimento de psicose completa foi de 40,8% (YUNG et al., 2003), seguido por 35% em um estudo de dois anos com 291 pacientes em pródromo (CANNON et al., 2008), e de 16% em um estudo com duração de 2 anos e 292 pacientes (YUNG et al., 2008). A razão para essa redução da transição do estágio do pródromo para psicose pode ser devido à detecção precoce e, portanto, uma intervenção mais efetiva ou ao grande número de pacientes em risco ultraelevado falso-positivos (YUNG et al., 2007).

Na realidade, o sucesso na identificação dos pacientes em risco ultraelevado tem facilitado o avanço nas pesquisas associadas a biologia do início da psicose, incluindo variáveis neurobiológicas, neurocognitivas e psicopatológicas. Além disso, tem promovido a implementação de intervenções específicas que sejam capazes de melhorar, atrasar ou prevenir o início da psicose nessa população, objetivando o tratamento do prejuízo sintomático e funcional (MCGORRY; GOLDSTONE, 2011).

1.5. Modelo animal de “dois desafios”

A exposição à infecção no período neonatal e o trauma psicológico ocorrido na puberdade configuram dois fatores de risco ambientais implicados na etiologia de distúrbios neuropsiquiátricos, como esquizofrenia (BROWN, 2011), autismo (ATLADOTTIR et al., 2012) e transtorno bipolar (PARBOOSING et al., 2013). Entretanto, ainda encontram-se ausentes as evidências epidemiológicas que mostrem o impacto cumulativos desses desafios ambientais na vulnerabilidade às desordens psiquiátricas crônicas (GIOVANOLI; WEBER; MEYER, 2014). Assim, modelos pré-clínicos têm mostrado as consequências de exposições combinadas de ativação imune pré-natal e estresse na puberdade, o chamado modelo de “dois-desafios” (GIOVANOLI et al., 2013).

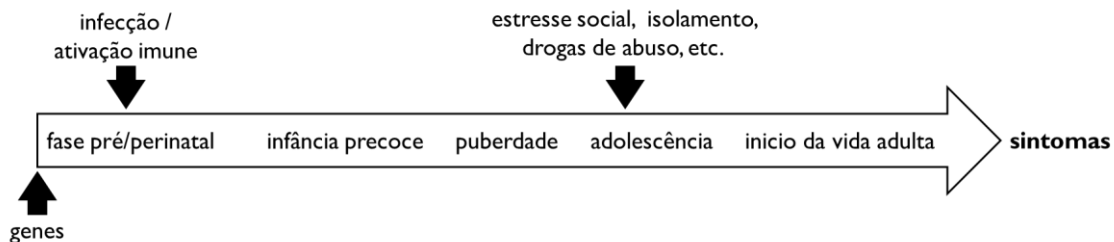


Figura 5: Modelo de “dois-desafios”. O primeiro desafio (composto de fatores genéticos e ambientais) torna o indivíduo mais suscetível ao segundo desafio, alterando o desenvolvimento do cérebro. O segundo desafio (fator ambiental) leva ao início real da desordem. Imagem obtida e modificada a partir de Jiang et al., 2013.

O modelo de dois desafios proposto por Keshavan e Hogarty (1999) trabalha a hipótese neurodesenvolvimental, na qual o prejuízo no desenvolvimento durante dois períodos críticos combinados (fase de desenvolvimento precoce cerebral e a adolescência) levam a sintomas associados com a esquizofrenia. De acordo com este modelo, o primeiro “desafio” seriam os insultos no desenvolvimento precoce, que podem levar à disfunção de redes neurais específicas que representam sinais e sintomas pré-mórbidos observados em indivíduos que mais tarde desenvolveriam esquizofrenia.

O segundo “desafio” ocorre na adolescência, quando a eliminação excessiva de sinapses e perda de plasticidade pode explicar o surgimento dos sintomas (KESHAVAN, 1999). A vulnerabilidade do período da adolescência ocorre devido aos processos neuromaturacionais que ocorrem nesta fase, como o aumento da atividade do eixo HPA, assim como um declínio normativo no volume de matéria cinzenta cortical, que desempenham um papel importante na expressão clínica da esquizofrenia (FEINBERG, 1982). Por isso, a exposição a eventos traumáticos durante a adolescência parece aumentar o risco de psicose (MAYNARD et al., 2001).

O modelo animal de dois desafios utiliza a injeção de padrões moleculares associados a patógenos ou PMAPs (do inglês “*Pathogen-associated molecular pattern*” ou “*PAMPs*”), como a partícula viral mimética *polyinosinic:polycytidylic acid* (Poly (I:C)), administrada durante o período inicial de desenvolvimento animal para mimetizar a infecção pré-natal (GIOVANOLI et al., 2013), ou o chamado primeiro desafio. O uso da poly(I:C), um análogo sintético do RNA viral de cadeia dupla, tem gerado um grande impacto sobre os pesquisadores que se concentram na base neurodegenerativa e neuroimunológica de distúrbios cerebrais humanos complexos, como a esquizofrenia (MEYER; FELDON, 2012b). Poly(I:C) leva a ativação de citocinas pró-inflamatórias através da ativação de receptores Toll-like 3, imitando a resposta de fase aguda de uma infecção viral (MACÊDO et al., 2012; WANG et al., 2004). Estudo prévio mostrou alterações comportamentais e pró-inflamatórias relacionadas aos sintomas do tipo esquizofrenia em ratos adultos submetidos ao desafio imune viral por poly(I:C) quando administrada do 5º ao 7º dia pós-natal (RIBEIRO et al., 2013).

Entre gêmeos monozigóticos a taxa de concordância da esquizofrenia é de aproximadamente 50%, o que indica que apesar de ambos compartilharem 100% do genoma, há uma chance de 50% de um irmão ser saudável e o outro ser afetado (CARDNO; GOTTESMAN, 2000). Isso também significa que deve haver outros fatores ambientais que aumentam significativamente a predisposição de anomalias comportamentais e doenças mentais (Fig. 6) (EHRENREICH, 2017). Um desses fatores de risco implicados nas doenças

mentais é a lesão cerebral traumática. Esta hipótese foi confirmada por um estudo dinamarquês com 113.906 indivíduos que tinham sofrido um trauma neurológico. De fato, lesão cerebral entre 11 e 15 anos de idade é um forte preditor para o subsequente desenvolvimento de esquizofrenia, depressão e transtorno bipolar (ORLOVSKA et al., 2014).

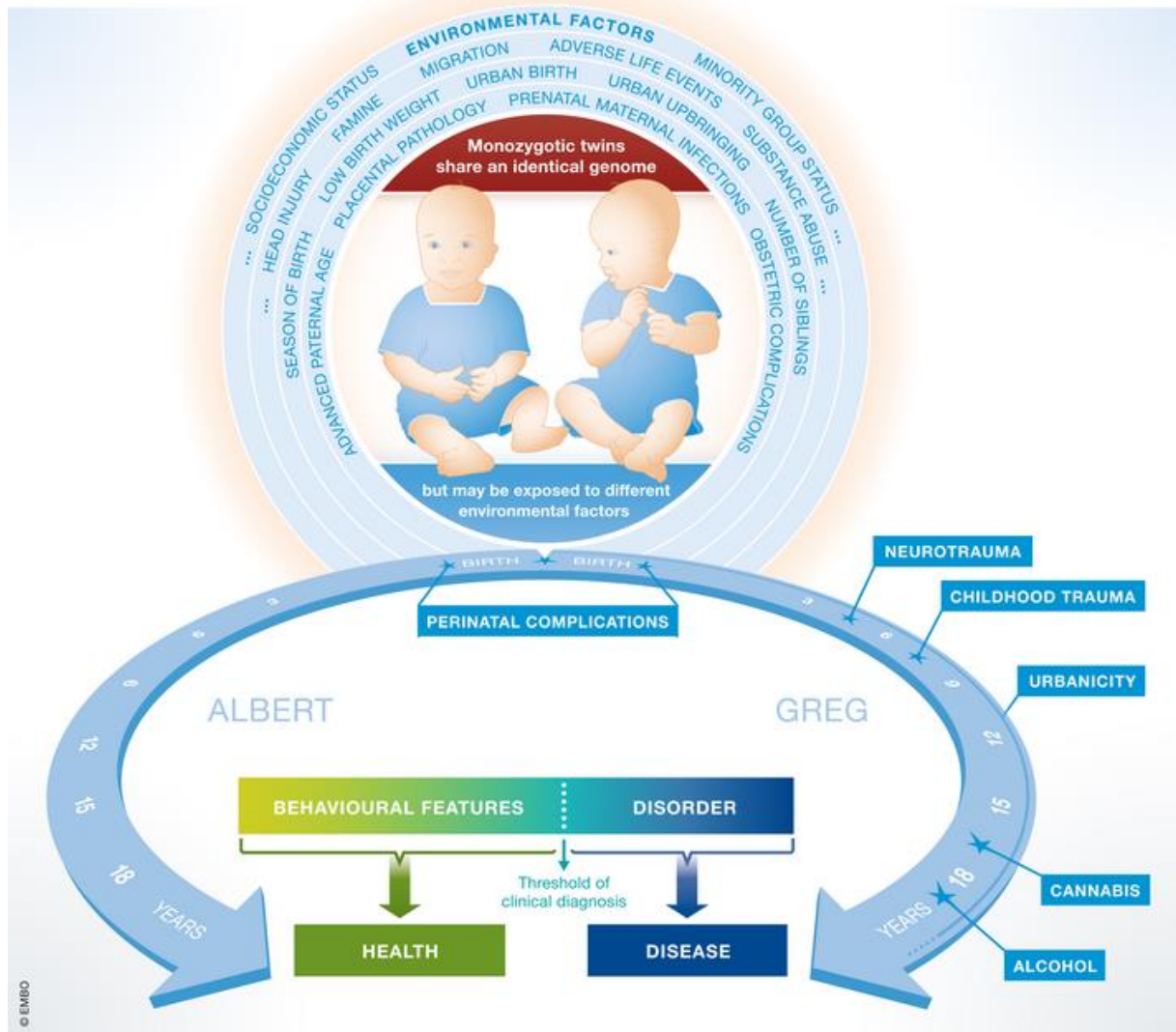


Fig. 6: Fatores de risco ambientais e desordens mentais (EHRENREICH, 2017)..

1.6. Tratamento farmacológico da esquizofrenia

Antes de 1950 não havia drogas para o tratamento da esquizofrenia. Desta forma, a terapia utilizada era feita por choque elétrico, terapia do coma insulínico e leucotomia pré-frontal (SWAYZE, 1995). A descoberta da clorpromazina no início dos anos 1950 e desenvolvimento da clozapina no final dos anos 1960 representaram dois grandes marcos no farmacoterapia da esquizofrenia (MIYAMOTO et al., 2008). Os antipsicóticos típicos, os quais

incluem fenotiazinas (iniciando com a clorpromazina), as butirofenonas (haloperidol), e as tioxantinas, são bastante efetivos na redução dos sintomas positivos (alucinações e delírios) em uma grande proporção de pacientes, (TANDON; NASRALLAH; KESHAVAN, 2010), embora 20 a 30% dos pacientes não mostrem melhora nos sintomas positivos quando utilizam antipsicóticos (STEEDS; CARHART-HARRIS; STONE, 2015). Em relação aos sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia, considerados os mais debilitantes já que dificultam a progressão ocupacional, esses medicamentos têm eficácia reduzida (CHAN, 2017). Um quinto a um terço dos pacientes diagnosticados com esquizofrenia não respondem aos antipsicóticos prescritos, e são considerados resistentes ao tratamento, intolerantes ao tratamento, ou apenas respondem parcialmente (MIYAMOTO et al., 2012). Para esses pacientes a clozapina tem sido a droga mais extensivamente estudada já que ela é o único antipsicótico aprovado pelo FDA para pacientes resistentes (CONLEY; KELLY, 2001). A clozapina não pode ser utilizada como um fármaco de primeira escolha devido a restrições legais que surgem com o alto risco de indução de agranulocitose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

O primeiro indício da ação celular das drogas antipsicóticas típicas surgiu da análise de seus efeitos colaterais. Estes fármacos têm maior afinidade pelos receptores dopaminérgicos D2. O bloqueio desses receptores no núcleo estriado cerebral determina o surgimento de sintomas parkinsonianos agudos, os chamados efeitos extrapiramidais que contribuem para o surgimento de distonias e discinesias tardias, sinais crônicos relacionados ao uso de antipsicóticos que comprometem a adesão do paciente ao tratamento.

Os antipsicóticos atípicos foram elaborados para serem mais eficazes no tratamento de pacientes refratários e na diminuição do comportamento suicida, bem como para evitar os efeitos motores secundários a curto e longo prazo. Assim, foram desenvolvidos mais medicamentos da classe dos atípicos, como risperidona, olanzapina, quetiapina, ziprazidona e amisulpride (LIEBERMAN, 1996; TANDON; NASRALLAH; KESHAVAN, 2010).

Resultados de estudos em grande escala, comparando a eficácia das drogas típicas contra drogas atípicas na esquizofrenia parecem indicar que as drogas de atípicas não são mais eficazes do que as típicas e não estão associadas com melhores resultados cognitivos ou sociais (KEEFE et al., 2007; LIEBERMAN, 2007). No entanto, alguns estudos relatam que os antipsicóticos de segunda geração favorecem a adesão do paciente ao tratamento quando comparados aos de primeira, uma vez que é menor a incidência de sintomas extrapiramidais (LAHON et al., 2012).

1.7. N-Acetilcisteína

A N-acetilcisteína (NAC) é uma droga comumente usada como agente mucolítico e antídoto de intoxicações por paracetamol (DEKHUIJZEN; VAN BEURDEN, 2006). Ela também é utilizada como protetor renal em nefropatia induzida por contraste (QUINTAVALLE et al., 2013), como agente preventivo para fibrilação atrial (LIU; XU; FAN, 2014) e como terapia adjuvante na infecção por HIV (DE ROSA et al., 2000). Devido a sua atividade como precursora da cisteína e por ser considerada segura e biodisponível, a NAC vem sendo cada vez mais investigada como uma droga potencialmente eficaz na elevação de GSH cortical (DEAN; GIORLANDO; BERK, 2011).

No entanto, o espectro das atividades químicas e bioquímicas da NAC é amplo e não está totalmente compreendido, pois evidências de pesquisas clínicas e médicas ainda são contraditórias (MINARINI et al., 2017). Por exemplo, se utilizada na ausência ou em excesso de estresse oxidativo a NAC pode se auto-oxidar e atuar como pró-oxidante (CHAN; RICHES; WHITE, 2001). Isso pode ocorrer devido ao processo de feedback negativo envolvido na síntese de GSH, onde sugere-se que o potencial benefício da NAC ocorra no tratamento de doenças onde déficits de GSH já são documentados, como a esquizofrenia e outras doenças neurodegenerativas, pois nesses casos é improvável que a síntese de GSH seja inibida por *feedback* negativo (SHUNGU, 2012). Outra possível explicação para esse efeito pró-oxidante da NAC é a sua fácil interação com ferro. Neal e colaboradores (1998) sugerem que os íons de ferro livre liberados na inflamação, em contato a NAC levam a formação de peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e radicais sulfidrilas. Segundo Childs e colaboradores (2001) isso ocorre porque o ferro é um metal de transição que tende a sequestrar os sítios ativos de antioxidantes hidrossolúveis desestabilizando-os quimicamente.

Na esquizofrenia, NAC tem sido usada como adjuvante do tratamento convencional, demonstrando efeito benéfico na redução dos sintomas negativos e dos sintomas depressivos no distúrbio bipolar (DEAN; GIORLANDO; BERK, 2011). Estudos sugerem que a NAC tem uma variedade de outros mecanismos que podem ser determinantes para o tratamento da esquizofrenia, como a ação sobre as citocinas inflamatórias. Há evidências de que a NAC foi capaz de reduzir os níveis de IL1- β e TNF- α em modelo animal de isquemia (CHEN et al., 2008; KHAN et al., 2004). Beloosesky (2012) evidenciou que o tratamento com NAC em ratas prenhas desafiadas com LPS preveniu o aumento de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6, na prole. Esse potencial da NAC em reduzir a neuroinflamação pode se dar através da inibição das células inflamatórias do cérebro, como a micróglia (MASU et al., 1993). As células microgliais são macrófagos cerebrais que podem ser ativados por citocinas produzindo, então,

mediadores inflamatórios, induzindo o estresse oxidativo e promovendo a neurotoxicidade (RAJKOWSKA; MIGUEL-HIDALGO, 2007).

Além da sua atuação na inflamação, NAC modula os neurotransmissores glutamatérgicos e dopaminérgicos (SAMUNI et al., 2013). Isso ocorre pela sua capacidade de atuar no trocador cistina/glutamato, também chamado de “trocador xCT” ou sistema Xc, localizado predominantemente nos astrócitos cerebrais e considerado um elemento chave no controle de glutamato extracelular (BERK et al., 2013). O trocador cistina/glutamato funciona transportando a cisteína extracelular, gerada a partir de NAC, para dentro da célula enquanto o glutamato intracelular é transportado para fora da célula. Este glutamato livre estimula os receptores glutamatérgicos metabotrópicos inibidores, mGluR2/3, em terminais nervosos pré-sinápticos, que regulam negativamente a liberação vesicular de glutamato, inibindo, assim, a excitotoxicidade (Fig. 7) (DEAN; GIORLANDO; BERK, 2011; MINARINI et al., 2017). A interação recíproca entre dopamina e glutamato no cérebro aumentou o interesse em modelos de distúrbios psiquiátricos. NAC influencia a liberação de dopamina em terminais pré-sinápticos através da regulação da neurotransmissão glutamatérgica (BAKER et al., 2002).

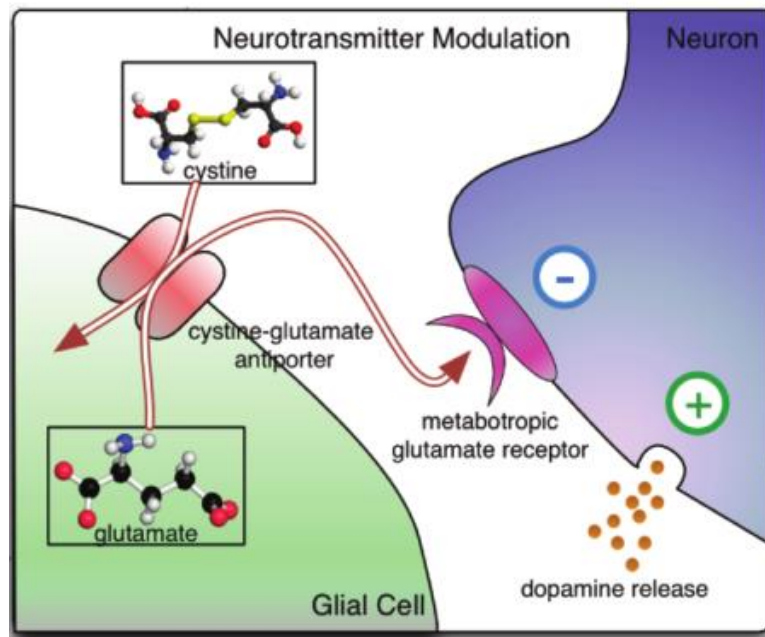


Fig. 7: Trocador cistina/glutamato (DEAN; GIORLANDO; BERK, 2011)

Estudos indicam que a NAC pode modular processos fisiopatológicos envolvidos em condições psiquiátricas, incluindo a neurogênese. A NAC é capaz de promover a neurogênese tanto diretamente, aumentando as proteínas neuroprotetoras, tais como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), quanto indiretamente, reduzindo a apoptose através do aumento de proteínas anti-apoptóticas, tais como Bcl-2 (BERK et al., 2013).

Berk e colaboradores (2008b) testaram a segurança e eficácia da NAC através de um estudo com 140 pacientes esquizofrênicos que foram submetidos a um tratamento com 2000mg/dia de NAC durante 24 semanas. O estudo mostrou moderados efeitos benéficos. No âmbito pré-clínico, estudos com a NAC mostraram a sua capacidade de reestabelecer o equilíbrio do sistema redox durante as fases iniciais de desenvolvimento, o que pode atenuar os efeitos adversos do estresse na maturação do cérebro de roedores (POWELL; SEJNOWSKI; BEHRENS, 2012), além de restaurar fenótipos de déficit cognitivo ou social induzidos pelo isolamento social precoce (JIANG; COWELL; NAKAZAWA, 2013), ou impedir o desenvolvimento destes fenótipos induzidos por lesão hipocampal neonatal (CABUNGAL et al., 2014).

1.8. Influência do gênero na esquizofrenia

Ultimamente, quando se trata de início do surto psicótico, severidade dos sintomas e desfecho da esquizofrenia, tem-se mencionado a diferença de gênero sob a hipótese de que os hormônios sexuais também exercem um papel na etiologia e tratamento da esquizofrenia (GOGOS et al., 2015).

A observação inicial sobre as diferenças de sexo na esquizofrenia foi que a primeira hospitalização ocorre em uma idade mais jovem em homens em comparação com as mulheres (HÄFNER et al., 1991b). Assim, o início do surto psicótico ocorre entre 18 e 24 anos nos homens, enquanto que nas mulheres ocorre cerca de 4 anos mais tarde (ERANTI et al., 2013). Entretanto, apenas mulheres com esquizofrenia sofrem um segundo pico de surto, geralmente aos 45 a 50 anos de idade (HÄFNER et al., 1993), e o curso da doença nas mulheres é menos severo quando comparado com os homens (OCHOA et al., 2012). Outras diferenças de sexo já relatadas são que as mulheres apresentam menos sintomas graves do tipo negativos, porém mais sintomas dos tipos positivos e afetivos, além de terem uma resposta mais favorável ao tratamento com antipsicótico (BEGEMANN et al., 2012).

A hipótese estipulada para as diferenças de gênero citadas é de que os hormônios esteroides gonadais são capazes de desempenhar um papel protetor nas mulheres contra o desenvolvimento da esquizofrenia (COHEN et al., 1999). Dessa forma, os picos de surto esquizofrênico que ocorrem na mulher pouco depois da puberdade e depois da transição da menopausa podem ser definidos por níveis de estrogênio flutuantes, especificamente estradiol, que é o hormônio primário do sexo feminino (SEARLES; MAKAREWICZ; DUMAS, 2017). O estrógeno exerce seus efeitos através de duas classes de receptores distintas: receptores

nucleares α e β , e receptores acoplados a proteína G, sendo o GPR30 o principal desta classe (KASTENBERGER; LUTSCH; SCHWARZER, 2012). Também chamado de GPER1, o receptor acoplado à proteína G sensível ao estrógeno é expresso em múltiplas regiões do SNC dos ratos, incluindo córtex pré-frontal (CPF), hipocampo e substância negra (BRAILOIU et al., 2007; MARUYAMA et al., 1998).

Entretanto sua localização celular tem sido controversa, pois estudos sugerem que ele está expresso na membrana plasmática, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (EVANS et al., 2016). No entanto, o GPR30 também é encontrado na membrana plasmática das células do hipocampo e hipotálamo, indicando que a sua ligação pode ter efeitos diretos sobre a transmissão neuronal nestas regiões cerebrais (WATERS et al., 2015).

Os efeitos da ativação da via de GPR30 não são totalmente elucidados, mas evidências sugerem que a modulação positiva de adenilato ciclase e conseqüentemente AMPc é mediado pela estimulação da proteína G α s (EVANS et al., 2016). Por sua vez, a estimulação da proteína Gi/o produz a liberação da subunidade G $\beta\gamma$ que ativa tanto a ERK1/2 como o mTOR, ambos através de uma complexa via que envolve a trans-ativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e a ativação da via PI3K/Akt (Fig. 8) (FILARDO; THOMAS, 2005).

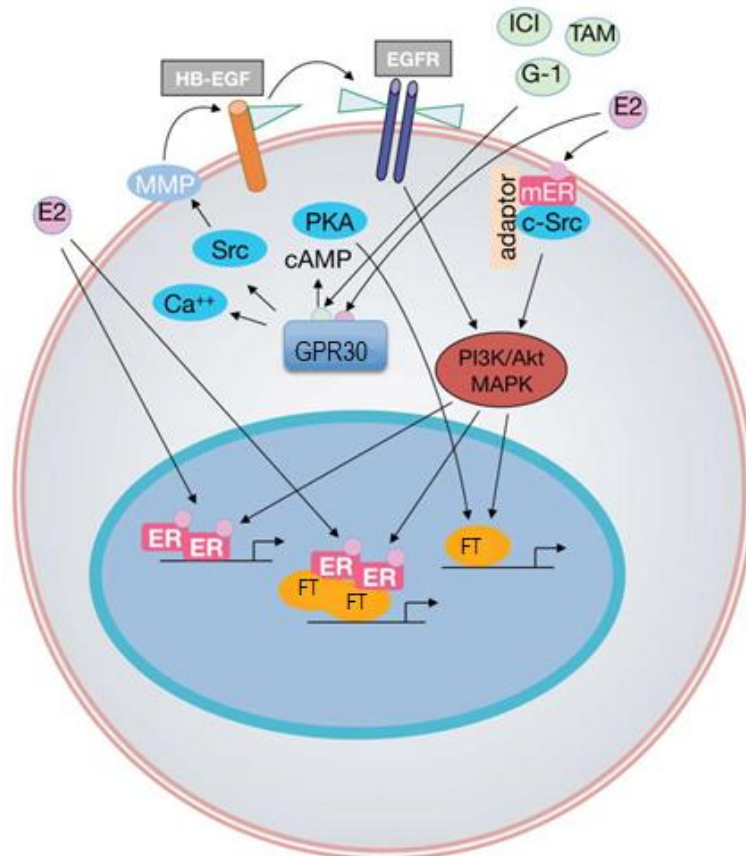


Fig. 8: Vias de sinalização ativadas pelo GPR30 e por receptores clássicos de estrógenos. Estrógeno endógeno são ativadores não selecionados dos três receptores de estrogênio conhecidos, ER α , ER β e GPR30. O estrógeno (E2) ativa os receptores de estrógeno nucleares (ER) que modulam a função de outras classes de fatores da transcrição

(FT) através das interações da proteína-proteína. Estrógeno, tamoxifeno, G-1 e compostos relacionados são permeáveis e conseguem alcançar os receptores de estrógenos localizados intracelularmente. A estimulação de GPR30 ativa proteínas G, que desencadeiam múltiplos efeitos, resultando na produção de AMP cíclico (cAMP), mobilização de cálcio e ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs) leva à liberação de HB-EGF que pode transativar receptores de fator de crescimento epidermal (EGFRs). A ativação de EGFR provoca múltiplos eventos incluindo ativação de MAPKs e PI3K/Akt, o que resulta na expressão de fatores de transcrição. Figura traduzida de Prossnitz and Barton, 2011.

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Para transtornos crônicos e incapacitantes como a esquizofrenia, a prevenção é particularmente importante (MORGAN et al., 2014). Isto porque há um grande desafio com a não adesão ao tratamento e com o risco relacionado ao dano iatrogênico dos antipsicóticos (SCOTT, 2016). Além disso, pacientes que se encontram no estágio prodrômico apresentam sintomas psicóticos por uma média de até 2 anos antes do início do tratamento (SARPAL et al., 2017). Essa longa duração da psicose não tratada está associada a mudanças cerebrais estruturais, a déficits cognitivos que irão ocorrer no primeiro episódio de psicose e a um pior prognóstico da doença (BORA et al., 2017).

Assim, acumulam-se provas sugerindo que a intervenção psicossocial e farmacológica precoce pode ser benéfica para atrasar ou prevenir o aparecimento de psicose (FUSAR-POLI et al., 2012). No entanto, atualmente, não existe um tratamento estabelecido para os sujeitos em estado mental de "risco ultraelevado" para a psicose. Particularmente, o uso de antipsicóticos para a prevenção da psicose é controverso e os riscos e benefícios potenciais associados ao seu uso no pródromo permanecem incertos (MIYAKE et al., 2016).

Tendo em vista a falta de tratamentos eficazes e seguros preconizados para a fase prodrômica da esquizofrenia, potenciais agentes neuroprotetores têm sido testados. A NAC tem se mostrado uma estratégia segura e eficaz para a esquizofrenia crônica (BERK et al., 2008a; BULUT et al., 2009; LAVOIE et al., 2008). O uso da NAC na psiquiatria fornece tanto uma oportunidade de uma nova terapia preventiva como uma possível chave para elucidar marcadores da patofisiologia desta desordem (BERK et al., 2013). No entanto, não se sabe ao certo através de quais mecanismos a NAC está exercendo seus efeitos (DEAN et al., 2011).

Uma das razões para o baixo surgimento de potenciais novos antipsicóticos na clínica é o poder preditivo não confiável dos modelos animais da esquizofrenia. A capacidade de realizar investigações comportamentais, eletrofisiológicas e neuroquímicas na ausência de intervenções cirúrgicas ou de drogas que confundam, configura uma das principais vantagens do modelo neurodesenvolvimental sobre os modelos farmacológicos ou de lesão da esquizofrenia (JONES et al., 2011).

Assim, o modelo de “dois desafios”, considerado um modelo neurodesenvolvimental, foi utilizado nesse estudo, tendo em vista o mesmo ter validade de face (homologia sintomática), de constructo (o modelo é capaz de replicar a neurobiologia teórica e a patologia) e validade preditiva (o modelo é capaz de mostrar a resposta farmacológica esperada, ou a falta

dela, sob o tratamento com antipsicóticos conhecidos ou com potenciais novas terapias adjuvantes) (JONES et al., 2011).

Historicamente, o estudo da diferença de sexo no cérebro e no comportamento não tem sido considerado de grande importância para a neurociência (MCCARTHY; NUGENT; LENZ, 2017). Os mecanismos funcionais que configuram as diferenças sexuais aparentes na sintomatologia, idade de início e resposta ao tratamento permanecem incertos em estudos humanos (HILL, 2016). Por isso, faz-se necessário o estudo com modelos animais que forneçam embasamento para estas questões fundamentais sobre a fisiopatologia da esquizofrenia. Vale destacar que, até o momento, não há estudos abordando a influência sexual e o possível efeito neuroprotetor da NAC em modelo de esquizofrenia de “dois desafios” combinando o desafio imune neonatal com poly(I:C) e o estresse na puberdade.

Nesse contexto, pretende-se com este trabalho defender a tese de que a NAC, um composto com propriedades antioxidantes, é capaz de prevenir os sintomas comportamentais e neuroquímicos do tipo esquizofrenia em ratos que sofreram desafio imune neonatal induzido pela partícula viral poly(I:C) e passaram por eventos estressores durante a puberdade, evidenciando as possíveis influências do sexo no efeito deste fármaco. Esperamos, portanto, que nossos resultados contribuam para a compreensão das alterações neurobiológicas subjacentes à exposição de ocorrências e às diferenças de sexo na esquizofrenia, bem como contribua para a prevenção da esquizofrenia.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar a influência do sexo sobre alterações comportamentais e neuroquímicas e o efeito preventivo da administração da NAC durante a periadolescência de ratos submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por desafio imune neonatal por partícula vírus-símile combinado a estresse na adolescência.

3.2. Objetivos Específicos

Capítulo I:

- Avaliar a influência do sexo nos sintomas esquizofreniformes do tipo positivo, negativo e cognitivo de animais submetidos a estimulação imune neonatal do 5º ao 7º dia de vida ou a eventos estressores na fase peripuberal sozinhos ou combinados, ou seja, um ou dois desafios;
- Determinar alterações oxidativas nos animais submetidos aos modelos de um ou dois desafios.

Capítulo II:

- Estudar a influência do sexo nas alterações comportamentais e oxidativas de animais submetidos ao modelo de dois desafios e tratados com NAC na adolescência.

Capítulo III:

- Determinar as alterações na expressão de proteínas hipocampais intracelulares relacionadas a esquizofrenia: Akt-fosforilada/total, parvalbumina, GPR30, NR2B-fosforilado/total, $\alpha 7$ -nAChR em animais expostos ao modelo de dois desafios e submetidos ao tratamento preventivo com NAC.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Ratos Wistar machos e fêmeas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, foram mantidos em uma sala com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), com alimentos e água *ad libitum* e com ciclos claro/escuro de 12/12 horas. Com três meses de idade as fêmeas foram colocadas para acasalamento e aquelas que ficaram prenhas foram separadas em caixas individuais. As fêmeas eram acompanhadas diariamente até o dia do parto, que foi denominado dia pós-natal 0 (DPN0). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal (CEUA-UFC) sob número 01/15 e os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas internacionais de uso de animais em experimentação.

4.2. Drogas

Polyinosinic:polycytidylic (Poly(I:C)) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) foi diluído em salina para uma concentração de 2 mg/kg de peso e administrado em um volume de 0,1 mL/10g de peso. N-acetilcisteína (NAC) (Sigma-Aldrich, St Gallen, Suíça) foi diluída em água potável para as concentrações de 110 mg/kg e 220 mg/kg e fornecida através da via oral com agulha curva de gavagem para ratos em um volume de 0,1 mL/10g de peso.

4.3. Protocolo Experimental

Do 5º ao 7º dia pós-natal (DPN5-7) os neonatos receberam uma injeção por dia de salina via intraperitoneal (i.p) ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p), correspondendo ao primeiro “desafio”. A administração de poly(I:C) teve o intuito de provocar o desafio imune neonatal nestes animais para que, assim, pudéssemos verificar os sintomas esquizofreniformes negativos, cognitivos e positivos posteriormente.

No DPN21 os animais foram desmamados e separados por gênero e grupo de maneira que cada grupo contivesse um “n” de 10 a 15 animais oriundos de pelo menos seis proles diferentes. O modelo experimental contou com um total de 20 grupos (Tabela 2). Posteriormente, no período de DPN30-59, esses animais foram tratados com água potável, ou NAC 110 mg/kg ou NAC 220 mg/kg e submetidos ou não ao protocolo de estresse que correspondeu ao segundo “desafio” (Fig. 9). No 60º dia de vida (DPN60) os animais foram submetidos aos testes comportamentais e no DPN61 eles eram eutanasiados por decapitação. As seguintes áreas cerebrais foram dissecadas, pesadas e armazenadas em temperatura de -70°

C até o dia dos ensaios: corpo estriado (CE) e córtex pré-frontal (CPF) para avaliação das respostas oxidativas e hipocampo (HC) para avaliação dos marcadores neuroquímicos.

O DPN60 em ratos corresponde ao período da adolescência tardia em humanos e é considerado crítico para os indivíduos com alto risco de desencadear psicose aguda quando desafiados com eventos estressantes da vida (PRUESSNER et al., 2011). Tendo em vista que o tratamento com a NAC tem caráter preventivo, não foi testada nenhuma droga antipsicótica, já que estas atuam apenas quando o distúrbio já está manifestado, não tendo efetividade no pródromo.

<i>Sexo</i>	<i>Primeiro desafio (DPN5-7)</i>	<i>Tratamento (DPN30-59)</i>	<i>Segundo desafio (DPN40-48)</i>
<i>M e F</i>	Salina	Água	-
<i>M e F</i>	Salina	Água	Estresse
<i>M e F</i>	Salina	NAC110	-
<i>M e F</i>	Salina	NAC220	-
<i>M e F</i>	Poly(I:C)	Água	-
<i>M e F</i>	Poly(I:C)	Água	Estresse
<i>M e F</i>	Poly(I:C)	NAC110	-
<i>M e F</i>	Poly(I:C)	NAC220	-
<i>M e F</i>	Poly(I:C)	NAC110	Estresse
<i>M e F</i>	Poly(I:C)	NAC220	Estresse

Tabela 2: Divisão dos grupos experimentais. DPN: dia pós-natal, M: machos, F: fêmeas, NAC: N-acetilcisteína.

