



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

GREICY COELHO ARRAES

**ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL COMO ESTRATÉGIA DE PREVENÇÃO NA
ESQUIZOFRENIA: EVIDÊNCIAS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A MODELO DE DESAFIO IMUNE NEONATAL**

FORTALEZA/CE

2019

GREICY COELHO ARRAES

**ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL COMO ESTRATÉGIA DE PREVENÇÃO NA
ESQUIZOFRENIA: EVIDÊNCIAS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A MODELO DE DESAFIO IMUNE NEONATAL**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Farmacologia.

Orientadora: Dra. Danielle Macêdo Gaspar

FORTALEZA

2019

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)

- A796e Arraes, Greicy Coelho Arraes.
ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL COMO ESTRATÉGIA DE PREVENÇÃO NA ESQUIZOFRENIA:
EVIDÊNCIAS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS
A MODELO DE DESAFIO IMUNE NEONATAL / Greicy Coelho Arraes Arraes. – 2019.
124 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.
1. Esquizofrenia. 2. Enriquecimento ambiental. 3. Modelos experimentais. 4. Comportamento. 5.
Epigenética. I. Título.

CDD 615.1

GREICY COELHO ARRAES

**ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL COMO ESTRATÉGIA DE PREVENÇÃO NA
ESQUIZOFRENIA: EVIDÊNCIAS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A MODELO DE DESAFIO IMUNE NEONATAL**

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

Aprovada em: 24/01/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof (a). Dra. Danielle Macêdo Gaspar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof (a). Dra. Júlia Ariana de Souza Gomes Lenzi
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Dr. Wesley Lyevertton Correia Ribeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof (a). Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado
Universidade Federal do Ceará

A Deus.

Aos meus pais, Rouvani e Ivonete, exemplos
de força e trabalho, que foram minha
primeira motivação para sonhar e crescer.

Sem o esforço, dedicação, sacrifício, e,
sobretudo, sem o amor deles eu certamente
nunca poderia ter chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todo amor e zelo por mim nesta jornada e por tornar os sonhos do meu coração em realidade segundo o Seu coração.

Agradeço à minha família, meu alicerce, a meu pai e a minha mãe, força e cuidado de Deus comigo e que sempre me estimularam a estudar e deram o suporte para meu crescimento intelectual e profissional, ensinando-me o valor da educação.

Agradeço ao meu amado esposo, Vitor Milhomens Arraes, que tem sido luz, um motivador e grande apoio de fé para mim durante boa parte dessa jornada, assim como um ombro zeloso e afável nas horas de cansaço.

Agradeço à minha primeira orientadora, a professora e fisioterapeuta Dra. Ana Paula Abdon que abriu as portas da pesquisa para mim na minha universidade de origem UNIFOR e à Dra. Adriana Rolim que foi um anjo do Senhor que acreditou em mim e me confiou aos cuidados da professora Dra. Danielle Macêdo.

Agradeço à professora e Dra. Danielle Macêdo Gaspar, que me recebeu em seu grupo de pesquisa e me confiou seu nome como orientadora. Sou muito grata a Deus por tê-la usando para me formar sobre superação, resiliência e autoconfiança.

Agradeço aos amigos que fiz no laboratório Manoel, Eliclécio, Giovanna, Aline, Taciana e Nayana, que me mostraram que a afetividade é um dos pilares do aprendizado, e que a amizade é necessária ao crescimento humano.

Às amigas Germana Vasconcelos e Camila Nayane Lima, em especial, agradeço por me ajudarem de forma importantíssima por vários momentos cruciais deste trabalho.

Agradeço ao amigo Dr. Estêfano Barreto, que participou dessa jornada desde a seleção do mestrado. Nos momentos mais causticantes estive ao meu lado, tanto na prática laboratorial, quanto no apoio emocional. Ganhei um amigo-irmão.

Agradeço a todos meus amigos pessoais que sempre me estimularam e sempre entenderam quando eu não podia estar com eles, pois era preciso estudar, e também àqueles que fizeram parte dessa conquista, mas não estamos mais juntos para compartilhar esse momento.

Agradeço a todos os professores, técnicas e colegas do Laboratório de Neurofarmacologia da UFC que contribuíram nessa trajetória por mim percorrida até este ponto.

Agradeço ao CNPQ pelo apoio financeiro necessário à execução deste trabalho.

“A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério. Essa é a fonte de toda a arte e ciências verdadeiras”.

Albert Einstein

RESUMO

ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL COMO ESTRATÉGIA DE PREVENÇÃO NA ESQUIZOFRENIA: EVIDÊNCIAS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A MODELO DE DESAFIO IMUNE NEONATAL

A esquizofrenia é um transtorno mental complexo de expressão fenotípica variável e etiologia multifatorial ainda mal compreendida, caracterizada por sintomas como psicose, alucinações, delírios e pensamentos anormais. Os pacientes com este transtorno evoluem com declínio do potencial funcional, conduzindo a uma incapacidade social e laboral em mais de 50% dos casos. Atualmente, o tratamento precoce é fundamental na prevenção das complicações da cronificação, embora não haja estratégias de prevenção para o desenvolvimento deste transtorno mental. É forte a associação entre a exposição a fatores ambientais, como infecções perinatais em períodos críticos do neurodesenvolvimento, com o desenvolvimento da esquizofrenia na idade adulta. Ademais influências ambientais positivas (Ex.: ambiente controlado) ou negativas (Ex.: uso de cannabis sativa) na adolescência podem proteger ou potencializar, respectivamente, o risco para o desenvolvimento da esquizofrenia. No presente trabalho objetivou-se estudar o efeito preventivo da estratégia não-farmacológica, enriquecimento ambiental (EA), que representa a exposição do animal a um ambiente agregado de recursos para estimulação, em camundongos Swiss submetidos ao modelo de esquizofrenia por “dois desafios”, que consiste na exposição a desafio imune no período neonatal combinado ao estresse imprevisível na adolescência, dois importantes fatores de risco para esquizofrenia. As avaliações comportamentais foram realizadas por meio dos testes de Inibição pré-pulso (IPP) e campo aberto, para avaliação de sintomas positivos, Labirinto em Y, para avaliação da memória de trabalho e Interação social, para determinação do comportamento social. Foram avaliados parâmetros relacionados a hipóteses da esquizofrenia, como neuroinflamatória (por meio da determinação da ativação microglial), glutamatérgica (pela expressão da subunidade NR2b do receptor NMDA), serotoninérgica (pela avaliação da metilação do gene *Slc6a4* que codifica o transportador da serotonina - SERT), e neurogênese, através da expressão de doublecortina (DCX). Os animais submetidos a prevenção com EA apresentaram melhor performance cognitiva, melhor resposta de sobressalto, se mostraram mais exploradores, tendendo a serem menos ansiosos e preservando a capacidade de interação social quando comparados ao grupo esquizofrenia. A prevenção por EA reduziu a ativação microglial sem alterar a subunidade NR2b em relação ao grupo esquizofrenia. Neurogênese foi observada em animais submetidos a prevenção por EA. A prevenção por EA causou hipometilação do gene do *Slc6a4* avaliado por *High Resolution Melting* (HRM), enquanto o grupo esquizofrenia apresentou aproximadamente 50% de metilação. Conclui-se que um ambiente enriquecido pode ser uma importante estratégia de prevenção da esquizofrenia, por mecanismos que envolvem efeito anti-inflamatório, neurogênese e alterações na metilação do gene *Slc6a4*.

Palavras-chave: Esquizofrenia. Modelos experimentais. Neuropsicologia. Comportamento. Enriquecimento ambiental. Epigenética. Microglia. Glutamate. Serotonina.

ABSTRACT

ENVIRONMENTAL ENRICHMENT AS A PREVENTION STRATEGY IN SCHIZOPHRENIA: BEHAVIORAL AND NEUROCHEMICAL EVIDENCES OF MICE SUBMITTED TO NEONATAL IMMUNE CHALLENGE MODEL

Schizophrenia is a complex mental disorder of variable phenotypic expression and multifactorial etiology still poorly understood characterized by symptoms such as psychosis, hallucinations, delusions and abnormal thoughts. Patients with this disorder develop with declining functional potential, leading to social and occupational disability in more than 50% of cases. Currently, early treatment is essential in preventing complications of chronification, although there are no prevention strategies for the development of this mental disorder. There is a strong association between exposure to environmental factors, such as perinatal infections during critical periods of neurodevelopment, with the development of schizophrenia in adulthood. In addition, positive environmental influences (eg, controlled environment) or negative influences (eg, cannabis sativa use) in adolescence may protect or potentiate, respectively, the risk for the development of schizophrenia. In this context, the objective of this study was to study the preventive effect of the non-pharmacological strategy, environmental enrichment (EA), which represents the mice Swiss exposure to an aggregate environment of stimulation resources in mice submitted to the model of schizophrenia by "2Hits", which consists of exposure to immune challenge in the neonatal period combined with unpredictable stress in adolescence, two important risk factors for schizophrenia. The behavioral evaluations were performed through the pre-pulse Inhibition (IPP) and open field tests, for evaluation of positive symptoms, Y-labyrinth, for evaluation of working memory and social interaction, to determine social behavior. Parameters related to the hypothesis of schizophrenia, such as neuroinflammatory (through the determination of microglial activation), glutamatergic (by the expression of the NMDA receptor NR2b subunit), serotonergic (through the methylation of the do gene *Slc6a4* serotonin transporter), and neurogenesis, through the expression of doublecortin (DCX). The animals submitted to prevention with AD presented better cognitive performance, better startle response, were more explorers, tending to be less anxious and preserving the social interaction capacity when compared to the schizophrenia group. Prevention by AE reduced microglial activation without altering the NR2b subunit in relation to the schizophrenia group. Neurogenesis was observed in animals submitted to AS prevention. Prevention by AD caused hypomethylation of the *Slc6a4* gene evaluated by *High Resolution Melting* (HRM), while the schizophrenia group presented approximately 50% methylation. It is concluded that an enriched

environment may be an important strategy to prevent schizophrenia, by mechanisms involving anti-inflammatory effect, neurogenesis and alterations in the methylation of the gene *Slc6a4*.

Keywords: Schizophrenia. Experimental models. Neuropsychology. Behavior. Environmental enrichment. Epigenetic. Microglia, Serotonin. Glutamate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estágios iniciais da psicose.....	19
Figura 2 - Sistema Córtico-límbico e regiões cerebrais e respectivas funções implicadas na esquizofrenia.....	22
Figura 3 - Relação entre dimensões dos sintomas e atividade cerebral relacionada à tarefa em IRMf (Imagem por ressonância magnética funcional).....	23
Figura 4 - Representação esquemática dos sistemas dopaminérgicos centrais humanos.....	24
Figura 5 - DNA metilado pela adição do grupamento metil (CH ₃) na base citosina (C).....	34
Figura 6 - Regulação epigenética em ilhas CpG mediada pela metilação do DNA. Na ausência de metilação nos dinucleotídeos CpG a transcrição ocorre normalmente, mas quando encontram-se metilado o fator de transcrição não consegue se ligar e o gene é silenciado.	35
Figura 7 - Modelo animal de esquizofrenia “2Hits”.....	43
Figura 8 - Trajetória da vida dos animais pertencentes ao grupo "Salina".....	46
Figura 9 - Trajetória da vida dos animais pertencentes ao grupo "Salina+EA".....	46
Figura 10 - Trajetória da vida dos animais pertencentes ao grupo “2Hits”.....	47
Figura 11 - Trajetória da vida dos animais pertencentes ao grupo "2Hits+EA".	47
Figura 12 - Caixas utilizadas para acondicionamento de animais de laboratório.	49
Figura 13 - Caixa com algumas das possíveis organizações de enriquecimento ambiental propostos.....	50
Figura 14 - Conceito básico de normalidade e anormalidade no teste de inibição pré-pulso. .	53
Figura 15 - Representação do aparato utilizado no teste do Labirinto em Y (“Y-Maze”).	55
Figura 16 – Teste do Campo Aberto.	56
Figura 17 - Imagem ilustrativa do aparato utilizado para aplicação do teste de interação social.	57
Figura 18 - Exemplo do resultado do sequenciamento de nucleotídeos pós modificação por bissulfito de sódio. Após a conversão do bissulfito, as citosinas não metiladas são convertidas em uracila, em seguida. Na etapa de amplificação do DNA, a uracila é lida como timina pela enzima taq DNA polimerase. A metilação protege as citosinas metiladas contra a modificação que permanecem citosinas após a amplificação. Portanto, a citosina metilada e a citosina não metilada (timina) podem ser distinguidas de acordo com o resultado do sequenciamento.....	61
Figura 19 - A) Seqüência genômica do <i>Slc6a4</i> de camundongo (553 nucleotídeos). Em azul: os dinucleotídeos CpGs analisados (total de 9); em vermelho: as regiões de pareamento dos primers utilizados; em letras minúsculas: o primeiro exon. B) Gráfico gerado pelo programa <i>MethPrimer</i> evidenciando a Ilha CpG (em azul) em fragmento correspondente ao gene <i>Slc6a4</i>	62
Figura 20 – Efeito do enriquecimento ambiental na percentagem de inibição pré-pulso de animais submetidos ao modelo de esquizofrenia por “2Hits”.....	65
Figura 21 – Efeito do enriquecimento ambiental sob a memória de trabalho de animais submetidos ao modelo do “2Hits”.....	69

Figura 22 – Efeito do enriquecimento ambiental sob o número total de entradas espontâneas em cada braço do aparato do teste <i>Y-Maze</i> de animais submetidos ao modelo do “ <i>2Hits</i> ”.	70
Figura 23 - Efeito do enriquecimento ambiental sob a distância percorrida no campo aberto de animais submetidos ao modelo do “ <i>2Hits</i> ”.....	74
Figura 24 - Efeito do enriquecimento ambiental sob o número total de cruzamentos no teste de campo aberto em camundongos submetidos ao modelo de esquizofrenia por “ <i>2Hits</i> ”.....	75
Figura 25 – Imagem sobre a predominância do grupo <i>2Hits</i> em zonas do aparato medida pela permanência em áreas da arena teste determinada por cores.	77
Figura 26 - Imagem sobre a predominância do grupo <i>2Hits</i> +EA em zonas do aparato medida pela permanência em áreas da arena teste determinada por cores.....	78
Figura 27 – Imagem sobre a predominância do grupo Salina em zonas do aparato medida pela permanência em áreas da arena teste determinada por cores.	80
Figura 28 - Imagem sobre a predominância do grupo Salina+EA em zonas do aparato medida pela permanência em áreas da arena teste determinada por cores.....	81
Figura 29 - Efeito do enriquecimento ambiental na interação social de animais submetidos ao modelo de esquizofrenia por “ <i>2Hits</i> ”.	82
Figura 30 - A figura abaixo representa a movimentação dos animais submetidos ao modelo animal de esquizofrenia “ <i>2Hits</i> ”.	86
Figura 31 - A figura abaixo representa a movimentação dos animais pertencentes aos grupos Salina e Salina+EA.....	87
Figura 32 – Quantificação proteica de Iba1 no hipocampo (HC) de animais expostos ao enriquecimento ambiental e submetidos ao modelo de “ <i>2Hits</i> ”.....	89
Figura 33 – Expressão proteica da subunidade NR2b do receptor de glutamato no hipocampo (HC) de animais expostos ao enriquecimento ambiental e submetidos ao modelo de esquizofrenia por “ <i>2Hits</i> ”.	94
Figura 34 - Expressão proteica de DCX em animais submetidos ao enriquecimento ambiental como estratégia de prevenção para as alterações induzidas pelo modelo do “ <i>2Hits</i> ”.	98
Figura 35 - Picos de <i>Melting</i> normalizados do DNA controle.	99
Figura 36 - Curvas de <i>Melting</i> do DNA controle.	100
Figura 37 – Representação das curvas de <i>Melting</i> nos grupos em estudo. Em verde: DNA hipometilado (0%), em vermelho, DNA parcialmente metilado (50%), em azul, DNA hipermetilado (100%).....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos sintomas típicos da esquizofrenia.....	20
Tabela 2 - Exposição aos estímulos estressores e seus componentes específicos.....	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
°C	Grau Celsius
CE	Corpo estriado
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animal
CID-10	Classificação Internacional de Doenças – 10ª edição
CPF	Córtex pré-frontal
CpG	Regiões de DNA de nucleotídeos de citosina
DA	Dopamina
DNMT1	DNA methyltransferase 1
D1	Receptor dopaminérgicos tipo 1
D2	Receptor dopaminérgicos tipo 2
dB	Decibel
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSM-V	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais da Associação Americana de Psiquiatria, 5ª edição.
EA	Enriquecimento Ambiental
EPM	Erro padrão da média
g	Grama
GxE	Interação Gene x Ambiente
h	Hora
Iba1	<i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>
HP	Hipocampo
HCl	Ácido clorídrico
IPP	Inibição Pré-Pulso
Kg	Quilograma
LTP	<i>Long-term potentiation</i>
mA	Miliampère
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro

ms	Milissegundos
NaCl	Cloreto de Sódio
NMDA	Receptor de Glutamato (N-metil D-aspartato)
NR2b	Subunidade do receptor de NMDA
OMS	Organização Mundial de Saúde
Ph	Potencial de hidrogeniônico
PIC	Poly:IC
Poly:IC	Ácido poliriboinosinico:poliribocitidilico
PN	Pós-natal
RIPA	Inibidor de protease
SDS	Deoxicolato de sódio
s	Segundo
SAL	Solução salina
SNC	Sistema Nervoso Central
μl	Microlitro
V	Volts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Aspectos gerais da esquizofrenia.....	18
1.2 Principais achados sobre a fisiopatologia da esquizofrenia.....	21
1.2.1 A Hipótese dopaminérgica	23
1.2.2 A hipótese glutamatérgica	25
1.2.3 HIPÓTESE SEROTONINÉRGICA.....	28
1.2.4 A hipótese imunoinflamatória	30
1.3 Modelo animal dos dois desafios “two-hits model”	31
1.4 A influência genética na esquizofrenia.....	32
1.5 Epigenética na esquizofrenia	33
1.5 O Enriquecimento Ambiental.....	36
1.6 Integração dos aspectos mencionados	38
2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	40
3.1 Objetivo Geral	41
3.2 Objetivos Específicos	41
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 Animais.....	42
4.2 Modelo de esquizofrenia induzida por estimulação imune pré-natal e estresse na adolescência – Modelo dos “dois desafios” (“2Hits”)	42
4.3 Desenho Experimental e tratamento dos animais.....	44
4.4 Determinações Comportamentais.....	52
4.4.1 Teste de Inibição Pré-pulso (IPP).....	52

4.4.2	Teste do Labirinto em Y (“Y-Maze”)	54
4.4.3	Teste do Campo aberto (“Open Field”)	55
4.4.4	Teste de Interação Social	56
4.5	Determinações neuroquímicas	58
4.5.1	Expressão das proteínas Iba1 (<i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>) e NR2b (Subunidade do receptor de NMDA)	58
4.5.2	Extração de proteínas	58
4.5.3	Método Bradford para dosagem de proteínas	58
4.5.4	<i>Western Blot</i>	58
4.6	Perfil de Metilação do gene <i>Slc6a4</i>	60
4.6.1	Extração do DNA genômico	60
4.6.2	Modificação do DNA por bissulfito de sódio	60
4.7	Identificação da ilha CpG e padronização da amplificação do DNA	61
4.8	<i>High Resolution Melting</i> (HRM)	62
4.10	Análise estatística	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
	PARTE 1: SOBRE OS TESTES COMPORTAMENTAIS	65
5.1.	Teste de Inibição Pré-Pulso (IPP)	65
5.2	Teste do Labirinto em Y (<i>Y-Maze</i>)	69
5.3	Teste de Campo Aberto	72
5.4	Teste de Interação Social	82
	PARTE 2: SOBRE OS TESTES BIOMOLECULARES	88
5.5	Avaliação proteica de células da micróglia por determinação de Iba1 (<i>Ionized calcium binding adaptor molecule-1</i>)	88
5.6	Avaliação da expressão proteica NR2b (<i>Subunidade do receptor de NMDA</i>)	93

5.7 Avaliação da proteína DCX marcador de neurogênese.....	97
PARTE 3: SOBRE AS ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS	99
5.8 Perfil de metilação do gene do transportador de serotonina (<i>Slc6a4</i>).....	99
7 CONCLUSÃO.....	106
REFERÊNCIAS	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da esquizofrenia

O termo esquizofrenia em 2011 completou cem anos sendo criado pelo psiquiatra suíço Eugen Bleuler, ao se referir aos casos de psicose que antes eram conceituados como demência precoce (GAEBEL, WOLFGANG, 2011). Em 1919, Kraepelin publicou o livro *Dementia Praecox and Paraphrenia*, segundo o qual as demências precoces eram agrupadas em quadros clínicos de psicose e uma evolução caracterizada por declínio cognitivo progressivo. A mudança na nomenclatura para o termo esquizofrenia ajudou a distinguir dos outros tipos de psicose. Na história são descritos vários relatos de doenças com sintomatologia semelhante ao que chamamos atualmente de esquizofrenia, mas existem linhas importantes de pensamentos que acreditam ser uma doença dos tempos modernos (NARDI; QUEVEDO, 2015)

A esquizofrenia é um transtorno mental complexo de expressão fenotípica variável e etiologia multifatorial mal compreendida. Essa é a percepção da doença no amplo consenso no âmbito acadêmico e clínico. Há um componente genético bastante associado, complexo e heterogêneo entre fatores ambientais que interagem com a suscetibilidade genética. Comumente, ocorrem desvios precoces nos padrões do neurodesenvolvimento precedendo o aparecimento dos sintomas psicóticos clássicos (JABLENSKY, *et al.*, 1992).

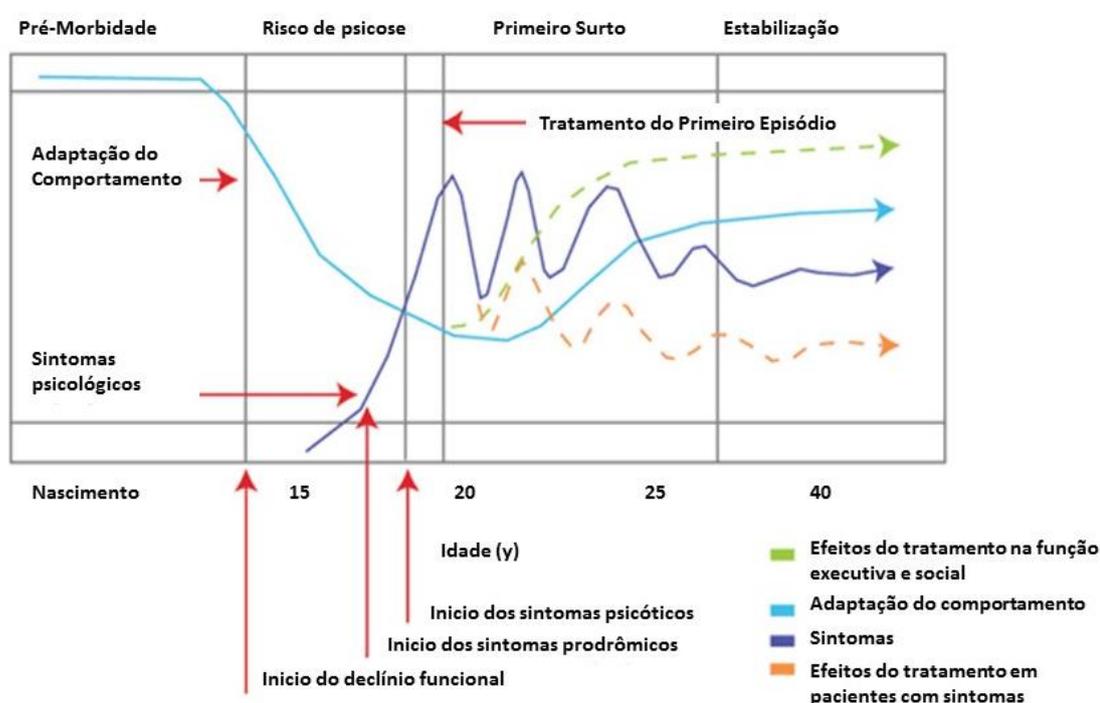
Um estudo da área de captação epidemiológica, realizado pelo *National Institute of Mental Health*, demonstrou prevalência de esquizofrenia ao longo da vida de 0,6 a 1,9% da população. Acomete principalmente a população jovem adulta, sendo igualmente prevalente entre homens e mulheres. Todavia, os sexos diferem quanto ao início da doença. O início é mais precoce para homens com idade de pico entre 10 e 25 anos, quanto para mulheres é de 25 a 35 anos. As mulheres apresentam distribuição bimodal quando 3 a 10% apresentam início da doença após os 40 anos. Cerca de 90% dos pacientes em tratamento se encontram na faixa etária de 15 a 55 anos (SADOCK; SADOCK, 2016).