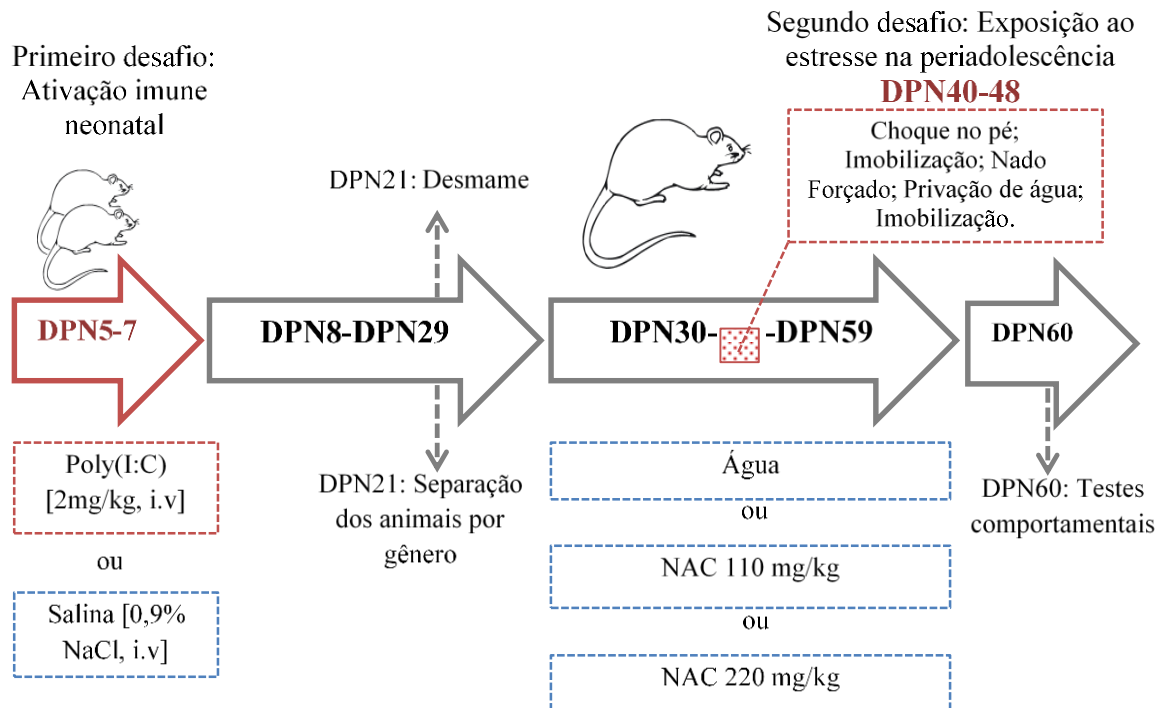


Fig. 9. Protocolo experimental. DPN: dia pós-natal. NAC: N-acetilcisteína (Fonte: Do próprio autor).

4.4. Exposição a estímulos estressores

O estresse no período da adolescência inicial foi induzido em determinados grupos através de um protocolo de estresse sub-crônico variável, que corresponde a cinco sessões de eventos estressores intercalados, em dias alternados, do 40º ao 48º dia de vida (segundo “desafio”) (GIOVANOLI et al., 2013). Esse período é compatível à idade de 12 a 18 anos em seres humanos (SEMPLE et al., 2013). Os cinco eventos estressores foram aplicados adicionalmente ao tratamento com água, NAC110 ou NAC220 na seguinte ordem: 1. Choque no pé (DPN40); 2. Imobilização (DPN42); 3. Nado forçado (DPN44); 4. Privação de água (DPN46); 5. Imobilização (DPN48).

DPN40: Choque elétrico no pé: Os ratos sofreram 3 estímulos de choques de intensidade de 3mA durante 1 segundo, separados por 3 minutos de descanso, no aparelho de Esquiva Passiva (INSIGHT equipamentos científicos – Brasil modelo EP- 104-MC). A sessão terminou com um período adicional de 3 minutos, no qual não houve estímulo de choque.

DPN42: Imobilização: Cada animal foi mantido em um tubo de plástico fosco (diâmetro: 6 cm, comprimento: 13 cm) por 45 min. Os tubos contensores tem furos (2 mm de diâmetro), de modo

a facilitar o fornecimento de oxigênio. Ao final do procedimento os animais foram imediatamente devolvidos para suas gaiolas.

DPN44: Nado forçado: Os animais foram submetidos a duas sessões de nado forçado, cada uma com duração de 5 minutos. Para isso, eles foram colocados individualmente em cilindros de acrílico (50 cm de altura, 18 cm de diâmetro) contendo 30 centímetros de profundidade de água a temperatura ambiente. As sessões foram separadas por um intervalo de 5 minutos. Terminadas as sessões, os ratos eram secos com uma toalha e imediatamente levados de volta para suas gaiolas.

DPN46: Privação de água: Os animais sofreram uma privação de água durante 16 horas. Para isso, no 46º dia os animais eram transferidos para gaiolas individuais e tiveram suas garrafas de água retiradas às 16:00 horas. As garrafas eram colocadas novamente e os animais voltavam para suas gaiolas originais às 8:00 horas do dia seguinte (47º dia). Os animais tiveram livre acesso à comida durante todo o período de privação de água.

DPN48: Imobilização: Os animais sofreram o mesmo estímulo estressor aplicado no dia 42.

4.5. Determinações Comportamentais

4.5.1. Interação Social

O aparato do teste consiste em uma caixa de acrílico 60 × 40 cm dividida em três câmaras (Fig.10). Os animais foram capazes de mover-se entre as câmaras através de uma pequena abertura (6 × 6 cm) em divisores. Nas câmaras das extremidades havia uma gaiola de ferro, uma com um animal desconhecido e do mesmo sexo (câmara social) e outra vazia (câmara oposta). Os animais testes foram colocados na câmara central, cada um teve um tempo de 5 min de exploração na caixa (RADYUSHKIN et al., 2009). Foi medido o tempo que o animal passou em cada uma das três câmaras e a interação social foi definida como: (o tempo gasto na câmara social) – (o tempo gasto na câmara oposta).

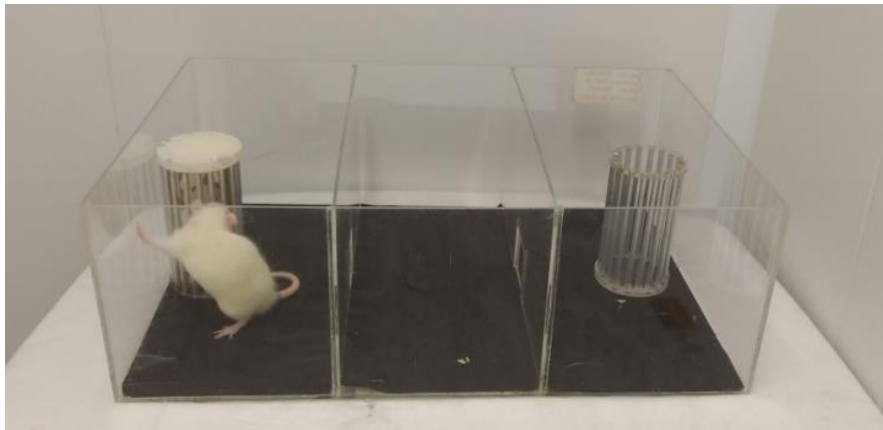
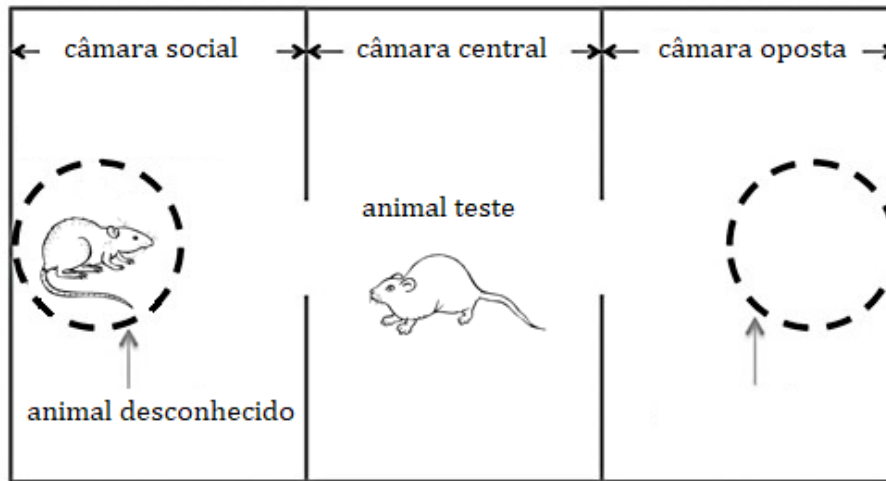


Fig 10. Protótipo e aparato utilizado para o teste de Interação Social (Fonte: Do próprio autor).

4.5.2. Inibição Pré-Pulso

Esse teste foi utilizado para determinar déficits no filtro sensório motor, um endofenótipo da esquizofrenia (TURETSKY et al., 2007). A 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., 2008).

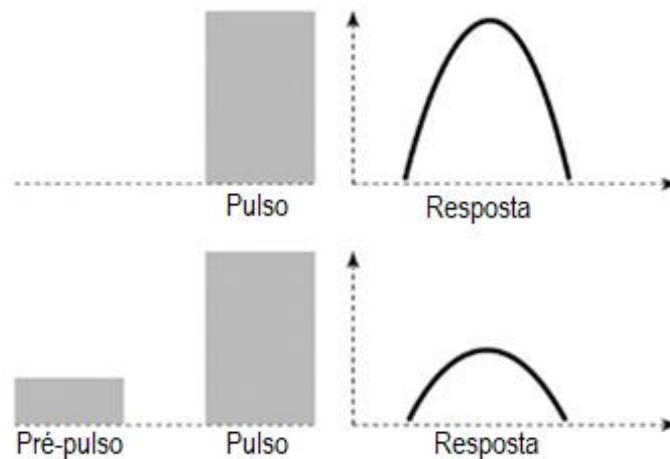


Fig. 11. Inibição pré-pulso (IPP) é a diminuição da resposta de sobressalto quando o estímulo de sobressalto eliciador, o pulso, é precedido por um estímulo sensorial mais fraco, o pré-pulso (KOHL et al., 2013).

A reação corporal dos ratos a um estímulo acústico, no presente trabalho, foi monitorada em uma câmara (INSIGHT equipamentos científicos – Brasil modelo EP-175) montada em uma caixa fechada ventilada.

Os animais foram colocados em um contensor ($16,0 \times 8,0 \times 8,0$ 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 miniaturas parafusos. 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 foram localizados dentro de uma câmara acústica ventilada ($64 \times 60 \times 40$ 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 começou ao colocar um animal no contensor para a aclimação, este procedimento consistiu 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 - 120 dB, 50 ms de duração), com um ensaio de inter-intervalo de 20s. O objetivo desta fase foi permitir a habituação da resposta de sobressalto do animal. Posteriormente, a modulação IPP de sobressalto foi testada no seguinte protocolo (KINKEAD et al., 2006). Consistiu de 50 ensaios pseudorandomizados dividido em cinco blocos diferentes, apresentados com um intervalo inter-estímulos de 20s: 10 apresentações de Pulso sozinho (P) (120dB, 40ms de duração); 10 apresentações de cada intensidade de pré-pulso (PP) (70, 75 e 80 dB, frequência 3000 Hz, 20 ms de duração) + intensidade de pulso (P) (com intervalo de 80ms entre pré-pulso e pulso); e ausência de estímulo, nesse bloco o animal só recebe o estímulo de ruído de fundo.

Foram utilizadas três intensidades de pré-pulso diferentes para que o teste tivesse maior veracidade, como se o mesmo fosse feito em triplicata. 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 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: $\% \text{ IPP} = 100 \times [P - (PP + P / P)]$. 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, conseqüentemente, não houve IPP (LEVIN et al., 2011). A amplitude da resposta do sobressalto (ARS) foi determinada como a média dos 10 testes de pulsos sozinho. Esperou-se que o grupo de animais submetidos ao desafio imune pós natal e aos eventos estressores (controle positivo) apresentasse déficits de IPP neste teste comportamental e que os animais tratados com a NAC não apresentassem alterações neste parâmetro.



Fig. 12. Aparelho de Inibição pré-pulso (Fonte: Do próprio autor).

4.5.3. Labirinto em Y

Este teste foi utilizado para avaliar a memória de trabalho espacial, ou seja, o comportamento cognitivo exploratório, através da percepção de uma performance de alternância espontânea (MAURICE; LOCKHART; PRIVAT, 1996). O labirinto consiste em 3 braços idênticos de 45,0 cm de comprimento, 35,0 cm de altura e 10, cm de largura cada convergindo a um ângulo igual de 120°. Cada rato foi colocado na extremidade de um braço e deixado para explorar o ambiente por 8 minutos. A sequência dos braços em que os animais entraram foi então anotada e as informações analisadas de forma a determinar o número de entradas no braço sem repetição. Uma alternância foi considerada correta se o animal visitou um novo braço e não retornou ao braço anteriormente visitado (exemplo de alternância correta: braços 1,2,3 ou 3,1,2;

exemplo de alternância incorreta: 1,2,1 ou 3,1,3). O número máximo de alternações foi o total de número de braços entrados menos dois ($n - 2$) e a percentagem das alternações foi calculada como a razão entre: (número de alternações corretas/ número máximo de alternações) x 100 (DALL'IGNA et al., 2007; YAMADA et al., 1996).



Fig. 13: Teste do Labirinto em Y (Fonte: Do próprio autor).

4.5.4. Campo Aberto

O aparato utilizado para avaliar a atividade locomotora e o comportamento tipo ansioso dos animais foi um campo aberto de 50 x 50 cm, com o chão e paredes pintadas com uma tinta preta fosca. Como mostrado na Fig. 14, o software Panlab SMART video tracking system 3.0 foi utilizado para gravar e avaliar o movimento dos ratos. Para isto, a câmera do software foi anexada a um suporte elevado acima do aparato, a uma distância que permitisse que todas as áreas dos campos abertos fossem visualizadas. O software permitia que dois animais fossem avaliados ao mesmo tempo em cada sessão do teste, ficando um animal em cada aparato. Seguindo as instruções do fabricante, nove zonas foram delimitadas virtualmente para que os seguintes parâmetros fossem observados: a distância total percorrida no campo pelo animal e o número de entradas na zona central. Assim, os animais foram colocados no centro do campo e foi permitido que eles explorassem livremente o cenário por 1 minuto (período de habituação) seguidos de mais 5 minutos (período do teste) (ARCHER, 1973).

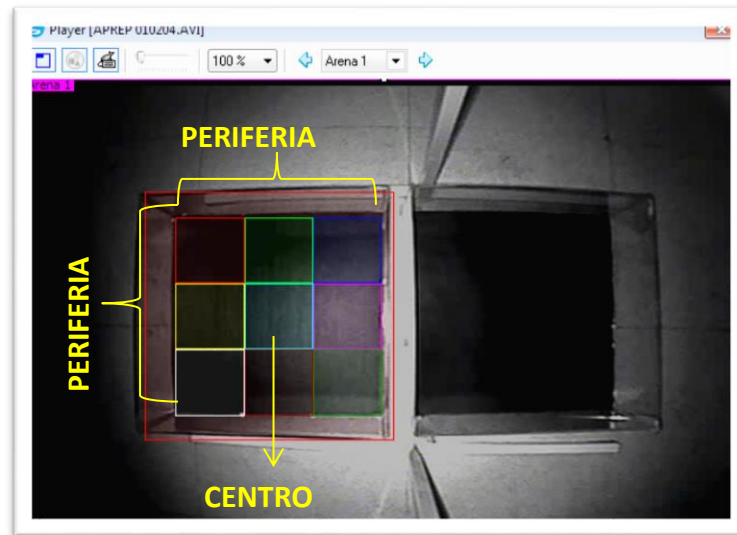


Fig 14: Avaliação da Atividade Locomotora e do Comportamento de Ansiedade através do software SMART (Fonte: Do próprio autor).

4.6. Determinações do Estresse Oxidativo

4.6.1. 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 foi recolhido e os níveis de GSH foram determinados (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Resumidamente, as amostras foram 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.

4.6.2. Nitrito

Para avaliar alterações na produção de óxido nítrico (NO), foram determinados níveis de nitrito em homogenatos dos cérebros dos animais imediatamente após a decapitação em todos os grupos. Após centrifugação ($800 \times g/10$ min), o sobrenadante do homogeneizado foi coletado e a produção não foi determinada com base na reação de Griess (GREEN; TANNENBAUM; GOLDMAN, 1981; RADENOVIC; SELAKOVIC, 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 NaNO_2 (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 absorbância foi medida em leitor de microplacas em 560 nm.

4.6.3. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi avaliada através da mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês: *thiobarbituric acid reactive substances -TBARS*) nos homogenatos como uma medida de produção de espécies reativas de oxigênio (DRAPER et al., 1993). As amostras foram homogenizadas com tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM pH 7,4, 63 μ L do homogenato foi misturado a 100 μ L de ácido perclórico 35%, sendo estas centrifugadas (7000 rpm/15 min), no qual 150 μ L do sobrenadante foram recuperados e misturado 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 foi determinada por absorbância a 535 nm e foi expressa como mmol tecido malonaldeído (MDA) / mg de proteína (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

4.7. Determinações biomoleculares e neuroquímicas

4.7.1. Expressão de Akt-fosforilada e Akt-total

A expressão de Akt-fosforilada e Akt-total foram medidas através de ensaio imunoenzimático (ELISA). Foi utilizado um kit comercial de Elisa (SigmaAldrich, EUA, Phospho-Akt (pSer473)/pan-Akt ELISA Kit) de acordo com as instruções do fabricante onde foram avaliadas ambas as expressões na mesma placa e em seguida determinou-se a proporção de Akt-fosforilada/Akttotal para cada amostra.

Inicialmente, as amostras foram homogeneizadas a 5x em tampão PBS, centrifugadas a 13000 RPM durante 10 minutos e tiveram seus sobrenadantes transferidos para novos microtubos. Aos sobrenadantes utilizados para dosagem de Akt-fosforilada foram adicionados o tampão de lisado celular com inibidor de protease em uma proporção de 60 μ l do sobrenadante para 180 μ l do tampão, para a dosagem de Akt-total a proporção foi de 100 μ l do sobrenadante para 180 μ l do tampão. As amostras foram então incubadas com agitação a 40C por 30 minutos. A cada poço da placa foi adicionado 100 μ L da amostra ou do padrão, a placa foi então coberta

e incubada overnight a 4°C com agitação orbital. Após essa etapa, a placa foi lavada quatro vezes com tampão de lavagem e em seguida foram adicionados 100 µl do preparado do Anticorpo-Anti-phospho-Akt ou 1x-Anti-pan-Akt (1:55) e realizada a incubação por 1 hora com agitação em temperatura ambiente. Em seguida repetiu-se as lavagens, adicionou-se 100 µl do anticorpo secundário Anti-Rabbit IgG HRP e incubou-se a placa por mais uma hora em temperatura ambiente com agitação. A placa foi novamente lavada quatro vezes com tampão de lavagem e foi adicionado aos poços 100 µl de Reagente Colorimétrico de TMB, a placa foi incubada por 30 min em temperatura ambiente, no escuro, com agitação. Em seguida adicionou-se 50 µl da solução de parada em cada poço e a leitura foi feita imediatamente em uma absorvância de 450nm.

4.7.2. Expressão proteica de GPR30, parvalbumina, α 7-nAChR e NR2B

A quantificação da expressão proteica hipocampal do GPR30, parvalbumina, α 7-nAChR, NR2B total e NR2B fosforilado foi avaliada através da técnica de Western Blotting. Seguiram-se sequencialmente as seguintes etapas: extração de proteínas, dosagem de proteínas e Western Blotting.

4.7.2.1.Extração de proteínas

O hipocampo foi macerado com auxílio de cadinho e pistilo em nitrogênio líquido. O produto desse processo foi inserido em microtubo contendo 200 µl de tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% triton-X-100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) e inibidor de protease (SigmaAldrich, EUA, 1µL de inibidor de protease: 100µL de RIPA). Em seguida, as amostras foram vortexadas por 30 segundos, a cada 10 min por 30 min, e centrifugadas (17 min, 4°C, 13000 rpm). O pellet foi desprezado e o sobrenadante (porção que contém as proteínas) foi transferido para um novo microtubo.

4.7.2.2. Método Bradford para dosagem de proteínas

A concentração de proteínas totais na amostra foi determinada pelo emprego de reagente de Bradford (Bio-Rad Protein Assay – Dye Reagent Concentrate - BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). A ligação à proteína ocorre quando a absorção máxima da solução ácida Coomassie Brilliant Blue G-250 muda de 465 para 595 nm. Foram pipetados 160 µL de amostra e 40 µL de solução de Bradford nas placas e a leitura foi feita por espectrofotômetro (595 nm), utilizando-se uma curva de calibração de albumina bovina sérica (BSA) de 0,2 a 1,0 mg / mL.

4.7.2.3. Western Blotting

Inicialmente, preparou-se 50 µg de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e β-mecaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10 segundos, aquecendo no banho maria (95°C, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4°C, 30s). Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 V nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 V para o restante da corrida, onde foi utilizado gel a 10% para todas as proteínas, com exceção do gel para determinação de NR2B que foi de 7%, e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Após a corrida, efetuou-se a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100 V por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Em seguida, realizou-se a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 10 min cada. Na etapa seguinte, as diferentes membranas foram incubadas, overnight a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos primários Anti-GPR30 (1:1000; Abcam, USA), anti-parvalbumina (1:1000; Abcam, USA), anti-phosphoNR2B subunidade (pTyr1472) (1:1000; Sigma, USA) Anti-Nicotinic Acetylcholine Receptor alpha 7 (1:1000; Abcam, USA), e rat anti-α-tubulin IgG primary antibody (1:4000; Sigma, USA) diluídos em 1% de BSA em TBS-T. Após esta etapa, realizaram-se três lavagens de 10 min cada com TBS-T. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários HRP-goat anti-rabbit IgG (1:1000; Invitrogen, USA) ou HRP-goat anti-mouse IgG (1:1000; Sigma, USA) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas 4 vezes, duração de 10 min cada, com TBS-T. Enfim, adicionou-se o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, Clarity western ECL blotting substrate) e as membranas foram agitadas por 5 min. As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ImageQuant 300 Imager (GE 75 Healthcare, EUA). A densidade das bandas foi mensurada por meio do software Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA).

4.8. Avaliação do peso dos hipocampos

Os hipocampos dos animais, após dissecados, foram acondicionados em microtubos, pesados e posteriormente avaliados quanto às diferenças de peso entre os grupos/sexos. Após a pesagem os mesmos foram mantidos em freezer a -70°C até o dia dos ensaios.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média utilizando o *software* SPSS (Versão 23 para Windows). No Capítulo I deste trabalho os resultados foram analisados por ANOVA de três vias seguida por análise de *post hoc* de comparações múltiplas utilizando o teste de Bonferroni para explorar as interações significativas e revelar as diferenças específicas entre os grupos. Os fatores utilizados para estas análises foram "sexo" (macho e fêmea), "tratamento neonatal" (salina e poly(I:C)) e "estresse na adolescência" (exposição ao estresse e não exposição ao estresse). No Capítulo II do trabalho, os resultados foram analisados por ANOVA de quatro vias, seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Além dos fatores utilizados para análise no Capítulo I, acrescentou-se o fator "droga" (salina, NAC110 e NAC220) na análise dos resultados do Capítulo II. A análise dos resultados do Capítulo III foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Para análise dos resultados do teste de IPP foi realizada uma média entre as IPPs das três intensidades de decibéis que cada animal foi exposto. O nível de significância foi definido em $P \leq 0.05$.

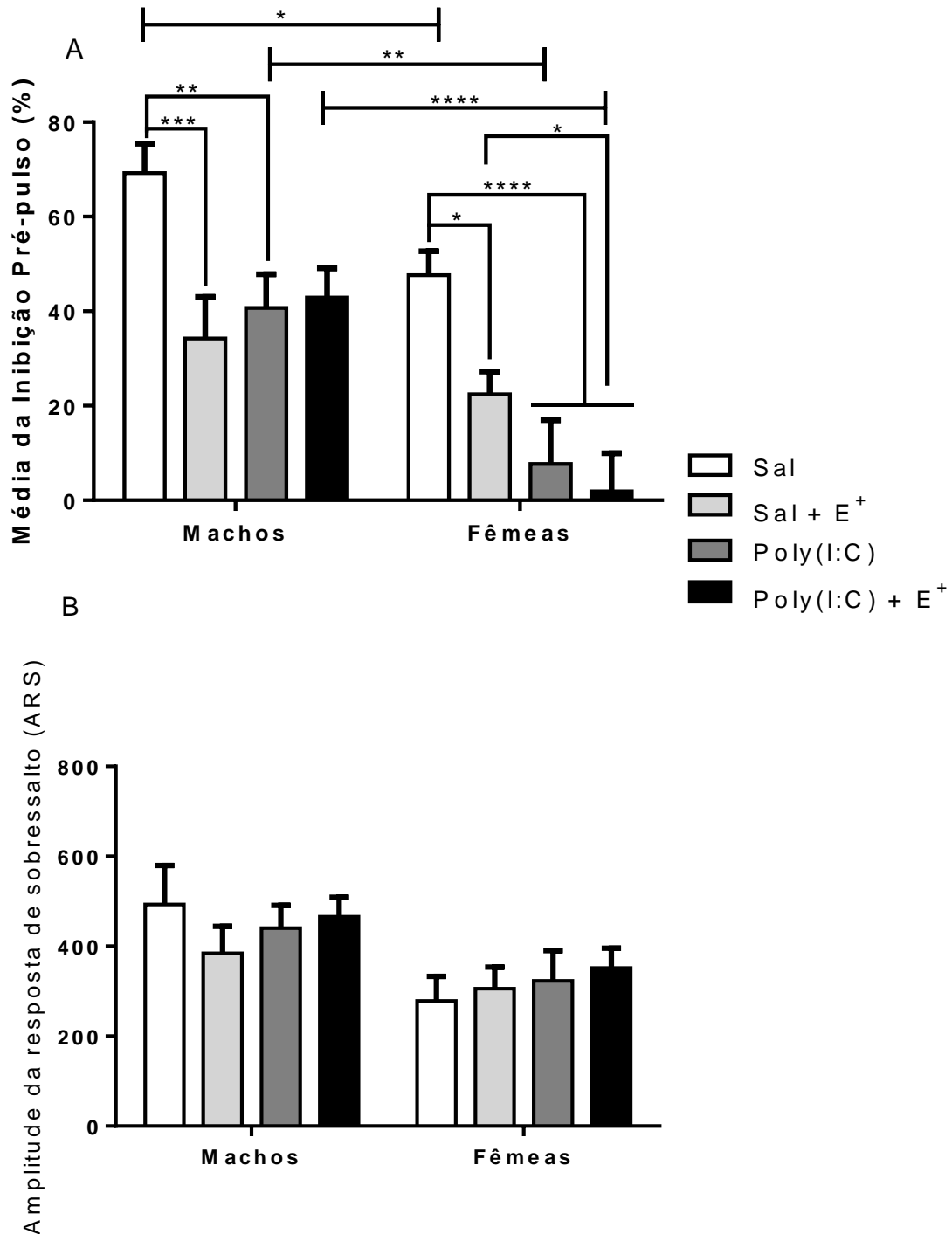
6. CAPÍTULO I

ESTUDO DE DIFERENÇAS DE SEXO E ALTERAÇÕES CEREBRAIS OXIDATIVAS NO MODELO DE ESQUIZOFRENIA DE DOIS DESAFIOS

6.1. Resultados das alterações comportamentais

O teste de IPP foi utilizado para mensurar a função sensório motor atencional, prejudicada na esquizofrenia (BRAFF; LIGHT, 2005). A análise de IPP (Fig. 15A) revelou uma significativa interação de duas vias entre “sexo” e “tratamento neonatal” [$F(1,41)=4.117$, $p=0.049$] “tratamento neonatal” e “estresse na adolescência” [$F(1,41)=8.020$, $P=0.007$] sem interação significativa entre os três fatores. Tanto machos quanto fêmeas, quando submetidos ao poly(I:C) (machos: $P=0.004$, fêmeas: $P<0.0001$) ou ao estresse (machos: $P=0.001$, fêmeas $P=0.016$) na adolescência, apresentaram déficits significativos de IPP quando comparados ao grupo salina. Apenas nas fêmeas foi observado que a exposição aos dois desafios causou significativo déficit de IPP quando comparados ao grupo controle ($P < 0.001$) e ao grupo submetido apenas ao estresse ($P=0.039$). Além disso, fêmeas expostas apenas a salina ($P=0.026$) ao poly(I:C) sozinho ($P=0.003$) ou combinado com estresse ($P<0.0001$) apresentaram diminuição significativa de IPP quando comparadas aos machos dos respectivos grupos de tratamento. A amplitude da resposta de sobressalto (ARS) não variou entre os grupos, como mostrado na figura 15B.

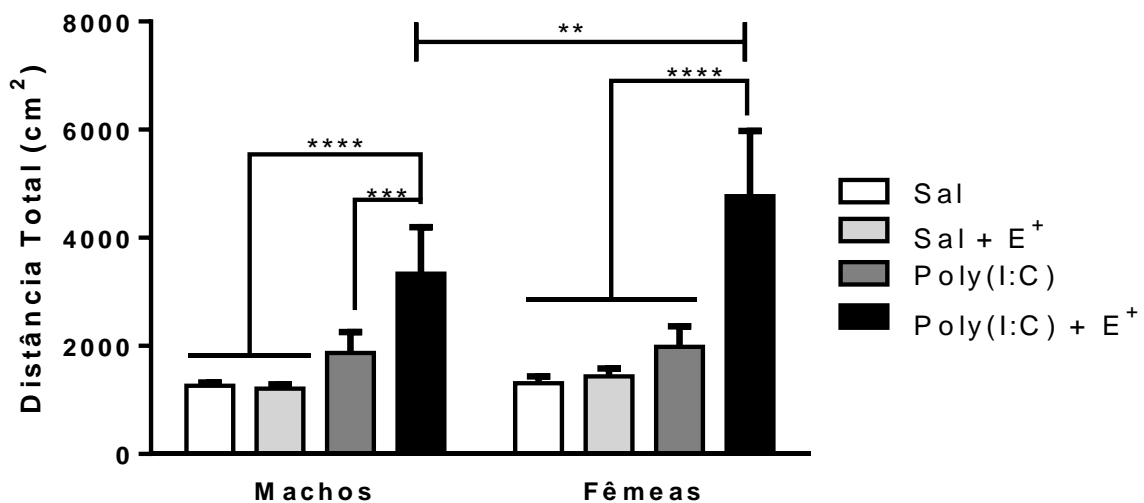
Fig. 15. Efeito do estresse, de poly(I:C) e de poly(I:C) + estresse na média da % de IPP (A) e na amplitude da resposta de sobressalto (ARS) (B) de ratos machos e fêmeas.



Os ratos eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. As barras representam a média \pm E.P.M (n=10-15 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de three-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

Na avaliação da distância total percorrida no campo aberto (Fig. 16) houve uma significativa interação entre “tratamento neonatal” e “estresse na adolescência” [$F(1,24)=32.136$, $P < 0.0001$] sem interação significativa entre os três fatores. Nesse teste, machos e fêmeas submetidos aos dois desafios apresentaram um significativo aumento na distância total percorrida quando comparados ao grupo salina, ao grupo salina+estresse ($P < 0.0001$) e ao grupo poly(I:C) (machos: $P=0.001$, fêmeas: $P < 0.0001$). Vale ressaltar que a hiperlocomoção de fêmeas expostas aos dois desafios foi 1,5 vezes maior quando comparados aos machos do grupo respectivo ($P=0.002$).

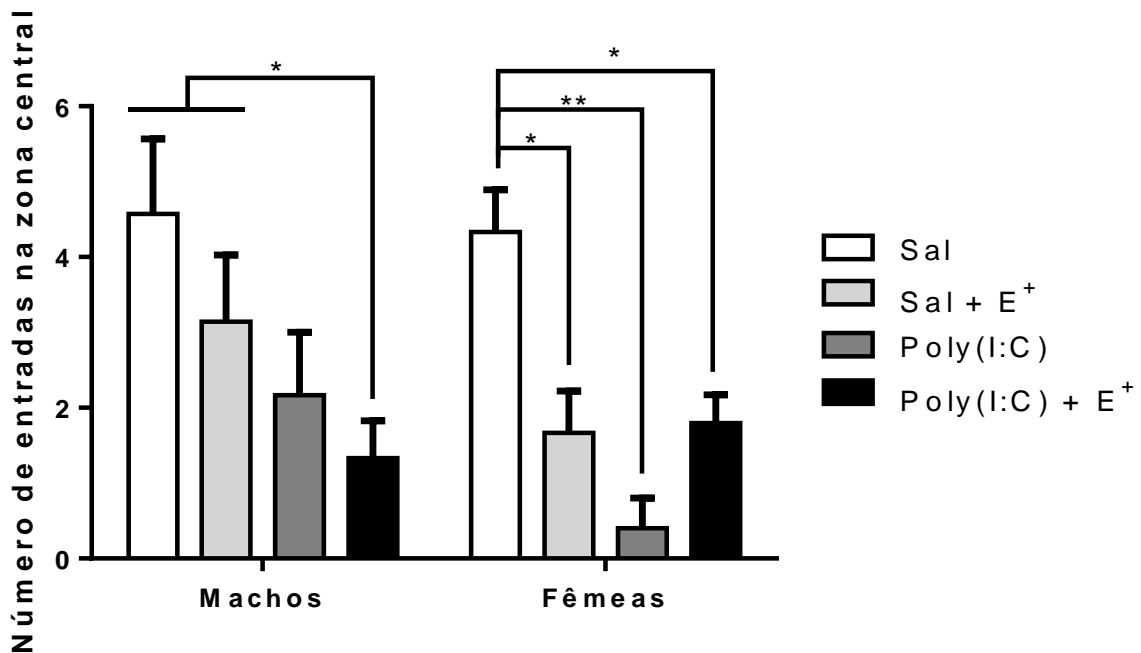
Fig. 16. Efeito do estresse, de poly(I:C) e de poly(I:C) + estresse na distância total percorrida no campo aberto por ratos machos e fêmeas.



Os ratos eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. As barras representam a média ± E.P.M (n=10-15 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de three-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

No teste do campo aberto também avaliamos o número de entradas na zona central (Fig. 17). Não foram verificadas interações entre os fatores estudados. Entretanto, observou-se uma redução no número de entradas na zona central nas fêmeas expostas ao poly(I:C) neonatal ($P=0.003$), ao estresse na adolescência ($P=0.039$) e aos dois insultos combinados ($P=0.044$), quando comparadas ao grupo controle. Já nos machos essa redução foi encontrada naqueles animais submetidos aos dois desafios quando comparados aos submetidos apenas ao estresse ($P=0.05$) ou ao controle ($P=0.04$).

Fig. 17. Efeito do estresse, de poly(I:C) e de poly(I:C) + estresse no número de entradas na zona central do campo aberto por ratos machos e fêmeas.