Por ser um severo transtorno mental que acompanha o paciente por toda a vida, geralmente evoluindo com significativo sofrimento, limitando o potencial funcional,

conduzindo a uma incapacidade social e laboral em mais de 50% dos casos, torna-se assim uma das 10 doenças mais caras do mundo (KESSLER *et al.*, 2005; MURRAY; LOPEZ, 1996).

Diversos estudos demonstram que após a primeira hospitalização ao longo de 5 a 10 anos apenas 10 a 20% dos pacientes apresentam um desfecho positivo e mais de 50% apresentam resultado insatisfatório com hospitalizações frequentes, exacerbação dos sintomas, episódios de transtornos do humor e tentativas de suicídio (SADOCK; SADOCK, 2016).

Figura 1 - Estágios iniciais da psicose.



Fonte: (<http://www.psychiatrytimes.com/schizophrenia/early-antecedents-and-detection-schizophrenia> acesso em: 01/02/2017).

A maioria dos indivíduos que desenvolvem quadros psicóticos com características de esquizofrenia evoluirão para um quadro de cronificação da doença (Figura 1). Os sintomas são classificados e subdivididos de forma tradicional distinção positivo/negativos (TABELA 1) {Formatting Citation}. Também, são considerados domínios sindrômicos na dimensão cognitiva, afetiva e do humor. Todos são bastante variáveis quanto as características e gravidade, como também o declínio da atividade profissional e a disfunção social (LIEBERMAN; SCOTT STROUP, 2009).

O sistema de classificação americano para transtornos psiquiátricos, o DSM-5 (Manual de Diagnóstico e Estatística), e o sistema da Organização Mundial de Saúde (OMS), o CID-10 (Classificação Internacional de Doenças) são os documentos mais importantes para classificação de doenças e transtornos psiquiátricos utilizados para definição e o diagnóstico da esquizofrenia. Atualmente, o DSM-5 escreve o tópico como “Espectro da Esquizofrenia e Outros Transtornos Psicóticos” para caracterizar a esquizofrenia em seu panorama de complexidades (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; JABLENSKY, 2009).

Existem características com relevância clínica significativa para compor o diagnóstico de esquizofrenia como afeto restrito, pobreza no discurso, restrição do interesse e interesse social diminuído. Pelo menos duas destas características duradouras devem estar presentes (TABELA 1) as quais podem estar associados a fatores importantes como ansiedade, transtorno do pensamento formal e alucinações ou delírios (SADOCK; SADOCK, 2016).

Tabela 1 - Classificação dos sintomas típicos da esquizofrenia

Positivos		Negativos
Psicóticos	De desorganização	
<i>Alucinação</i>	<i>Desagregação do pensamento</i>	<i>Embotamento afetivo</i>
<i>Delírio</i>	<i>Bloqueio do pensamento</i>	<i>Anedonia</i>
<i>Alterações da consciência da atividade do eu</i>	<i>Alterações da consciência da unidade do eu</i>	<i>Hipobulia</i>
Ex: Roubo do pensamento, imposição do pensamento	Ex: Paratimia, ambitimia,	<i>Pensamento empobrecido</i>
<i>Alterações da consciência da identidade do eu</i>	<i>Sinais catatônicos</i>	<i>Déficit de atenção</i>
Ex: Despersonalização	Ex: Negativismo, obediência automática, agitação, estupor, estereotípias	
<i>Alterações da consciência dos limites do eu</i>		
Ex: Publicação do pensamento, transitivismo		

Fonte: modificado de “Esquizofrenia: Teoria e clínica” (NARDI; QUEVEDO, 2015).

O reconhecimento dos sinais e sintomas precoce e a prevenção da esquizofrenia são áreas de pesquisa de grande interesse, porque os estudos mostram diferentes graus de progresso, desde os estados prodrômicos até a esquizofrenia manifesta, dependendo dos critérios utilizados para detectar e avaliar indivíduos de alto risco para desenvolver a doença (GAEBEL; WOLFGANG, 2011).

O curso clássico da esquizofrenia é de exacerbação e remissão. As recaídas são comuns e os primeiros 5 anos da doença são importantes para indicar o curso da doença. A deterioração do funcionamento basal é cada vez maior a cada recaída da psicose. O retorno

inexitoso das atividades com o nível funcional anterior é o principal distinção entre a esquizofrenia e os outros transtornos do humor (SADOCK; SADOCK, 2016).

As perspectivas atuais tornam cada vez mais evidentes que intervenções precoces são fundamentais para prevenir as complicações da cronificação do transtorno para o indivíduo, já sendo bastante evidente na prática clínica que, quanto maior for o tempo de psicose não tratada, pior será o prognóstico (NOTO, 2009).

1.2 Principais achados sobre a fisiopatologia da esquizofrenia

A classificação da esquizofrenia tem sido definida a partir das manifestações visíveis comum, o fenótipo, considerado evidente na fisiopatologia. Ainda assim, o fenótipo clínico da esquizofrenia é difícil dada a diversidade individual de sintomas (ANDREASEN *et al.*, 1995; LIDDLE, 1987; LINDENMAYER; GROCHOWSKI; HYMAN, 1995; TOOMEY, *et al.*, 1998; TOOMEY; ROSEMARY *et al.*, 1997).

A discussão dos sinais e sintomas clínicos da esquizofrenia levanta três questões fundamentais. A primeira é que nenhum sinal e sintoma é patognomônico para esquizofrenia, ou seja, os achados clínicos são encontrados em outros transtornos psiquiátricos e neurológicos. A segunda é que os sintomas mudam ao longo do curso da doença. Terceiro, é necessário se levar em conta as experiências de vida como escolaridade, capacidade intelectual e sua identidade cultural, e, a subcultural (SADOCK; SADOCK, 2016). Os conceitos abstratos na esquizofrenia se sobrepõem a magnitude da complexidade da doença e história do paciente, como também, a seus aspectos neurobiológicos, afetivo e ambiental.

Devido a uma diversidade na sintomatologia da doença, correspondentemente, também são levantadas várias hipóteses sobre a etiologia da síndrome. Dentre as hipóteses estão (1) teorias sobre a disfunção de neurotransmissores, associadas à (2) disfunções morfofuncionais de regiões do cérebro (FIGURA 3), (3) distúrbios neurodesenvolvimentais associado a um processo neurodegenerativo, e ainda, (4) sinapses patológicas, (5) disfunção da micróglia e (6) redução da neurogênese (GAEBEL; WOLFGANG, 2011).

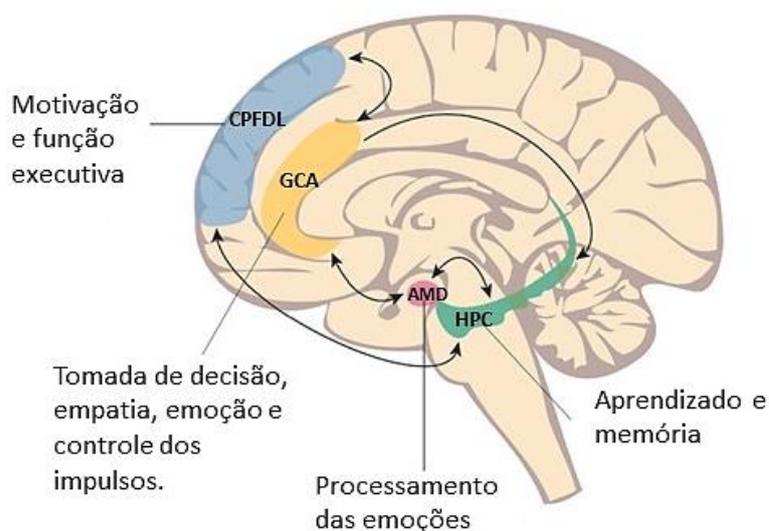
O sistema límbico responde pelos comportamentos instintivos ligados aos impulsos básicos (ex. ira, prazer e sobrevivência) e regulando o comportamento emocional (FIGURA 2). Filogeneticamente, corresponde a parte mais antiga do córtex cerebral, formando um elo entre os centros de consciência superiores no córtex cerebral e o tronco encefálico, que rege os sistemas corporais. O sistema límbico é a unidade básica responsável pelos

comportamentos sociais. Sua descoberta em 1937, foi através das pesquisas do neuroanatomista James Papez, para identificar as áreas básicas do sistema nervoso ligadas as emoções. Papez, percebeu que as regiões eram conectadas, formando um circuito, conhecido hoje, como “Circuito de Papez” (BARRETT; RAYBOULD, 2010).

O sistema límbico é responsável pelo controle das emoções, devido a isso, ele está envolvido na hipótese da fisiopatologia da esquizofrenia. Estudos *post motem* em cérebros de paciente com o transtorno revelaram redução no tamanho das regiões amídala, hipocampo e giro para-hipocampal. Pesquisas sobre o hipocampo, também apresentam funcionalidade anormal adicionalmente a redução do tamanho, distúrbios na transmissão do glutamato e desorganização dos neurônios (SADOCK; SADOCK, 2016).

Alterações nos circuitos neuronais também são mencionados como parte da fisiopatologia da esquizofrenia. Gânglios da base e cerebelo estão reciprocamente conectados aos lobos frontais, portanto anormalidade das funções podem estar relacionadas a qualquer uma dessas áreas. Corroborado a isso, a hipótese dopaminérgica sugere que haja uma lesão no início do desenvolvimento dos tratos dopaminérgicos para córtex pré-frontal e límbico que possa conduzir tanto a sintomas positivos quanto negativos, além de sintomas cognitivos, como observados em pacientes com esquizofrenia (SADOCK; SADOCK, 2016).

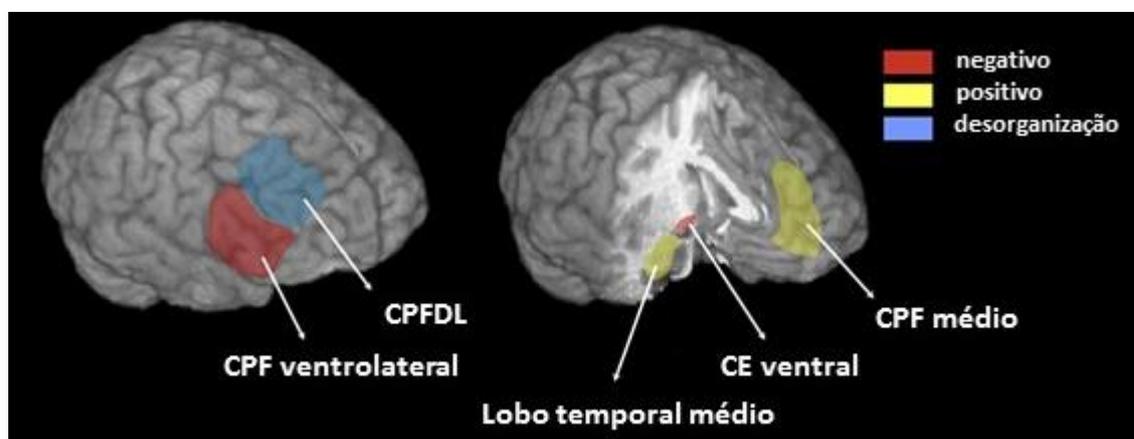
Figura 2 - Sistema Córtico-límbico e regiões cerebrais e respectivas funções implicadas na esquizofrenia.



As regiões que compõem o sistema límbico (hipocampo e giro parahipocampal) em associação com córtex pré-frontal (CPF) e parietal. CPFDL (córtex pré-frontal dorsolateral; GCA (giro do cíngulo anterior); AMD (amígdala); HPC (hipocampo). FONTE: Adaptado, disponível em < <http://www.psychiatrytimes.com/special-reports/neurobiology-borderline-personality-disorder>>. Acesso: 21 mar. 2018.

As evidências da relação do córtex pré-frontal na esquizofrenia baseiam-se em estudos de necropsia cerebral apontando anormalidades anatômicas, déficits funcionais em pesquisas de imagens, bem como, paralelos dos sintomas em pacientes com esquizofrenia e pessoas submetidas a lobotomias pré-frontal ou *síndrome do lobo frontal* (SADOCK; SADOCK, 2016).

Figura 3 - Relação entre dimensões dos sintomas e atividade cerebral relacionada à tarefa em IRMf (Imagem por ressonância magnética funcional).



CPF = córtex pré-frontal; CPFDL = córtex pré-frontal dorso-lateral; Lobo temporal medial = amígdala, hipocampo e giro para-hipocampo. Regiões cerebrais aproximadas para fins de visualização. FONTE: (GOGHARI; SPONHEIM; MACDONALD, 2010).

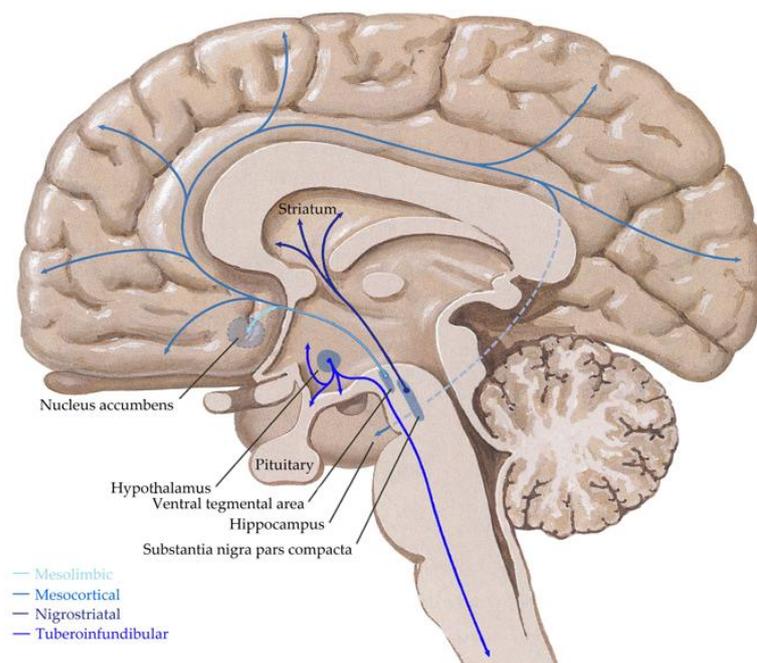
As hipóteses dos neurotransmissores são, ainda hoje, importantes na esquizofrenia. Elas são postuladas principalmente sobre disfunções da dopamina (monoamina) e do glutamato (aminoácido), porém não excluindo a participação de outros neurotransmissores por vias coparticipativas (GAEBEL; WOLFGANG, 2011).

1.2.1 A Hipótese dopaminérgica

A formulação mais simples da hipótese da dopamina na esquizofrenia postula que o transtorno resulta do excesso da atividade dopaminérgica. A teoria básica não indica se a hiperatividade dopaminérgica se dá pela liberação excessiva de dopamina, hipersensibilidade dos receptores ou excesso deles, ou ainda, pela combinação de todos esses. Os tratos

dopaminérgicos frequentemente implicados são o mesocortical e mesolímbico (FIGURA 4). Os neurônios dopaminérgicos projetam-se de seus corpos celulares no mesencéfalo para os neurônios dopaminérgicos no sistema límbico e no córtex cerebral (SADOCK; SADOCK, 2016).

Figura 4 - Representação esquemática dos sistemas dopaminérgicos centrais humanos.



As vias (1) mesolímbica, (2) mesocortical, (3) nigrostriatal e (4) tuberoinfundibular estão representadas em tons de azul diferentes. Fonte: (DAVID L. FELTEN & ANIL N. SHETTY, 2010)

A hipótese dopaminérgica evoluiu baseada nas evidências a partir dos estudos utilizando neurolépticos típicos com ação antagonista sobre receptores D2 apresentando efeitos sobre o tratamento dos efeitos positivos, supostamente reduzindo uma hiperatividade dopaminérgica no circuito do sistema límbico (HEINZ; SCHLAGENHAUF, 2010). Este dado é corroborado com o potencial clínico dessas drogas antagonista de D2 (SEEMAN *et al.*, 1976).

Adicionalmente, os testes baseados em princípios inversos aos anteriores, utilizando drogas como anfetaminas direcionadas a receptores dopaminérgicos aumentam a atividade

dopaminérgica, e geralmente provocam piora nos sintomas positivos da esquizofrenia (ANGRIST; KAMMEN, 1984; LIEBERMAN; KANE; ALVIR, 1987).

Contudo, vista a alta variabilidade, a disfunção da dopamina pode ser restrita a subgrupos de pacientes. Estudos apontam que a estados de hiperdopaminérgicos estão relacionados a fase aguda da doença, enquanto que em períodos remissivos, não há essa hiperatividade do neurotransmissor (LARUELLE *et al.*, 1999).

Outras pesquisas em cérebro de paciente esquizofrênicos *post-mortem* mediram níveis de dopamina, receptores e metabólitos relacionados a doença e não demonstraram alterações consistentes (DAVIS *et al.*, 1991). Portanto, a relação com dopamina com o período da sintomatologia positiva já é bem definida, porém nos períodos de sintomas negativos e cognitivos não são claras as interferências (CROW, 1980), revelando apenas parte do mecanismo fisiopatológico da doença e sinalizando um panorama ainda desafiador.

Baseado nessa série de evidências sobre a neurotransmissão dopaminérgica é possível sugerir que as anormalidades do sistema dopaminérgico não são uma consequência de um problema primário dos neurônios dopaminérgicos, mas uma alteração nas vias neuronais que controlam do fluxo de DA (LARUELLE *et al.*, 1999).

1.2.2 A hipótese glutamatérgica

A hipótese glutamatérgica é baseada no bloqueio dos receptores glutamatérgicos (N-metil-D-Aspartato - NMDA) e na hipofunção do receptor NMDA, presentes em psicoses. Esses efeitos podem ser observados pela ação de fármacos antagonistas do receptor NMDA como Ketamina, induzindo sintomas psicóticos (SUZUKI *et al.*, 2017). Os receptores glutamatérgicos tipo NMDA são sofisticados neuroreceptores ionotrópicos essenciais para a plasticidade neuronal, incluindo os mecanismos de “*long-term potentiation*” (LTP), sinaptogênese e excitotoxicidade (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993).

Um aspecto interessante do modelo de psicose induzida por antagonistas NMDA é o fato de que essas drogas raramente induzem psicose em crianças. Por essa razão, a ketamina tem sido mais utilizada em anestesia pediátrica do que em adultos, já que a incidência de efeitos colaterais (sintomas psicóticos) em adultos é bastante comum. Isso sugere que os efeitos psicogênicos dos antagonistas NMDA dependem de uma maturação do sistema nervoso central (SNC), assim como os quadros de esquizofrenia que se iniciam na

adolescência e muito raramente acometem crianças (BÖSENBERG, 2018; OLNEY; FARBER, 1995).

Estudos em modelos animais de esquizofrenia usando antagonistas de receptores de NMDA demonstraram que as alterações de comportamento tradicionalmente associadas a esse modelo, tais como aumento da atividade motora, estereotípias, déficit em interações sociais e sexuais, sendo esses comportamentos revertidos com tratamento antipsicóticos como haloperidol e clozapina (MOHN *et al.*, 1999).

Sabe-se que a exposição ao estresse aumenta a atividade dopaminérgica em várias regiões cerebrais, em especial no sistema dopaminérgico mesocortical, sugerindo que a ativação da transmissão dopaminérgica pelo estresse tem papel fundamental no desencadeamento de episódios psicóticos (ABERCROMBIE *et al.*, 1989). Estudos com roedores sugerem que a atividade dopaminérgica desencadeada por estresse é regulada por projeções glutamatérgicas provenientes do córtex pré-frontal (MOGHADDAM, 2002).

As vias neuronais que envolvem os receptores NMDA na esquizofrenia estão possivelmente integradas com as vias do modelo dopaminérgico, pois ambos os sistemas têm uma grande interação no SNC (MOORE; WEST; GRACE, 1999). Alterações no sistema glutamatérgico do córtex pré-frontal estão associadas à disfunção dopaminérgica observada na esquizofrenia (MEYER-LINDENBERG *et al.*, 2002). Na esquizofrenia ocorre uma hipofunção glutamatérgica, que promove, conseqüentemente, pouca liberação de dopamina no córtex, o que pode resultar em sintomas negativos e cognitivos (DEUTSCH *et al.*, 1989; NETO; BRESSAN; BUSATTO FILHO, 2007; STAHL, 2007).

Os neurônios glutamatérgicos na via mesolímbica em condições fisiológicas, regulam a atividade de interneurônios gabaérgicos que inibem a liberação de dopamina. Logo, a hipofunção de receptores NMDA na via mesolímbica, condição típica na esquizofrenia, resultaria em baixos níveis de estimulação dos interneurônios gabaérgicos, conseqüentemente, não inibem de forma eficaz a liberação de dopamina nesta região. Portanto, o excesso de dopamina sobre os receptores D2 desencadeia sintomas positivos (DEUTSCH *et al.*, 1989; NETO; BRESSAN; BUSATTO FILHO, 2007; STAHL, 2007).

Podemos concluir que a esquizofrenia é uma doença que possui mecanismo fisiopatológicos que envolvem uma gama de disfunções neuroquímicas, em sua micro e macroconectividade, e também, morfuncionais associadas a um déficit cognitivo no curso da

doença. Os resultados sinalizam que novos tratamentos para a esquizofrenia devem partir de uma visão mais abrangente da doença.

1.2.3 Hipótese serotoninérgica

O sistema serotoninérgico começa nos núcleos medianos e dorsal da rafe no mesencéfalo e se espalha por todo o cérebro e a medula (ELKIS, 2009).

A 5-hidroxitriptamina, ou a serotonina, é sintetizada a partir do aminoácido triptofano e está envolvida na via espinhal da dor, facilitação da atividade motora, sono, vigília e na modulação do comportamento. O sistema serotoninérgico é um dos sistemas neurotransmissores mais complexos, englobando pelos menos quinze subtipos de receptores diferenciados (ELKIS, 2009; KAY; TASMAN; LIEBERMAN, 2002).

O gene transportador de serotonina dependente de sódio e transportador de soluto família 6 membro 4 (*Slc6a4*) codifica os transportadores de serotonina (5-HTT ou SERT) que são inseridos na membrana plasmática após as vesículas sinápticas se fundirem a ela, levando a exocitose da serotonina. A maior parte da serotonina é reabsorvida na fenda sináptica após o uso e o transportador de serotonina permite que os neurônios serotoninérgicos sejam reabastecidos (BORON; BOULPAEP, 2015).

O gene do transportador de serotonina tem sido estudado amplamente, e pouco se sabe sobre a maneira pela qual diferentes versões deste gene influenciam a neurotransmissão serotoninérgica que, por sua vez, influenciam a personalidade e a saúde mental (CANLI; LESCH, 2007; HARIRI *et al.*, 2002; HARIRI; HOLMES, 2006).

Vale destacar que alterações no gene *Slc6a4* estão relacionadas a psicose (FORREST; COTO; SIEGEL, 2014), bem como animais knockout para o gene *Slc6a4* são considerados modelos animais de esquizofrenia (RAFTER *et al.*, 2016). Neste contexto, a deleção do *Slc6a4* pode causar um excesso de 5HT e ativação de receptores 5-HT_{2A}.

Estudos sugerem que o sistema serotoninérgico seria um modulador do sistema dopaminérgico, inibindo fortemente a atividade dopaminérgica mesocortical e nigroestriatal (ELKIS, 2009). Corroborado esse dado pela classe de antipsicóticos de segunda geração que usam um possivelmente mecanismo de bloqueio balanceado de uma combinação de sistemas de neurotransmissão, especialmente o sistema serotoninérgico (MELTZER *et al.*, 2003; OLIJSLAGERS *et al.*, 2006; WERKMAN *et al.*, 2006).

A segunda geração de drogas antipsicóticas, também conhecidas como drogas antipsicóticas atípicas, risperidona, olanzapina, quetiapina, ziprasidona e aripiprazol, foram modeladas com base no protótipo do agente clozapina (KUROKI; NAGAO; NAKAHARA,

2008). O resultado foi um tratamento com melhor tolerância subjetiva dos pacientes a farmacoterapia, mas melhorias relativamente modestas sobre os sintomas negativos da esquizofrenia (MAREK, 2007).

O mecanismo de ação de drogas antipsicóticas atípicas se dá por um bloqueio relativamente potente de receptores 5-HT (2A) acoplado ao antagonismo mais fraco de os receptores dopaminérgicos D (2) são a única característica farmacológica que a maioria dos antipsicóticos atípicos têm em comum (KUROKI; NAGAO; NAKAHARA, 2008).

Além das interações físicas e funcionais entre a sinalização da serotonina-dopamina, também têm sido sugeridas a da serotonina-glutamato na fisiopatologia da psicose e supostamente relevantes para o tratamento antipsicótico (BARTOLOMEIS; BUONAGURO; IASEVOLI, 2013). Este dado fortalece a interação de vários sistemas de neurotransmissores, assim como muitas as áreas cerebrais respectivamente (ABERCROMBIE *et al.*, 1989; AUXÉMÉRY, 2012; CÁCEDA *et al.*, 2012; HOWES *et al.*, 2004; NETO; BRESSAN; BUSATTO FILHO, 2007).