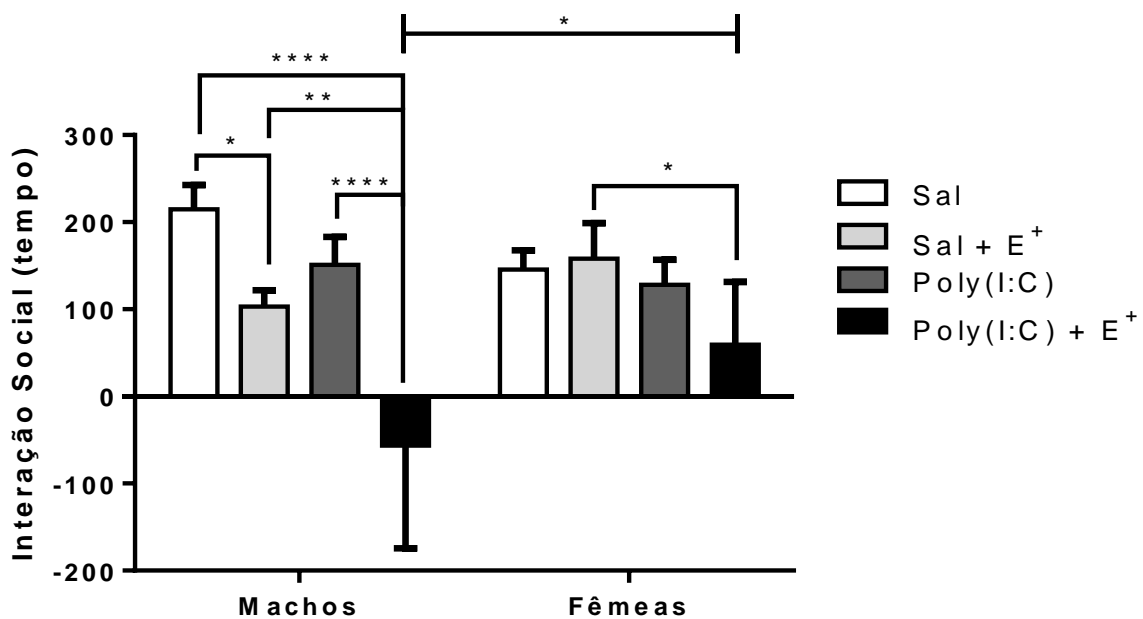


Os ratos eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. As barras representam a média \pm E.P.M (n=10-15 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de three-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

Em relação à preferência social houve uma interação significativa entre “sexo” e “estresse na adolescência” [$F(1,50)=8.326$, $P=0.006$]. Um déficit significativo na preferência social foi observado em machos expostos ao estresse na adolescência quando comparados ao grupo controle ($P=0.030$). A combinação de poly(I:C)+estresse potencializou esse déficit de maneira significativa quando comparado aos grupos controle ($P<0.0001$), sal+estresse ($P=0.002$) e poly(I:C) ($P<0.0001$).

Fêmeas submetidas aos dois desafios mostraram uma redução na preferência social quando comparadas ao grupo exposto apenas ao segundo desafio, ou seja, ao grupo sal+estresse ($P < 0.043$). A comparação entre machos e fêmeas indicou que machos do grupo poly(I:C)+estresse apresentaram um significativo prejuízo na interação social quando comparados a fêmeas do mesmo grupo ($P < 0.011$), como mostrado na Fig. 18.

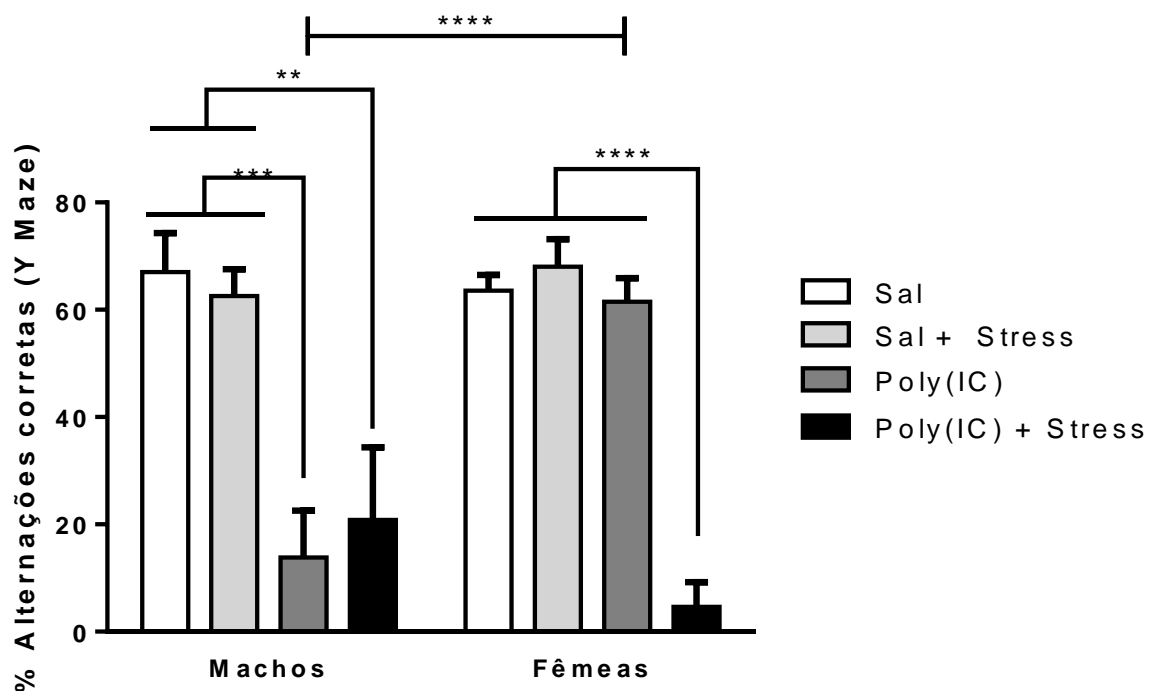
Fig. 18. Efeito do estresse, de poly(I:C) e de poly(I:C) + estresse no tempo de interação social por ratos machos e fêmeas.



Os ratos eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. As barras representam a média \pm E.P.M (n=10-15 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de three-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

Em relação a memória de trabalho foi observada uma interação significativa entre os três fatores avaliados: “sexo”, “tratamento neonatal” e “estresse na adolescência” [$F(1,47)=10.307, P=0.002$]. Nesse teste, a exposição apenas ao estresse não causou alteração comportamental em machos e fêmeas quando comparados ao grupo controle não estressado (salina). Quando administrada em machos, poly(I:C) promoveu uma diminuição da porcentagem de alterações corretas se comparados aos grupos salina e salina+estresse ($P < 0.0001$). Por outro lado, a combinação dos dois desafios reduziu a porcentagem de alterações corretas em animais machos e fêmeas quando comparados aos grupos controle e sal+estresse no caso dos machos ($P=0.0015$), e aos grupos controle, sal+estresse e poly(I:C) no caso das fêmeas ($P < 0.0001$). A comparação entre machos e fêmeas mostrou uma redução na memória de trabalho de machos submetidos apenas ao primeiro desafio (grupo poly(I:C)) quando comparados a fêmeas do mesmo grupo ($P < 0.0001$) (Fig.19).

Fig. 19. Efeito do estresse, de poly(I:C) e de poly(I:C) + estresse na porcentagem de alterações corretas no teste do Labirinto em Y pelos ratos machos e fêmeas.

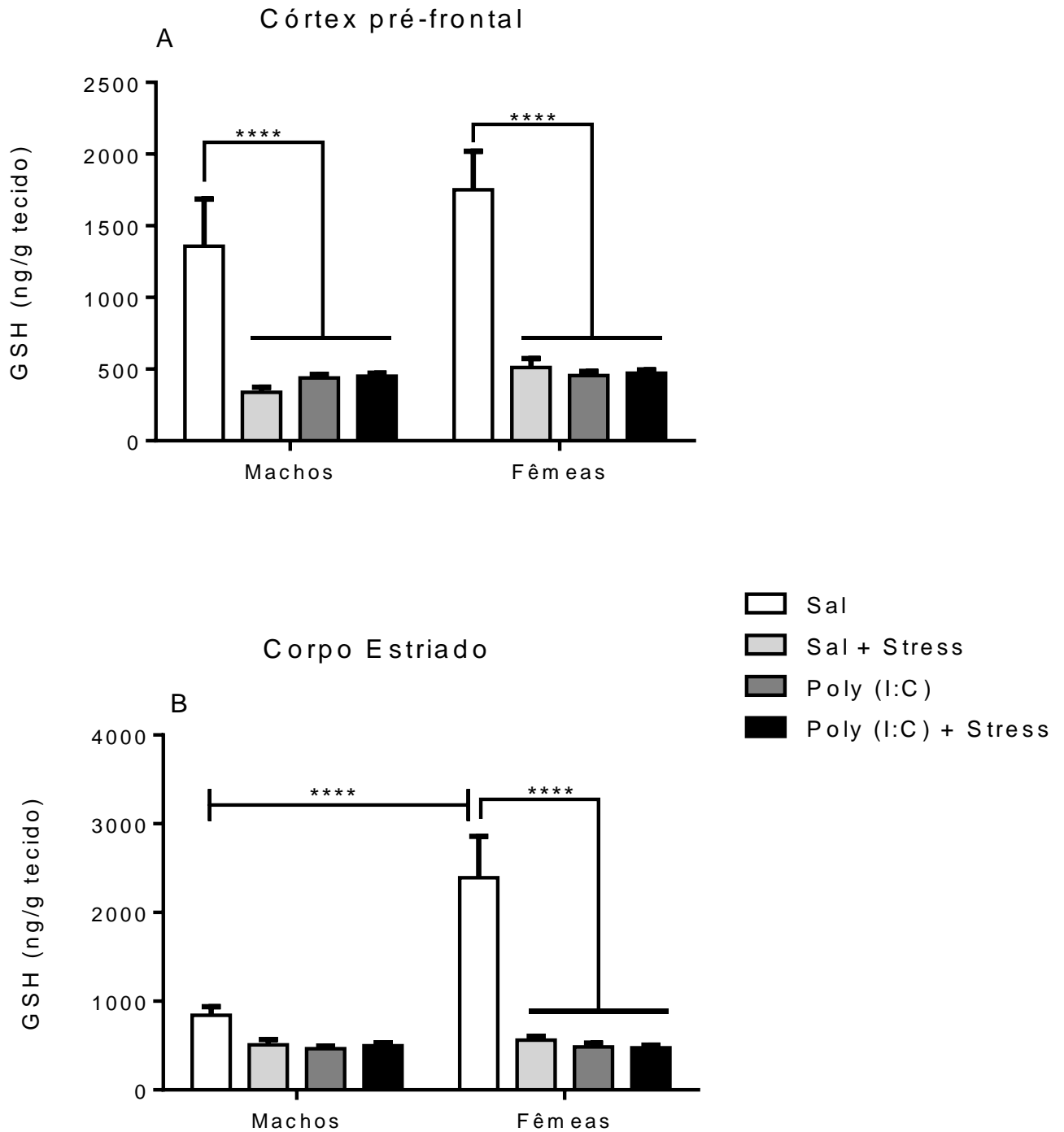


Os ratos eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E^+) ou não. As barras representam a média \pm E.P.M ($n=10-15$ animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de three-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E^+ : estresse.

6.2. Resultados das alterações oxidativas cerebrais

A análise dos níveis de GSH no CPF revelou uma interação significativa entre “estresse na adolescência” e “tratamento neonatal” [$F(1,30) = 39.647$, $P < 0.0001$]. Nesta área cerebral os níveis do antioxidante GSH foi aproximadamente três vezes menor em machos e fêmeas expostos ao estresse, poly(I:C) e poly(I:C)+estresse quando comparados ao grupo controle ($P < 0.0001$) (Fig. 20A). No CE observou-se uma interação significativa entre os três fatores: “sexo”, “tratamento neonatal” e “estresse na adolescência” [$F(1,30) = 12.742$, $P = 0.001$]. Fêmeas expostas ao estresse, ao poly(I:C) e ao poly(I:C)+estresse apresentaram níveis de GSH aproximadamente cinco vezes menor que fêmeas do grupo controle ($P < 0.0001$). Na comparação entre os sexos salienta-se que os níveis de GSH no CE de fêmeas do grupo controle foi quase três vezes maior do que seus homólogos machos ($P < 0.0001$) (Fig. 20B).

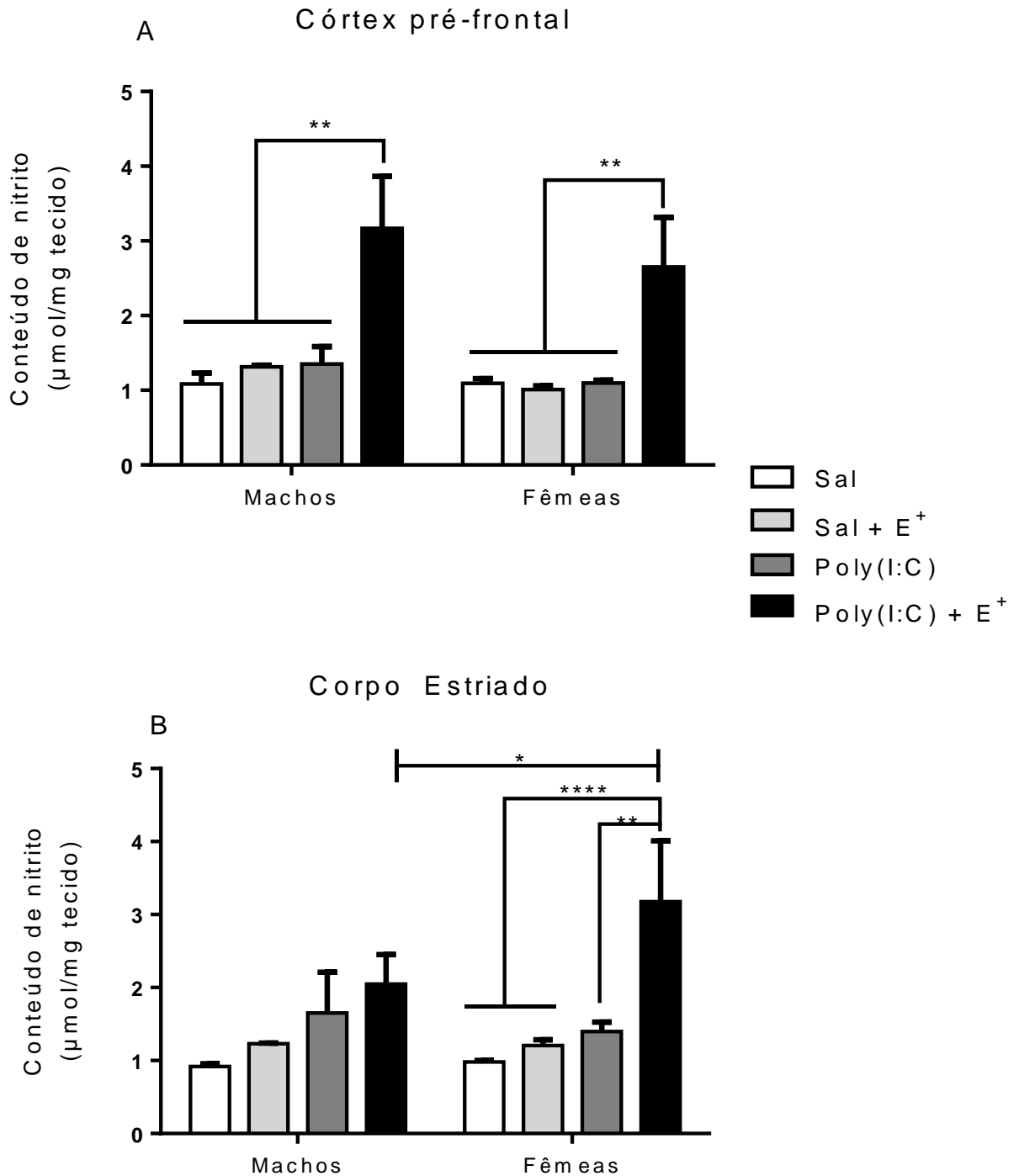
Fig. 20. Efeito do estresse, de poly(I:C) e de poly(I:C) + estresse nos níveis de GSH no córtex pré-frontal (A) e corpo estriado (B) de ratos machos e fêmeas.



Os ratos eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. As barras representam a média ± E.P.M (n=10-15 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de three-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

Em relação aos níveis de nitrito, uma interação significativa entre “estresse na adolescência” e “tratamento neonatal” foi observada no CPF [$F(1,26) = 11.686$, $P=0.002$]. Níveis aumentados de nitrito foram detectados tanto nos ratos machos ($P=0.001$) quanto nas fêmeas ($P=0.001$) expostos a combinação de poly(I:C)+estresse, sendo esse aumento significativo em relação aos grupos controle, estresse e poly(I:C) de ambos os sexos, respectivamente ($P=0.005$) (Fig. 21A). No CE não foram detectadas interações significantes entre os fatores estudados. Nessa área cerebral, fêmeas submetidas aos dois desafios apresentaram níveis significativamente maiores de nitrito quando comparadas aos grupos salina, estresse ($P<0.0001$) e poly(I:C) ($P=0.002$) (Fig.21B).

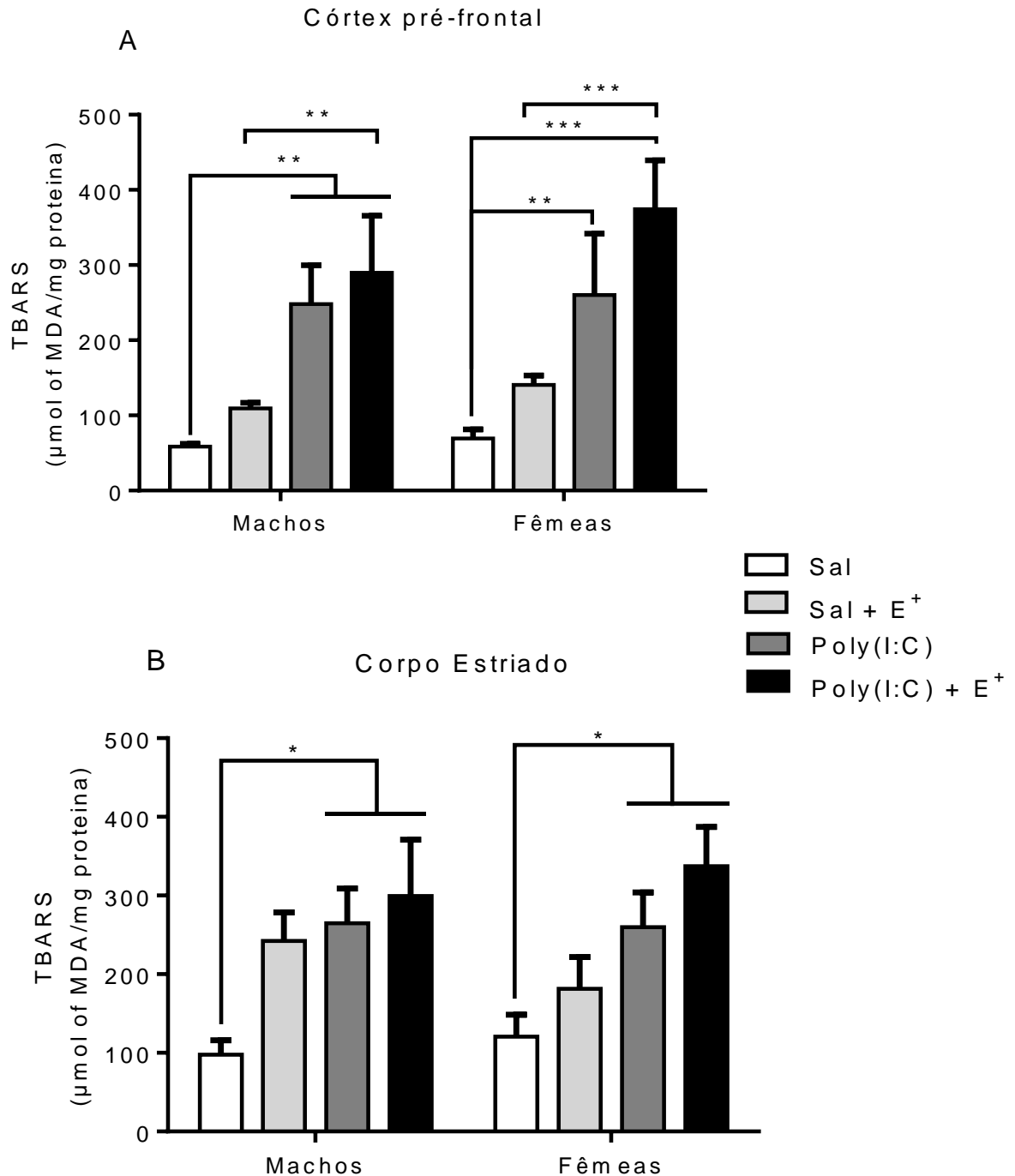
Fig. 21. Efeito do estresse, de poly(I:C) e de poly(I:C) + estresse nos níveis de conteúdo de nitrito no córtex pré-frontal (A) e corpo estriado (B) de ratos machos e fêmeas.



Os ratos eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. As barras representam a média \pm E.P.M (n=10-15 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de three-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

Não foram encontradas interações significantes entre os fatores nas análises de peroxidação lipídica no CPF e CE. Ratos machos ($P=0.007$) e fêmeas ($P=0.009$) pertencentes aos grupos poly(I:C) apresentaram níveis elevados de TBARS no CPF quando comparados aos controles de cada sexo, respectivamente. Nas fêmeas submetidas aos dois desafios, quando comparadas ao controle, esse aumento foi aproximadamente 6 vezes maior ($P=0.001$). Observou-se também um aumento de TBARS nos machos do grupos poly(I:C)+estresse quando comparados ao grupo controle ($P=0.014$) e ao grupo apenas estressado ($P=0.007$) e em fêmeas poly(I:C)+estresse quando comparadas ao grupo apenas estressado ($P=0.001$) (Fig.22A). No CE, a peroxidação lipídica mostrou-se aumentada em machos dos grupos poly(I:C)+estresse ($P=0.026$) e poly(I:C) ($P=0.017$) quando comparados ao controle e em fêmeas submetidos a poly(I:C)+estresse ($P=0.045$) e poly(I:C) ($P=0.038$) quando comparados ao controle (Fig.22B).

Fig. 22. Efeito do estresse, de poly(I:C) e de poly(I:C) + estresse nos níveis de peroxidação lipídica mensurados através da quantidade de TBARS no córtex pré-frontal (A) e corpo estriado (B) de ratos machos e fêmeas.



Os ratos eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. As barras representam a média ± E.P.M (n=10-15 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de three-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

6.3. Discussão

Nossos resultados mostraram que o desafio imune neonatal com poly(I:C), combinado ou não com estresse na adolescência, provocou alterações comportamentais e oxidativas em regiões cerebrais específicas em ratos machos e fêmeas. Observamos que machos e fêmeas quando expostos apenas ao primeiro desafio com poly(I:C) apresentaram déficits de inibição pré-pulso (fêmeas com maiores déficits que os machos), prejuízo na memória de trabalho (apenas os machos) e aumento do comportamento tipo ansioso (apenas fêmeas), acompanhados por uma diminuição dos níveis de GSH no CPF (ambos os sexos), CE (apenas fêmeas) e aumento dos níveis de peroxidação lipídica no CPF e no CE (ambos os sexos). Já a exposição apenas ao segundo desafio sozinho (estresse na adolescência) causou déficit de IPP em ambos os sexos, aumento do comportamento tipo ansiosos (apenas fêmeas) e um prejuízo social nos machos, acompanhados por uma redução nos níveis de GSH no CPF de ambos os sexos e no CE das fêmeas.

Após exposição aos dois desafios as seguintes mudanças foram observadas: déficits de IPP (apenas em fêmeas), hiperlocomoção (fêmeas com uma hiperlocomoção maior que os machos), aumento do comportamento tipo ansioso (ambos os sexos) prejuízo social (machos com um maior prejuízo que as fêmeas) e déficits na memória de trabalho (ambos os sexos). Ocorreram também mudanças oxidativas: redução dos níveis de GSH no CPF (ambos os sexos) e no CE (apenas fêmeas) e aumento dos níveis de nitrito (no CE essa mudança só foi observada nas fêmeas) e aumento de peroxidação lipídica (ambos os sexos). Esses resultados podem refletir uma tendência para o desenvolvimento de piores sintomas “positivos” tipo esquizofrenia em fêmeas submetidas a apenas um desafio (com poly(I:C)) e aos dois desafios, enquanto que os machos expostos aos dois desafios apresentam piores sintomas “negativos” tipo esquizofrenia.

A ARS é a resposta reflexa observada após a apresentação de um estímulo sonoro súbito alto (pulso). A IPP refere-se ao processo pelo qual a apresentação de um estímulo acústico fraco (pré-pulso) imediatamente antes do pulso reduz a ASR, demonstrando desse modo, como proposto, o papel do filtro sensório-motor (GRAHAM, 1975).

Tanto pacientes homens quanto mulheres com esquizofrenia apresentam déficits de IPP (BRAFF et al., 2005), mas em nossa condição de experimental observamos que as fêmeas do grupo poly(I:C) + estresse apresentaram déficits mais pronunciados de IPP, ou seja, um maior prejuízo no filtro sensório-motor, quando comparadas com os machos. Resultado semelhante foi encontrado em um estudo de diferença de sexo na esquizofrenia através de um

modelo animal com exposição pré-natal à poly(I:C), onde as ratas fêmeas especificamente mostraram mais déficits de IPP que os machos (VORHEES et al., 2015). Entretanto, um estudo com camundongos revelou um resultado contrário, com a exposição ao poly(I:C) no 9º dia de gestação levando a um piora na IPP da prole de machos em comparação às fêmeas (O'LEARY et al., 2014).

Além disso, observamos que, quando expostos somente ao estresse na adolescência, machos e fêmeas apresentaram déficits de IPP. Um estudo com modelo animal de transtorno de estresse pós-traumático por exposição a predador sugeriu que os déficits de IPP observados podem ter sido induzidos pela liberação do hormônio corticotrofina (BAKSHI et al., 2012). Tem sido sugerido que as diferenças sexuais encontradas especialmente no teste de IPP refletem as diferenças hormonais, principalmente em relação ao estrógeno (KOCH, 1998). Sabe-se que o estrógeno influencia a atividade neuroquímica e dopaminérgica no núcleo accumbens, área que tem desempenhado um papel crítico na IPP de ratos (SWERDLOW et al., 1992) e de seres humanos (KUMARI et al., 1999).

Vale ressaltar o fato de que, no nosso estudo, os animais machos expostos ao estresse na adolescência ou a poly(I:C) apresentaram quase o mesmo nível de redução de IPP quando expostos aos dois insultos conjuntamente, enquanto as fêmeas expostas a poly(I:C) + estresse apresentaram níveis de IPP reduzidos quando comparadas às submetidas apenas ao estresse. Isto significa que, nas fêmeas, o déficit na função sensório-motora promovido pelos insultos tem caráter aditivo. Importante comentar que as fêmeas controles apresentaram menores níveis de IPP do que os machos. De fato, mulheres saudáveis exibem significativamente menos IPP que homens (SWERDLOW et al., 1993).

A ARS é aumentada em situações de medo/estresse tanto em ratos quanto em humanos (KOCH; SCHNITZLER, 1997). Em nosso estudo não foram encontradas diferenças significativas entre as ARS dos grupos experimentais de ambos os sexos. Isso significa que os déficits encontrados em relação aos resultados de IPP devem-se aos prejuízos no filtro sensório-motor desses animais, e não são devidos às respostas ao medo ou estresse.

Observamos também que as fêmeas do grupo poly(I:C) + estresse apresentaram um padrão de atividade locomotora mais intenso do que os machos, o que pode ser sugestivo de piores sintomas tipo positivos em fêmeas expostas aos dois desafios. O início do surto posteriormente, as exacerbações sintomáticas nos períodos menstruais, e o aumento da incidência após a menopausa entre as mulheres sugerem que os hormônios sexuais podem ser os responsáveis por essa diferença de sexo (SEEMAN, 2012a, 2012b).

Sabe-se que as respostas a eventos estressores estão intimamente ligadas ao desenvolvimento de distúrbios de ansiedade (SAPOLSKY, 2000). Observamos que as fêmeas expostas a um desafio sozinho (poly(I:C) ou estresse) ou aos dois desafios combinados apresentaram uma piora no comportamento tipo ansioso observado através da redução do número de entradas na zona central do campo aberto, enquanto nos machos essa redução só foi encontrada no grupo dois desafios. Resultados semelhantes foram observados em um estudo utilizando modelo animal de esquizofrenia por isolamento social, onde ratas fêmeas, mas não os machos, apresentaram menos entradas na zona central quando comparados aos controles (POWELL et al., 2002).

Ressaltamos que somente os machos mostraram um prejuízo na interação social e na memória de trabalho quando submetidos apenas ao estresse e apenas ao poly(I:C) neonatal, respectivamente. Esses resultados confirmam o que dizem as pesquisas, que as fêmeas precisam de mais exposição a eventos estressantes do que os machos para desencadear os sintomas negativos da esquizofrenia (ALMEIDA; KESSLER, 1998; MYIN-GERMEYS et al., 2004). Parece, portanto, que as mulheres com esquizofrenia apresentam maior resiliência do que os homens para lidar com situações de estresse e que elas precisam de maiores fatores de risco do que os homens para desenvolver psicose (OCHOA et al., 2012). Além disso, os machos expostos aos dois desafios combinados apresentaram um prejuízo maior na interação social quando comparados às fêmeas. Essa diferença sexual comportamental também pode ser vista no estudo de Ratnayake e colaboradores (2014) onde ratos machos tratados com poly(I:C) pré-natal mostraram interação reduzida com um rato estranho.

Sintomas “cognitivos” tipo esquizofrenia, avaliados através do teste de labirinto em Y, foram observados em machos expostos a um desafio com poly(I:C) e em machos e fêmeas submetidos aos dois desafios. Um modelo animal neurodesenvolvimental semelhante ao nosso, em que as ratas grávidas eram tratadas com lipopolissacarídeo (LPS) no 19º dia de gestação, mostrou que o reconhecimento espacial no Morris water maze foi prejudicado na prole do sexo masculino, mas não na prole de sexo feminino (LANTÉ et al., 2007). Ou seja, assim como em nosso estudo, a exposição ao desafio imune neonatal sozinho promoveu prejuízo cognitivo apenas nos machos, o que sugere que os estes sejam mais sensíveis ao desafio neonatal em relação ao prejuízo na memória de trabalho.

Dessa forma, nossos resultados comportamentais em relação aos grupos poly(I:C) + estresse parecem estar de acordo com as substanciais diferenças de sexo observadas clinicamente na esquizofrenia, com as mulheres tendendo a apresentar mais sintomas psicóticos

positivos e afetivos, e os homens tendendo a apresentar mais sintomas negativos (CHOI et al., 2009).

O estresse oxidativo é um mecanismo bem conhecido e implicado há muito tempo na patogênese da esquizofrenia (YAO; LEONARD; REDDY, 2006). Além disso, as vias oxidativas (por exemplo, GSH e peroxidação lipídica) são conhecidas por serem influenciadas pelo sexo (BAYIR et al., 2004; CASTAGNÉ; CUÉNOD; DO, 2004). Para testar esta hipótese, determinamos os níveis de GSH, nitrito e peroxidação lipídica em áreas cerebrais relacionadas a sintomas positivos e negativos/cognitivos nos seres humanos, respectivamente, o CE (KAPUR; MIZRAHI; LI, 2005) e CPF (PERLSTEIN et al., 2001; WIBLE et al., 2001).

Em nosso estudo, GSH, o composto antioxidante mais abundante presente em células de mamíferos, foi diminuído em ratos expostos ao estresse, ao poly(I:C) neonatal e ao poly(I:C) + estresse. Experimentos anteriores mostraram que o estresse causado por imobilização em roedores induziu a geração de espécies reativas de oxigênio e diminuiu as defesas antioxidantes endógenas (LIU; WANG; MORI, 1994). A diminuição dos níveis de GSH é uma alteração cerebral importante observada tanto em modelos animais da esquizofrenia (MONTE et al., 2013; RIBEIRO et al., 2013) quanto em estudos *post-mortem* de pacientes esquizofrênicos (YAO; LEONARD; REDDY, 2006). A biossíntese de GSH está sob o controle direto dos receptores NMDA (BAXTER et al., 2015). Um estudo anterior mostrou que a ativação pré-natal de receptores de toll-like 3 por poly(I:C) resultou em níveis diminuídos de GluN1, uma proteína associada ao receptor NMDA, no cérebro da prole no dia pós-natal 21 (FORREST et al., 2012). De fato, a hipofunção do receptor NMDA é outra alteração cerebral importante observada na esquizofrenia (COYLE et al., 2010).

Em nossos resultados, a diminuição dos níveis GSH no CPF foi observada em machos e fêmeas expostos ao poly(I:C) neonatal, ao estresse e ao poly(I:C)+estresse. Estudos prévios sugerem que níveis reduzidos de GSH na porção medial do córtex pré-frontal podem estar relacionados a sintomas negativos em pacientes esquizofrênicos (MATSUZAWA et al., 2008). Os déficits no teste de interação social, responsável por simular os sintomas negativos, foram observados em machos e fêmeas submetidos aos dois desafios (sendo nos machos um resultado mais proeminente), e em machos expostos apenas ao estresse. Tanto o resultado comportamental quanto o bioquímico corroboram a teoria de que os sintomas negativos estão mais relacionados ao sexo masculino (CHOI et al., 2009).

Entretanto, em relação aos parâmetros de GSH no CE, houve um déficit apenas nas fêmeas expostas a cada um dos desafios sozinhos e aos dois desafios juntamente. Levando em consideração que o CE está mais relacionado aos sintomas positivos da esquizofrenia (KAPUR;

MIZRAHI; LI, 2005) e extrapolando os resultados de GSH para os testes comportamentais, observamos que as fêmeas mostraram um prejuízo maior na atividade locomotora e no reflexo sensorio motor, ambos parâmetros utilizados para simular os sintomas positivos. Novamente, os resultados obtidos aqui corroboram com a correlação entre sintomas positivos e o sexo feminino.

No CE, as fêmeas do grupo controle mostraram níveis de GSH elevados quando comparados aos machos. De fato, diferentes autores propõem que ratas Wistar fêmeas produzem menos EROs que os machos (BORRÁS et al., 2003; JANG et al., 2004). Experimentos realizados por Viña e colaboradores (2005) mostraram que níveis de glutathiona mitocondrial em ratos machos eram de aproximadamente a metade dos níveis encontrados nas fêmeas. Primeiramente eles sugeriram que o estrógeno poderia ter um efeito protetor em diminuir os danos oxidativos e aumentar as defesas antioxidantes das fêmeas. Entretanto, ao realizarem mais experimentos eles concluíram que o estradiol não atuou como antioxidante, mas aumentou a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes como a superóxido desmutase que tem o manganês no seu centro reativo (Mn-SOD) e a glutathiona peroxidase (GPx), ambas enzimas mitocondriais.

A menor produção de radicais livres mitocondriais pelas fêmeas também pode ser explicada por diferenças no consumo de oxigênio mitocondrial, já que os animais pequenos (fêmeas) podem consumir mais oxigênio por grama do que animais maiores (machos) (SANZ et al., 2007). Embora pesquisadores tenham discutido extensivamente diferenças sexuais na estrutura e função do cérebro humano (GONG et al., 2009; GONG; HE; EVANS, 2011), diferenças de sexo específicas dentro dos circuitos estruturais ligados ao CE permanecem amplamente desconhecidas principalmente devido às limitações das abordagens anteriores para analisar dados de imagens por tensor de difusão (LEI et al., 2016).

Por décadas o nitrito foi considerado fisiologicamente inerte, hoje sabe-se que ele representa um reservatório estável que pode ser reduzido a óxido nítrico (NO) bioativo e a outras espécies reativas de nitrogênio (LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008). Sabe-se que o NO pode reagir com moléculas como o ânion superóxido e formar espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Estas ERNs podem modificar macromoléculas biológicas desempenhando um papel crucial na morte celular mediada (PATEL et al., 1999). Dessa forma, mensuramos o nitrito com o objetivo de analisar indiretamente os níveis de NO.

Primeiramente observamos que os níveis de nitrito aumentaram no CPF de machos e fêmeas expostos a poly(I:C) + estresse e que esses grupos mostraram déficits no teste do labirinto em Y. A relevância desta observação é que o CPF é uma área do cérebro envolvida

com o desempenho da memória de trabalho e função executiva (PHENSY et al., 2017). Percebemos também uma relação no fato de que somente as fêmeas submetidas aos dois desafios mostraram aumento dos níveis de nitrito no CE, uma área cerebral tem sido relacionada à psicose (HOWES; KAPUR, 2009), e maiores prejuízos nos testes de atividade locomotora e IPP, utilizados para avaliar os sintomas tipo positivos.

Outro resultado interessante observado foi que os níveis de conteúdo de nitrito nos animais submetidos aos dois desafios eram inversamente proporcionais aos níveis de GSH destes mesmos grupos. Em um contexto patológico, o excesso de ativação da óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) produz quantidades elevadas de NO e do ânion superóxido que resulta na geração de peroxinitrito, que por sua vez danifica moléculas alvo, incluindo proteínas, GSH, mitocôndrias e DNA (LEZA et al., 2015).

A peroxidação lipídica, por sua vez, é o processo metabólico pelo qual as EROs resultam na deterioração oxidativa dos lipídios. Isso pode afetar significativamente a estrutura e função da membrana celular (VALKO et al., 2007). Encontramos um aumento na peroxidação lipídica no CE e CPF de machos e fêmeas expostos a poly(I:C) + estresse, bem como ao poly(I:C) neonatal sozinho. No entanto, nós não observamos influências sexuais em níveis de peroxidação lipídica no CPF e no CE. Um estudo na mesma linha mostrou que camundongos machos e fêmeas expostos a poly(I:C) neonatal, seguido por estresse por contensão na adolescência apresentaram alterações oxidativas, principalmente no CPF (DESLAURIERS et al., 2014). Uma das diferenças entre este trabalho e o nosso é que Deslauriers e colaboradores não dividiram os animais machos e fêmeas em grupos separados. Sugere-se que insultos ambientais pré e/ou pós-natais interajam com fatores genéticos específicos para produzir estresse oxidativo e aumentar o risco de disfunção cerebral neurodesenvolvimental a longo prazo (JIANG; COWELL; NAKAZAWA, 2013).

Até o momento, nenhum estudo sobre o modelo animal de esquizofrenia por dois desafios tinha avaliado as consequências de poly(I:C) neonatal como o primeiro desafio e ninguém havia investigado as influências sexuais sobre o desenvolvimento de alterações tipo esquizofrenia neste modelo. Observamos que as maiores alterações comportamentais e oxidativas ocorreram em animais expostos a poly(I:C) + estresse. De fato, os fatores de risco precoces e tardios não são simplesmente aditivos, em vez disso, a hipótese preconiza que o primeiro desafio aumenta a vulnerabilidade do indivíduo para os efeitos do segundo desafio (BUUSE; GARNER; KOCH, 2003).

Geralmente o modelo animal original de esquizofrenia por dois desafios é baseado na exposição materna a uma dose fisiologicamente relevante de poly(I:C) no nono dia gestacional,

considerada como o primeiro desafio, seguida por eventos estressores na fase peripuberal como um segundo desafio (GIOVANOLI et al., 2013). No entanto, o cérebro dos roedores ainda encontra-se em desenvolvimento e maturação significativa no início da vida pós-natal (SEMPLE et al., 2013).

Por isso, nesse estudo decidiu-se por introduzir o primeiro desafio durante a vida neonatal, a fim de simular um desafio imune que, traduzido para os seres humanos, representa o fim do terceiro trimestre da gravidez (SEMPLE et al., 2013), considerado um período vulnerável para distúrbios de desenvolvimento, uma vez que o acometimento de infecções virais nessa fase da gestação humana está associada a um risco aumentado para a psicose na prole quando adulta (BUKA et al., 2008). O período pós-natal 5-7 em roedores é equivalente ao início do terceiro trimestre da gravidez em humanos, já que o intervalo de 36 a 40 semanas da gestação humana corresponde aos dias pós-natais 7 a 10 em roedores (SEMPLE et al., 2013).

Em relação às diferenças sexuais, estudo recente do nosso grupo de pesquisa mostrou que ratos adultos machos e fêmeas submetidos a um primeiro desafio neonatal com quetamina apresentaram alterações comportamentais e oxidativas que se assemelham às diferenças de sexo na esquizofrenia. No caso das fêmeas, as alterações variavam de acordo com a fase do ciclo estral em que elas se encontravam (BORELLA et al., 2015). Estas descobertas somaram evidências quanto ao papel protetor do estrogênio na esquizofrenia (KULKARNI et al., 2001).

7. CAPÍTULO II

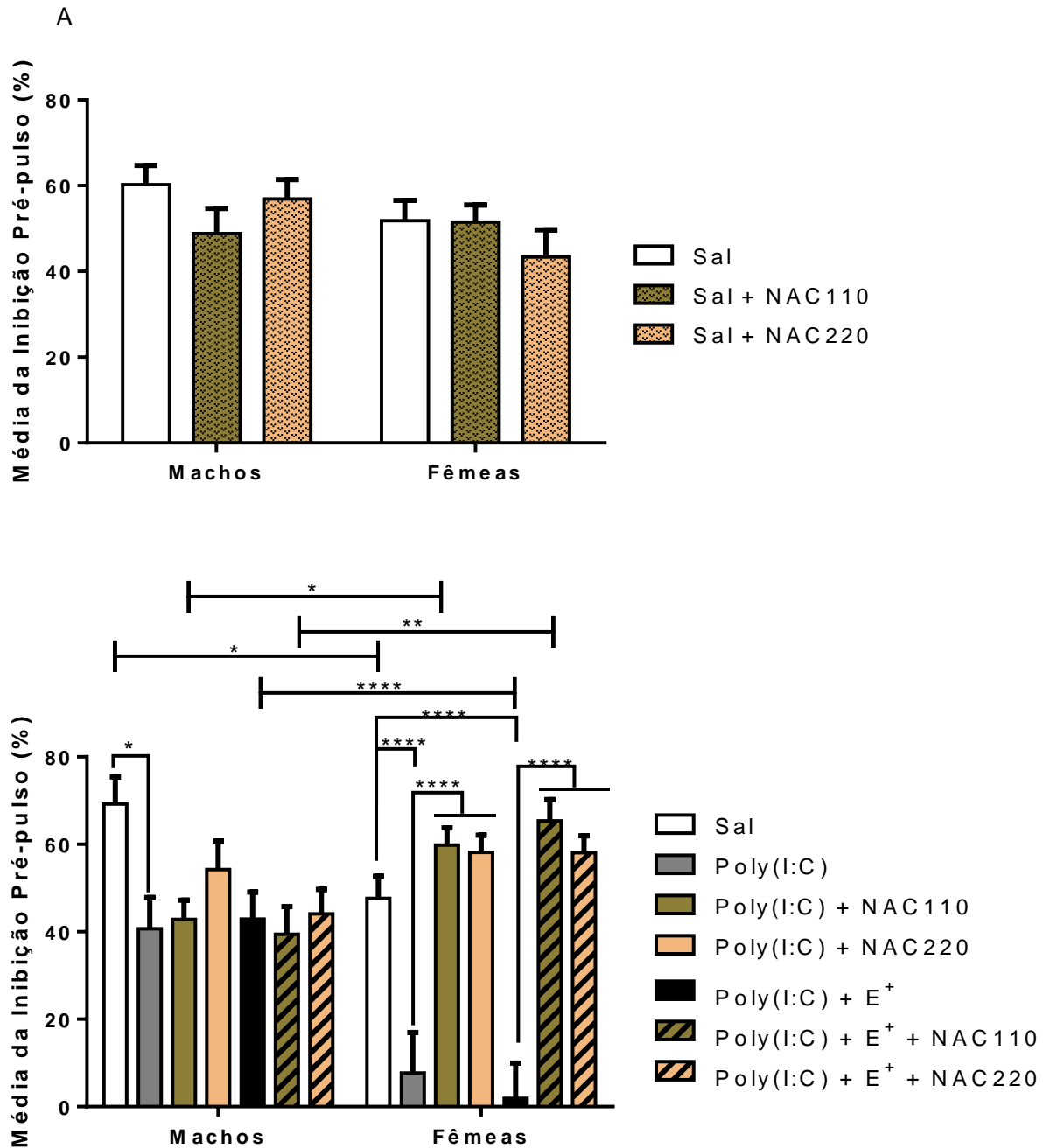
ESTUDO DA N-ACETILCISTEÍNA COMO POSSÍVEL ESTRATÉGIA DE PREVENÇÃO PARA ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E OXIDATIVAS NO MODELO DE ESQUIZOFRENIA DE DOIS DESAFIOS

7.1 Resultados das alterações comportamentais

Analisando os resultados do teste de IPP, percebeu-se uma interação de três vias entre “sexo”, “tratamento neonatal” e “droga” [$F(2,154)=3.697$, $P=0.027$]. Não houve diferenças significativas entre os animais machos e fêmeas tratados com sal + NAC110 ou sal + NAC220 quando comparados ao controle (Fig.23A). Foi observado que as fêmeas dos grupos poly(I:C) + estresse + NAC110 e poly(I:C) + estresse + NAC220 mostraram um aumento significativo na função sensorio motora quando comparadas às fêmeas submetidas aos dois desafios ($P<0.0001$).

Resultados semelhantes foram encontrados nas fêmeas tratadas com poly(I:C) + ambas as doses de NAC quando comparadas as que receberam poly(I:C) neonatal ($P<0.0001$). Em relação aos machos, tanto aqueles pertencentes ao grupo poly(I:C) + NAC110 ($P=0.023$) quanto os do grupo poly(I:C) + estresse + NAC110 ($P=0.002$) apresentaram um déficit de IPP quando comparados as fêmeas dos grupos respectivos. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas entre machos submetidos a um (poly(I:C)) ou dois desafios (poly(I:C) + estresse) comparados aos animais destes grupos sendo que tratados com ambas as doses de NAC (Fig.23B).

Fig. 23. Efeito da NAC110 e NAC220 na média da % de IPP de animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E⁺) (B).

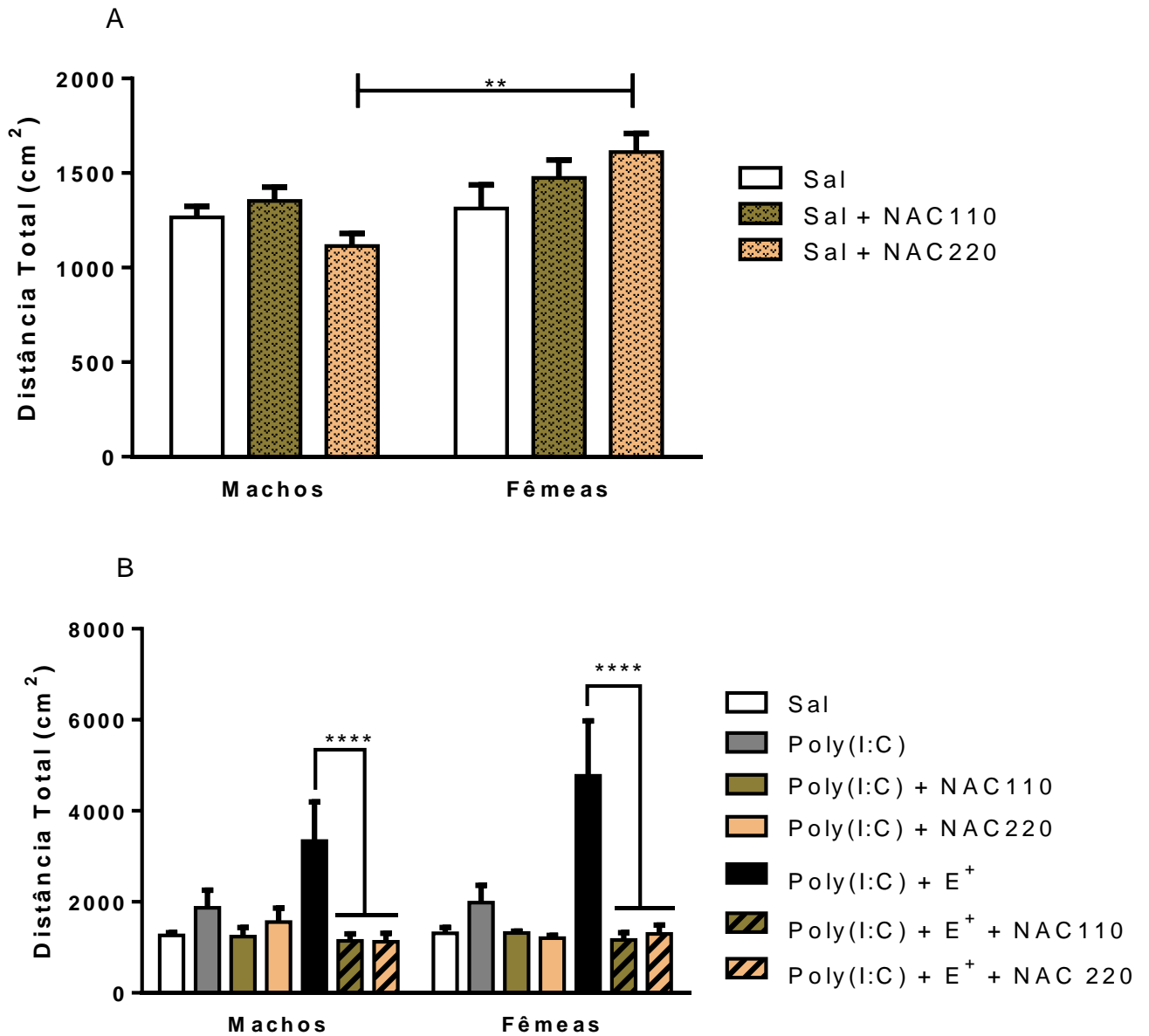


Os animais eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. No DPN30-59 os animais eram tratados com água, NAC 110mg/kg ou NAC 220mg/kg (v.o). As barras representam a média ± E.P.M (n=10-15 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de quatro vias seguida pelo teste de Bonferroni. (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

Quanto ao parâmetro de distância total percorrida avaliado pelo teste do campo aberto houve uma interação de duas vias entre os fatores “estresse na adolescência” e “droga” [$F=(2,147)=14.871$, $P<0.0001$]. Observou-se um aumento significativo da distância total percorrida pelas fêmeas do grupo sal + NAC220 quando comparadas aos machos do mesmo grupo ($P=0.0031$). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os animais machos e fêmeas tratados com sal + NAC110 ou sal + NAC220 quando comparados ao controle (Fig. 24A).

Houve uma redução significativa da atividade locomotora de machos e fêmeas dos grupos poly(I:C) + estresse + NAC110 e poly(I:C) + estresse + NAC220 quando comparados aos grupos poly(I:C) + estresse de cada sexo respectivo ($P<0.0001$). Nos machos e fêmeas dos grupos poly(I:C) + NAC110 ou poly(I:C) + NAC220 não foram observadas diferenças significativas quando comparados aos animais tratados apenas com poly(I:C) neonatal (Fig.24B).

Fig. 24. Efeito da NAC110 e NAC220 na distância total percorrida pelos animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E⁺) (B).

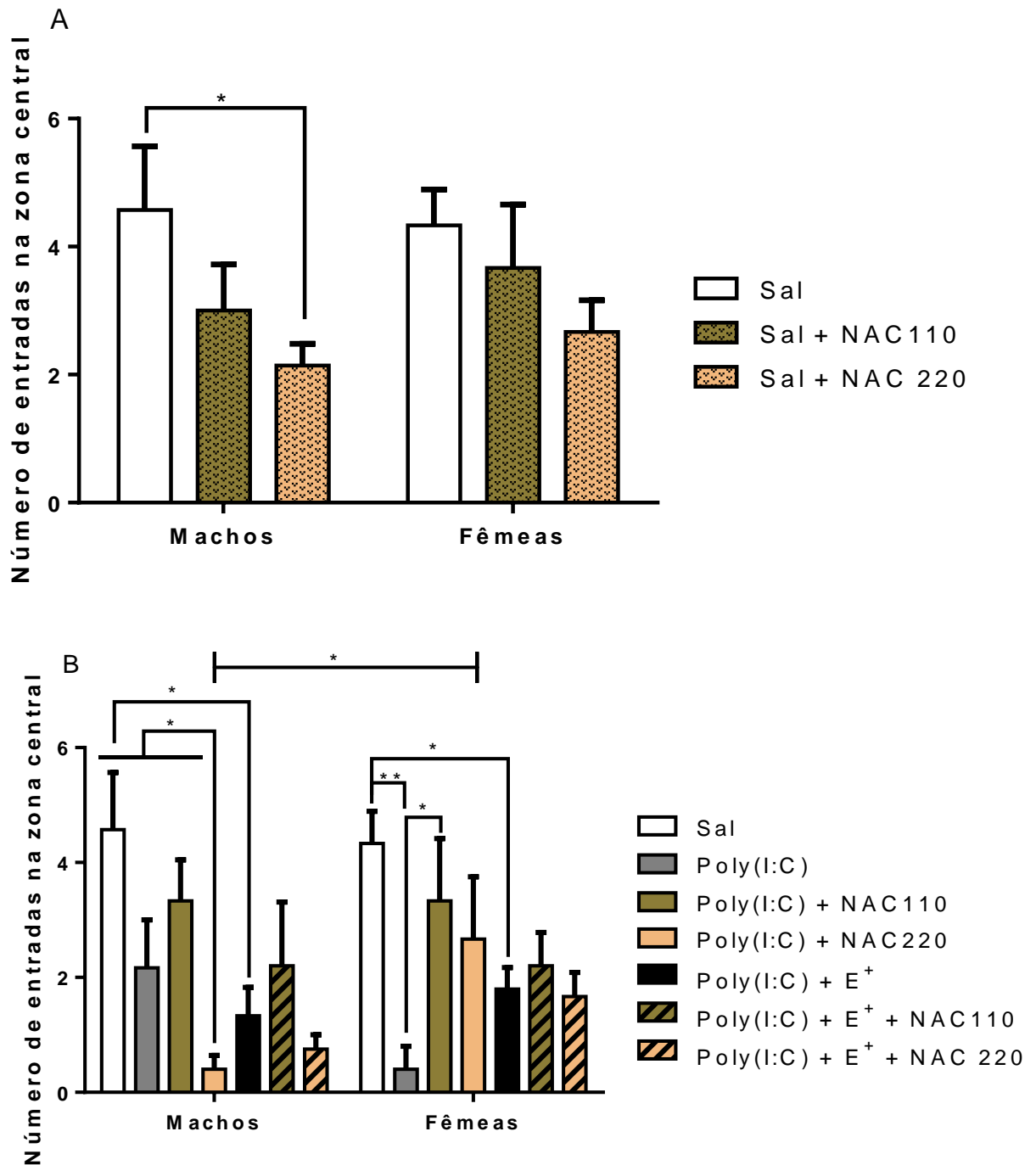


Os animais eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. No DPN30-59 os animais eram tratados com água, NAC 110mg/kg ou NAC 220mg/kg (v.o). As barras representam a média ± E.P.M (n=10-15 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de quatro vias seguida pelo teste de Bonferroni. (*P < 0.05,**P<0.01,***P < 0.001,****P < 0.0001). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

Em relação ao parâmetro número de entradas na zona central, também avaliado pelo teste de campo aberto, verificou-se uma interação de duas vias entre “tratamento neonatal” e “droga” [$F(2,97)=4.954$, $P=0.009$]. Verificou-se uma redução significativa no número de entradas na zona central dos machos do grupo sal + NAC220 quando comparados com o controle ($P=0.040$). Não observamos diferenças significativas entre as fêmeas tratadas com sal + NAC110 ou NAC220 quando comparadas ao controle (Fig.25A).

Foi observado um aumento significativo do número de entradas na zona central de fêmeas do grupo poly(I:C) + NAC220 quando comparadas aos machos do grupo respectivo ($P=0.041$). Resultado semelhante foi encontrado nas fêmeas tratadas com poly(I:C) + NAC110 quando comparadas as fêmeas do grupo poly(I:C) ($P=0.026$). Nos machos, a maior dose de NAC quando administrada no grupo tratado com poly(I:C) neonatal promoveu uma diminuição significativa do número de entradas na zona central quando comparados aos grupos salina ($P=0.03$), com poly(I:C) neonatal e poly(I:C) + NAC110 ($P=0.026$) (Fig. 25B).

Fig. 25. Efeito da NAC110 e NAC220 no número de entradas na zona central do campo aberto pelos animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E⁺) (B).

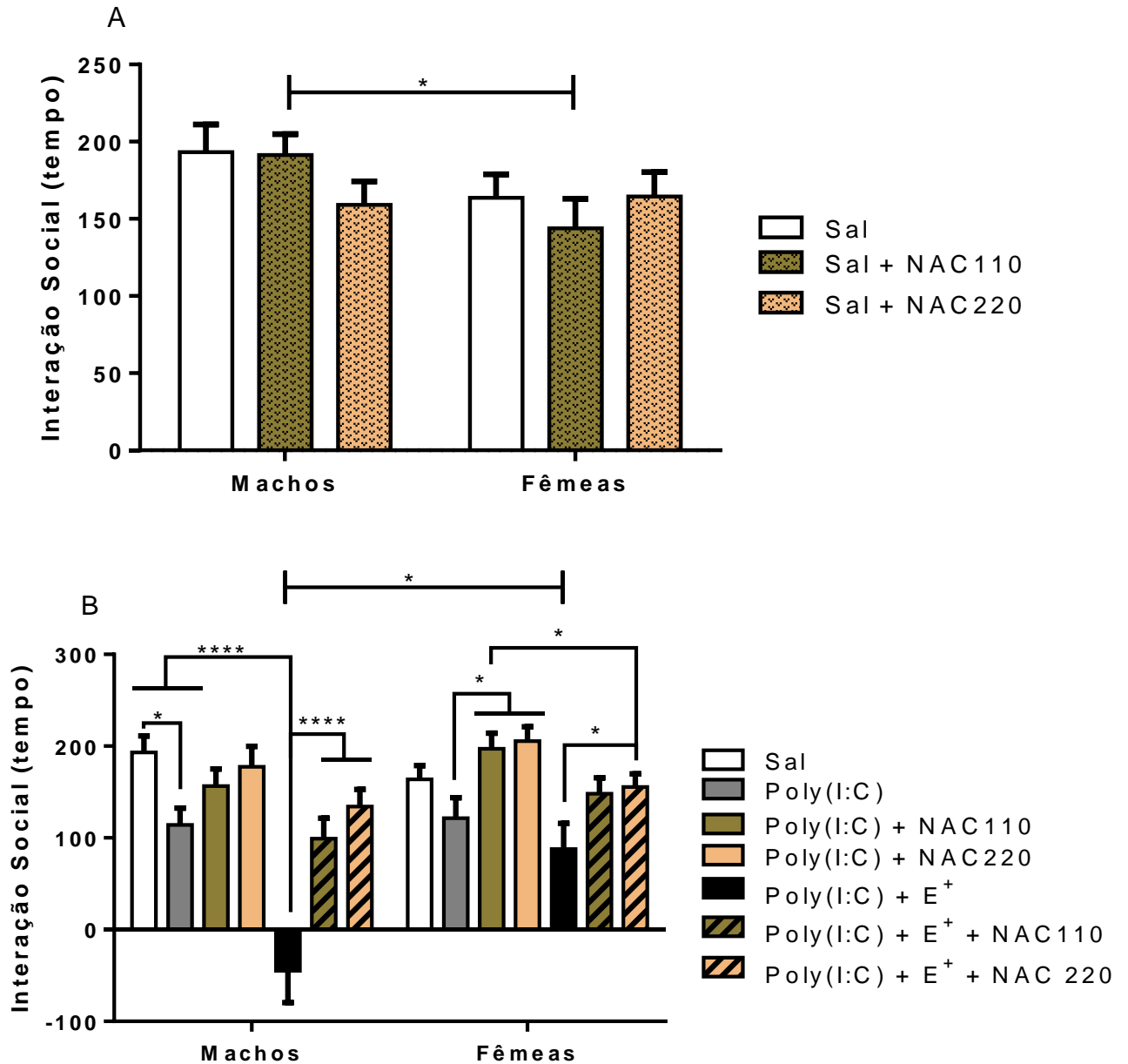


Os animais eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. No DPN30-59 os animais eram tratados com água, NAC 110mg/kg ou NAC 220mg/kg (v.o). As barras representam a média ± E.P.M (n=10-15 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de quatro vias seguida pelo teste de Bonferroni. (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

Em relação ao teste de Interação Social, houve uma interação de duas vias entre “tratamento neonatal” e “droga” [$F(2,208)=6.117$, $P=0.003$] e de três vias entre “sexo”, “estresse na adolescência” e “droga” [$F(2,208)=3.170$, $P=0.044$]. Verificamos que machos tratados com salina+NAC110 mostraram um aumento significativo na interação social quando comparados as fêmeas do mesmo grupo ($P=0.039$). Entretanto, quando comparados aos controles, machos e fêmeas tratados apenas com NAC110 ou NAC220 não apresentaram diferenças significativas (Fig.26A).

Foi observado um aumento da interação social em machos expostos aos dois desafios + NAC110 ou NAC220 quando comparados aos machos do grupo dois desafios sem tratamento ($P<0,0001$). No entanto, apenas as fêmeas grupo poly(I:C) + estresse + NAC220 ($P=0.037$), mostraram aumento significativo da interação social quando comparadas ao grupo dois desafios sem tratamento. Já quando comparadas ao grupo poly(I:C)+NAC220, essas fêmeas mostraram diminuição significativa da interação social ($P=0.049$). Foi observado um aumento significativo da interação social das fêmeas dos grupos poly(I:C)+NAC110 ($P=0.026$) e poly(I:C)+NAC220 ($P=0.011$) quando comparadas as fêmeas dos grupo tratado apenas com poly(I:C) neonatalmente. Não foram evidenciadas diferenças significativas entre machos dos grupos poly(I:C) + NAC110 ou poly(I:C) + NAC220 quando comparados aos machos tratados apenas com poly(I:C) neonatal (Fig.26B).

Fig. 26. Efeito da NAC110 e NAC220 na interação social de animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E⁺) (B).

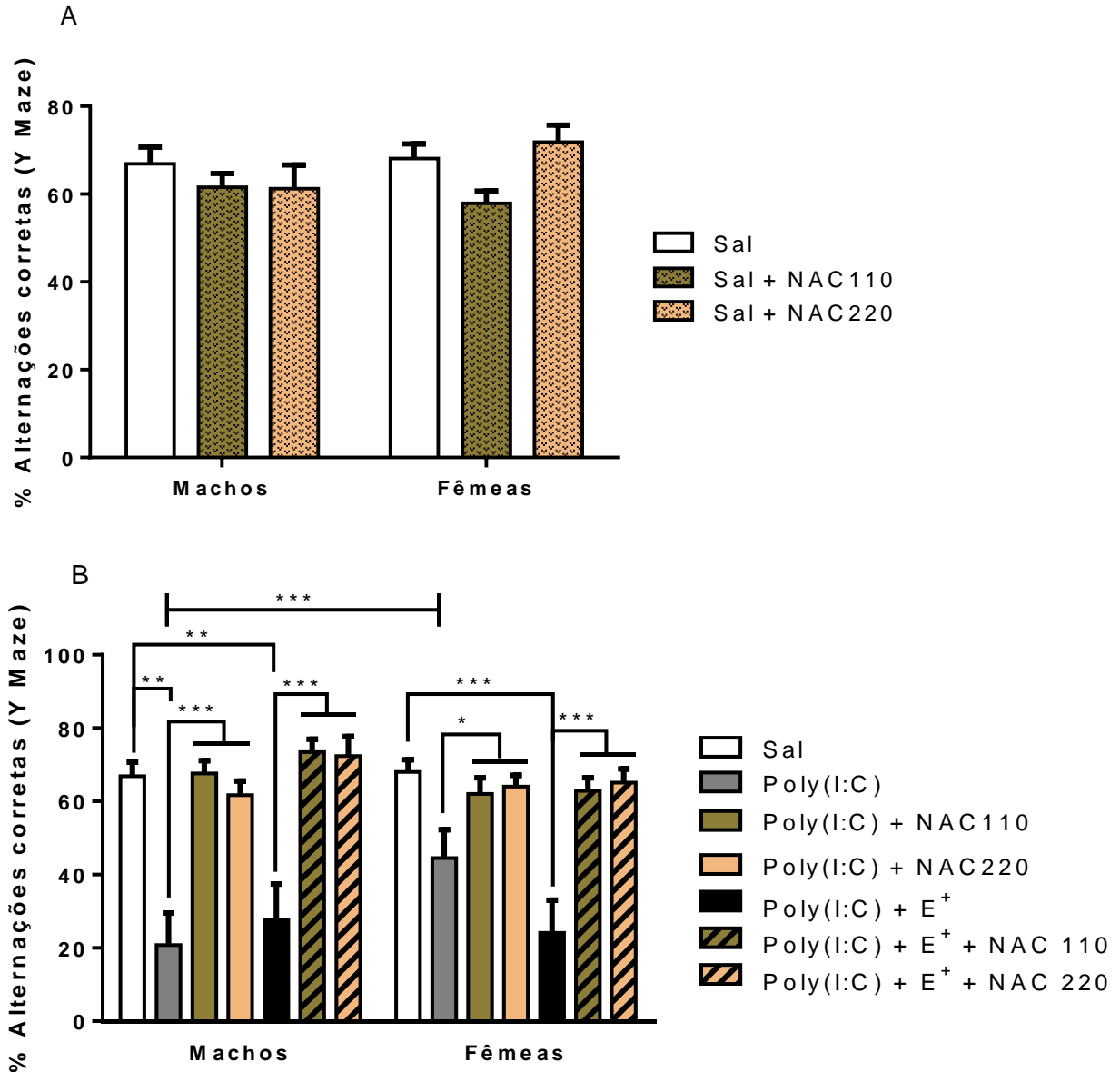


Os animais eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. No DPN30-59 os animais eram tratados com água, NAC 110mg/kg ou NAC 220mg/kg (v.o). As barras representam a média ± E.P.M (n=10-15 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de quatro vias seguida pelo teste de Bonferroni. (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

A análise do teste de Labirinto em Y pela Anova de 3 vias revelou uma significativa interação de duas vias entre “tratamento neonatal” e “droga” [$F(2,198)=15.705, P<0.0001$] e entre “estresse na adolescência” e “droga” [$F(2,198)=4.384, P=0.014$]. Primeiramente, não identificamos diferenças significativas entre os animais machos e fêmeas tratados com sal + NAC110 ou sal + NAC220 quando comparados ao controle (Fig. 27A). Neste teste, fêmeas dos grupos poly(I:C) + estresse + NAC110 ou NAC220 apresentaram aumento significativo da porcentagem de alterações corretas quando comparadas às fêmeas do grupo poly(I:C) + estresse ($P<0.0001$).

Além disso, as fêmeas tratadas com poly(I:C) + NAC110 ($P=0.050$) ou NAC220 ($P=0.041$) também mostraram um aumento significativo na porcentagem de alterações corretas quando comparadas às fêmeas tratadas apenas com poly(I:C) neonatal. Em relação aos machos, ambas as doses de NAC foram capazes de reverter de maneira significativa o déficit de memória de trabalho causado por poly(I:C) sozinho ou por poly(I:C)+estresse ($P<0.0001$) (Fig. 27B).

Fig.27. Efeito da NAC110 e NAC220 na % de alterações corretas (Labirinto em Y) de animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E⁺) (B).



Os animais eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. No DPN30-59 os animais eram tratados com água, NAC 110mg/kg ou NAC 220mg/kg (v.o). As barras representam a média \pm E.P.M (n=10-15 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de quatro vias seguida pelo teste de Bonferroni. (*P < 0.05,**P<0.01,***P < 0.001,****P < 0.0001). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

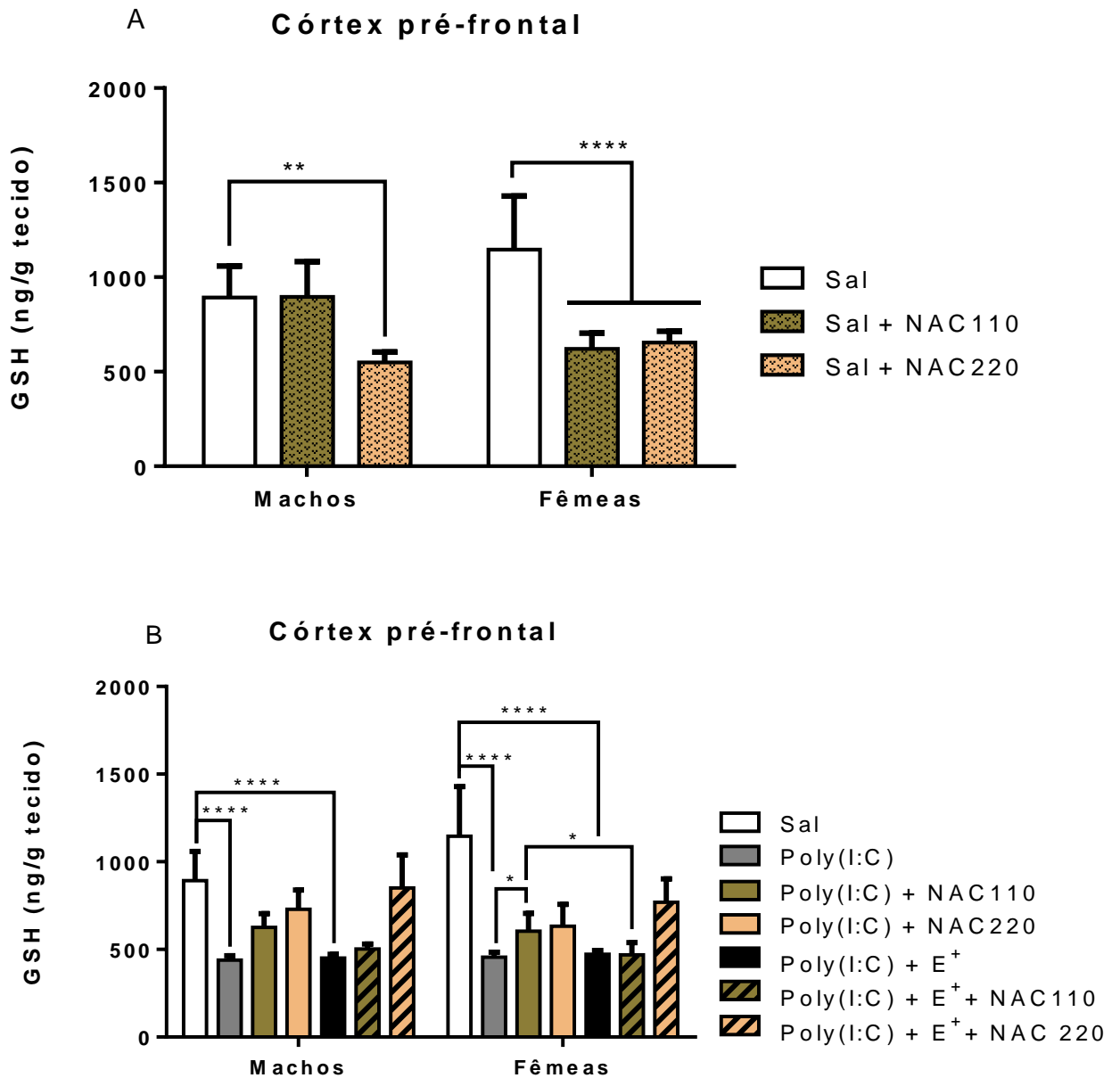
7.2. Resultados das alterações oxidativas cerebrais

A análise dos níveis de GSH no CPF revelou uma interação significativa entre “tratamento neonatal” e “droga” [$F(2,78) = 9.038$, $P < 0.0001$]. Nesta área cerebral os níveis do antioxidante GSH reduziram significativamente quando os machos ($P=0.01$) tratados com salina + NAC220 e fêmeas ($P<0.0001$) tratados com salina + ambas as doses de NAC220 foram comparados com os controles (Fig.28A). Entretanto, observou-se um aumento significativo de GSH de fêmeas submetidas a poly(I:C) + NAC110 quando comparados aquelas submetidas apenas a poly(I:C) ($P=0.042$). Quando comparadas as fêmeas do grupo poly(I:C) + NAC110, as fêmeas do grupo dois desafios + NAC110 apresentaram uma queda nos níveis de GSH ($P=0.017$) (Fig. 28B).