1.2.4 A hipótese imunoinflamatória

A inflamação e infecções podem afetar o cérebro através de muitas vias diferentes que não são necessariamente mutuamente exclusivas e podem aumentar o risco de esquizofrenia em indivíduos vulneráveis (BENROS; MORTENSEN; EATON, 2012). Um estudo epidemiológico em larga escala, as infecções graves e distúrbios autoimunes, demonstraram uma possível relação de causalidade no risco maior de desenvolver transtornos do espectro da esquizofrenia. Este estudo mostrou que a história prévia de doença autoimune e hospitalização prévia devido à infecções, aumentaram a incidência de esquizofrenia em 36 e 60%, respetivamente (BENROS *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, a hipótese de que fatores imunológicos estão associados à esquizofrenia tem ganhado muita evidência. Ao mesmo tempo, pesquisas indicaram um papel importante do sistema imunológico no neurodesenvolvimento através da modulação de diferentes processos neurais, incluindo plasticidade cerebral e regulação de neurotransmissores. Esses achados poderiam ser explicados pela ação de agentes infecciosos e fatores neurotóxicos associados à citocinas pró-inflamatórias (MÜLLER, 2017).

Um estudo demonstrou que pacientes no primeiro episódio de esquizofrenia e aqueles com recidiva, similarmente tiveram maiores níveis sanguíneos de interleucina (IL-6), Interferon (IFN- γ) e Fatores de Necrose Tumoral (TNF- α) quando comparados ao grupo controle. No entanto, o grupo sob tratamento com antipsicótico mostrou diminuição significativa de IL-6, IL-1 β e IFN- γ e aumento de IL-12 (MILLER *et al.*, 2011).

Alterações da neurotransmissão serotoninérgica, noradrenérgica e glutamatérgica têm sido associadas com neuroinflamação de baixo nível, e compostos anti-inflamatórios têm um benefício terapêutico na esquizofrenia e os antipsicóticos têm efeitos imunomodulatórios intrínsecos. Adicionalmente, evidências destacam o papel que os processos inflamatórios desempenham na patogênese dos principais transtornos psiquiátricos (MÜLLER, 2017)

Um argumento importante de que a inflamação está envolvida na esquizofrenia é o benefício derivado do tratamento com anti-inflamatórios. Em particular, drogas inibidoras da ciclooxigenase- 2 (COX-2) ao tratamento com risperidona em pacientes com exacerbações agudas de esquizofrenia levaram a um resultado melhor do que o tratamento com apenas risperidona, em um estudo prospectivo, randomizado, duplo-cego (MÜLLER *et al.*, 2002).

1.3 Modelo animal dos dois desafios “two-hits model”

Avanços recentes no estudo da esquizofrenia trouxeram mudanças no paradigma da doença. A teoria neurodesenvolvimental, proposta inicialmente na década de 80, mudou a perspectiva de que esse transtorno fosse causado apenas por uma degeneração precoce do cérebro (NOTO; BRESSAN, 2009).

Assim, o aperfeiçoamento de modelos animais em esquizofrenia é importante para esclarecer sua fisiopatologia e facilitar o desenvolvimento de novas terapias e estratégias de prevenção. O modelo animal neurodesenvolvimental “2Hits”, do original “two-hits model”, ou no português “dois desafios”, aproxima-se de outra teoria da esquizofrenia, a teoria neurocognitiva. Esta teoria fundamenta-se na compreensão da esquizofrenia baseada em 3 pilares: perturbação das conexões neurais, deficits neurocognitivos e comprometimento funcional (NOTO; BRESSAN, 2009).

O modelo animal “2Hits” é uma estratégia neurodesenvolvimental que se baseia na exposição do animal a 2 insultos, em fases diferentes do neurodesenvolvimento. A natureza dos insultos também é diferente: uma por exposição a partícula vírus-mimética logo após o nascimento e outro por estresse imprevisível em estágio inicial da adolescência. Desta forma, contemplando 2 dimensões de vulnerabilidade, alterações em fatores neurobiológicos e ambientais (GIOVANOLI *et al.*, 2013).

Corroborando esses achados em humanos, estudos apontam contaminações em períodos gestacionais e condições de estresse durante o desenvolvimento cerebral, que possivelmente estejam envolvidos na patogênese da esquizofrenia (SADOCK; SADOCK, 2016; PAPALIA, 2013).

Nosso grupo de pesquisa tem contribuído para uma melhor compreensão das consequências da exposição neonatal a desafios imunes virais como o poly I:C (MONTE *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2013) e bacterianos como o lipopolissacarídeo (LPS) (CUSTÓDIO *et al.*, 2017). Neste contexto, observamos um aumento progressivo entre a infância e adolescência na ativação microglial em animais expostos ao poly I:C na vida neonatal (RIBEIRO *et al.*, 2013).

Também observamos mais recentemente alterações comportamentais distintas entre ratos machos e fêmeas submetidos ao modelo de esquizofrenia por “dois desafios” (MONTE

et al., 2017). Ainda nesta linha, vários estudos estão em andamento avaliando a prevenção por estratégias farmacológicas, das alterações induzidas pela exposição aos “dois desafios”.

Dada a impossibilidade de se reproduzir experimentalmente todo o fenótipo da esquizofrenia, os pesquisadores estão passando do foco holístico para modelos de fenótipos quantitativos, chamados também de traços intermediários (SEONG; SEASHOLTZ; BURMEISTER, 2002).

Os traços fenotípicos são fatores de risco mais comuns e mais facilmente associados a fatores genéticos que a própria síndrome. O estudo da integração de tais endofenótipos, inclusive em indivíduos esquizotípicos e em consanguíneos assintomáticos, pode representar considerável subsídio à compreensão da doença (KILTS, 2001).

É importante mencionar que como os transtornos mentais são tipicamente humanos, envolvendo comportamentos complexos, é praticamente impossível reproduzi-los em sua totalidade nos roedores, existindo, portanto, limitações em todos os modelos animais, especialmente nos aplicados à psiquiatria.

1.4 A influência genética na esquizofrenia

A ciência atual que estuda a genética do transtorno, afirmam que a esquizofrenia apresenta um componente hereditário com até 80% de chances maior de desenvolvimento do transtorno em comparação com pacientes que não possuem histórico familiar. Parte relevante dos genes conhecidos no desenvolvimento do transtorno, estão relacionados ao neurodesenvolvimento e são compartilhados por outros transtornos mentais, tais como transtorno bipolar e autismo (NOTO, 2009)

Uma alta proporção da variação na suscetibilidade ao transtorno se deve a efeitos genéticos cumulativos. Ocorrem com uma frequência maior entre parentes biológicos de pacientes com esquizofrenia, transtornos relacionados à doença, como por exemplo, transtorno de personalidade esquizotípica. Parentescos de primeiro e segundo grau aumentam a probabilidade significativamente. Em gêmeos monozigóticos, há uma taxa de concordância de cerca de 50%, quanto que em gêmeos dizigóticos ou em parentes de primeiro grau, essa taxa cai para 4 a 5 menos risco (SADOCK; SADOCK, 2016).

O comportamento aprendido resulta da interação do indivíduo com o meio. Esta interação cria experiências que se registram na memória e contribuem para o aperfeiçoamento dos desempenhos subsequentes. O resultado de uma interação do indivíduo com o meio é

primariamente possibilitada pela constituição genética do indivíduo (PINHEIRO, 1994). Uma história familiar de esquizofrenia é o fator de risco mais bem estabelecido para o transtorno, mas sugere que os fatores ambientais, incluindo o local e época de nascimento, são fortes determinantes (MCGUFFIN; GOTTESMAN, 1999).

Estudos epigenéticos também fortalecem a hipótese neurodesenvolvimental e “*two-hits*” quando relaciona ativação microglial, neuroinflamação e estresse no desencadeamento da esquizofrenia (LEWIS *et al.*, 2003; MILL *et al.*, 2008)

Baseado nesses achados, é possível identificar um fator genético não é sozinho determinante no desenvolvimento da doença, apesar de ser um fator de risco forte. Outros fatores como ambiente, devem estar envolvidos no desfecho da doença. O modelo de vulnerabilidade-tendência sugere a influência ambiental, com fatores biológicos e psicossociais do ambiente podendo prevenir ou causar esquizofrenia no indivíduo geneticamente vulnerável (SADOCK; SADOCK, 2016).

1.5 Epigenética na esquizofrenia

Em 1956, o biólogo britânico, Conrad Waddington, publicou um artigo no qual ele conseguiu demonstrar a herança de uma característica adquirida em uma população em resposta a um estímulo ambiental (NOBLE, 2015).

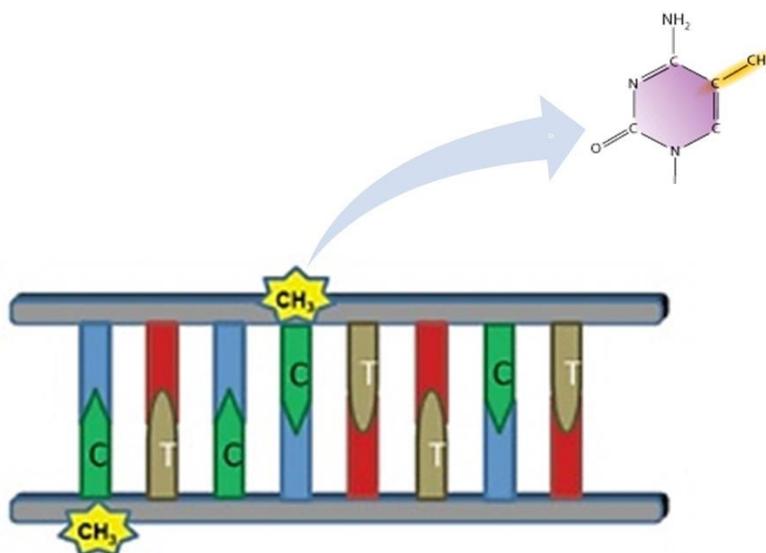
O termo epigenética faz referência a alterações estáveis na expressão gênica que não são explicadas por mudanças na sequência primária de DNA ou genótipo. Os mecanismos epigenéticos atuam modificando a estrutura de cromatina e/ou de um determinado domínio cromossômico permitindo a ativação de alguns genes e o silenciamento de outros, ao bloquear o sítio de ligação do fator de transcrição (LOCK, 2018; WADDINGTON, 1942).

Existem três mecanismos epigenéticos de controle da expressão gênica: modificações da histonas que alteram a estrutura da cromatina pela adição de grupos químicos às caudas dessas proteínas que formam o nucleossomo; RNAs não codificadores que ativam ou silenciam genes em um determinado domínio cromossômico; modulação da estrutura da cromatina, e o terceiro, e o mais estudado atualmente, é a metilação do DNA (MOHAMMAD; MONDAL; KANDURI, 2009; SMITH; MEISSNER, 2013).

A metilação do DNA geralmente está relacionada ao silenciamento gênico ou a redução da sua atividade. A reação de conversão de citosina para 5-metilcitosina na sequência de DNA é reversível e catalisada pelas enzimas DNMTs (DNA metiltransferase). Como a

metilação é propagada e mantida entre divisões celulares sucessivas não é totalmente compreendida (BESTOR, 2000; KIM; SAMARANAYAKE; PRADHAN, 2009; KURIHARA *et al.*, 2008; WU; TAO; SUN, 2012)

Figura 5 – DNA metilado pela adição do grupamento metil (CH₃) na base citosina (C).



Fonte: Modificado (GONZALEZ-RECIO, 2011).