No CE observou-se uma interação significativa entre os três fatores: "sexo", “tratamento neonatal” e “droga” [$F(2,78)=9.983$, $P<0.0001$]. Fêmeas tratadas com salina + ambas as doses de NAC mostraram uma diminuição significativa nos níveis de GSH quando comparadas ao controle ($P<0.0001$) (Fig. 29A). Entretanto, quando tratadas com poly(I:C) neonatal + NAC110 houve um aumento significativo de GSH nesta área cerebral quando comparou-se ao grupo poly(I:C) ($P=0.018$).

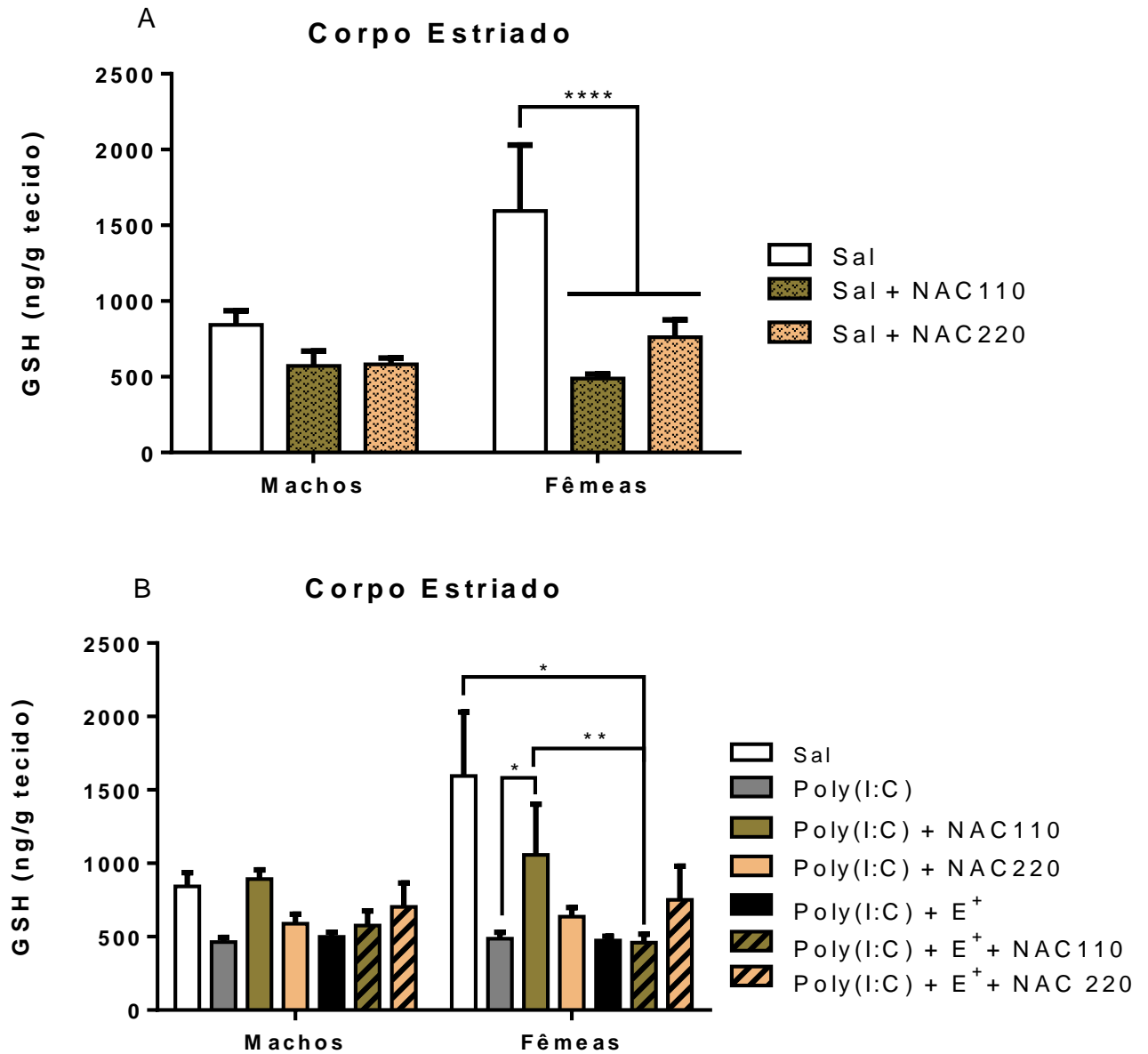
Observou-se uma redução nos níveis de GSH das fêmeas expostas aos dois desafios + NAC110 quando comparadas às expostas ao poly(I:C)+NAC110 ($P=0.004$) e ao controle ($P=0.013$). Nos machos não foram verificadas diferenças estatísticas significativas (Fig.29B).

Fig. 28. Efeito da NAC110 e NAC220 nos níveis de GSH no córtex pré-frontal de animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E⁺) (B).



Os animais eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. No DPN30-59 os animais eram tratados com água, NAC 110mg/kg ou NAC 220mg/kg (v.o). As barras representam a média ± E.P.M (n=10-15 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de quatro vias seguida pelo teste de Bonferroni. (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

Fig. 29. Efeito da NAC110 e NAC220 nos níveis de GSH no corpo estriado de animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E⁺) (B).

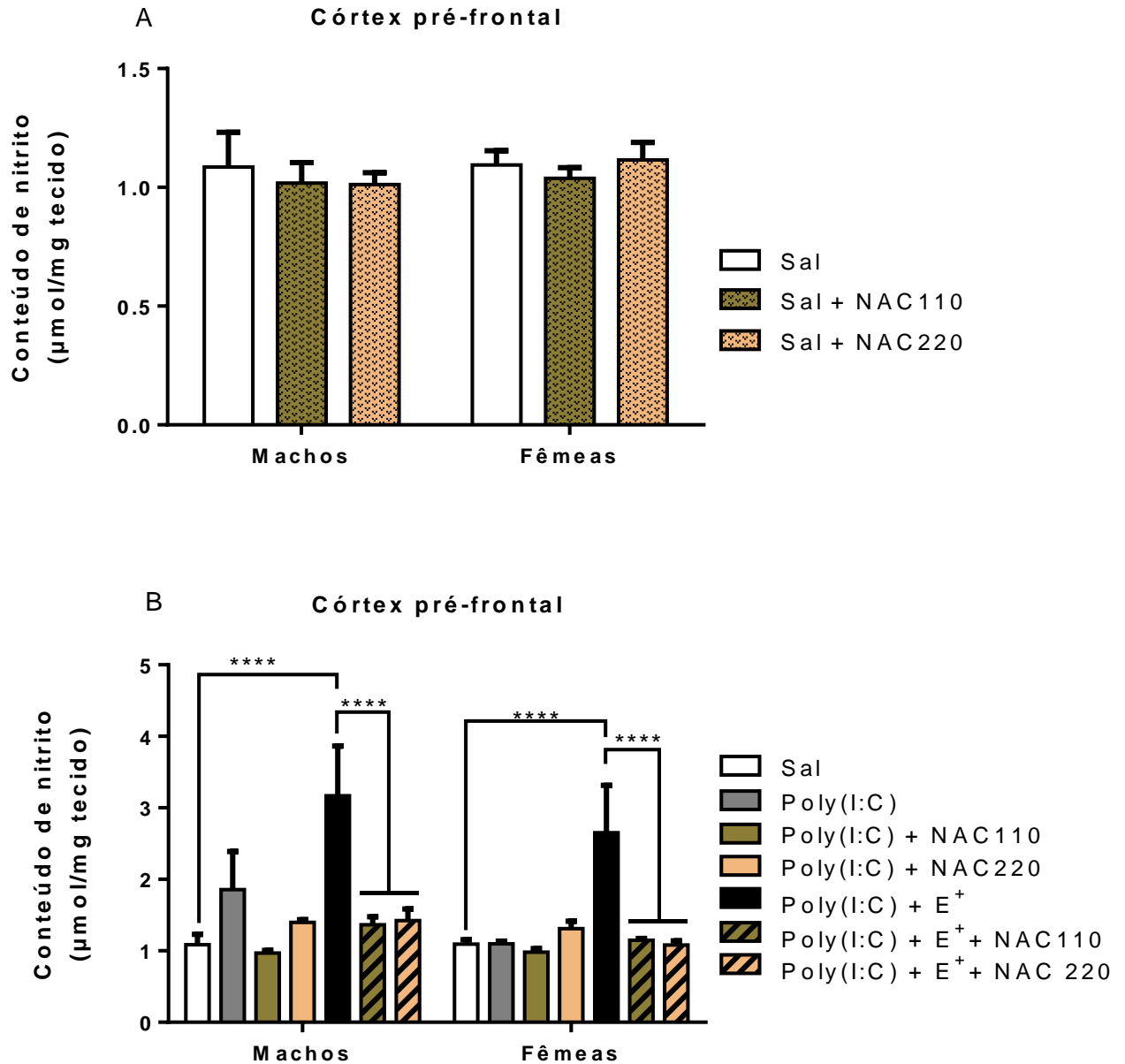


Os animais eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. No DPN30-59 os animais eram tratados com água, NAC 110mg/kg ou NAC 220mg/kg (v.o). As barras representam a média \pm E.P.M (n=10-15 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de quatro vias seguida pelo teste de Bonferroni. (*P < 0.05,**P<0.01,***P < 0.001,****P < 0.0001). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

Em relação aos níveis de nitrito, uma interação significativa entre “estresse na adolescência” e “droga” foi observada no CPF [$F(2,62)=16.897$, $P<0.0001$]. Não foram observadas diferenças significativas entre machos e fêmeas tratados com salina + ambas as doses de NAC quando comparados aos controles (Fig. 30A). Níveis diminuídos de nitrito foram detectados tanto nos ratos machos quanto nas fêmeas expostos a combinação de poly(I:C) + estresse + ambas as doses de NAC, sendo essa redução significativa em relação aos grupos poly(I:C) + estresse de ambos os sexos ($P<0.0001$) (Fig. 30B).

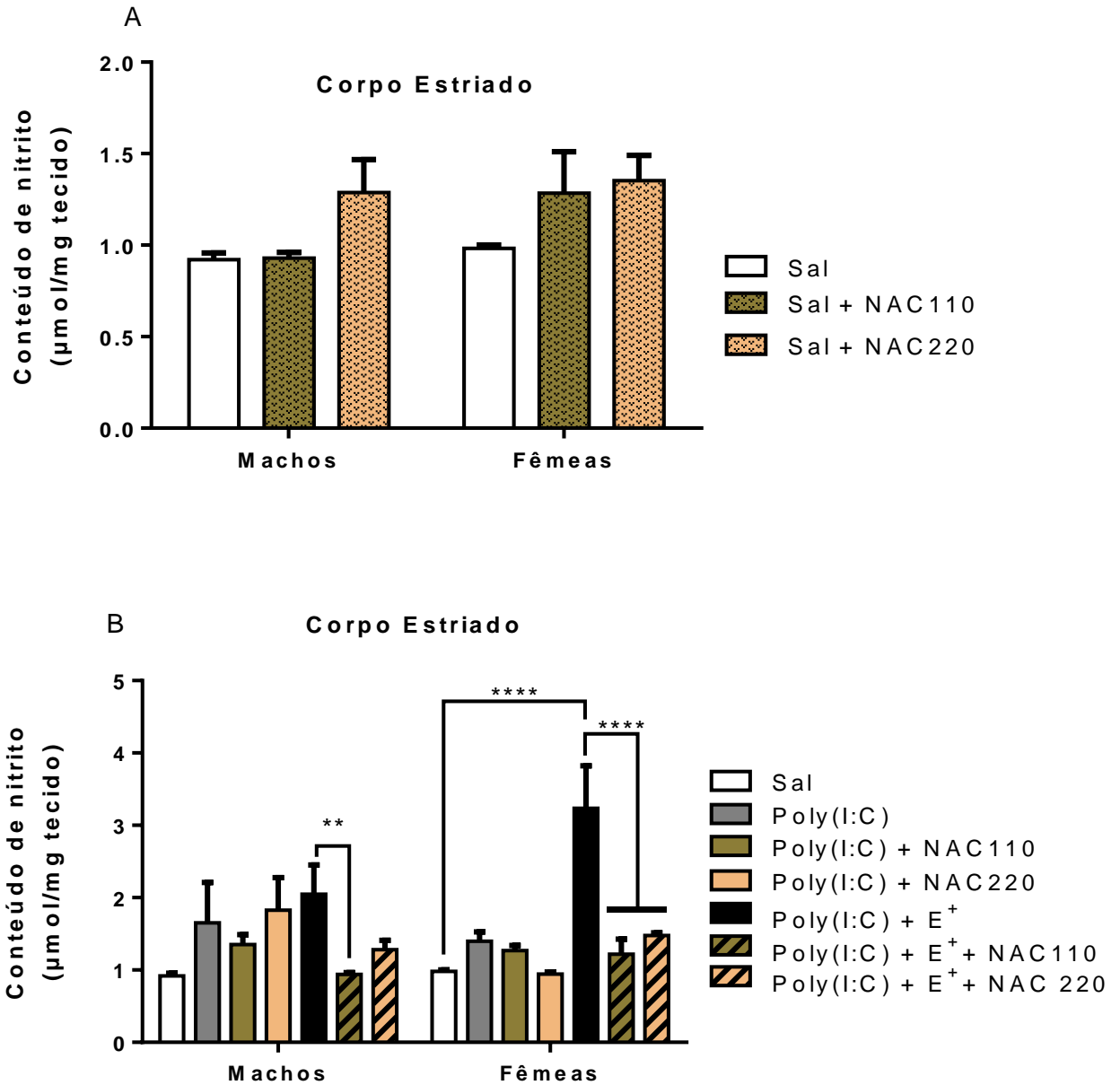
No CE houve uma significativa interação de três vias entre “sexo”, “tratamento neonatal” e “estresse na adolescência” [$F(1,60)=4.274$, $P=0.043$]. Não foram observadas diferenças significativas entre machos e fêmeas tratados com salina + ambas as doses de NAC quando comparados aos controles (Fig. 31A). Nessa área cerebral, fêmeas submetidas aos dois desafios + ambas as doses de NAC apresentaram níveis significativamente menores de nitrito quando comparadas as fêmeas dois desafios não tratadas ($P<0.0001$). Nos machos, essa diferença significativa só foi observada com a menor dose de NAC ($P=0.008$) (Fig. 31B).

Fig. 30. Efeito da NAC110 e NAC220 nos níveis de Nitrito no córtex pré-frontal de animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E⁺) (B).



Os animais eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. No DPN30-59 os animais eram tratados com água, NAC 110mg/kg ou NAC 220mg/kg (v.o). As barras representam a média \pm E.P.M (n=10-15 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de quatro vias seguida pelo teste de Bonferroni. (*P < 0.05,**P<0.01,***P < 0.001,****P < 0.0001). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

Fig. 31. Efeito da NAC110 e NAC220 nos níveis de Nitrito no corpo estriado de animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E⁺) (B).



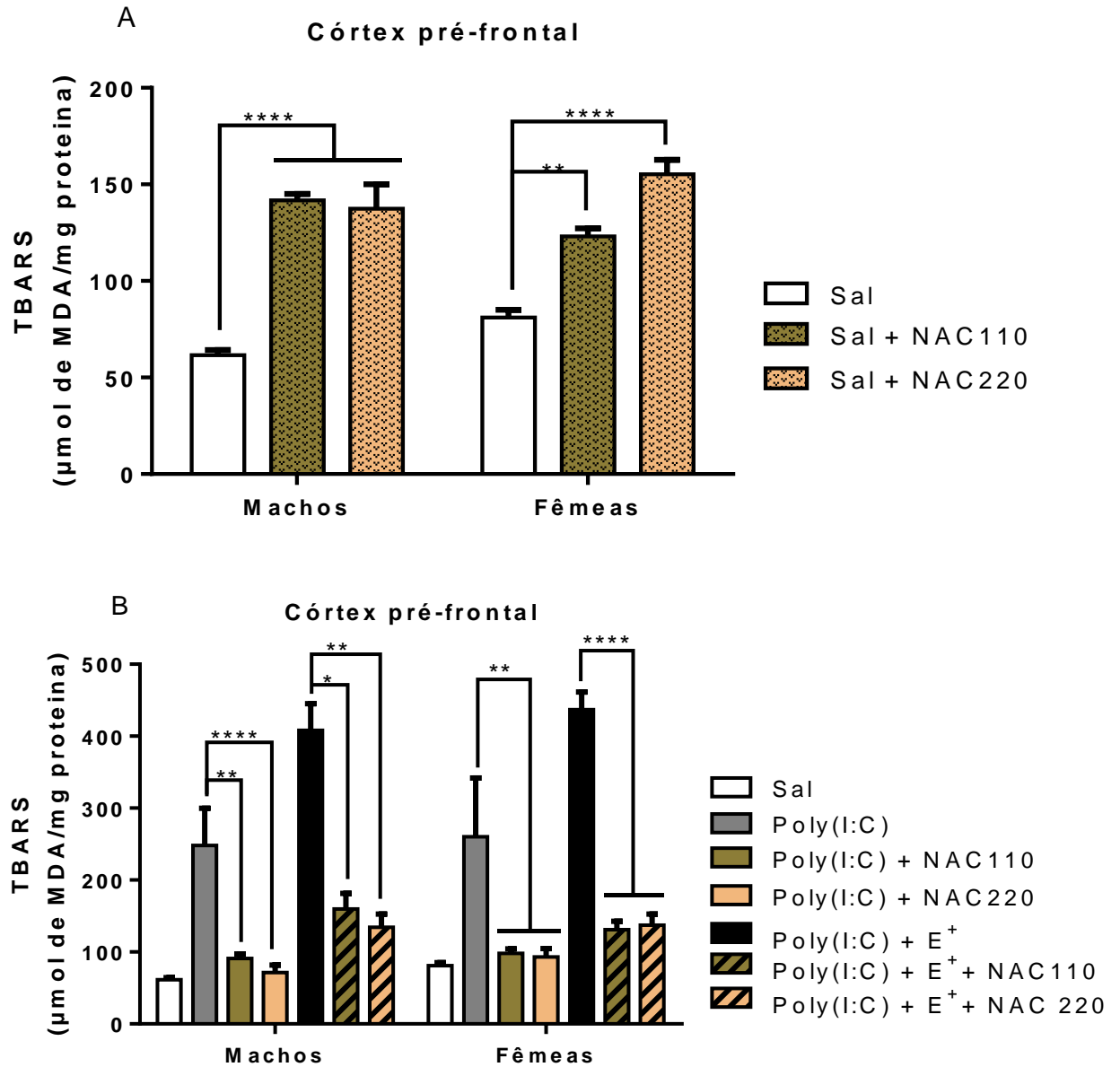
Os animais eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. No DPN30-59 os animais eram tratados com água, NAC 110mg/kg ou NAC 220mg/kg (v.o). As barras representam a média \pm E.P.M (n=10-15 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de quatro vias seguida pelo teste de Bonferroni. (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

Em relação à análise de peroxidação lipídica no CPF, foi observada uma interação de duas vias entre “tratamento neonatal” e “droga” [$F(2,80)=21.178, P<0.0001$]. O tratamento com NAC mostrou um aumento dos níveis de TBARS em machos ($P<0.0001$) e fêmeas (NAC110: $P=0.004$, NAC220: $P<0.0001$) tratados com salina quando comparados aos controles (Fig. 32A). Machos e fêmeas ($P<0.0001$) submetidos aos dois desafios e tratados com NAC110 (machos: $P=0.01$) e NAC220 (machos: $P=0.002$) apresentaram uma redução nos níveis de TBARS quando comparados aos expostos aos dois desafios sem tratamento. Diminuição semelhante foi observada nos machos e fêmeas tratados com poly(I:C) + NAC110 ($P=0.002$) e poly(I:C) + NAC220 (fêmeas: $P=0.002$, machos: $P<0.0001$) quando comparados aos tratados apenas com poly(I:C) neonatal (Fig. 32B).

Em relação ao CE houve uma interação de duas vias entre “tratamento neonatal” e “droga” [$F(2,77)=14.356, P<0.0001$]. Não foram observadas diferenças significativas entre machos e fêmeas tratados com salina + ambas as doses de NAC quando comparados aos controles (Fig. 33A). As fêmeas dos grupos dois desafios + NAC110 ($P=0.048$) e NAC220 ($P=0.044$) mostraram uma redução significativa na peroxidação lipídica quando comparadas às fêmeas expostas aos dois desafios não tratadas. Machos submetidos apenas a poly(I:C) + ambas as doses de NAC ($P<0.0001$) apresentaram diminuição de TBARS quando comparados aos machos submetidos apenas a poly(I:C).

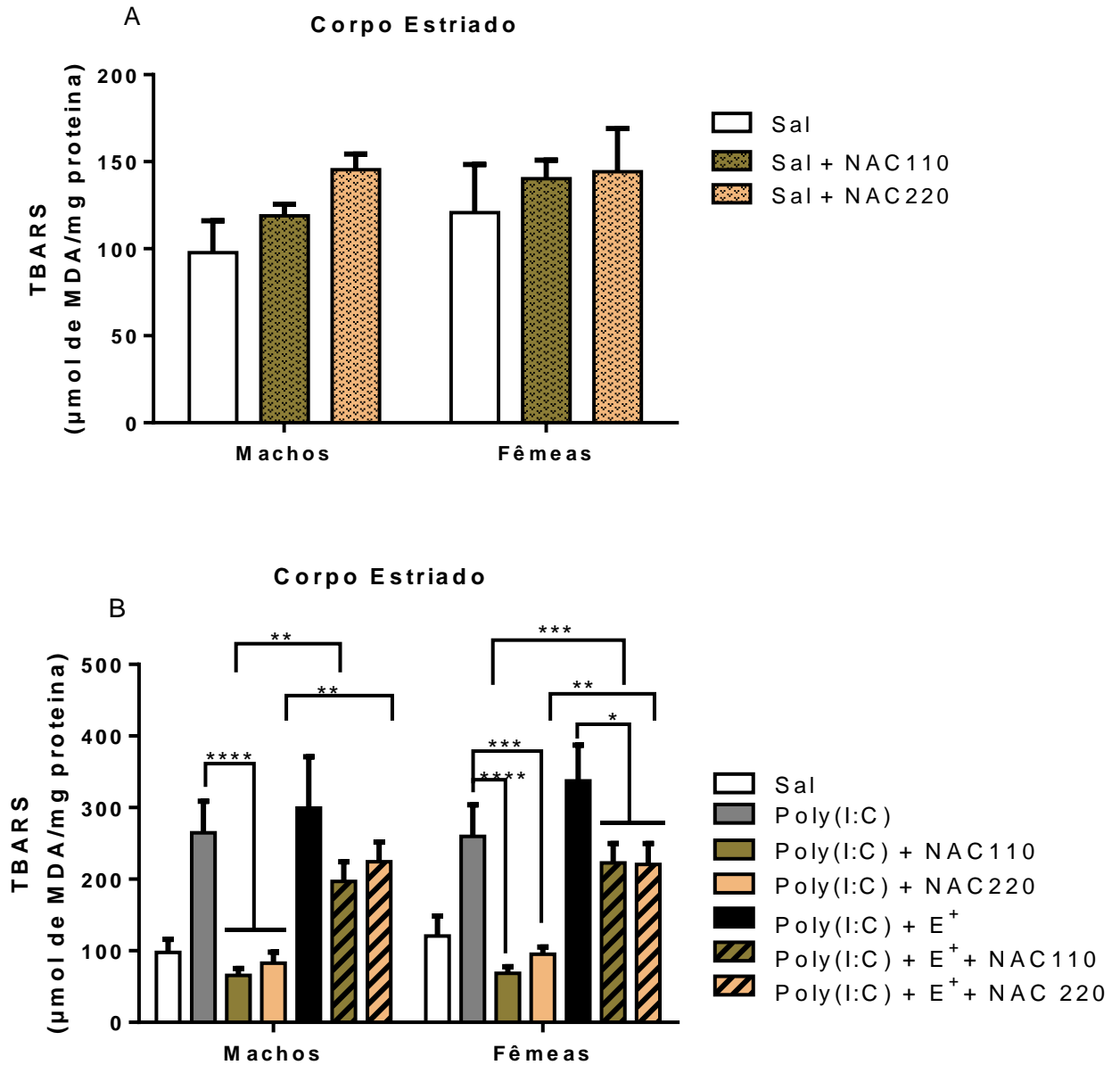
Fêmeas poly(I:C) + NAC110 ($P<0.0001$) e fêmeas poly(I:C) + NAC220 ($P=0.001$) também mostraram diminuição significativa de TBARS quando comparadas as fêmeas poly(I:C). Por último, houve um aumento de peroxidação lipídica quando aos animais submetidos ao primeiro desafio + NAC era acrescido o segundo desafio, demonstrado através das seguintes diferenças significativas: Fêmeas: poly(I:C) + NAC110 versus poly(I:C) + estresse + NAC110 ($p=0.001$), poly(I:C) + NAC220 versus poly(I:C) + estresse + NAC220 ($p=0.005$); Machos: poly(I:C) + NAC110 versus poly(I:C) + estresse + NAC110 ($p=0.004$), poly(I:C) + NAC220 versus poly(I:C) + estresse + NAC220 ($p=0.002$) (Fig. 33B).

Fig. 32. Efeito da NAC110 e NAC220 nos níveis de TBARS no córtex pré-frontal de animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E⁺) (B).



Os animais eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. No DPN30-59 os animais eram tratados com água, NAC 110mg/kg ou NAC 220mg/kg (v.o). As barras representam a média ± E.P.M (n=10-15 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de quatro vias seguida pelo teste de Bonferroni. (*P < 0.05,**P<0.01,***P < 0.001,****P < 0.0001). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

Fig. 33. Efeito da NAC110 e NAC220 nos níveis de Nitrito no corpo estriado de animais submetidos a nenhum desafio (A) a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E⁺) (B).



Os animais eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. No DPN30-59 os animais eram tratados com água, NAC 110mg/kg ou NAC 220mg/kg (v.o). As barras representam a média ± E.P.M (n=10-15 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de quatro vias seguida pelo teste de Bonferroni. (*P < 0.05,**P<0.01,***P < 0.001,****P < 0.0001). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

7.3. Discussão

Nossos resultados mostraram que a administração de NAC durante a fase da periadolescência de machos e fêmeas preveniu parcialmente as anormalidades comportamentais e oxidativas do tipo esquizofrenia induzidas pelo modelo de dois desafios. Observamos uma influência do sexo nos efeitos da NAC na avaliação de algumas alterações comportamentais induzidas pelos desafios. Neste contexto, fêmeas expostas ao poly(I:C) + estresse foram prevenidas das alterações na inibição pré-pulso quando tratadas com NAC. Machos e fêmeas submetidos aos dois desafios e tratados com NAC foram prevenidos das alterações na memória de trabalho, na atividade locomotora e na interação social. Nos parâmetros oxidativos, observamos uma prevenção nas alterações nos níveis de nitrito e da peroxidação lipídica no CPF (ambos os sexos) e CE (apenas fêmeas) de animais submetidos aos dois desafios.

Dessa forma, nossos resultados sugerem que o efeito preventivo da NAC é dependente do sexo em algumas situações específicas já que foram encontradas interações de três vias entre sexo, droga e tratamento neonatal, e sexo, droga e estresse na adolescência. Assim, diferenças hormonais entre machos e fêmeas durante a maturação peripuberal parece ter uma influência na efetividade do tratamento com NAC em prevenir alterações comportamentais e bioquímicas a longo prazo, com as fêmeas respondendo melhor, em algumas situações, a este antioxidante do que os machos. Corroborando nossos resultados, dados clínicos e experimentais sugerem que as fêmeas tem um melhor potencial antioxidante do que os machos (BHATIA et al., 2012). Esses estudos indicam que existe uma aparente associação entre o sexo e o estresse oxidativo, onde as mulheres parecem ser menos suscetíveis ao estresse oxidativo (KANDER; CUI; LIU, 2017).

Nas fêmeas, o efeito benéfico da NAC na deficiência de IPP é consistente com o efeito benéfico dessa droga revelado em outros modelos animais que capturam anormalidades nesses domínios comportamentais, como por exemplo o estudo de Chen e colaboradores (2010) que mostrou que a NAC amenizou significativamente os déficits de IPP observados em ratos knockout para o receptor metabotrópico de glutamato (mGluR5), considerado um modelo que induz anomalias comportamentais relevantes para a esquizofrenia baseados na redução da função glutamatérgica.

Com relação ao efeito da NAC na atividade locomotora, fêmeas e machos expostos aos dois desafios e tratados com ambas as doses de NAC apresentaram uma redução da atividade locomotora quando comparados aos animais dois desafios não tratados. Ou seja, NAC

preveniu os sintomas positivos tipo esquizofrenia nesses animais. Estudo prévio mostrou que NAC foi capaz de prevenir a hiperlocomoção observada em ratos tratados com metanfetamina, uma droga associada a esquizofrenia (FUKAMI et al., 2004; LI et al., 2014). Já os animais tratados com poly(I:C) e NAC mantiveram o mesmo nível de atividade locomotora que aqueles submetidos apenas à poly(I:C), níveis estes semelhante aos dos controles. Parece, portanto, que o fator determinante tanto para a expressão do sintoma quanto para a resposta à NAC é a associação entre os dois desafios. Esses dados validam o modelo de dois desafios, o qual afirma que o primeiro desafio não vai resultar em manifestações clínicas, mas sim deixa o indivíduo mais vulnerável a um futuro segundo desafio (FEIGENSON; KUSNECOV; SILVERSTEIN, 2014).

Em nosso estudo, a administração pré-sintomática de NAC não levou a resultados comportamentais adversos em animais controles que foram expostos a nenhum, a apenas um ou aos dois insultos ambientais. Com exceção dos resultados obtidos na avaliação do número de entradas na zona central do campo aberto, onde foi observado que a maior dose de NAC promoveu uma piora no comportamento tipo ansioso de machos submetidos a nenhum insulto ou ao desafio imune pós-natal com poly(I:C). O teste do campo aberto está bem validado para mensurar o comportamento tipo ansioso nos roedores (HALENE et al., 2009). A zona central do campo aberto é uma área aberta bem iluminada e considerada pelo animal um ambiente potencialmente perigoso (SHEPHERD et al., 1994). Assim, a diminuição do número de entradas na zona central do campo aberto pelos machos tratados com a maior dose de NAC significa que os mesmos passaram mais tempo percorrendo a periferia do campo aberto, característica de ansiedade denominada tigmotaxia (OUHAZ et al., 2015). Nossos resultados reforçam estudos prévios que mostraram que especificamente no teste de campo aberto ratos machos exibem mais ansiedade do que ratas fêmeas ao examinar o parâmetro da tigmotaxia (KOKRAS; DALLA, 2014).

Estudo semelhante recente utilizando o modelo de ativação imune pré-natal no 9º dia de gestação e o estresse na puberdade do 30º ao 40º dia de vida da prole mostrou que a administração da NAC através da água durante o período do estresse falhou em prevenir o comportamento tipo ansioso (HERRMANN; GIOVANOLI; ELISABETSKY, 2016). Entretanto, em nosso estudo as fêmeas tratadas com poly(I:C) e a menor dose de NAC mostraram melhora no comportamento tipo ansioso. Quanto à ensaios clínicos, há uma escassez nesse tipo de estudo controlado relacionando as potenciais aplicações de NAC no tratamento da ansiedade, o que torna difícil discutir o efeito da NAC neste transtorno (MINARINI et al., 2017).

Quanto ao teste de interação social percebemos que os machos submetidos ao desafio imune com poly(I:C) e tratados com ambas as doses de NAC não mostraram uma melhora significativa na interação social. Esses resultados corroboram estudo recente que, de maneira semelhante, não mostrou resultado significativo em relação a interação social de camundongos machos tratados de maneira subaguda com uma dose de 100mg/kg de NAC (SANTOS et al., 2017). Parece, portanto, que o comportamento ansioso previamente relatado contribuiu para a pobre interação social observada nos machos desse grupo. Entretanto, quando submetidos aos dois insultos e tratados com NAC houve uma melhora no comportamento de interação social, sendo que nas fêmeas essa melhora só foi observada com a maior dose de NAC. Estudo recente mostrou que o tratamento com NAC preveniu os déficits de interação social induzidos na prole de ratas prenhas desafiadas imunologicamente com quetamina (PHENSY et al., 2017).

Observamos que ambas as doses de NAC foram capazes de prevenir déficit na memória de trabalho em machos e fêmeas causado pelo desafio imune neonatal sozinho ou combinado com o estresse. Um estudo utilizando modelo de desafio imune pré-natal com LPS mostrou que o tratamento com NAC às ratas prenhas, na dose de 500mg/kg/dia, promoveu uma melhora na memória de trabalho dos filhotes, sugerindo que esta droga pode ser clinicamente usada mesmo após episódios imuno-inflamatórios (LANTÉ et al., 2008).

O estresse psicossocial tem sido cada vez mais associado ao estresse oxidativo e às vias inflamatórias. Ratos socialmente isolados no início da vida desenvolvem déficits na inibição pré-pulso, memória de reconhecimento, comportamento social e citocinas anti-inflamatórias, efeitos que poderiam ser revertidos pelo tratamento combinado de clozapina e NAC (MÖLLER et al., 2013).

Em relação ao estresse oxidativo nossos resultados mostraram que em animais submetidos a nenhum desafio, ou seja, tratados apenas com salina, NAC promoveu um prejuízo nos níveis do antioxidante GSH no CE e CPF de fêmeas (ambas as doses) e no córtex pré-frontal dos machos (apenas a maior dose). Esses resultados podem ser explicados pelo mecanismo de *feedback* negativo na síntese de GSH, que faz com que este metabólito, em altas concentrações, iniba a enzima glutamato-cisteína ligase (GCL) (GRIFFITH, 1999). O efeito protetor de NAC, portanto, se dá em contextos metabólicos carentes de GSH, ou seja, se GSH já é abundante, a inibição da síntese de mais glutatona por este mecanismo auto-regulatório culminará na ausência dos efeitos protetores de NAC mediados por GSH (RUSHWORTH; MEGSON, 2014). De fato, um estudo com voluntários saudáveis mostrou que o tratamento oral com NAC durante seis semanas nas doses de 1.6 e 2.4g por dia reduziu em 48% os níveis de glutatona (KLEINVELD; DEMACKER; STALENHOEF, 1992).

Curiosamente, a NAC não aumentou os níveis de GSH de animais que foram submetidos aos dois insultos. Provavelmente isso pode ter ocorrido pelo fato de que o modelo de dois desafios proporcionou um déficit de GSH em excesso, o qual a NAC não foi capaz de reverter. No entanto, quando submetidos apenas ao desafio imune com poly(I:C) a menor dose de NAC preveniu os déficits de GSH nas duas áreas cerebrais estudadas, apenas nas fêmeas. Assim, consideramos que o estresse é um fator relevante para que a NAC não consiga exercer seu papel de doadora da cisteína e, portanto, precursora de GSH. Em nosso protocolo experimental não foi delimitado um grupo apenas submetido ao estresse e tratado com NAC. Portanto, estudos posteriores precisam ser realizados para compreendermos melhor o papel dos eventos estressores sozinhos na fase da periadolescência e sua relação com a ação antioxidante da NAC. O fato de que a NAC só teve ação benéfica nas fêmeas pode ser explicado pelo efeito protetor benéfico que o estrógeno exerce sobre o estresse oxidativo (NICKELSON et al., 2012).

Observamos que NAC promoveu uma redução nos níveis de nitrito no CPF e CE de machos (apenas a menor dose no CE) e fêmeas (ambas as doses). Esses resultados condizem com os estudos que propõem que NAC é capaz de modular a produção de NO através de um efeito inibitório sobre iNOS, muito provavelmente agindo em um dos eventos que levam à indução da enzima. A administração de NAC em animais desafiados por LPS promoveu uma redução nos níveis plasmáticos de nitrito/nitrato e nitrosil hemoglobina (NO-hb) (BERGAMINI et al., 2001). Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram que animais submetidos ao poly(I:C) neonatal apresentam aumento progressivo, entre a adolescência e idade adulta, de iNOS em áreas cerebrais relevantes para a esquizofrenia (RIBEIRO et al., 2013).