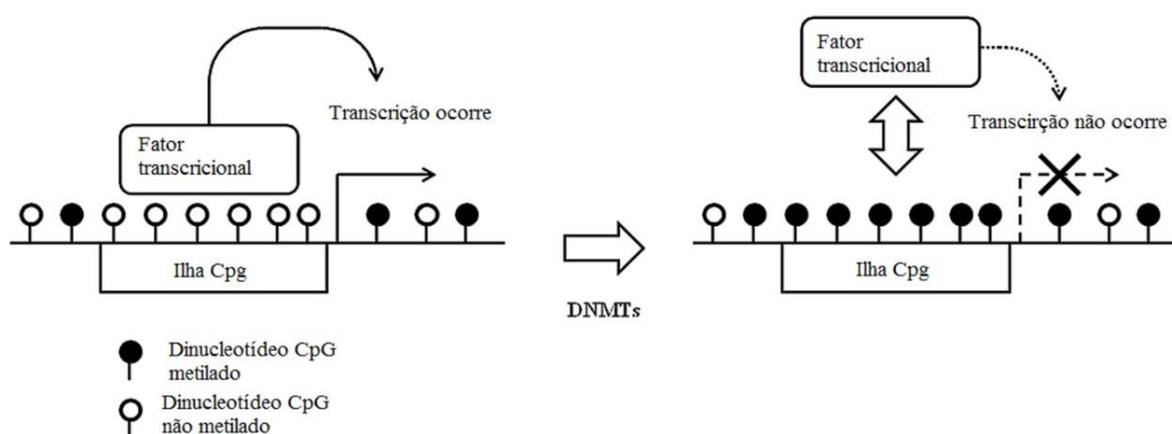
A metilação do DNA que consiste na ligação covalente de um radical metil ao carbono 5 de citosinas que precedem uma guanina, estrutura conhecida como dinucleotídeo CpG (Citosina-fosfato-Guanina), resultando na conversão de citosina para 5-metilcitosina (mC) na sequência de DNA (FIGURA 5) (EDWARDS *et al.*, 2017; GEIMAN; MUEGGE, 2010; SMITH; MEISSNER, 2013).

A sigla CpG significa uma citosina seguida de uma guanina na mesma cadeia de DNA, ligadas por um fosfato. Existem menos CpG no genoma de mamíferos, aproximadamente cerca de 1%, se considerarmos a quantidade nucleotídeos de citosinas e guaninas existente no genoma, aproximadamente 40% de citosinas e guaninas. Provavelmente, a principal razão desta pequena quantidade de CpG seja a tendência de, quando uma citosina é seguida na mesma cadeia por uma guanina, esta citosina pode sofrer uma alteração química, a metilação do DNA (STRACHAN; READ, 2016).

Há algumas áreas do genoma particularmente ricas em CpG. Essas zonas, denominadas de ilhas de CpG, são próximas de genes que estão permanentemente expressos em todas as células. Estas zonas no genoma encontram-se normalmente em proximidade de

genes essenciais para o normal funcionamento da maioria das células do organismo. Uma elevada densidade de CpG próximo destes genes fornece uma rigidez ao DNA essencial para manter uma expressão constante e estável (FIGURA 6) (BORON; BOULPAEP, 2015).

Figura 6 - Regulação epigenética em ilhas CpG mediada pela metilação do DNA. Na ausência de metilação nos dinucleotídeos CpG a transcrição ocorre normalmente, mas quando encontram-se metilado o fator de transcrição não consegue se ligar e o gene é silenciado.



Fonte: Modificado (JUNIOR, 2015)

O mecanismo de metilação do DNA, somado aos outros fatores epigenéticos de regulação da expressão gênica são fundamentais para o correto desenvolvimento de um organismo e auxilia na manutenção da estabilidade genômica (LOCK, 2018). Marcas epigenéticas estabelecidas pelos primeiros as condições ambientais tendem a ser estáveis (GUDSNUK; CHAMPAGNE, 2012), mas são reversíveis, mesmo na idade adulta, por meio de efeitos sustentados da mudança de ambientes (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; WEAVER *et al.*, 2004).

Todavia, a suscetibilidade genômica às influências ambientais continua ao longo da vida. Gêmeos criados separados manifestaram maior discordância no DNA metilação do que gêmeos criados juntos, indicando que exposição a ambientes discordantes (LIPMAN; TIEDJE, 2006).

Compreender como as mudanças herdáveis que dependem das sequencias de DNA, a epigenética, é uma área de crescente importância nas pesquisas sobre a genética humana e médica, porque o silenciamento gênico é um exemplo epigenéticos da expressão gênica é um

fenômeno que explica fenômenos diversos de doenças e características que fortalecem as espécies (LOCK, 2018).

Baseado em evidências convergentes de várias pesquisas, tem sido fortemente aceito que fatores genéticos e ambientais têm um significado papel importante na etiopatogenia da esquizofrenia. Entretanto, a natureza exata desses dois principais fatores etiológicos, seu padrão de interação e seus mecanismos patogênicos são pouco conhecidos apesar das muitas descobertas na fisiopatologia, fatores clínicos e genéticos. Avanços recentes na epigenômica aumentaram compreensão da interação gene-ambiente (GxE). O futuro promissor desse modelo é a possibilidade de desenvolver uma prevenção e estratégias de tratamento para esquizofrenia (MARIC; SVRAKIC, 2012).

1.5 O Enriquecimento Ambiental

O enriquecimento ambiental (EA) é um termo utilizado quando ao ambiente são agregados recursos para estimulação física e/ou social maior de animais do que existiriam em condições normais de habitação (ROSENZWEIG; BENNETT, 1996). O EA se dá através de uma combinação de estimulação inanimada e social complexa e geralmente consiste em condições de moradia que facilitam a estimulação sensorial, cognitiva, motora e social relativamente às condições de habitação padrão promovendo o bem estar animal (SZTAINBERG; CHEN, 2010).

O bem-estar animal refere-se a uma boa ou satisfatória qualidade de vida que envolve determinados aspectos referentes ao animal tais como saúde, felicidade e a longevidade (TANNENBAUM, 1991) ou ainda, à sua capacidade de se adaptar ao seu meio ambiente (BROOM, 1986). A pesquisa científica sobre bem-estar animal tem sido baseada nos vários critérios de bem-estar. O bem-estar animal, também pode ser definido como o fornecimento de condições ambientais em que os animais podem exibir todos os seus comportamentos normais na natureza (KOKNAROGLU; AKUNAL, 2013).

Muitos progressos têm sido feitos nos últimos anos na compreensão dos fatores genéticos e outros mediadores moleculares que contribuem para vários distúrbios cerebrais, porém ainda pouco se sabe sobre fatores ambientais e a plasticidade dependente da experiência humana/animal associada, modulando a patogênese e progressão da doença (LANDER *et al.*, 2001).

Existe também um conceito moral relacionado ao bem estar animal que envolve a atribuição da capacidade de gerar experiências subjetivas tais como estados afetivos, sofrimento e sentimentos de prazer (DAWKINS, 1990; HELD; ŠPINKA, 2011; LARUELLE *et al.*, 1999). Dado a dificuldade em medir estados afetivos diretamente, tem-se proposto várias medidas comportamentais indiretas como a análise da preferência animal, motivação e comportamento a partir de metodologias do manejo animal.

O ambiente é considerado como o meio em que se vive, onde engloba em todas as dimensões aquele que nele está inserido, o qual envolve os relacionamentos familiares, amizades, lazer, condição socioeconômica, moradia, entre outros. Fortes evidências demonstram que o ambiente pode ter grandes influências, tanto positivas quanto negativas sobre o desenvolvimento cerebral e, conseqüentemente, sobre diversos aspectos comportamentais relacionados ao indivíduo (SOLINAS *et al.*, 2010).

O EA aplicados a animais seria uma condição coplanar aos fatores ambientais positivos, como condições socioeconômicas favoráveis, bons relacionamentos, educação adequada, prática de atividades esportivas e culturais. Adverso a isso, representaria um ambiente empobrecido, que pode facilitar o desenvolvimento de várias doenças de naturezas diversas. Portanto o EA, apresenta efeitos importantes sobre comportamento e ao nível celular e molecular (plasticidade dependente da experiência, incluindo neurogênese adulta e plasticidade sináptica) (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006).

Uma série de estudos relata que a exposição a um enriquecimento ambiental (EA) promove benefícios fisiológicos, morfológicos e moleculares que incluem aumento da arborização dendrítica, gliogênese, neurogênese e modificações na expressão de genes ligados à plasticidade neuronal (BIRCH; MCGARRY; KELLY, 2013). A estimulação cognitiva usando EA, que aumenta a neurogênese adulta e a integração funcional de neurônios recém-nascidos em circuitos neurais do hipocampo, protege contra o declínio da memória em modelos de camundongos transgênicos da Doença de Alzheimer (VALERO *et al.*, 2011).

O papel crucial que os fatores ambientais podem desempenhar tanto na determinação do fenótipo de um indivíduo como na etiologia de doenças estão sendo discutidos, indicando claramente que a etiologia de numerosas doenças cerebrais é muitas vezes multifatorial e implica em complexas interações entre experiências de vida e antecedentes genéticos. Todavia, a influência mútua e complexa entre experiências de vida, patógenos e determinantes

genéticos e a epigenética, são ainda pouco conhecidos (SÁNCHEZ; LADD; PLOTSKY, 2001).

O comportamento dos animais é fruto de fatores imediatos (causas proximais) de vida e também de uma longa história das linhagens de antepassados (causas evolutivas ou distais). Aqueles que conseguiram se reproduzir, transferiram genes para gerações futuras, e esses trechos de DNA ainda influenciam o desenvolvimento de sistemas como o nervoso, muscular e endócrino. Ambas as causas estão inter-relacionadas e são igualmente importantes para a compreensão do comportamento animal (ALCOCK, 2016).

1.6 Integração dos aspectos mencionados

A esquizofrenia compromete várias funções do indivíduo o impedindo de alcançar o auge de suas potencialidades. O curso da doença leva a cronificação e somente abordagens que combinem medicamentos, terapia psicológica e intervenções psicossociais conseguem contemplar particularidades individuais de cada indivíduo na manifestação dos sinais e sintomas, e ainda, todas as diferentes dimensões da doença (SADOCK; SADOCK, 2016; NOTO; BRESSAN, 2009; GAEBEL, W, 2011).

As evidências atuais descrevem a etiopatogenia da esquizofrenia como um processo longo que provavelmente se inicia nos períodos pré- e perinatal do indivíduo. Infecções maternas ou experiências adversas que a crianças pode passar estão associados a psicoses. Portanto, se o mecanismo se inicia no período desenvolvimento fetal e puerperal, então o desencadeamento dos sintomas positivos e negativos devem ser classificados como um período avançado da doença. Desta forma, qualquer estratégia preventiva e/ou intervenção terapêutica que iniciar nas fases pré-morbididade, prodrômica e já manifesta, poderá ser demasiadamente tardia (BROWN; PATTERSON, 2011; INSEL, 2010; VARESE *et al.*, 2012).

Na esquizofrenia, as taxas de remissão funcional são baixas e são principalmente preditas por uma resposta precoce ao tratamento, indicando que há uma "janela de oportunidade" crítica para a intervenção precoce (LAMBERT, 2014).

Visto que o acometimento do indivíduo impacta não somente ao paciente, como também, em alto grau, a família, estratégias preventivas/terapêuticas que promovam precocemente a contenção da doença, seriam potencialmente benéficas a todo esse grupo de indivíduos ("Combating schizophrenia", 2010).

O intercâmbio bidirecional modelo biomédico (perspectiva analítica) e os campos holísticos (medicina integrativa) têm sido essenciais para um progresso rápido e sustentado em sistemas modelo simples. No entanto, relativamente poucas pesquisas foram realizadas em organismos complexos como os mamíferos para entender como os genes e o ambiente interagem para produzir mudanças fenotípicas. As evidências crescentes de que a estimulação ambiental induz, a longo prazo, a ajustes dos sistemas neurocomportamentais envolvendo aprendizagem, memória e respostas defensivas, demonstrando a relevância de novas pesquisas visando estratégias terapêuticas apoiadas na medicina integrativa, buscando promover uma melhor qualidade de vida para esses pacientes (LAVIOLA *et al.*, 2008).

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A esquizofrenia é um transtorno mental grave e incapacitante. É considerado um transtorno progressivo neurodesenvolvimental, visto que sua etiologia envolve a exposição a patógenos em idades iniciais da vida (neurodesenvolvimental), sendo seu caráter progressivo relacionado a presença de alterações imunoinflamatórias que determinam o curso progressivo e o declínio cognitivo observados ao longo da doença. Neste sentido, os modelos neurodesenvolvimentais para o estudo da esquizofrenia são baseados na exposição a fatores de risco importantes para o desenvolvimento da esquizofrenia, exposição esta, que em períodos críticos do neurodesenvolvimento, levando a alterações duradouras. Por outro lado, a adolescência também é uma idade importante para a maturidade cerebral, e formação dos últimos circuitos, bem como de mielinização, fazendo com que a exposição a um ambiente negativo nesta idade seja capaz de funcionar como um *trigger* para transtornos mentais. A interação dos genes relacionados à esquizofrenia, o mal desenvolvimento cerebral e questões ambientais parecem resultar em uma conectividade defeituosa entre algumas regiões cerebrais, como núcleo accumbens, tálamo, temporo-límbicas e córtex pré-frontal (RAKIC; SELEMON, 2017).