Em relação aos níveis de peroxidação lipídica, quando os animais eram expostos ao desafio imune neonatal com poly(I:C) e tratados com NAC na fase peri-puberal houve uma redução nos níveis de peroxidação lipídica de machos e fêmeas, quando comparadas aos animais expostos apenas ao desafio imune. Estudos sugerem que a NAC atua através de diferentes vias metabólicas subjacentes à patofisiologia de várias desordens psiquiátricas e neurológicas e, por isso, pode gerar diferentes respostas (DEEPMALA et al., 2015). Efeitos da NAC semelhantes aos encontrados em nosso estudo foram observados em outras desordens psiquiátricas. Em um modelo animal de mania a administração combinada de antioxidantes (NAC e deferoxamina) preveniu o aumento da peroxidação lipídica (ARENT et al., 2015). Além disso, o tratamento com NAC inibiu a peroxidação lipídica e aumentou a atividade de GSH em modelo de doença de Alzheimer (HUANG et al., 2010). Em estudos clínicos, a NAC promoveu uma melhora na desregulação do sistema redox em pacientes esquizofrênicos (CARMELI et al., 2012).

Interessantemente, ao tratarmos com NAC os animais submetidos apenas à salina verificamos um aumento da peroxidação lipídica no CPF de machos e fêmeas. Provavelmente isso pode ter ocorrido pelo fato de que o suplemento com NAC em animais que possuem níveis normais de GSH promoveu a ativação do trocador cistina/glutamato, fazendo com que ocorresse uma saída de glutamato dos astrócitos. Esse glutamato, em excesso, ativará os receptores do tipo NMDA, promovendo um influxo de cálcio e, portanto, um aumento da peroxidação lipídica e dano celular (DEAN; GIORLANDO; BERK, 2011).

Observamos que ao suplementarmos com NAC os animais submetidos aos dois desafios observamos uma melhora nos níveis de nitrito e TBARS, em relação aos animais submetidos aos dois desafios e não tratados. Entretanto, verificou-se que as fêmeas expostas aos dois desafios e tratadas com ambas as doses de NAC apresentaram maiores níveis de peroxidação lipídica no CE quando comparadas às fêmeas expostas apenas ao desafio imune e tratadas com NAC. Isso sugere que o estresse seja um fator delimitador que não permite que a NAC exerça seu papel de antioxidante em sua totalidade. De fato, os antioxidantes podem atuar de forma diferente, dependendo do estado redox do organismo e do meio celular, de modo que eles agem tanto como um antioxidante ou como um pró-oxidante (HARVEY et al., 2008; MÖLLER; SWANEPOEL; HARVEY, 2015). A este respeito, a localização da geração das EROs, a espécie gerada e a abundância relativa de antioxidantes endógenos na localidade são exemplos de fatores determinantes vitais do sucesso ou fracasso de um antioxidante administrado para ajudar a prevenir danos celulares (RUSHWORTH; MEGSON, 2014).

Observamos que no teste de IPP, que avalia sintomas positivos de esquizofrenia, as fêmeas responderam melhor ao tratamento com o antioxidante NAC. De fato, já é bem conhecido que as mulheres respondem melhor aos antipsicóticos do que os homens, inclusive exigindo menores doses desses medicamentos (SEEMAN; LANG, 1990), isso pode ser devido às propriedades do estrógeno em melhorar a eficácia dos antipsicóticos na esquizofrenia (HÄFNER et al., 1991a). Por outro lado, machos e fêmeas, foram prevenidos das alterações em memória de trabalho, interação social e hiperatividade induzidos pela exposição a um ou dois desafios. De maneira geral, a prevenção das alterações comportamentais pela NAC foi acompanhada da prevenção de alterações nos níveis de nitrito e peroxidação lipídica.

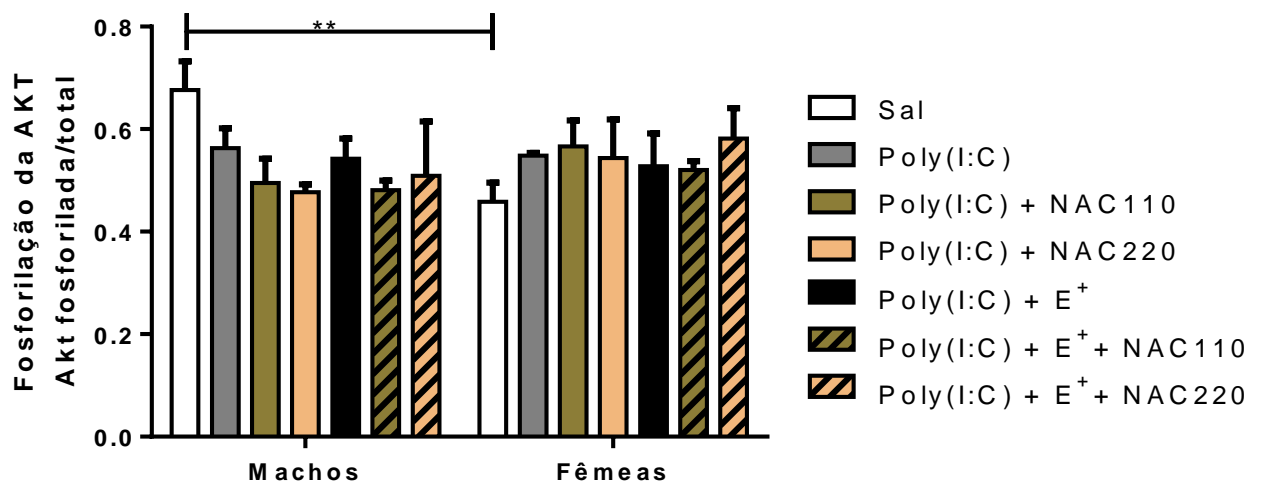
8. CAPÍTULO III

ESTUDO DAS VIAS NEUROQUÍMICAS DA ESQUIZOFRENIA

8.1. Resultados da avaliação de Akt-fosforilada/total

Na avaliação da ativação hipocampal da Akt não houve interação entre os fatores, entretanto verificou-se uma diminuição significativa nos níveis da Akt-fosforilada/Akt-total nos controles fêmeas quando comparados aos controles machos ($P=0.009$) (Fig. 34).

Fig. 34. Efeito da NAC110 e NAC220 na fosforilação da Akt no hipocampo de animais submetidos a um desafio (poly(I:C)) ou a dois desafios (poly(I:C) + E⁺).

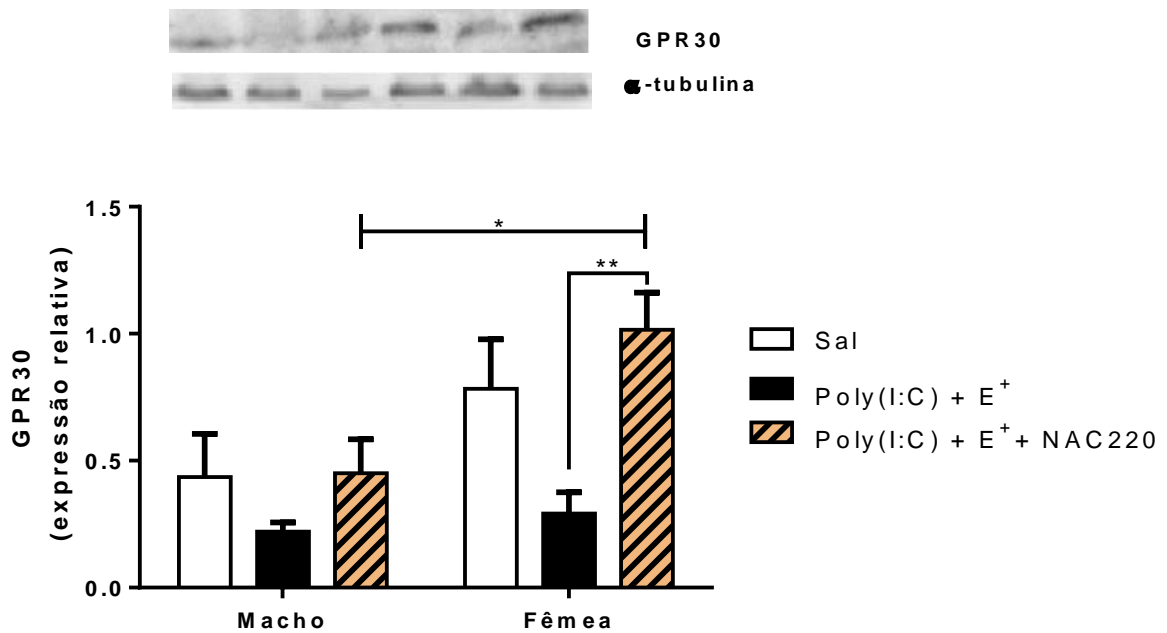


Os animais eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. No DPN30-59 os animais eram tratados com água, NAC 110mg/kg ou NAC 220mg/kg (v.o). As barras representam a média \pm E.P.M (n=5 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

8.2. Resultados da avaliação da expressão proteica do receptor GPR30

Na avaliação da expressão hipocampal do receptor GPR30 não houve interação entre os fatores, entretanto verificou-se uma diminuição significativa na expressão de GPR30 nos animais machos submetidos aos dois desafios e tratados com NAC220 quando comparados às fêmeas respectivas ($P=0.019$). Observamos também um aumento de GPR30 quando as fêmeas expostas aos dois desafios eram tratadas com NAC220 ($P=0.004$) (Fig. 35).

Fig. 35. Efeito da NAC220 na expressão de GPR30 no hipocampo de machos e fêmeas submetidos a poly(I:C) + estresse.

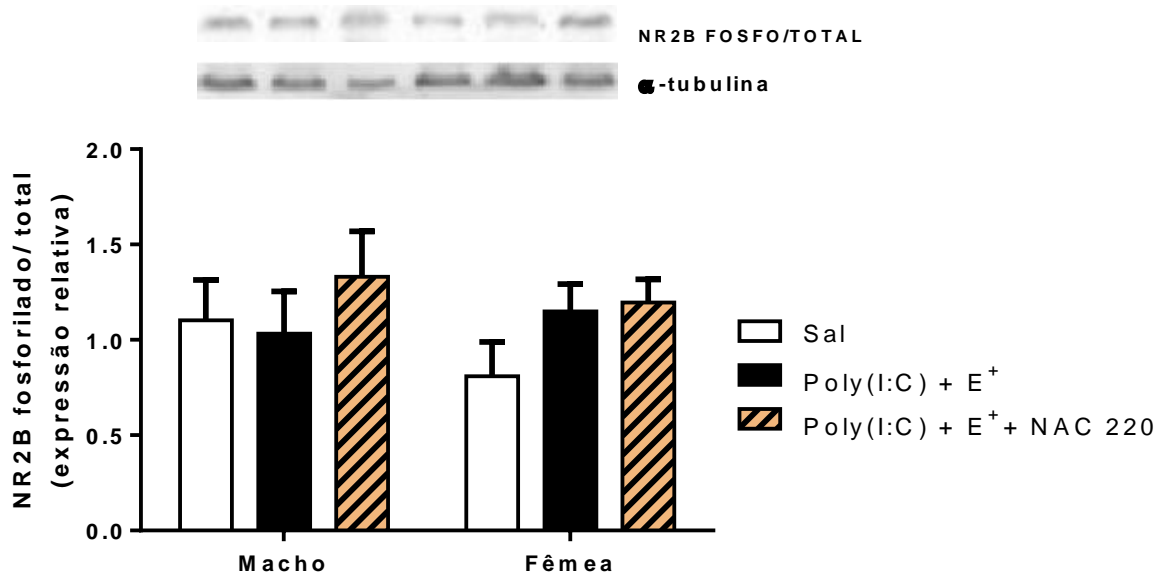


Os animais eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. No DPN30-59 os animais eram tratados com água, NAC 110mg/kg ou NAC 220mg/kg (v.o). As barras representam a média \pm E.P.M (n=5 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

8.3. Resultados da avaliação da expressão proteica de NR2B fosforilado/ total

Na avaliação da expressão hipocampal do receptor NR2B ativado, ou seja, fosforilado em relação ao NR2B total não houve interação entre os fatores nem diferenças significativas entre os grupos (Fig. 36).

Fig. 36. Efeito da NAC220 na expressão de NR2B fosforilado no hipocampo de machos e fêmeas submetidos a poly(I:C) + estresse.

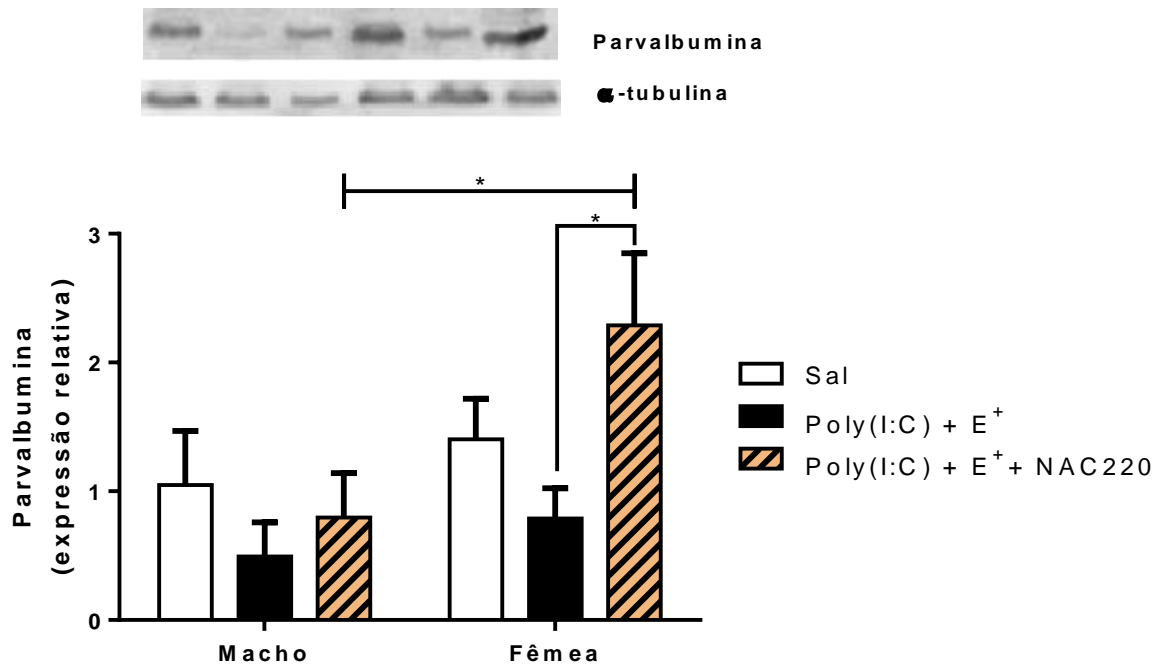


Os animais eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. No DPN30-59 os animais eram tratados com água, NAC 110mg/kg ou NAC 220mg/kg (v.o). As barras representam a média ± E.P.M (n=5 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

8.4. Resultados da avaliação da expressão proteica de parvalbumina

Na avaliação da expressão hipocampal de PV não houve interação entre os fatores, entretanto verificou-se um aumento significativo dessa proteína em fêmeas submetidas aos dois desafios e tratadas com NAC220 quando comparadas aos respectivos machos ($P=0.018$) e às fêmeas expostas aos dois desafios não tratadas ($P=0.45$) (Fig. 37).

Fig. 37. Efeito da NAC220 na expressão de parvalbumina no hipocampo de machos e fêmeas submetidos a poly(I:C) + estresse.

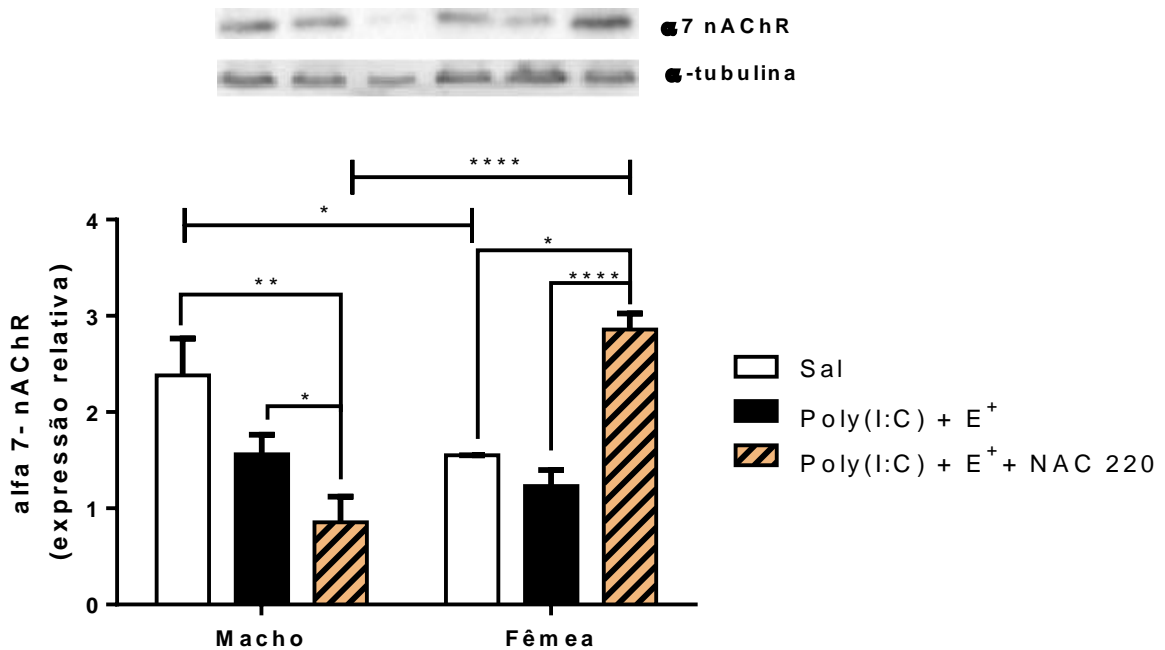


Os animais eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. No DPN30-59 os animais eram tratados com água, NAC 110mg/kg ou NAC 220mg/kg (v.o). As barras representam a média ± E.P.M (n=5 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

8.5. Resultados da avaliação da expressão do receptor $\alpha 7$ -nAChR

Na avaliação da expressão hipocampal de $\alpha 7$ -nAChR houve uma interação de duas vias [F(1,20)= 26.353, P<0.0001], com um aumento significativo da expressão proteica de $\alpha 7$ -nAChR nas fêmeas submetidas aos dois desafios e tratadas com NAC220 quando comparadas aos respectivos machos, às fêmeas expostas aos dois desafios não tratadas (P<0.0001) e ao controle (P=0.001). Verificou-se que a expressão de $\alpha 7$ -nAChR nas fêmeas controles é significativamente menor do que nos machos (P=0.023). Além disso, os machos submetidos aos dois desafios + NAC220 mostraram uma menor expressão de $\alpha 7$ -nAChR quando comparados aos expostos apenas aos dois desafios sem tratamento (P=0.032) e ao controle (P=0.003) (Fig. 38).

Fig. 38. Efeito da NAC220 na expressão de $\alpha 7$ -nAChR no hipocampo de machos e fêmeas submetidos a poly(I:C) + estresse.

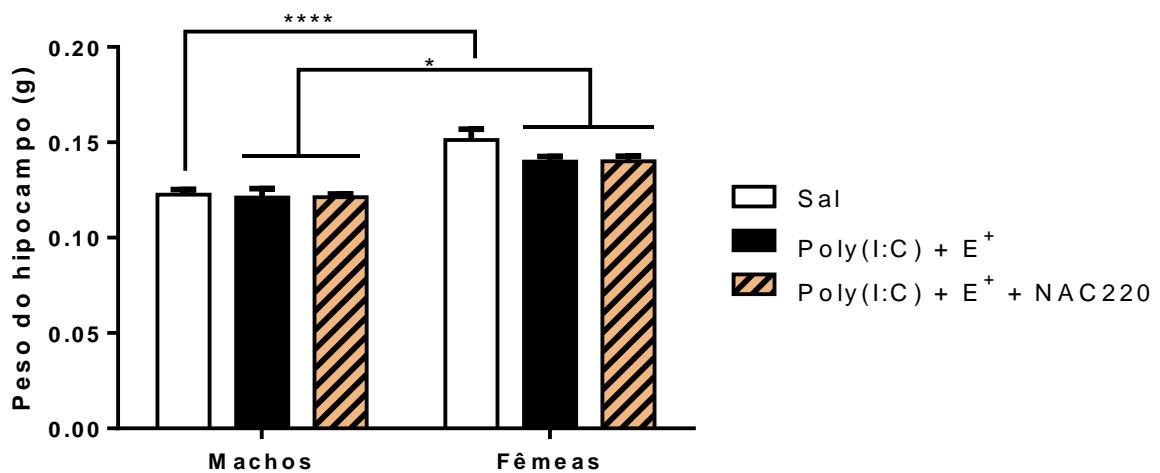


Os animais eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. No DPN30-59 os animais eram tratados com água, NAC 110mg/kg ou NAC 220mg/kg (v.o). As barras representam a média ± E.P.M (n=5 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

8.6. Resultado da avaliação do peso do hipocampo

Na avaliação do peso do hipocampo observamos que houve uma interação de duas vias [F(1,39)=47.76, P<0.0001], com um aumento significativo do volume hipocampal das fêmeas controles (P<0.0001), desafiadas (P=0.01) e desafiadas e tratadas com NAC (P=0.04) quando comparadas aos machos destes grupos respectivos (Fig.39).

Fig. 39. Efeito da NAC220 no volume do hipocampo de machos e fêmeas submetidos a poly(I:C) + estresse.



Os animais eram tratados com salina ou poly(I:C) 2mg/kg (i.p) no DPN5-7. No DPN40-48 os animais eram expostos ao estresse (E⁺) ou não. No DPN30-59 os animais eram tratados com água, NAC 110mg/kg ou NAC 220mg/kg (v.o). As barras representam a média ± E.P.M (n=5 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. (*P < 0.05, **P<0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001). Abreviações: Sal = salina; DPN = dia pós-natal; E⁺: estresse.

8.7.Discussão

Em relação ao estudo das vias de sinalização neuroquímicas observamos que as fêmeas tratadas apenas com salina apresentaram uma menor fosforilação de Akt e uma menor expressão de $\alpha 7$ -nAChR do que os machos. Além disso, fêmeas do grupo poly(I:C) + estresse + NAC220 apresentaram níveis maiores de expressão de GPR30, PV e $\alpha 7$ -nAChR quando comparadas aos machos deste grupo. Vale ressaltar que as fêmeas submetidas aos dois desafios e tratadas com NAC também mostraram um aumento de PV e $\alpha 7$ -nAChR quando comparadas as fêmeas expostas aos dois desafios, mas não tratadas. Quanto aos machos, houve uma redução na expressão do receptor $\alpha 7$ -nAChR naqueles submetidos aos dois desafios + NAC220, quando comparamos aos submetidos apenas aos dois desafios, mas não tratados. Em relação à ativação da subunidade NR2B do receptor NMDA não foram identificadas alterações significativas.

Essas diferenças sexuais encontradas podem ser explicadas pelo desenvolvimento cerebral distinto entre os sexos. A mielinização neuronal ocorre mais cedo no cérebro femininos, assim como o estabelecimento de conexões neurais e a lateralização das funções cerebrais (TAYLOR, 1969). Isso resulta em maior maturidade relativa de cérebros femininos ao nascimento e subsequente menor vulnerabilidade ao trauma potencial do processo de nascimento (SEEMAN; LANG, 1990). Além disso, as propriedades neuroprotetoras do estrógeno pode parcialmente explicar a influência do sexo clinicamente (RAO; KÖLSCH, 2003).

Estudos sugerem que as concentrações de Akt total e Akt fosforilada estão diminuídas no CPF e HC na esquizofrenia (EMAMIAN, 2012), enquanto outros estudos não evidenciaram mudanças nas concentrações de Akt no CPF de pacientes com esquizofrenia (AMAR et al., 2008; IDE et al., 2006). Em nossos resultados não houve alteração significativa dos níveis de fosforilação de Akt entre os grupos experimentais, exceto entre os controles machos e fêmeas, onde os machos mostraram uma maior ativação de Akt em relação às fêmeas.

Já é bem conhecido que o estradiol ativa Akt em neurônios através do receptor de IGF-1 e da interação de receptores de estrógeno e PI3K (CARDONA-GOMEZ et al., 2004). No cérebro, o tratamento com estradiol aumenta fosforilação de Akt no hipocampo de ratas fêmeas ovariectomizadas e no estriado de camundongos machos da linhagem C57Bl/6 (D'ASTOUS et al., 2006; ZNAMENSKY et al., 2003). Isso sugere que a ativação de Akt pode ser um importante efeito das ações do estradiol no cérebro (SPENCER et al., 2008).

No entanto essa ativação depende do ciclo estral, assim como mostrou Spencer e colaboradores (2008), onde a Akt foi ativada em toda formação hipocampal dorsal de camundongos fêmeas durante a fase do proestro, na qual o estradiol encontra-se elevado, mas não na fase do diestro. Em nosso estudo não foi avaliado o ciclo estral das ratas fêmeas, dessa forma, sugere-se que possivelmente as fêmeas desse grupo estavam na fase do ciclo onde o estrógeno não se encontra elevado.

A regulação da sinalização da via Akt/GSK3 pelos receptores dopaminérgicos tem importantes influências modulares em algumas funções do receptor NMDA (CHEN et al., 2007). Foi relatado que a atividade de GSK3 regula a expressão e função de NR2B (LI et al., 2009). Um estudo recente mostrou que a modulação positiva de NR2B promove a fosforilação de Akt (SHEN et al., 2016). A relevância dessa informação é que em nosso estudo não foram encontradas diferenças significativas na ativação tanto de Akt quanto de NR2B. Além disso, quando comparadas aos machos do grupo controle, as fêmeas deste grupo mostraram tanto uma redução significativa na ativação de Akt quanto uma tendência na redução da ativação de NR2B.

Desde que a via da PI3K/Akt tem sido mostrada como sendo a maior sinalização consequente da estimulação de GPR30 pelo estrogênio (KOGANTI, 2015), investigamos a expressão do receptor GPR30 em nosso modelo. Em nossos resultados observamos uma diferença sexual entre os grupos submetidos aos dois desafios e tratados com NAC, com as fêmeas apresentando maior expressão de GPR30 do que os machos. Na mesma linha que nossos resultados, autores mostraram que os níveis de GPR30 em ratos machos eram comparáveis ao das fêmeas em metaestro, mas consideravelmente menores que os níveis vistos nas fêmeas em proestro e estro (SPARY et al., 2013). Dessa forma, essa diferença sexual na expressão de GPR30 em nosso estudo pode ter ocorrido pela influência dos níveis de estrógeno circulante entre machos e fêmeas. Outro resultado encontrado foi de que NAC preveniu a diminuição da expressão de GPR30 observada nas fêmeas expostas aos dois desafios. Um estudo recente sugere que o efeito antioxidante do 17 β -estradiol é reforçado na presença de NAC, identificado através da neuroproteção dos neurônios dopaminérgicos in vivo (BOTSAKIS et al., 2016).

Em modelos animais de esquizofrenia a NAC tem sido utilizada com sucesso para prevenir as mudanças na expressão dos interneurônios parvalbumina (PVIs) (CABUNGCAL et al., 2014), que acredita-se que são o centro de muitas mudanças na rede cerebral de pacientes esquizofrênicos (LEWIS et al., 2012). Por isso, resolvemos avaliar o efeito do nosso modelo e do tratamento com a NAC na expressão desses interneurônios. Observamos que o modelo de dois desafios não promoveu uma redução significativa da expressão hipocampal de PV. Um

estudo utilizando um modelo esquizofrenia por dois desafios semelhante ao nosso, com diferenças apenas na espécie (a deles foram camundongos) e na ativação imune com poly(I:C) (a deles foi realizada no 9º dia de gestação), mostrou que poly(I:C) e estresse interagiram sinergicamente para causar um déficit na expressão de PV no giro denteado ventral, embora nem a exposição única nem a combinada desses fatores mudaram a expressão de PV em outras regiões da formação hipocampo (GIOVANOLI; WEBER; MEYER, 2014). Esses resultados acrescentam à literatura em crescimento, sugerindo que a parte ventral do hipocampo é mais vulnerável do que a parte dorsal em relação às mudanças na expressão de PV após exposição aos estressores do desenvolvimento tais como o desafio imune pré-natal intenso (MEYER et al., 2008), inibição de neurogênese fetal (LODGE; BEHRENS; GRACE, 2009), ou aumento do estresse oxidativo durante a maturação peripubertal (CABUNGAL et al., 2013).

O efeito causal do estresse oxidativo na integridade dos PVI é fortemente apoiado pelo fato de que o estresse oxidativo induz o déficit de PVI na parte ventral do hipocampo, mas não na dorsal (STEULLET et al., 2010). Em nosso estudo, o tratamento com NAC preveniu a diminuição de PV em fêmeas submetidas aos dois desafios. De fato, o efeito protetor de antioxidantes na expressão de PV já foi amplamente estudado em vários modelos animais como: ratos submetidos ao isolamento social e tratados com o antioxidante apocinina (SCHIAVONE et al., 2009); ratos tratados com ketamina e com apocinina (BEHRENS et al., 2007); ratos knockout para GCLM e tratados com NAC (CABUNGAL et al., 2013).

Vale ressaltar que em nosso estudo esse aumento de PVI foi significativamente maior nas fêmeas quando comparadas aos machos, o que vai ao encontro dos resultados demonstrados por Wu e colaboradores (2013) onde a expressão de PV hipocampal aumenta gradualmente durante o desenvolvimento de camundongos fêmeas, enquanto que os machos não mostraram quaisquer mudanças significativas na expressão PV. Esta diferença de sexo sugere um papel dos hormônios esteroides sexuais na regulação do desenvolvimento de PVI no hipocampo.

O $\alpha 7$ -nAChR é conhecidamente expresso em menores quantidades em cérebros pós-morte de pacientes esquizofrênicos (DE LUCA et al., 2004). As regiões cerebrais de menor expressão, comparadas aos controles psiquiátricos, incluem as envolvidas no processamento de informações sensoriais, como o hipocampo (FREEDMAN et al., 1995). Em nosso estudo, as fêmeas controles mostraram uma menor expressão de $\alpha 7$ -nAChR do que os machos. Esse resultado não era esperado, já que há evidências de que a expressão cerebral de nAChRs pode ser induzida pelo estradiol (CENTENO et al., 2006). Diferentemente do nosso estudo, Koylu e colaboradores (1997) observaram níveis basais mais elevados de nAChRs no cerebelo de ratas fêmeas em comparação com machos (Koylu et al., 1997). Esses resultados se assemelham aos

encontrados nas avaliações da ativação de Akt e da expressão de NR2B, onde as fêmeas controles apresentaram menores níveis destas proteínas do que os machos. Mais uma vez sugerimos que provavelmente as fêmeas destes grupos encontravam-se em uma fase do ciclo estral onde o estrógeno não se encontra elevado. Não é de hoje que se sabe que durante a fase do ciclo estral de proestro, quando há um pico de estradiol e progesterona, há muitas mudanças fisiológicas, como por exemplo: aumentos na atividade fisiológica (KAWAKAMI; TERASAWA; IBUKI, 1970), plasticidade (TERASAWA; TIMIRAS, 1968), potenciação de longo prazo (WARREN et al., 1995), e densidade sináptica (GOULD et al., 1990) no hipocampo, que não são vistos durante as fases de metaestro e diestro do ciclo (caracterizadas por uma diminuição em estradiol e progesterona em relação ao proestro) (FRYE; PETRALIA; RHODES, 2000).

Entretanto, as fêmeas responderam melhor à NAC, já que aquelas submetidas aos dois desafios e tratadas com NAC mostraram um aumento de $\alpha 7$ -nAChR quando comparadas às fêmeas controles, às fêmeas desafiadas não tratadas e aos machos desafiados tratados com NAC. Os agonistas seletivos de $\alpha 7$ -nAChR tem mostrado um efeito positivo em diversos modelos animais de cognição (BOESS et al., 2007; YOUNG et al., 2009). Além disso, o tratamento com o agonista nicotínico PNU-282987 promoveu uma melhora na função sensório-motora (BODNAR et al., 2005), na memória (REDROBE et al., 2009) e na atividade locomotora de ratos (VICENS et al., 2013). Isso sugere que o efeito benéfico nos parâmetros comportamentais observados em fêmeas pode ter se dado pela remodelação neuronal dos receptores $\alpha 7$ -nAChR. Observamos também que nos machos desafiados e tratados com NAC houve uma piora na expressão de $\alpha 7$ -nAChR. De fato, as diferenças nas vias de nicotina entre roedores machos e fêmeas podem resultar diretamente dos diferentes níveis neuroesteróides corticais entre os sexos ou da translocação nuclear diferencial de receptores de esteróides. A progesterona tem sido relatada como um fator influenciador direto na função do receptor nicotínico através de modulação alostérica negativa de receptores de nicotina (BERTRAND et al., 1991; VALERA; BALLIVET; BERTRAND, 1992).

Vale ressaltar que em nossa pesquisa as fêmeas expostas aos dois desafios e tratadas com NAC tiveram um aumento na expressão de $\alpha 7$ -nAChR e PV. Esses resultados corroboram estudos que mostraram menor expressão de PV em camundongos $\alpha 7$ -nAChR knockout (ADAMS et al., 2008; FERNANDES et al., 2006).

O hipocampo é uma estrutura do lóbulo temporal medial de mamíferos que está implicada na formação de memórias episódicas e espaciais e no controle da emoção (KANDEL, 2012). Várias linhas de pesquisa mostraram que existem anomalias funcionais e estruturais no

hipocampo de pacientes com esquizofrenia, incluindo uma redução no volume hipocampal, alteração nas conexões sinápticas e mudanças nos receptores de neurotransmissores (HARRISON, 2004). Entre os muitos reguladores endógenos da função hipocampal, o estrogênio e progesterona se destacam por sua relevância para a saúde humana e doenças. Em seres humanos, o humor, a cognição e a ativação do hipocampo oscilam em resposta à circulação dos níveis de esteróides ovarianos durante todo o ciclo menstrual (ROSENBERG; PARK, 2002). Similarmente, em ratos e camundongos, a fase do ciclo estral modula a excitabilidade hipocampal e alguns comportamentos dependentes do hipocampo (KOROL et al., 2004; SCHARFMAN et al., 2003). Supomos, portanto, que há uma relação entre esta área cerebral e o estrógeno, e, por esse motivo, as dosagens neuroquímicas deste capítulo foram realizadas apenas no hipocampo, no sentido de tentar atrelar os resultados aqui encontrados às diferenças de sexo.

Nesse contexto, realizamos a comparação do peso desta área cerebral medido após a dissecação da mesma e observamos que as fêmeas dos três grupos experimentais avaliados neste capítulo apresentaram um hipocampo de maior tamanho do que os machos. Esses resultados corroboram os vistos em humanos, com as mulheres mostrando um hipocampo mais largo bilateralmente do que os homens (LENROOT; GIEDD, 2010). Além disso, seguem a mesma linha sugerida por Andrade e colaboradores (2000), que mostraram que a formação hipocampal pode ser sensível aos efeitos estruturais e organizacionais dos esteroides gonadais. Esses dados podem, em parte, explicar o porquê do aumento da expressão dos receptores GPR30, $\alpha 7$ -nAChR e de PV nas fêmeas quando comparadas aos machos.

Assim, fornecemos aqui evidências de que a NAC está associada a uma remodelação dos circuitos cerebrais, especialmente nas fêmeas, através do aumento da expressão dos receptores GPR30, $\alpha 7$ -nAChR e de PV, o que pode estar potencialmente vinculado às alterações comportamentais envolvidas nesse modelo. Os diferentes resultados entre os sexos aqui encontrados podem ser embasados pela influência do gênero na maturação cerebral (GEDDES, 2015) com evidências sugerindo que machos e fêmeas tem diferentes susceptibilidades às perturbações cognitivas induzidas pelo estresse (MARKHAM; MULLINS; KOENIG, 2013).

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo foi o primeiro a avaliar os efeitos da NAC nas diferenças de sexo observadas em machos e fêmeas em resposta à um modelo animal neurodesenvolvimental de esquizofrenia por “dois desafios”.

Aqui, fornecemos evidências de padrões de comportamento específicos do sexo de ratos expostos aos dois desafios, os quais são análogos aos sintomas da esquizofrenia adulta, com machos apresentando maior prejuízo social quando comparados com as fêmeas, sendo esta alteração comportamental associada a sintomas tipo esquizofrenia "negativos" (ELLENBROEK et al., 2000), enquanto as fêmeas apresentaram maiores déficits de IPP e hiperlocomção, o que mimetiza sintomas tipo esquizofrenia "positivos" (VAN DEN BUUSE, 2010), além de mudanças oxidativas no estriado, uma área do cérebro associada com sintomas positivos da esquizofrenia (VALKO et al., 2007). Ambos os sexos apresentaram déficit cognitivo.

Quanto ao efeito neuroprotetor da NAC, observamos que esta droga preveniu os sintomas tipo positivos, negativos, cognitivos, além de ter promovido uma melhora nos níveis de peroxidação lipídica e nitrito de ambos os sexos. Assim, nossos resultados fornecem mais um ponto de apoio para o redirecionamento de fármacos considerados seguros para serem utilizados na fase do pródromo da esquizofrenia, na tentativa de prevenir o aparecimento do primeiro episódio psicótico e melhorar os sintomas que aparecem nessa fase.

Entretanto, a NAC não apresentou um efeito positivo em relação à ansiedade nos animais submetidos aos dois desafios, e, apesar de ser uma droga antioxidante, não aumentou os níveis de GSH em animais submetidos aos dois insultos (exceto nas fêmeas submetidas ao desafio imune e ao tratamento com a menor dose de NAC). Além disso, quando utilizada em animais saudáveis, NAC promoveu uma redução dos níveis de GSH e um aumento da peroxidação lipídica em ambos os sexos e uma piora no comportamento tipo ansioso de machos. Esses dados reforçam a necessidade de selecionar com cautela e precisão os indivíduos que eventualmente serão submetidos ao tratamento preventivo com NAC.

Quanto à influência do sexo, observamos que as fêmeas expostas apenas ao desafio imune neonatal responderam melhor ao tratamento com NAC do que os machos deste grupo, como observado nos testes de IPP, interação social, número de entradas na zona central e níveis de GSH. Em relação aos animais submetidos aos dois desafios, observamos que as fêmeas também responderam melhor à NAC do que os machos, resultados vistos no teste de IPP e na

expressão de proteínas celulares relacionadas à esquizofrenia, com as fêmeas tratadas com NAC apresentando melhores níveis de expressão do receptor estrogênico GPR30, de parvalbumina e de $\alpha 7$ -nAChR, quando comparadas aos machos. Além disso, as fêmeas mostraram um hipocampo maior do que os machos. Esses resultados provavelmente denotam a proteção do estrógeno contra a perda de células nervosas e a preservação da conectividade neuronal, que pode ser crucial para atrasar o aparecimento da esquizofrenia (COHEN et al., 1999).

Acreditando na eficácia do estrógeno como um potencial foco terapêutico para o tratamento de transtornos com base neuroinflamatória, como a esquizofrenia, pretendemos realizar estudos posteriores para compreendermos melhor os mecanismos de interação entre os receptores estrogênicos, em especial o GPR30, e possíveis fármacos que atuem sobre ele, no sentido de colaborar para um futuro tratamento alternativo baseado em estrogênio que possa ser utilizado tanto em mulheres quanto em homens, sem causar nestes últimos os efeitos feminilizantes deste hormônio.

10. CONCLUSÃO

Concluimos neste estudo que machos e fêmeas apresentaram diferentes resultados comportamentais e neuroquímicos em resposta ao modelo de dois desafios e ao tratamento com NAC. Esses achados podem estar associados às alterações nos níveis hormonais de estrógeno entre machos e fêmeas, acrescentando, portanto, evidências ao estudo da influência do sexo em esquizofrenia pelo uso de modelos animais baseados no desafio neonatal com Poly(I:C) e estresse na peripuberdade. Dessa forma, nossos resultados apontam para uma forte interação entre desafio imune na fase neonatal e eventos estressores na adolescência contribuindo para o desenvolvimento de alterações comportamentais tipo esquizofrenia na idade adulta, os quais podem ser prevenidos, em parte, pelo tratamento com a NAC, mostrando que o uso deste antioxidante pode ser uma alternativa interessante para a condução de pesquisas com modelos animais com validade translacional em psiquiatria. Finalmente, nosso estudo pode estimular e orientar o desenho de pesquisas que abordem novas metas para intervenções sexo-específicas (preventivas ou terapêuticas) na esquizofrenia.

11. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Apesar de todas as provas pré-clínicas apresentadas aqui, este trabalho teve algumas limitações e, portanto, algumas questões ainda devem ser elucidadas no futuro:

1. Nós avaliamos os parâmetros comportamentais no PND60, que corresponde ao início da fase adulta dos animais, entretanto, sabe-se que os sintomas da esquizofrenia aparecem mais precocemente em homens do que em mulheres. Dessa forma, a avaliação comportamental deve ser feita em duas fases da vida, na peri-adolescência, antes do tratamento com a NAC e na fase adulta, após o tratamento com a NAC, no sentido de testar se esta droga, quando utilizada no pródromo, realmente promove uma melhora nesses sintomas e se há diferenças na manifestação dos sintomas entre machos e fêmeas dependendo da fase da vida.
2. Avaliamos se o possível efeito protetor da NAC poderia dever-se a sua capacidade antioxidante, ou de influenciar na fisiopatologia da esquizofrenia através das hipóteses glutamatérgica (avaliação da expressão de NR2B), colinérgica (avaliação da expressão de $\alpha 7$ -nAChR), gabaérgica (avaliação da expressão de PVIs) ou da sinalização celular pela via da Akt, entretanto, não avaliamos parâmetros inflamatórios. A mensuração de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL1 β e TNF α deve ser feita no sentido de responder o seguinte questionamento: O modelo de dois desafios promove um aumento dos marcadores pró-inflamatórios? Seria a NAC capaz de promover uma melhora nesses parâmetros?
3. Na avaliação das diferenças sexuais, mensuramos a expressão do receptor de estrógeno GPR30 em ambos os sexos. Entretanto, para tentar elucidar melhor o efeito dos hormônios em cada alteração comportamental e bioquímica os níveis hormonais de machos e fêmeas assim como a determinação do ciclo estral das ratas deve ser feita.

12. REFERÊNCIAS

- ABDUL-MONIM, Z.; NEILL, J. C.; REYNOLDS, G. P. Sub-chronic psychotomimetic phencyclidine induces deficits in reversal learning and alterations in parvalbumin-immunoreactive expression in the rat. **Journal of Psychopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 198–205, 16 mar. 2007.
- ABI-DARGHAM, A.; MOORE, H. Prefrontal DA Transmission at D1 Receptors and the Pathology of Schizophrenia. **The Neuroscientist**, v. 9, n. 5, p. 404–416, out. 2003.
- ADAMS, C. E. et al. Altered hippocampal circuit function in C3H $\alpha 7$ null mutant heterozygous mice. **Brain Research**, v. 1194, p. 138–145, fev. 2008.
- ADDINGTON, J.; HEINSEN, R. Prediction and Prevention of Psychosis in Youth at Clinical High Risk. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 8, n. 1, p. 269–289, 27 abr. 2012.
- AL-ASMARI, A.; KHAN, M. W. Inflammation and schizophrenia. **Human & Experimental Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 115–122, 8 fev. 2014.
- ALMEIDA, D. M.; KESSLER, R. C. Everyday stressors and gender differences in daily distress. **Journal of personality and social psychology**, v. 75, n. 3, p. 670–80, set. 1998.
- AMAR, S. et al. Possible involvement of post-dopamine D2 receptor signalling components in the pathophysiology of schizophrenia. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 2, 6 mar. 2008.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. [s.l.] American Psychiatric Association, 2013.
- 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, 5 abr. 2013.
- ANDRADE, J. P.; MADEIRA, M. .; BARBOSA, P. M. M. Sexual dimorphism in the subiculum of the rat hippocampal formation. **Brain Research**, v. 875, n. 1–2, p. 125–137, 2000.
- ANGRIST, B.; KAMMEN, D. P. VAN. CNS stimulants as tools in the study of schizophrenia. **Trends in Neurosciences**, v. 7, n. 10, p. 388–390, out. 1984.
- ARARIPE NETO, A. G. DE A.; BRESSAN, R. A.; BUSATTO FILHO, G. Fisiopatologia da esquizofrenia: aspectos atuais. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 34, p. 198–203, 2007.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim Behav**, v. 21, n. 2, p. 205–235, 1973.
- ARENT, C. O. et al. The effects of n-acetylcysteine and/or deferoxamine on manic-like behavior and brain oxidative damage in mice submitted to the paradoxal sleep deprivation

model of mania. **Journal of Psychiatric Research**, v. 65, p. 71–79, jun. 2015.

ARICIOGLU, F. et al. Neuroinflammation in schizophrenia: a critical review and the future. **Bulletin of Clinical Psychopharmacology**, v. 24, n. 4, p. 429–437, 2016.

ATLADOTTIR, H. O. et al. Autism After Infection, Febrile Episodes, and Antibiotic Use During Pregnancy: An Exploratory Study. **PEDIATRICS**, v. 130, n. 6, p. e1447–e1454, 1 dez. 2012.

AYANO, G. Schizophrenia: A Concise Overview of Etiology, Epidemiology Diagnosis and Management: Review of literatures. **Journal of Schizophrenia Research**, v. 3, n. 2, p. 1026, 2016.

BAIMBRIDGE, K. G.; CELIO, M. R.; ROGERS, J. H. Calcium-binding proteins in the nervous system. **Trends in neurosciences**, v. 15, n. 8, p. 303–8, ago. 1992.

BAKER, D. A. et al. The Origin and Neuronal Function of In Vivo Nonsynaptic Glutamate. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 20, 2002.

BAKSHI, V. P. et al. Enduring sensorimotor gating abnormalities following predator exposure or corticotropin-releasing factor in rats: A model for PTSD-like information-processing deficits? **Neuropharmacology**, v. 62, n. 2, p. 737–748, 2012.

BARTOS, M.; VIDA, I.; JONAS, P. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 45–56, jan. 2007.

BAXTER, P. S. et al. Synaptic NMDA receptor activity is coupled to the transcriptional control of the glutathione system. **Nat. Commun.**, v. 6, p. 6761, 2015.

BAYIR, H. et al. Marked gender effect on lipid peroxidation after severe traumatic brain injury in adult patients. **Journal of neurotrauma**, v. 21, n. 1, p. 1–8, jan. 2004.

BEAULIEU, J.-M. et al. Beyond cAMP: The Regulation of Akt and GSK3 by Dopamine Receptors. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 4, p. 38, 2011.

BEAULIEU, J.-M.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G. The Akt–GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 28, n. 4, p. 166–172, abr. 2007.

BEGEMANN, M. J. H. et al. Estrogen augmentation in schizophrenia: A quantitative review of current evidence. **Schizophrenia Research**, v. 141, n. 2–3, p. 179–184, nov. 2012.

BEHRENS, M. M. et al. Ketamine-Induced Loss of Phenotype of Fast-Spiking Interneurons Is Mediated by NADPH-Oxidase. **Science**, v. 318, n. 5856, 2007.

BELLACOSA, A. et al. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. **Science (New York, N.Y.)**, v. 254, n. 5029, p. 274–7, 11 out. 1991.

BELOOSESKY, R. et al. Maternal N-acetyl-cysteine (NAC) protects the rat fetal brain from inflammatory cytokine responses to lipopolysaccharide (LPS). **The journal of maternal-fetal**

& **neonatal medicine**, v. 25, n. 8, p. 1324–8, ago. 2012.

BENROS, M. E. et al. Autoimmune Diseases and Severe Infections as Risk Factors for Schizophrenia: A 30-Year Population-Based Register Study. **American Journal of Psychiatry**, v. 168, n. 12, p. 1303–1310, dez. 2011.

BERGAMINI, S. et al. N-acetylcysteine inhibits in vivo nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry / Official Journal of the Nitric Oxide Society**, v. 5, n. 4, p. 349–360, 2001.

BERK, M. et al. N-Acetyl Cysteine as a Glutathione Precursor for Schizophrenia—A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. **Biological Psychiatry**, v. 64, n. 5, p. 361–368, 2008a.

BERK, M. et al. Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 7, p. 346–351, jul. 2008b.

BERK, M. et al. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 3, p. 167–177, 2013.

BERTRAND, D. et al. Steroids inhibit nicotinic acetylcholine receptors. **Neuroreport**, v. 2, n. 5, p. 277–80, maio 1991.

BHATIA, K. et al. Oxidative stress contributes to sex differences in angiotensin II-mediated hypertension in spontaneously hypertensive rats. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n. 2, p. R274–R282, 15 jan. 2012.

BODNAR, A. L. et al. Discovery and Structure–Activity Relationship of Quinuclidine Benzamides as Agonists of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 905–908, 24 fev. 2005.

BOESS, F. G. et al. The Novel $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-7-[2-(methoxy)phenyl]-1-benzofuran-2-carboxamide Improves Working and Recognition Memory in Rodents. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 321, n. 2, 2007.

BORA, E. et al. Cognitive deficits in youth with familial and clinical high risk to psychosis: a systematic review and meta-analysis. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 130, n. 1, p. 1–15, jul. 2014.

BORA, E. et al. Duration of untreated psychosis and neurocognition in first-episode psychosis: A meta-analysis. **Schizophrenia Research**, 2017.

BORELLA, V. C. M. et al. Gender and estrous cycle influences on behavioral and neurochemical alterations in adult rats neonatally administered ketamine. **Developmental Neurobiology**, p. n/a-n/a, 2015.

BORRÁS, C. et al. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. **Free radical biology & medicine**, v. 34, n. 5, p. 546–52, 1 mar. 2003.

BOTSAKIS, K. et al. 17β -Estradiol/N-acetylcysteine interaction enhances the neuroprotective

effect on dopaminergic neurons in the weaver model of dopamine deficiency. **Neuroscience**, v. 320, p. 221–229, 21 abr. 2016.

BRAFF, D. L. et al. Female schizophrenia patients have prepulse inhibition deficits. **Biological Psychiatry**, v. 57, n. 7, p. 817–820, 2005.

BRAFF, D. L.; LIGHT, G. A. The use of neurophysiological endophenotypes to understand the genetic basis of schizophrenia. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 125–35, jan. 2005.

BRAILOIU, E. et al. Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. **Journal of Endocrinology**, v. 193, n. 2, p. 311–321, 1 maio 2007.

BREY, R. L. et al. Neuropsychiatric syndromes in lupus: prevalence using standardized definitions. **Neurology**, v. 58, n. 8, p. 1214–20, 23 abr. 2002.

BROWN, A. The environment and susceptibility to schizophrenia. **Prog Neurobiol**, v. 93, p. 23–58, 2011.

BUKA, S. L. et al. Maternal exposure to herpes simplex virus and risk of psychosis among adult offspring. **Biological psychiatry**, v. 63, n. 8, p. 809–15, maio 2008.

BULUT, M. et al. Beneficial effects of N-acetylcysteine in treatment resistant schizophrenia. **The World Journal of Biological Psychiatry**, v. 10, n. 4–2, p. 626–628, 8 jan. 2009.

BUUSE, M.; GARNER, B.; KOCH, M. Neurodevelopmental Animal Models of Schizophrenia: Effects on Prepulse Inhibition. **Current Molecular Medicine**, v. 3, n. 5, p. 459–471, 1 ago. 2003.

BYMASTER, F. P. et al. Potential role of muscarinic receptors in schizophrenia. **Life Sciences**, v. 64, n. 6–7, p. 527–534, jan. 1999.

CABUNGCAL, J.-H. et al. Early-Life Insults Impair Parvalbumin Interneurons via Oxidative Stress: Reversal by N-Acetylcysteine. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 6, p. 574–582, 2013.

CABUNGCAL, J. H. et al. Juvenile Antioxidant Treatment Prevents Adult Deficits in a Developmental Model of Schizophrenia. **Neuron**, v. 83, n. 5, p. 1073–1084, 2014.

CANNON, T. D. et al. Prediction of Psychosis in Youth at High Clinical Risk. **Archives of General Psychiatry**, v. 65, n. 1, p. 28, 1 jan. 2008.

CARDNO, A. G.; GOTTESMAN, I. I. Twin studies of schizophrenia: from bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics. **American journal of medical genetics**, v. 97, n. 1, p. 12–7, 2000.

CARDONA-GOMEZ, P. et al. Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 25, n. 3, p. 363–373, mar. 2004.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M. Effect of Chlorpromazine or Haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and Normetanephrine in mouse brain. **Acta pharmacologica et**

toxicologica, v. 20, p. 140–4, 1963.

CARMELI, C. et al. Glutathione Precursor N-Acetyl-Cysteine Modulates EEG Synchronization in Schizophrenia Patients: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e29341, 22 fev. 2012.

CASTAGNÉ, V.; CUÉNOD, M.; DO, K. . An animal model with relevance to schizophrenia: sex-dependent cognitive deficits in osteogenic disorder-Shionogi rats induced by glutathione synthesis and dopamine uptake inhibition during development. **Neuroscience**, v. 123, n. 4, p. 821–834, 2004.

CENTENO, M. L. et al. Estradiol increases $\alpha 7$ nicotinic receptor in serotonergic dorsal raphe and noradrenergic locus coeruleus neurons of macaques. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 497, n. 3, p. 489–501, 20 jul. 2006.

CHAN, E. D.; RICHES, D. W.; WHITE, C. W. Redox paradox: effect of N-acetylcysteine and serum on oxidation reduction-sensitive mitogen-activated protein kinase signaling pathways. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 24, p. 627–632, 2001.

CHAN, V. Schizophrenia and Psychosis Diagnosis, Current Research Trends, and Model Treatment Approaches with Implications for Transitional Age Youth. 2017.

CHEN, G. et al. Inhibitory Effect on Cerebral Inflammatory Response following Traumatic Brain Injury in Rats: A Potential Neuroprotective Mechanism of N-Acetylcysteine. **Mediators of Inflammation**, v. 2008, p. 1–8, 2008.

CHEN, H.-H.; STOKER, A.; MARKOU, A. The glutamatergic compounds sarcosine and N-acetylcysteine ameliorate prepulse inhibition deficits in metabotropic glutamate 5 receptor knockout mice. **Psychopharmacology**, v. 209, n. 4, p. 343–350, 10 maio 2010.

CHEN, P. et al. Glycogen synthase kinase 3 regulates N-methyl-D-aspartate receptor channel trafficking and function in cortical neurons. **Molecular pharmacology**, v. 72, n. 1, p. 40–51, jul. 2007.

CHEN, X. et al. Differential sensory gating functions between smokers and non-smokers among drug-naive first episode schizophrenic patients. **Psychiatry Research**, v. 188, n. 3, p. 327–333, 15 ago. 2011.

CHILDS, A. et al. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. **Free radical biology & medicine**, v. 31, n. 6, p. 745–53, 15 set. 2001.

CHOI, J. S. et al. Gender difference in the prodromal symptoms of first-episode Schizophrenia. **Journal of Korean Medical Science**, v. 24, n. 6, p. 1083–1088, 2009.

COHEN, R. Z. et al. Earlier Puberty as a Predictor of Later Onset of Schizophrenia in Women. **Am J Psychiatry**, v. 1567, n. 156, p. 1059–1064, 1999.

CONLEY, R. R.; KELLY, D. L. Management of treatment resistance in schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 50, n. 11, p. 898–911, 1 dez. 2001.

- CORVIN, A.; MORRIS, D. W. Genome-wide Association Studies: Findings at the Major Histocompatibility Complex Locus in Psychosis. **Biological Psychiatry**, v. 75, n. 4, p. 276–283, 15 fev. 2014.
- COUGHLIN, J. M. et al. Marked reduction of soluble superoxide dismutase-1 (SOD1) in cerebrospinal fluid of patients with recent-onset schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 18, n. 1, p. 10–11, 21 jan. 2013.
- COYLE, J. T. The glutamatergic dysfunction hypothesis for schizophrenia. **Harvard review of psychiatry**, v. 3, n. 5, p. 241–53, 1996.
- COYLE, J. T. et al. Beyond the dopamine receptor: novel therapeutic targets for treating schizophrenia. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 359–82, jan. 2010.
- COYLE, J. T.; DUMAN, R. S. Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. **Neuron**, v. 38, n. 2, p. 157–60, 24 abr. 2003.
- D'ASTOUS, M. et al. Implication of the Phosphatidylinositol-3 Kinase/Protein Kinase B Signaling Pathway in the Neuroprotective Effect of Estradiol in the Striatum of 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine Mice. **Molecular Pharmacology**, v. 69, n. 4, p. 1492–1498, 18 jan. 2006.
- DALL'IGNA, O. P. et al. Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. **Experimental neurology**, v. 203, n. 1, p. 241–5, jan. 2007.
- DE LUCA, V. et al. Evidence of Association between Smoking and $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Subunit Gene in Schizophrenia Patients. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 8, p. 1522–1526, 21 ago. 2004.
- DEAN, O.; GIORLANDO, F.; BERK, M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. **Journal of psychiatry & neuroscience : JPN**, v. 36, n. 2, p. 78–86, mar. 2011.
- DEAN, O. M. et al. N-acetyl cysteine restores brain glutathione loss in combined 2-cyclohexene-1-one and d-amphetamine-treated rats: relevance to schizophrenia and bipolar disorder. **Neuroscience letters**, v. 499, n. 3, p. 149–53, 2011.
- DE ROSA, S. C. et al. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. **European journal of clinical investigation**, v. 30, n. 10, p. 915–29, out. 2000.
- DEEPMALA et al. Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: A systematic review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 55, p. 294–321, 2015.
- DEKHUIJZEN, P. N. R.; VAN BEURDEN, W. J. C. The role for N-acetylcysteine in the management of COPD. **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**, v. 1, n. 2, p. 99–106, 2006.
- DENCKER, D. et al. Muscarinic Acetylcholine Receptor Subtypes as Potential Drug Targets for the Treatment of Schizophrenia, Drug Abuse, and Parkinson's Disease. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 3, n. 2, p. 80–89, 15 fev. 2012.

DESLAURIERS, J. et al. Preventive effect of α -lipoic acid on prepulse inhibition deficits in a juvenile two-hit model of schizophrenia. **Neuroscience**, v. 272, p. 261–70, 11 jul. 2014.

DEUTSCH, S. I. et al. A “glutamatergic hypothesis” of schizophrenia. Rationale for pharmacotherapy with glycine. **Clinical neuropharmacology**, v. 12, n. 1, p. 1–13, fev. 1989.

DINELEY, K. T.; PANDYA, A. A.; YAKEL, J. L. Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 2, p. 96–108, fev. 2015.

DRAPER, H. H. et al. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radic Biol Med**, v. 15, n. 4, p. 353–363, 1993.

DRIVER, D. I.; GOGTAY, N.; RAPOPORT, J. L. Childhood onset schizophrenia and early onset schizophrenia spectrum disorders. **Child and adolescent psychiatric clinics of North America**, v. 22, n. 4, p. 539–55, out. 2013.

EHRENREICH, H. The impact of environment on abnormal behavior and mental disease. **EMBO reports**, v. 18, n. 5, p. 661–665, maio 2017.

ELLENBROEK, B. A et al. Animal models for the negative symptoms of schizophrenia. **Behavioural pharmacology**, v. 11, n. 3–4, p. 223–33, 2000.

EMAMIAN, E. S. AKT/GSK3 signaling pathway and schizophrenia. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 5, p. 33, jan. 2012.

ERANTI, S. . et al. Gender difference in age at onset of schizophrenia: a meta-analysis. **Psychological Medicine**, v. 43, n. 1, p. 155–167, 2013.

EVANS, N. J. et al. Characterisation of Signalling by the Endogenous GPER1 (GPR30) Receptor in an Embryonic Mouse Hippocampal Cell Line (mHippoE-18). **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0152138, 21 mar. 2016.

FATEMI, S. H.; FOLSOM, T. D. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. **Schizophrenia bulletin**, v. 35, n. 3, p. 528–48, maio 2009.

FEIGENSON, K. A.; KUSNECOV, A. W.; SILVERSTEIN, S. M. Inflammation and the two-hit hypothesis of schizophrenia. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 38, p. 72–93, jan. 2014.

FEINBERG, I. Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? **Journal of psychiatric research**, v. 17, n. 4, p. 319–34, 1982.

FERNANDES, C. et al. Performance deficit of $\alpha 7$ nicotinic receptor knockout mice in a delayed matching-to-place task suggests a mild impairment of working/episodic-like memory. **Genes, Brain and Behavior**, v. 5, n. 6, p. 433–440, ago. 2006.

FILARDO, E. J.; THOMAS, P. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 16, n. 8, p. 362–367, out. 2005.

FILLMAN, S. G. et al. Increased inflammatory markers identified in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 18, n. 2, p. 206–214, 7 fev. 2013.

FORREST, C. M. et al. Prenatal activation of Toll-like receptors-3 by administration of the viral mimetic poly(I:C) changes synaptic proteins, N-methyl-D-aspartate receptors and neurogenesis markers in offspring. **Molecular brain**, v. 5, n. 1, p. 22, jan. 2012.

FREEDMAN, R. et al. Evidence in postmortem brain tissue for decreased numbers of hippocampal nicotinic receptors in schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 38, n. 1, p. 22–33, 1 jul. 1995.

FREEDMAN, R. et al. Initial Phase 2 Trial of a Nicotinic Agonist in Schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, v. 165, n. 8, p. 1040–1047, ago. 2008.

FREYBERG, Z.; FERRANDO, S. J.; JAVITCH, J. A. Roles of the Akt/GSK-3 and Wnt signaling pathways in schizophrenia and antipsychotic drug action. **The American journal of psychiatry**, v. 167, n. 4, p. 388–96, 1 abr. 2010.

FRYE, C. A.; PETRALIA, S. M.; RHODES, M. E. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and $3\alpha,5\alpha$ -THP. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 67, n. 3, p. 587–596, 2000.

FUKAMI, G. et al. Effect of antioxidant N-acetyl-L-cysteine on behavioral changes and neurotoxicity in rats after administration of methamphetamine. **Brain Research**, v. 1016, n. 1, p. 90–95, 30 jul. 2004.

FUSAR-POLI, P. et al. Predicting Psychosis. **Archives of General Psychiatry**, v. 69, n. 3, p. 220, 1 mar. 2012.

GAEBEL, W. **Schizophrenia: Current Science and Clinical Practice**. First Edit ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd., 2011.

GAWRYLUK, J. W. et al. Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 1, p. 123–130, 16 fev. 2011.

GEDDES, A. E. **NR2B or not 2B? Alterations of NR2B in schizophrenia and the effect of an NR2B blockade in an exploratory mouse model**. [s.l.] University of Wollongong, 2015.

GIOVANOLI, S. et al. Stress in Puberty Unmasks Latent Neuropathological Consequences of Prenatal Immune Activation in Mice. **Science**, v. 339, n. 6123, p. 1095–1099, 2013.

GIOVANOLI, S.; WEBER, L.; MEYER, U. **Single and combined effects of prenatal immune activation and peripubertal stress on parvalbumin and reelin expression in the hippocampal formation** **Brain, Behavior, and Immunity**. [s.l.: s.n.].

GOGOS, A. et al. A Role for Estrogen in Schizophrenia: Clinical and Preclinical Findings. **International Journal of Endocrinology**, v. 2015, 2015.

GONG, G. et al. Age- and gender-related differences in the cortical anatomical network. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 50,

p. 15684–93, 16 dez. 2009.

GONG, G.; HE, Y.; EVANS, A. C. Brain Connectivity. **The Neuroscientist**, v. 17, n. 5, p. 575–591, 28 out. 2011.

GOULD, E. et al. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 10, n. 4, p. 1286–91, abr. 1990.

GRAHAM, F. K. The More or Less Startling Effects of Weak Prestimulation. **Psychophysiology**, v. 12, n. 3, p. 238–248, maio 1975.

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science (New York, N.Y.)**, v. 212, n. 4490, p. 56–8, 3 abr. 1981.

GRIFFITH, O. W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free radical biology & medicine**, v. 27, n. 9–10, p. 922–35, nov. 1999.

HÄFNER, H. et al. Oestradiol enhances the vulnerability threshold for schizophrenia in women by an early effect on dopaminergic neurotransmission. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 241, n. 1, p. 65–68, jul. 1991a.

HÄFNER, H. et al. Sex differences in schizophrenic diseases. **Fortschritte der Neurologie · Psychiatrie**, v. 59, n. 9, p. 343–360, 10 set. 1991b.

HÄFNER, H. et al. Generating and testing a causal explanation of the gender difference in age at first onset of schizophrenia. **Psychological medicine**, v. 23, n. 4, p. 925–40, nov. 1993.

HALENE, T. B. et al. Assessment of NMDA receptor NR1 subunit hypofunction in mice as a model for schizophrenia. **Genes, brain, and behavior**, v. 8, n. 7, p. 661–75, out. 2009.

HÄNNINEN, K. et al. Interleukin-1 beta gene polymorphism and its interactions with neuregulin-1 gene polymorphism are associated with schizophrenia. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 258, n. 1, p. 10–15, 27 dez. 2007.

HANSON, D. R.; GOTTESMAN, I. I. Theories of schizophrenia: a genetic-inflammatory-vascular synthesis. **BMC Medical Genetics**, v. 6, n. 1, p. 7, 11 dez. 2005.

HARDINGHAM, G. E.; FUKUNAGA, Y.; BADING, H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 5, p. 405–14, 15 abr. 2002.

HARRISON, P. The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications. **Psychopharmacology**, v. 174, n. 1, 6 jun. 2004.

HARVEY, B. H. et al. Effect of Chronic N-Acetyl Cysteine Administration on Oxidative Status in the Presence and Absence of Induced Oxidative Stress in Rat Striatum. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 3, p. 508–517, 31 mar. 2008.

HARVEY, P. D. Disability in Schizophrenia. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 75, n. suppl 1, p. 15–20, fev. 2014.

HEIZMANN, C. W. Calcium signaling in the brain. **Acta neurobiologiae experimentalis**, v. 53, n. 1, p. 15–23, 1993.

HERRMANN, A. P.; GIOVANOLI, S.; ELISABETSKY, E. N-acetylcysteine prevents the emergence of schizophrenia-like behaviors in an environmental two-hit ... **Schizophrenia International Research Society/Nature Publishing Group**, n. November, p. 76, 2016.

HILL, R. A. Sex differences in animal models of schizophrenia shed light on the underlying pathophysiology. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 67, p. 41–56, ago. 2016.

HOFFMAN, H. S.; ISON, J. R. Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. **Psychological review**, v. 87, n. 2, p. 175–89, mar. 1980.

HOWES, O. D.; KAPUR, S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. **Schizophrenia bulletin**, v. 35, n. 3, p. 549–62, maio 2009.

HU, M. et al. Negative regulation of neurogenesis and spatial memory by NR2B-containing NMDA receptors. **Journal of Neurochemistry**, v. 106, n. 4, p. 1900–1913, ago. 2008.

HUANG, Q. et al. Potential in vivo amelioration by N-acetyl-L-cysteine of oxidative stress in brain in human double mutant APP/PS-1 knock-in mice: Toward therapeutic modulation of mild cognitive impairment. **Journal of Neuroscience Research**, v. 88, n. 12, p. n/a-n/a, set. 2010.

HWANG, Y. et al. Gene expression profiling by mRNA sequencing reveals increased expression of immune/inflammation-related genes in the hippocampus of individuals with schizophrenia. **Translational Psychiatry**, v. 3, n. 10, p. e321, 29 out. 2013.

IDE, M. et al. Failure to support a genetic contribution of AKT1 polymorphisms and altered AKT signaling in schizophrenia. **Journal of Neurochemistry**, v. 99, n. 1, p. 277–287, out. 2006.

JANG, Y. M. et al. Doxorubicin treatment in vivo activates caspase-12 mediated cardiac apoptosis in both male and female rats. **FEBS Letters**, v. 577, n. 3, p. 483–490, 19 nov. 2004.

JIANG, Z.; COWELL, R. M.; NAKAZAWA, K. Convergence of genetic and environmental factors on parvalbumin-positive interneurons in schizophrenia. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 7, p. 116, jan. 2013.

JO, W. K. et al. Glia in the cytokine-mediated onset of depression: fine tuning the immune response. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, p. 268, 10 jul. 2015.

JONES, C. et al. Animal models of schizophrenia. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 1162–1194, 2011.

KAHN, R. S.; KEEFE, R. S. E. Schizophrenia Is a Cognitive Illness. **JAMA Psychiatry**, v. 70, n. 10, p. 1107, 1 out. 2013.

KANDEL, E. R. **Principles of neural science**. 5th. ed. [s.l.] McGraw-Hill Education/Medical, 2012.

- KANDER, M. C.; CUI, Y.; LIU, Z. Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 21, n. 5, p. 1024–1032, maio 2017.
- KAPUR, S.; MIZRAHI, R.; LI, M. **From dopamine to salience to psychosis-linking biology, pharmacology and phenomenology of psychosis**. Schizophrenia Research. **Anais...**2005
- KASTENBERGER, I.; LUTSCH, C.; SCHWARZER, C. Activation of the G-protein-coupled receptor GPR30 induces anxiogenic effects in mice, similar to oestradiol. **Psychopharmacology**, v. 221, n. 3, p. 527–35, jun. 2012.
- KAWAKAMI, M.; TERASAWA, E.; IBUKI, T. Changes in multiple unit activity of the brain during the estrous cycle. **Neuroendocrinology**, v. 6, n. 1, p. 30–48, 1970.
- KEEFE, R. S. E. et al. Neurocognitive Effects of Antipsychotic Medications in Patients With Chronic Schizophrenia in the CATIE Trial. **Archives of General Psychiatry**, v. 64, n. 6, p. 633, 1 jun. 2007.
- KELLER, W. R. et al. A review of anti-inflammatory agents for symptoms of schizophrenia. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 27, n. 4, p. 337–42, abr. 2013.
- KESHAVAN, M. S. Development, disease and degeneration in schizophrenia: a unitary pathophysiological model. **Journal of psychiatric research**, v. 33, n. 6, p. 513–21, 1999.
- KESHAVAN, M. S.; HOGARTY, G. E. Brain maturational processes and delayed onset in schizophrenia. **Development and Psychopathology**, v. 11, n. 3, p. 525–543, 1999.
- KHAN, M. et al. Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. **Journal of Neuroscience Research**, v. 76, n. 4, p. 519–527, 15 maio 2004.
- KIM, Y.-K.; NA, K.-S. Neuroprotection in Schizophrenia and Its Therapeutic Implications. **Psychiatry investigation**, v. 14, n. 4, p. 383–391, jul. 2017.
- 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, 15 fev. 2006.
- KIRCH, D. G. et al. Abnormal cerebrospinal fluid protein indices in schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 20, n. 10, p. 1039–46, out. 1985.
- KIRCH, D. G. et al. Blood-CSF barrier permeability and central nervous system immunoglobulin G in schizophrenia. **Journal of neural transmission. General section**, v. 89, n. 3, p. 219–32, 1992.
- KLEINVELD, H. A.; DEMACKER, P. N. M.; STALENHOF, A. F. H. Failure of N-acetylcysteine to reduce low-density lipoprotein oxidizability in healthy subjects. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 639–642, dez. 1992.
- KOCH, M. Sensorimotor gating changes across the estrous cycle in female rats. **Physiology & behavior**, v. 64, n. 5, p. 625–8, jul. 1998.