Até o presente momento o tratamento farmacológico da esquizofrenia é realizado por antipsicóticos que não são totalmente eficazes para o tratamento dos sintomas cognitivos e negativos. Baseado no difícil tratamento e na ausência de cura para esquizofrenia, estratégias de prevenção tornam-se muito bem-vindas, sendo uma importante área de estudo no momento atual. Dentre as estratégias de prevenção foi tentado o ômega 3 na adolescência, o que mostrou ser eficaz para alguns pacientes, bem como suplementação com colina na gestação. Há quase um consenso na comunidade científica de que a prevenção da esquizofrenia seja realizada com estratégias de suplementação ou até mesmo não-farmacológicas, mas que como condição necessária tenham um grande perfil de segurança.

Com base nestes fatos, no presente estudo estamos propondo uma estratégia não-farmacológica para a prevenção da esquizofrenia. No momento atual, conforme acima mencionado o ambiente em que estamos inseridos pode nos proteger ou adoecer. Estratégias como o enriquecimento ambiental, além de relativamente baratas e seguras podem ser utilizadas por toda a população, o que facilita o seu futuro uso em larga escala para a prevenção de doenças mentais em adolescentes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar os possíveis efeitos do enriquecimento ambiental contra alterações comportamentais e neuroquímicas em animais submetidos ao modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia por “dois desafios” (*2Hits model*).

3.2 Objetivos Específicos

- Observar o efeito da exposição de animais a um ambiente enriquecido ou não, sob o desenvolvimento de alterações comportamentais relacionadas a sintomas positivos (pelos testes de inibição pré-pulso e campo aberto), negativos (pelo teste de interação social) e cognitivos (pelo teste de Y-Maze) da esquizofrenia em animais adultos expostos ao modelo do “*2Hits*”, ou seja, desafio imune neonatal e estresse na adolescência;
- Determinar possíveis alterações neuroinflamatórias (por verificação da ativação microglial por Iba1), neurogênicas (verificação da expressão proteica de doublecortina-DCX) e na plasticidade relacionada a experiência (através da determinação da subunidade NR2b do receptor NMDA), em animais submetidos ao modelo do “*2Hits*” na esquizofrenia, expostos ou não a ambiente enriquecido durante a infância, adolescência e idade adulta;
- Verificar perfil de metilação do gene *Slc6a4* e possíveis modificações epigenéticas no transportador da serotonina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados para procriação camundongos Swiss fêmeas e machos adultos (30-40g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), ambientados em grupos de 8 animais separados por sexo em distintos microisoladores confeccionados em policarbonato transparente para rack ventilado produzidas por Lab Products®, autoclavável, em temperatura ambiente de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12h, recebendo ração para roedores NUVILAB e água “*ad libitum*”.

Os camundongos fêmeas utilizadas para reprodução foram mantidas por 2 semanas juntas para sincronizarem o ciclo reprodutivo para o dia programado do acasalamento, visando assim, aumentar as chances de todas engravidarem e dar à luz no mesmo dia. No período de reprodução as fêmeas eram separadas em caixas padrões na estante ventilada, na proporção de 1 macho para 3 fêmeas. Após constatada a gravidez, foram mantidas duas fêmeas prenhe por caixa. Para o protocolo experimental deste trabalho foram utilizados apenas camundongos Swiss machos.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), salientando que todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais. A presente pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da UFC, com protocolo nº 136/14.

4.2 Modelo de esquizofrenia induzida por estimulação imune pré-natal e estresse na adolescência – Modelo dos “dois desafios” (“*2Hits*”)

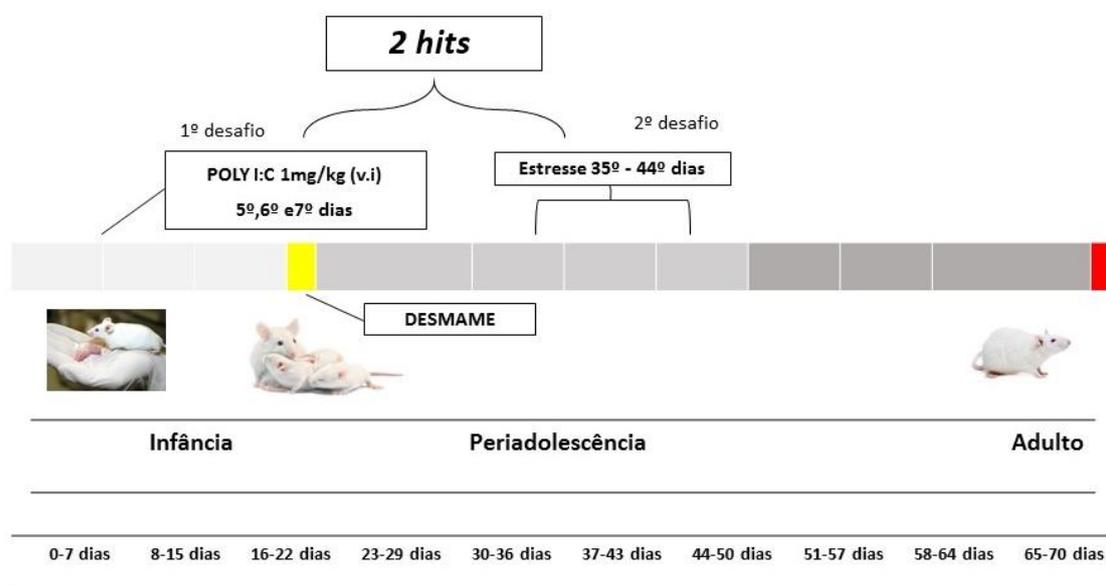
O ácido poliriboinosínico:poliribocitidílico (Poly I:C.) foi administrado aos filhotes do 5º ao 7º dia de nascidos. Este período equivale ao último trimestre da gestação humana (36 a 40ª semana), que corresponde a um período de grande sensibilidade para o desenvolvimento de esquizofrenia e autismo após infecção materna (BROWN; PATTERSON, 2011; SEMPLE *et al.*, 2013). 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 volume da dose de injeção se dava de acordo com o peso do filhote variando entre 1µL a 2µL. O Poly I:C foi diluído em veículo salina na concentração de 1mg/kg e administrado por via intraperitoneal (i.p). No 21º dia após o nascimento os filhotes foram desmamados e mantidos 4-6 animais por uma caixa com enriquecimento ambiental. A sexagem é realizada neste momento.

O modelo de esquizofrenia que foi utilizado foi baseado em trabalho recentemente publicado aplicando o modelo dos “dois desafios” ou “2Hits” (FIGURA 7) relacionado à etiologia da esquizofrenia em humanos (GIOVANOLI *et al.*, 2013), com algumas modificações. Para tanto além do desafio imune pós-natal os animais foram submetidos a eventos estressantes na adolescência. O estresse foi aplicado entre os dias 35 a 45 após o nascimento com intervalo de 1 dia. Os estressores aplicados foram: dia 1 – choque elétrico nos pés (0,3 mA) com duração de 1 s; dia 3 – estresse por contenção durante 45 min; dia 5 – privação de água por 16 h; dia 7 – duas seções de nado forçado com 1 min cada; dia 9 – mudança repetida de caixas.

Figura 7 - Modelo animal de esquizofrenia “2Hits”.



Fonte: Ilustração do próprio autor baseado no modelo 2Hits proposto por GIOVANOLI *et al.*, 2013.

4.3 Desenho Experimental e tratamento dos animais

Na estratégia experimental foram estabelecidos quatro grupos de animais distintos para o estudo. Os grupos foram nomeados com as seguintes indicações: grupo “salina” (FIGURA 8), grupo “Salina+EA” (FIGURA 9), grupo “2Hits” (FIGURA 10) e grupo “2Hits+EA” (FIGURA 11).

Os animais pertencentes ao grupo Salina e Salina+EA receberam solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) por via intraperitoneal no 5º, 6º e 7º dias pós-natal. O volume de injeção aplicado foi o mesmo utilizado para os animais que receberam a solução com poly (I:C), variando entre 1µL a 2µL, de acordo com o peso do filhote.

Os grupos submetidos a modelo “2Hits” foram administrados com poly (I:C) no 5º, 6º e 7º dias pós-natal e submetidos a estresses em dias alternados (FIGURA 10) na fase adolescência [Pós-natal (PN) 35 – 45 dias (d)]. O estresse no período inicial da adolescência foi induzido como o segundo desafio nos grupos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, “2Hits”, através de um protocolo de estresse repetido variável, que corresponde a cinco eventos estressores aplicados em dias alternados, do 35º ao 43º dia de vida (GIOVANOLI *et al.*, 2013). Esse período é compatível à idade de 12 a 18 anos em seres humanos (SEMPLE *et al.*, 2013).

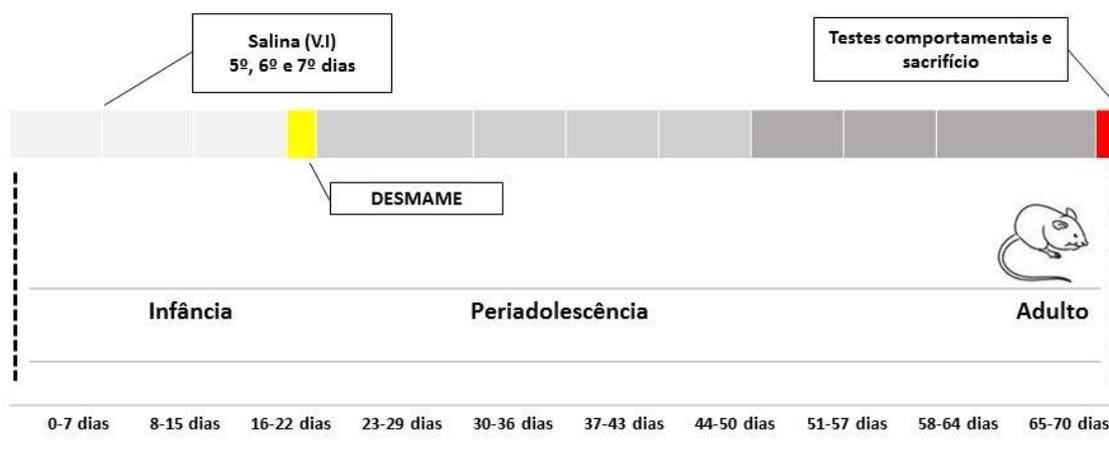
Tabela 2 – Exposição aos estímulos estressores e seus componentes específicos.

Exposição a estímulos estressores		
Dia 35°	<i>Choque elétrico no pé</i>	Os camundongos sofreram 3 estímulos de choques de intensidade de 0,3mA 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.
Dia 37°	<i>Imobilização</i>	Cada animal foi mantido em um tubo Falcon de 50 ml (diâmetro interno:27mm, comprimento total 117mm) com um corte circular de 0,6 mm na extremidade contrária a tampa, de modo a facilitar a respiração, por 45 min. Ao final do procedimento os animais foram imediatamente devolvidos para suas caixas.
Dia 39°	<i>Nado forçado</i>	Os animais foram submetidos a duas sessões de nado forçado, cada uma com duração de 1 minuto. 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 3 minutos de descanso. Terminadas as sessões, os camundongos eram secos com uma toalha e imediatamente levados de volta para suas gaiolas.
Dia 41°	<i>Privação de água</i>	Os animais sofreram uma privação de água durante 16 horas. Para isso, no 43° 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 (44° dia). Os animais tiveram livre acesso à comida durante todo o período de privação de água.
Dia 43°	<i>Imobilização</i>	Os animais sofreram o mesmo estímulo estressor aplicado no dia 37°.

Fonte: (GIOVANOLI *et al.*, 2013).

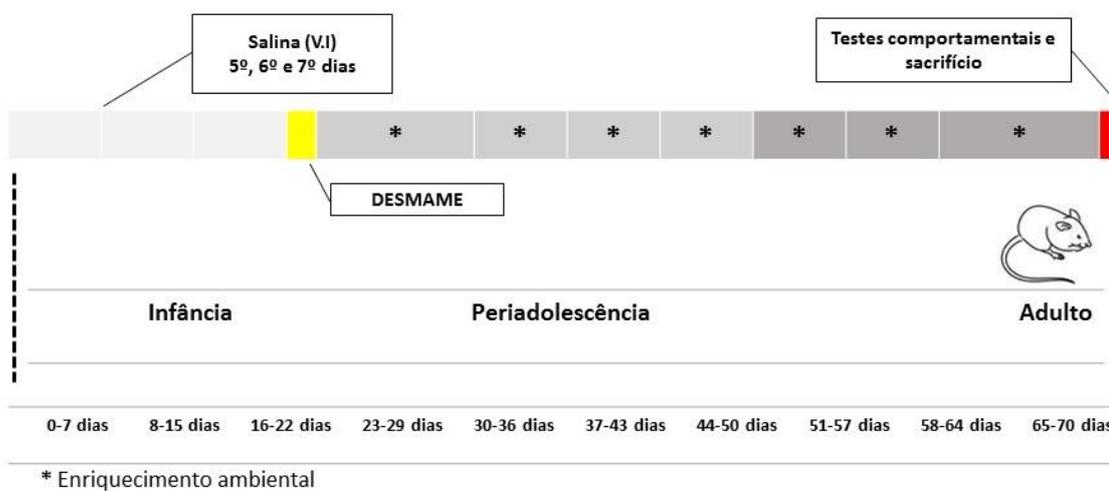
Nos animais submetidos ao modelo de enriquecimento ambiental na adolescência após os eventos estressores (TABELA 2) os animais voltaram às mesmas condições, de acordo com as condições de cada grupo, ou seja, como ou sem enriquecimento ambiental.