- KOCH, M.; SCHNITZLER, H.-U. The acoustic startle response in rats—circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. **Behavioural Brain Research**, v. 89, n. 1–2, p. 35–49, 1997.
- KOGA, M.; SERRITELLA, A. V.; SEDLAK, T. W. Implications for reactive oxygen species in schizophrenia pathogenesis. **Schizophrenia Research**, v. 176, n. 1, p. 52–71, 2016.
- KOGANTI, S. Cardioprotective role of G-Protein Coupled Estrogen Receptor 1 (GPER1). **Molecular Membrane Biology**, v. 32, n. 2, p. 35–38, 17 fev. 2015.
- KOHL, S. et al. Prepulse inhibition in psychiatric disorders – Apart from schizophrenia. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, n. 4, p. 445–452, abr. 2013.
- KOKRAS, N.; DALLA, C. Sex differences in animal models of psychiatric disorders. **British journal of pharmacology**, v. 171, n. 20, p. 4595–619, out. 2014.
- KOROL, D. L. et al. Shifts in preferred learning strategy across the estrous cycle in female rats. **Hormones and Behavior**, v. 45, n. 5, p. 330–338, maio 2004.
- KOYLU, E. et al. Sex difference in up-regulation of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain. **Life sciences**, v. 61, n. 12, p. PL 185-90, 1997.
- KRINGELBACH, M. L.; BERRIDGE, K. C. Towards a functional neuroanatomy of pleasure and happiness. **Trends in cognitive sciences**, v. 13, n. 11, p. 479–87, nov. 2009.
- KULKARNI, J. et al. Estrogen — a potential treatment for schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 48, n. 1, p. 137–144, mar. 2001.
- KUMARI, V. et al. Normalization of Information Processing Deficits in Schizophrenia With Clozapine. **Am J PsychiatryAm J Psychiatry**, v. 1567, n. 156, p. 1046–1051, 1999.
- LAHON, K. et al. A retrospective study of extrapyramidal syndromes with second generation antipsychotics in the psychiatric unit of a tertiary care teaching hospital. **Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics**, v. 3, n. 3, p. 266–8, jul. 2012.
- LANTÉ, F. et al. Neurodevelopmental damage after prenatal infection: Role of oxidative stress in the fetal brain. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 8, p. 1231–1245, abr. 2007.
- LANTÉ, F. et al. Late N-acetylcysteine treatment prevents the deficits induced in the offspring of dams exposed to an immune stress during gestation. **Hippocampus**, v. 18, n. 6, p. 602–609, jun. 2008.
- LARUELLE, M. et al. Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. **Biological psychiatry**, v. 46, n. 1, p. 56–72, 1 jul. 1999.
- LAURSEN, T. M. et al. Life Expectancy and Death by Diseases of the Circulatory System in Patients with Bipolar Disorder or Schizophrenia in the Nordic Countries. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e67133, 24 jun. 2013.
- LAVOIE, S. et al. Glutathione Precursor, N-Acetyl-Cysteine, Improves Mismatch Negativity in Schizophrenia Patients. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 9, p. 2187–2199, 14 ago.

2008.

LEE, S.-H. et al. Sustained activation of Akt by melatonin contributes to the protection against kainic acid-induced neuronal death in hippocampus. **Journal of Pineal Research**, v. 40, n. 1, p. 79–85, jan. 2006.

LEI, X. et al. Sex Differences in Fiber Connection between the Striatum and Subcortical and Cortical Regions. **Frontiers in computational neuroscience**, v. 10, p. 100, 2016.

LENROOT, R. K.; GIEDD, J. N. Sex differences in the adolescent brain. **Brain and cognition**, v. 72, n. 1, p. 46–55, fev. 2010.

LEPAGE, M.; BODNAR, M.; BOWIE, C. R. Neurocognition: clinical and functional outcomes in schizophrenia. **Canadian journal of psychiatry. Revue canadienne de psychiatrie**, v. 59, n. 1, p. 5–12, jan. 2014.

LEVIN, R. et al. Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) present deficits in prepulse inhibition of startle specifically reverted by clozapine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 7, p. 1748–1752, 2011.

LEWIS, D. A. et al. Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. **Trends in Neurosciences**, v. 35, n. 1, p. 57–67, jan. 2012.

LEZA, J. C. et al. Inflammation in schizophrenia: A question of balance. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 55, p. 612–626, 2015.

LI, H. et al. Methamphetamine enhances the development of schizophrenia in first-degree relatives of patients with schizophrenia. **Canadian journal of psychiatry. Revue canadienne de psychiatrie**, v. 59, n. 2, p. 107–113, fev. 2014.

LI, X.; FRYE, M. A.; SHELTON, R. C. Review of Pharmacological Treatment in Mood Disorders and Future Directions for Drug Development. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 1, p. 77–101, 2012.

LI, Y.-C. et al. Activation of glycogen synthase kinase-3 beta is required for hyperdopamine and D2 receptor-mediated inhibition of synaptic NMDA receptor function in the rat prefrontal cortex. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 49, p. 15551–63, 9 dez. 2009.

LIEBERMAN, J. A. Atypical antipsychotic drugs as a first-line treatment of schizophrenia: a rationale and hypothesis. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 57 Suppl 11, p. 68–71, 1996.

LIEBERMAN, J. A. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia: efficacy, safety and cost outcomes of CATIE and other trials. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 68, n. 2, p. e04, fev. 2007.

LIU, H. et al. Cavum septum pellucidum and first-episode psychosis: A meta-analysis. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0177715, 2017.

LIU, J.; WANG, X.; MORI, A. Immobilization stress-induced antioxidant defense changes in rat plasma: Effect of treatment with reduced glutathione. **International Journal of Biochemistry**, v. 26, n. 4, p. 511–517, 1994.

LIU, X.-H.; XU, C.-Y.; FAN, G.-H. Efficacy of N-acetylcysteine in preventing atrial fibrillation after cardiac surgery: a meta-analysis of published randomized controlled trials. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 14, n. 1, p. 52, 16 dez. 2014.

LODGE, D. J.; BEHRENS, M. M.; GRACE, A. A. A Loss of Parvalbumin-Containing Interneurons Is Associated with Diminished Oscillatory Activity in an Animal Model of Schizophrenia. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 8, p. 2344–2354, 25 fev. 2009.

LONDERO, M. D. B.; MASSUDA, R.; GAMA, C. S. Neurobiologia da Esquizofrenia. In: NARDI, A. E.; QUEVEDO, J.; SILVA, A. G. (Eds.). . **Esquizofrenia\ Teoria e Clínica**. Porto Alegre: Artmed, 2015. p. 45–51.

LOPICCOLO, J. et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: Effective combinations and clinical considerations. **Drug Resistance Updates**, v. 11, n. 1–2, p. 32–50, fev. 2008.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 2, p. 156–167, fev. 2008.

MACÊDO, D. S. et al. Animal models of prenatal immune challenge and their contribution to the study of schizophrenia: a systematic review. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 3, p. 179–186, mar. 2012.

MARKHAM, J. A.; MULLINS, S. E.; KOENIG, J. I. Periadolescent maturation of the prefrontal cortex is sex-specific and is disrupted by prenatal stress. **The Journal of comparative neurology**, v. 521, n. 8, p. 1828–43, 1 jun. 2013.

MARQUE, C. R. **Efeito da minociclina sobre o fluxo sanguíneo cerebral em pacientes com esquizofrenia de início recente**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

MARSMAN, A. et al. GABA and glutamate in schizophrenia: A 7 T 1H-MRS study. **NeuroImage: Clinical**, v. 6, p. 398–407, 2014.

MARTIN, L.; KEM, W.; FREEDMAN, R. Alpha-7 nicotinic receptor agonists: potential new candidates for the treatment of schizophrenia. **Psychopharmacology**, v. 174, n. 1, p. 54–64, 19 jun. 2004.

MARUYAMA, K. et al. A novel isoform of rat estrogen receptor beta with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regular of estrogen action. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 246, n. 1, p. 142–7, 8 maio 1998.

MASU, M. et al. Molecular Characterization of NMDA and Metabotropic Glutamate Receptors. **Molecular Basis of Ion Channels and Receptors Involved in Nerve Excitation, Synaptic Transmission and Muscle Contraction**, v. 707, n. 707, p. 153–164, 1993.

MATHUR, P. et al. Fear memory impairing effects of systemic treatment with the NMDA NR2B subunit antagonist, Ro 25-6981, in mice: attenuation with ageing. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 91, n. 3, p. 453–60, jan. 2009.

MATSUZAWA, D. et al. Negative correlation between brain glutathione level and negative symptoms in schizophrenia: a 3T 1H-MRS study. **PloS one**, v. 3, n. 4, p. e1944, 9 abr. 2008.

MAURICE, T.; LOCKHART, B. P.; PRIVAT, A. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. **Brain research**, v. 706, n. 2, p. 181–93, 15 jan. 1996.

MAYNARD, T. M. et al. Neural development, cell-cell signaling, and the “two-hit” hypothesis of schizophrenia. **Schizophrenia bulletin**, v. 27, n. 3, p. 457–476, 2001.

MCCARTHY, M. M.; NUGENT, B. M.; LENZ, K. M. Neuroimmunology and neuroepigenetics in the establishment of sex differences in the brain. **Nature Publishing Group**, 2017.

MCGORRY, P. D.; GOLDSTONE, S. Early recognition and prevention of schizophrenia. In: GAEBEL, W. (Ed.). **Schizophrenia \ Current Science and Clinical Practice**. Dusseldorf, Germany: Willey-Blackwell, 2011. p. 141–156.

MEISTER, A. Glutathione; Metabolism and function via the γ -glutamyl cycle. **Life Sciences**, v. 15, n. 2, p. 177–190, 1974.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, n. 1, p. 711–760, jun. 1983.

MEYER, N.; MACCABE, J. H. Schizophrenia. **Medicine**, v. 44, n. 11, p. 649–653, nov. 2016.

MEYER, U. et al. Adult brain and behavioral pathological markers of prenatal immune challenge during early/middle and late fetal development in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, n. 4, p. 469–486, maio 2008.

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

MEYER, U.; FELDON, J. To poly(I:C) or not to poly(I:C): advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 3, p. 1308–21, mar. 2012a.

MEYER, U.; FELDON, J. To poly(I:C) or not to poly(I:C): Advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 3, p. 1308–1321, mar. 2012b.

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 & Therapeutics**, v. 132, n. 1, p. 96–110, out. 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, 1 out. 2011.

MINARINI, A. et al. N-acetylcysteine in the treatment of psychiatric disorders: current status and future prospects. **doi.org**, n. 3, p. 279–292, 4 mar. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas**, 2013. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/02/pcdt-esquizofrenia-livro-2013.pdf>>. Acesso em: 31 ago. 2017

- MIYAKE, N. et al. Effects of N-Acetylcysteine on Cognitive Functions in Subjects With an At-Risk Mental State A Case Serie. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 36, n. 1, p. 87–88, 2016.
- MIYAMOTO, S. et al. Antipsychotic Drugs. In: **Psychiatry**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2008. p. 2161–2201.
- MIYAMOTO, S. et al. Pharmacological treatment of schizophrenia: a critical review of the pharmacology and clinical effects of current and future therapeutic agents. **Molecular Psychiatry**, v. 17, n. 12, p. 1206–1227, 15 dez. 2012.
- MIYATAKE, R.; FURUKAWA, A.; SUWAKI, H. Identification of a novel variant of the human NR2B gene promoter region and its possible association with schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 7, n. 10, p. 1101–1106, 12 dez. 2002.
- MOCHCOVITCH, M. D. Primeiro episódio psicótico. In: NARDI, A. E.; QUEVEDO, J.; SILVA, A. G. (Eds.). . **Esquizofrenia\ Teoria e Clínica**. Porto Alegre: Artmed, 2015. p. 95–106.
- MOGHADDAM, B. et al. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 2921–7, 15 abr. 1997.
- MÖLLER, M. et al. Social isolation rearing induces mitochondrial, immunological, neurochemical and behavioural deficits in rats, and is reversed by clozapine or N-acetyl cysteine. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 30, p. 156–167, maio 2013.
- MÖLLER, M.; SWANEPOEL, T.; HARVEY, B. H. Neurodevelopmental Animal Models Reveal the Convergent Role of Neurotransmitter Systems, Inflammation, and Oxidative Stress as Biomarkers of Schizophrenia: Implications for Novel Drug Development. **ACS Chem. Neurosci.**, v. 6, p. 987–1016, 2015.
- MONJI, A.; KATO, T.; KANBA, S. Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. **Psychiatry and clinical neurosciences**, v. 63, n. 3, p. 257–65, jun. 2009.
- MONTE, A. S. et al. Prevention and reversal of ketamine-induced schizophrenia related behavior by minocycline in mice: Possible involvement of antioxidant and nitrenergic pathways. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 11, p. 1032–1043, 2013.
- MORGAN, C. et al. Reappraising the long-term course and outcome of psychotic disorders: the AESOP-10 study. **Psychological Medicine**, v. 44, n. 13, p. 2713–2726, 26 out. 2014.
- MUELLER, D. R.; SCHMIDT, S. J.; RODER, V. One-Year Randomized Controlled Trial and Follow-Up of Integrated Neurocognitive Therapy for Schizophrenia Outpatients. **Schizophrenia Bulletin**, v. 41, n. 3, p. 604–616, 1 maio 2015.
- MYIN-GERMEYS, I. et al. Sex differences in emotional reactivity to daily life stress in psychosis. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 65, n. 6, p. 805–9, jun. 2004.
- NAJJAR, S. et al. Neuroinflammation and psychiatric illness. **Journal of neuroinflammation**, v. 10, p. 1–24, 2013.

NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH. **Schizophrenia**. Disponível em: <<https://www.nimh.nih.gov/health/topics/schizophrenia/index.shtml>>. Acesso em: 16 fev. 2017.

NEAL, R. et al. Effects of N-acetylcysteine and 2,3-dimercaptosuccinic Acid on Lead Induced Oxidative Stress in Rat Lenses. **Chemistry Faculty Research Toxicology Toxicology**, v. 130, p. 167–174, 1998.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 1161–9, out. 2010.

NICKELSON, K. J. et al. A Comparison of Inflammatory and Oxidative Stress Markers in Adipose Tissue from Weight-Matched Obese Male and Female Mice. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

O'LEARY, C. et al. Phenotypic effects of maternal immune activation and early postnatal milieu in mice mutant for the schizophrenia risk gene neuregulin-1. **Neuroscience**, v. 277, p. 294–305, 26 set. 2014.

OCHOA, S. et al. Gender Differences in Schizophrenia and First-Episode Psychosis: A Comprehensive Literature Review. **Schizophrenia Research and Treatment**, v. 2012, p. 1–9, 2012.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–8, jun. 1979.

ORLOVSKA, S. et al. Head Injury as Risk Factor for Psychiatric Disorders: A Nationwide Register-Based Follow-Up Study of 113,906 Persons With Head Injury. **American Journal of Psychiatry**, v. 171, n. 4, p. 463–469, abr. 2014.

OUHAZ, Z. et al. Behavioral and cognitive changes after early postnatal lesions of the rat mediodorsal thalamus. **Behavioural brain research**, v. 292, p. 219–32, 1 out. 2015.

PANTAZOPOULOS, H. et al. Parvalbumin neurons in the entorhinal cortex of subjects diagnosed with bipolar disorder or schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 61, n. 5, p. 640–52, 1 mar. 2007.

PARBOOSING, R. et al. Gestational Influenza and Bipolar Disorder in Adult Offspring. **JAMA Psychiatry**, v. 70, n. 7, p. 677, 1 jul. 2013.

PATEL, R. P. et al. Biological aspects of reactive nitrogen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1411, n. 2–3, p. 385–400, 1999.

PEDERSEN, C. B. et al. A Comprehensive Nationwide Study of the Incidence Rate and Lifetime Risk for Treated Mental Disorders. **JAMA Psychiatry**, v. 71, n. 5, p. 573, 1 maio 2014.

PERLSTEIN, W. M. et al. Relation of prefrontal cortex dysfunction to working memory and symptoms in schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, v. 158, n. 7, p. 1105–1113, 2001.

PHENSY, A. et al. Antioxidant Treatment with N-acetyl Cysteine Prevents the Development

of Cognitive and Social Behavioral Deficits that Result from Perinatal Ketamine Treatment. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 11, p. 106, 6 jun. 2017.

POWELL, S. B. et al. Isolation rearing-induced deficits in prepulse inhibition and locomotor habituation are not potentiated by water deprivation. **Physiology & behavior**, v. 77, n. 1, p. 55–64, set. 2002.

POWELL, S. B.; SEJNOWSKI, T. J.; BEHRENS, M. M. Behavioral and neurochemical consequences of cortical oxidative stress on parvalbumin-interneuron maturation in rodent models of schizophrenia. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 3, p. 1322–1331, mar. 2012.

PROSSNITZ, E. R.; BARTON, M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, n. 12, p. 715–726, 16 ago. 2011.

PRUESSNER, M. et al. Stress and protective factors in individuals at ultra-high risk for psychosis, first episode psychosis and healthy controls. **Schizophrenia Research**, v. 129, n. 1, p. 29–35, 2011.

QUINN, M. T.; AMMONS, M. C. B.; DELEO, F. R. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 111, n. 1, p. 1–20, jul. 2006.

QUINTAVALLE, C. et al. Therapeutic strategies to prevent contrast-induced acute kidney injury. **Current Opinion in Cardiology**, v. 28, n. 6, p. 676–682, nov. 2013.

RADENOVIC, L.; SELAKOVIC, V. Differential effects of NMDA and AMPA/kainate receptor antagonists on nitric oxide production in rat brain following intrahippocampal injection. **Brain research bulletin**, v. 67, n. 1–2, p. 133–41, 30 set. 2005.

RADYUSHKIN, K. et al. Neuroligin-3-deficient mice: model of a monogenic heritable form of autism with an olfactory deficit. **Genes Brain Behav**, v. 8, n. 4, p. 416–425, jun. 2009.

RAJKOWSKA, G.; MIGUEL-HIDALGO, J. J. Gliogenesis and glial pathology in depression. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 6, n. 3, p. 219–33, jun. 2007.

RAO, M. L.; KÖLSCH, H. Effects of estrogen on brain development and neuroprotection--implications for negative symptoms in schizophrenia. **Psychoneuroendocrinology**, v. 28 Suppl 2, p. 83–96, abr. 2003.

RATNAYAKE, U. et al. Prenatal Exposure to the Viral Mimetic Poly I:C Alters Fetal Brain Cytokine Expression and Postnatal Behaviour. **Developmental Neuroscience**, v. 36, p. 83–94, 2014.

REDROBE, J. P. et al. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor activation ameliorates scopolamine-induced behavioural changes in a modified continuous Y-maze task in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 602, n. 1, p. 58–65, 5 jan. 2009.

RIBEIRO, B. M. M. et al. Evidences for a progressive microglial activation and increase in iNOS expression in rats submitted to a neurodevelopmental model of schizophrenia: Reversal by clozapine. **Schizophrenia Research**, v. 151, n. 1–3, p. 12–19, 2013.

RODRIGUES NETO, A. S. DA S. **Glutathiona: Envolvimento em defesa antioxidante,**

regulação de morte celular progra mada e destoxificação de drogas. [s.l.] Universidade Fernando Pessoa, 2010.

ROSENBERG, L.; PARK, S. Verbal and spatial functions across the menstrual cycle in healthy young women. **Psychoneuroendocrinology**, v. 27, n. 7, p. 835–41, out. 2002.

ROTH, B. L.; ROGAN, S. C. Neuropharmacological Profiles of Antipsychotic Drugs. In: **Dopamine Handbook**. [s.l.] Oxford University Press, 2009. p. 520–539.

ROWE, A. R. et al. Dementia praecox redux: A systematic review of the nicotinic receptor as a target for cognitive symptoms of schizophrenia. **Journal of Psychopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 197–211, 7 fev. 2015.

RUSHWORTH, G. F.; MEGSON, I. L. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 141, n. 2, p. 150–159, fev. 2014.

SADOCK, B. **Compêndio de Psiquiatria - 11ed: Ciência do Comportamento e Psiquiatria Clínica - Benjamin J. Sadock, Virginia A. Sadock, Pedro Ruiz - Google Livros**. 11a. ed. [s.l.] Artmed, 2016.

SAMUNI, Y. et al. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 8, p. 4117–4129, 2013.

SANTOS, P. et al. Anxiolytic properties of N -acetylcysteine in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 317, p. 461–469, jan. 2017.

SANZ, A. et al. Evaluation of sex differences on mitochondrial bioenergetics and apoptosis in mice. **Experimental gerontology**, v. 42, n. 3, p. 173–82, mar. 2007.

SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids and Hippocampal Atrophy in Neuropsychiatric Disorders. **Archives of General Psychiatry**, v. 57, n. 10, p. 925, 1 out. 2000.

SARPAL, D. K. et al. Relationship between Duration of Untreated Psychosis and Intrinsic Corticostriatal Connectivity in Patients with Early Phase Schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, 15 mar. 2017.

SAWA, A.; SEDLAK, T. W. **Oxidative stress and inflammation in schizophrenia** *Schizophrenia Research*, 2016.

SCHARFMAN, H. E. et al. Hippocampal excitability increases during the estrous cycle in the rat: a potential role for brain-derived neurotrophic factor. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 37, p. 11641–52, 17 dez. 2003.

SCHIAVONE, S. et al. Involvement of NOX2 in the Development of Behavioral and Pathologic Alterations in Isolated Rats. **Biological Psychiatry**, v. 66, n. 4, p. 384–392, ago. 2009.

SCHNIEDER, T. P.; DWORK, A. J. Searching for neuropathology: gliosis in schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 69, n. 2, p. 134–9, 15 jan. 2011.

SCHWARZ, M. J. et al. The Th2-hypothesis of schizophrenia: a strategy to identify a

subgroup of schizophrenia caused by immune mechanisms. **Medical Hypotheses**, v. 56, n. 4, p. 483–486, abr. 2001.

SCOTT, J. G. Childhood antecedents of schizophrenia: Will understanding aetiopathogenesis result in schizophrenia prevention? **Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology**, v. 51, n. 4, p. 493–495, 2016.

SEARLES, S.; MAKAREWICZ, J. A.; DUMAS, J. A. The role of estradiol in schizophrenia diagnosis and symptoms in postmenopausal women. **Schizophrenia Research**, 2017.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192–205, out. 1968.

SEEMAN, M. V. Women and psychosis. **Women's health (London, England)**, v. 8, n. 2, p. 215–24, mar. 2012a.

SEEMAN, M. V. Menstrual exacerbation of schizophrenia symptoms. **Acta psychiatrica Scandinavica**, v. 125, n. 5, p. 363–71, maio 2012b.

SEEMAN, M. V.; LANG, M. The Role of Estrogens in Schizophrenia Gender Differences. v. 16, n. 2, 1990.

SEMPLE, B. D. et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Progress in neurobiology**, v. 106–107, p. 1–16, jan. 2013.

SHEN, F. et al. Essential role of the NO signaling pathway in the hippocampal CA1 in morphine-associated memory depends on glutaminergic receptors. **Neuropharmacology**, v. 102, p. 216–228, 2016.

SHEPHERD, J. K. et al. Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated zero-maze as an animal model of anxiety. **Psychopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 56–64, set. 1994.

SHUNGU, D. C. N-acetylcysteine for the treatment of glutathione deficiency and oxidative stress in schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 71, n. 11, p. 937–8, 2012.

SOMMER, I. E. et al. Early interventions in risk groups for schizophrenia: what are we waiting for? **npj Schizophrenia**, v. 2, n. January, p. 16003, 2016.

SOUZA, E. L. DE et al. Cognitive-behavioral therapy in prevention of psychosis in at-risk populations. **Revista Brasileira de Terapias Cognitivas**, v. 9, n. 1, p. 19–25, 2013.

SPARY, E. J. et al. Novel G protein-coupled oestrogen receptor GPR30 shows changes in mRNA expression in the rat brain over the oestrous cycle. **NeuroSignals**, v. 21, n. 1–2, p. 14–27, 2013.

SPENCER, J. L. et al. Estrous cycle regulates activation of hippocampal Akt, LIM kinase, and neurotrophin receptors in C57BL/6 mice. **Neuroscience**, v. 155, n. 4, p. 1106–19, 9 set. 2008.

STAHL, S. M. Beyond the dopamine hypothesis to the NMDA glutamate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. **CNS spectrums**, v. 12, n. 4, p. 265–8, abr. 2007.

STAHL, S. M. **Stahl's Essential Psychopharmacology - Neuroscientific Basis and Practical Application**. New York: Cambridge University Press, 2013.

STEEDS, H.; CARHART-HARRIS, R. L.; STONE, J. M. Drug models of schizophrenia. **Therapeutic advances in psychopharmacology**, v. 5, n. 1, p. 43–58, fev. 2015.

STEULLET, P. et al. Redox Dysregulation Affects the Ventral But Not Dorsal Hippocampus: Impairment of Parvalbumin Neurons, Gamma Oscillations, and Related Behaviors. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 7, p. 2547–2558, 17 fev. 2010.

STEULLET, P. et al. Redox dysregulation, neuroinflammation, and NMDA receptor hypofunction: A “central hub” in schizophrenia pathophysiology? **Schizophrenia Research**, v. 176, n. 1, p. 41–51, 2016.

STEVENS, J. R. Neuropathology of schizophrenia. **Archives of general psychiatry**, v. 39, n. 10, p. 1131–9, out. 1982.

STONE, J. M.; PILOWSKY, L. S. Novel targets for drugs in schizophrenia. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 6, n. 4, p. 265–72, ago. 2007.

SWAYZE, V. W. Frontal leukotomy and related psychosurgical procedures in the era before antipsychotics (1935-1954): a historical overview. **American Journal of Psychiatry**, v. 152, n. 4, p. 505–515, abr. 1995.

SWERDLOW, N. R. et al. The neural substrates of sensorimotor gating of the startle reflex: a review of recent findings and their implications. **Journal of Psychopharmacology**, v. 6, n. 2, p. 176–190, mar. 1992.

SWERDLOW, N. R. et al. Men are more inhibited than women by weak prepulses. **Biological Psychiatry**, v. 34, n. 4, p. 253–260, 1993.

SWERDLOW, N. R. et al. Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research. **Psychopharmacology**, v. 199, n. 3, p. 331–388, 21 ago. 2008.

TANDON, R. et al. Definition and description of schizophrenia in the DSM-5. **Schizophrenia Research**, v. 150, n. 1, p. 3–10, out. 2013.

TANDON, R.; NASRALLAH, H. A.; KESHAVAN, M. S. Schizophrenia, “Just the Facts” 5. Treatment and prevention Past, present, and future. **Schizophrenia Research**, v. 122, n. 1–3, p. 1–23, 2010.

TAYLOR, D. DIFFERENTIAL RATES OF CEREBRAL MATURATION BETWEEN SEXES AND BETWEEN HEMISPHERES. **The Lancet**, v. 294, n. 7612, p. 140–142, jul. 1969.

TERASAWA, E.; TIMIRAS, P. S. Electrical Activity During the Estrous Cycle of the Rat: Cyclic Changes in Limbic Structures. **Endocrinology**, v. 83, n. 2, p. 207–216, ago. 1968.

TOMASIK, J. et al. Neuroimmune biomarkers in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 176, n. 1, p. 3–13, 2016.

TOSIC, M. et al. Schizophrenia and oxidative stress: glutamate cysteine ligase modifier as a susceptibility gene. **American journal of human genetics**, v. 79, n. 3, p. 586–92, set. 2006.

TRZESNIAK, C. et al. Adhesio interthalamica alterations in schizophrenia spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 4, p. 877–886, jun. 2011.

TSUANG, M. Schizophrenia: genes and environment. **Biological psychiatry**, v. 47, n. 3, p. 210–20, 1 fev. 2000.

TURETSKY, B. I. et al. Neurophysiological endophenotypes of schizophrenia: the viability of selected candidate measures. **Schizophrenia bulletin**, v. 33, n. 1, p. 69–94, jan. 2007.

URANOVA, N. A. et al. Ultrastructural damage of capillaries in the neocortex in schizophrenia. **The World Journal of Biological Psychiatry**, v. 11, n. 3, p. 567–578, 29 jan. 2010.

VALERA, S.; BALLIVET, M.; BERTRAND, D. Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 20, p. 9949–53, 15 out. 1992.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

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. 246–70, mar. 2010.

VAN DER WERF, M. et al. Systematic review and collaborative recalculation of 133 693 incident cases of schizophrenia. **Psychological Medicine**, v. 44, n. 1, p. 9–16, 17 jan. 2014.

VICENS, P. et al. Effects of an alpha7 nicotinic receptor agonist and stress on spatial memory in an animal model of Alzheimer's disease. **BioMed research international**, v. 2013, p. 952719, 2013.

VIÑA, J. et al. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. **FEBS Letters**, v. 579, n. 12, p. 2541–2545, 9 maio 2005.

VORHEES, C. V et al. Prenatal immune challenge in rats: effects of polyinosinic-polycytidylic acid on spatial learning, prepulse inhibition, conditioned fear, and responses to MK-801 and amphetamine. **Neurotoxicology and teratology**, v. 47, p. 54–65, 2015.

WANG, T. et al. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12, p. 1366–1373, 21 dez. 2004.

WARREN, S. G. et al. LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. **Brain research**, v. 703, n. 1–2, p. 26–30, 12 dez. 1995.

WATANABE, Y.; SOMEYA, T.; NAWA, H. Cytokine hypothesis of schizophrenia pathogenesis: Evidence from human studies and animal models. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 64, n. 3, p. 217–230, 8 abr. 2010.

WATERS, E. M. et al. G-Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 Is Anatomically Positioned to Modulate Synaptic Plasticity in the Mouse Hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 6, p. 2384–2397, 11 fev. 2015.

WATKINS, C. C.; ANDREWS, S. R. Clinical studies of neuroinflammatory mechanisms in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 176, n. 1, p. 14–22, 2016.

WEINBERGER, D. . From neuropathology to neurodevelopment. **The Lancet**, v. 346, n. 8974, p. 552–557, ago. 1995.

WENZEL, A. et al. NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. **Journal of neurochemistry**, v. 68, n. 2, p. 469–78, fev. 1997.

WHO | Schizophrenia. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs397/en/>>. Acesso em: 16 fev. 2017.

WIBLE, C. G. et al. Prefrontal cortex, negative symptoms, and schizophrenia: an MRI study. **Psychiatry Res**, v. 108, n. 2, p. 65–78, 2001.

WU, J. Q. et al. Transcriptome Sequencing Revealed Significant Alteration of Cortical Promoter Usage and Splicing in Schizophrenia. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e36351, 27 abr. 2012.

WU, Y. C. et al. Sex differences and the role of estrogen in animal models of schizophrenia: Interaction with BDNF. **Neuroscience**, v. 239, p. 67–83, 2013.

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. 460–6, fev. 1996.

YANG, A.; TSAI, S.-J. New Targets for Schizophrenia Treatment beyond the Dopamine Hypothesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1689, 3 ago. 2017.

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

YOUNG, J. W. et al. Using the MATRICS to guide development of a preclinical cognitive test battery for research in schizophrenia. **Pharmacology & therapeutics**, v. 122, n. 2, p. 150–202, maio 2009.

YUNG, A. R. et al. Psychosis prediction: 12-month follow up of a high-risk ("prodromal") group. **Schizophrenia research**, v. 60, n. 1, p. 21–32, 1 mar. 2003.

YUNG, A. R. et al. Declining Transition Rate in Ultra High Risk (Prodromal) Services: Dilution or Reduction of Risk? **Schizophrenia Bulletin**, v. 33, n. 3, p. 673–681, 19 mar. 2007.

YUNG, A. R. et al. Validation of “prodromal” criteria to detect individuals at ultra high risk of psychosis: 2 year follow-up. **Schizophrenia Research**, v. 105, n. 1–3, p. 10–17, out. 2008.

ZEEVALK, G. D.; RAZMPOUR, R.; BERNARD, L. P. Glutathione and Parkinson’s disease: Is this the elephant in the room? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, n. 4, p. 236–249, abr. 2008.

ZHAO, D. et al. Prenatal stress disturbs hippocampal KIF17 and NR2B in spatial cognition in male offspring. **Journal of Neuroscience Research**, v. 91, n. 4, p. 535–544, abr. 2013.

ZHENG, W. et al. The possible role of the Akt signaling pathway in schizophrenia. **Brain Research**, v. 1470, p. 145–158, 2012.

ZNAMENSKY, V. et al. Estrogen Levels Regulate the Subcellular Distribution of Phosphorylated Akt in Hippocampal CA1 Dendrites. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 6, 2003.

APÊNDICE A – ARTIGO REFERENTE AO CAPÍTULO I PUBLICADO EM REVISTA DE IMPACTO B1

Behavioural Brain Research 331 (2017) 30–37



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr



Research report

Two-hit model of schizophrenia induced by neonatal immune activation and peripubertal stress in rats: Study of sex differences and brain oxidative alterations



Aline Santos Monte^a, Bruna Stefânia Ferreira Mello^a, Vlândia Célia Moreira Borella^a, Tatiane da Silva Araujo^a, Francisco Eliclécio Rodrigues da Silva^a, Francisca Cléa F de Sousa^a, Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira^b, Clarissa Severino Gama^{c,d}, Mary V. Seeman^e, Silvânia Maria Mendes Vasconcelos^f, David Freitas De Lucena^{g,h}, Danielle Macêdo^{a,i,*}

^a Drug Research and Development Center, Department of Physiology and Pharmacology, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^b Department of Pharmacology and Department of Physiology – ICB, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Laboratório de Psiquiatria Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^e Department of Psychiatry, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

^f National Institute for Developmental Psychiatry (INCT – INPD, CNPq), Brazil

^g National Institute for Translational Medicine (INCT-TM, CNPq), Brazil

ARTICLE INFO

Keywords

Schizophrenia
Sex differences
Two-hit animal model
Neonatal poly(I:C)
Oxidative imbalance

ABSTRACT

Schizophrenia is considered to be a developmental disorder with distinctive sex differences. Aiming to simulate the vulnerability of the third trimester of human pregnancy to the developmental course of schizophrenia, an animal model was developed, using neonatal poly(I:C) as a first-hit, and peripubertal stress as a second-hit, i.e. a two-hit model. Since, to date, there have been no references to sex differences in the two-hit model, our study sought to determine sex influences on the development of behavior and brain oxidative change in adult rats submitted to neonatal exposure to poly(I:C) on postnatal days 5–7 as well as peripubertal unpredictable stress (PUS). Our results showed that adult two-hit rats present sex-specific behavioral alterations, with females showing more pronounced deficits in prepulse inhibition of the startle reflex and hyperlocomotion, while males showing more deficits in social interaction. Male and female animals exhibited similar working memory deficits. The levels of the endogenous antioxidant, reduced glutathione, were decreased in the prefrontal cortex (PFC) of both male and female animals exposed to both poly(I:C) and poly(I:C) + PUS. Only females presented decrements in GSH levels in the striatum. Nitrite levels were increased in the PFC of male and in the striatum of female poly(I:C) + PUS rats. Increased lipid peroxidation was observed in the PFC of females and in the striatum of males and females exposed to poly(I:C) and poly(I:C) + PUS. Thus, the present study presents evidence for sex differences in behavior and oxidative brain change induced by a two-hit model of schizophrenia.

APÊNDICE B - APROVAÇÃO DO TRABALHO PELO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA ANIMAL (CEPA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza – CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “N-acetilcisteína: uma possível estratégia de prevenção dos sintomas esquizofreniformes em animais submetidos ao modelo de esquizofrenia por desafio imune pós-natal”, protocolo nº 01/15, sob responsabilidade Danielle Macêdo Gaspar, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 30 de junho de 2015.

Vigência do projeto	01/08/2013 a 01/07/2018
Espécie/Linhagem	Rato Wistar heterogênico
Nº de Animais	60
Peso/Idade	250-350g / 3 meses
Sexo	
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 07 de julho de 2015

Rodrigo Siqueira
Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Sipe: 1520734