Figura 8 - Trajetória da vida dos animais pertencentes ao grupo "Salina".



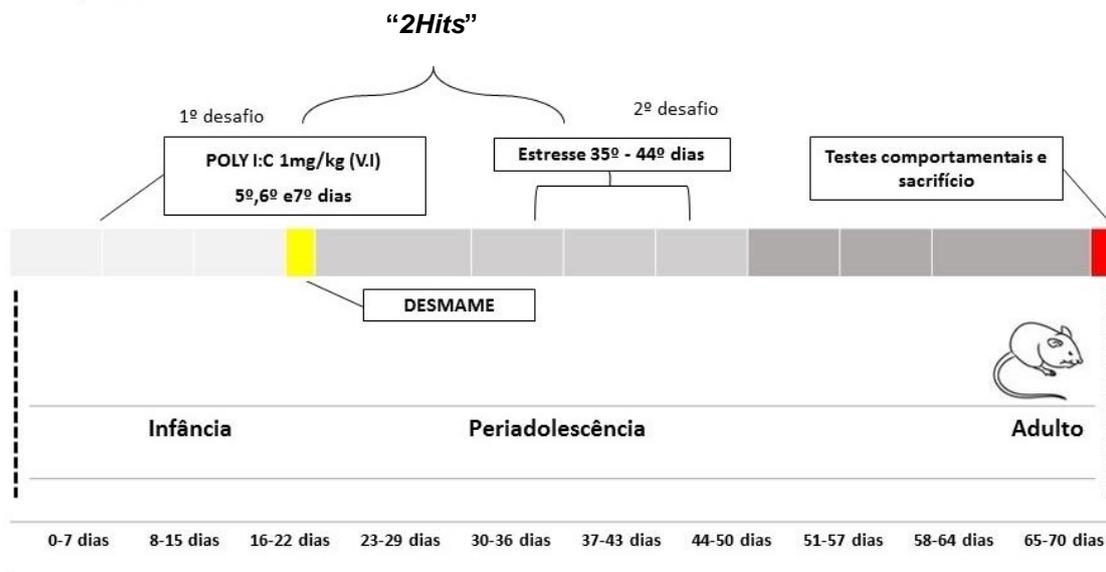
Fonte: próprio autor.

Figura 9 - Trajetória da vida dos animais pertencentes ao grupo "Salina+EA".



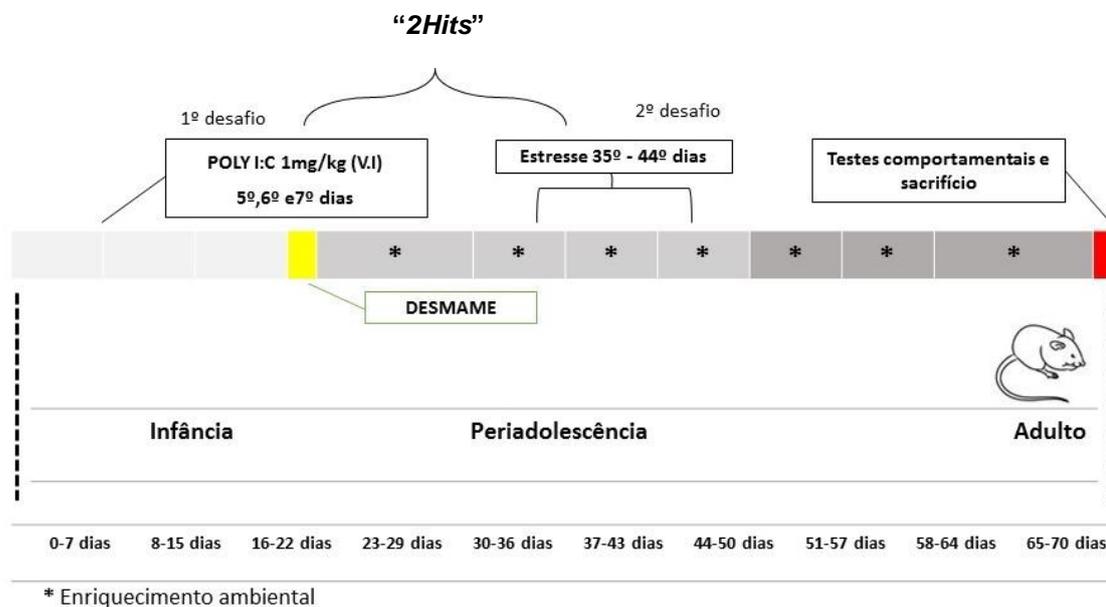
Enriquecimento ambiental (EA). Fonte: Próprio autor.

Figura 10 - Trajetória da vida dos animais pertencentes ao grupo “2Hits”.



Fonte: Ilustração do próprio autor baseado no modelo *2Hits* proposto por GIOVANOLI *et al.*, 2013.

Figura 11 - Trajetória da vida dos animais pertencentes ao grupo "2Hits+EA".



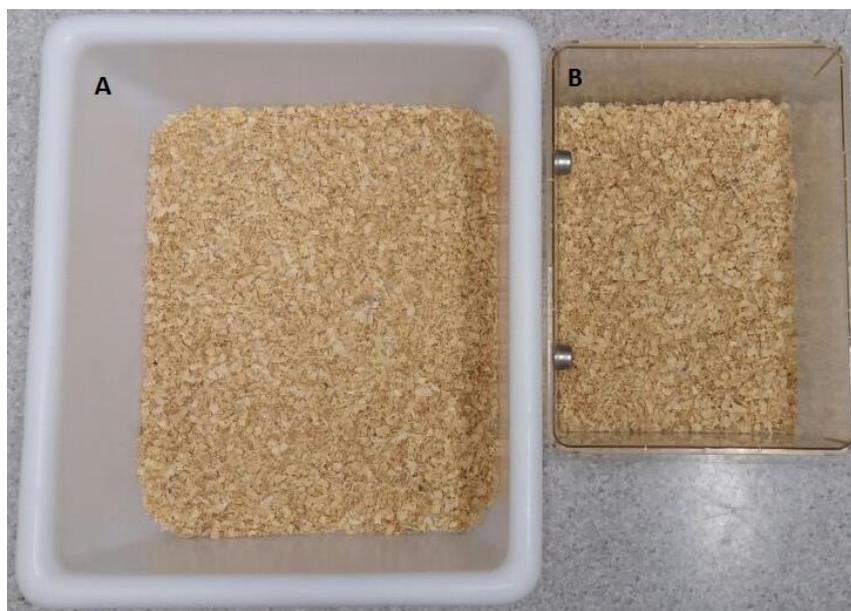
Enriquecimento ambiental (EA). Fonte: Ilustração do próprio autor baseado no modelo *2Hits* proposto por GIOVANOLI *et al.*, 2013.

O enriquecimento ambiental para animais busca oferecer condições normais, saudáveis e semelhantes as condições que viveriam em habitat natural de acordo com cada

espécie. O EA proporciona o desenvolvimento de comportamentos naturais e o bem-estar. Desta forma, o enriquecimento ambiental aplicado a animais roedores neste estudo, seria o equivalente ao ambiente humano com estímulos sociais, físicos, cognitivos e sensoriais em condições saudáveis e naturais a biologia própria do ser humano (ALCOCK, 2016).

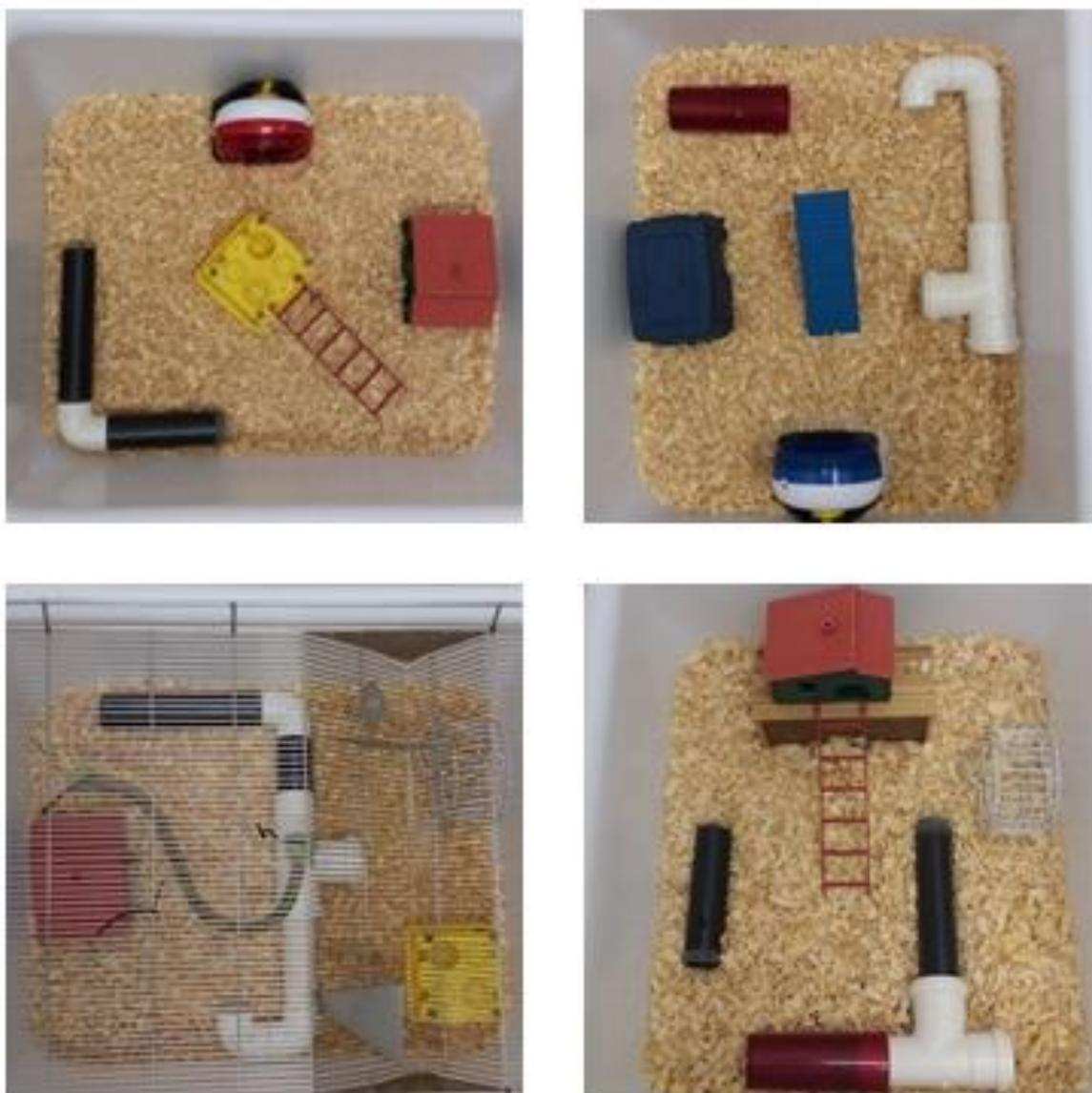
O EA inicia-se no pós-desmane, 21º dia, até o final da vida do animal, no 70º dia. Os quatro grupos de animais neste estudo foram mantidos em caixas com as dimensões idênticas, porém, somente os grupos que foram submetidos ao enriquecimento ambiental, foram adicionados recursos como esconderijos e exercitadores. As caixas eram maiores que microisoladores para racks ventilados recomendados para o manejo de camundongos em laboratório. A dimensão é de 50x60x22 cm. Uma vez por semana, os grupos que recebiam os objetos da estratégia ambiental, eram trocados os objetos da caixa, tanto na forma, cor e posição no ambiente do animal para não gerar acomodação. A montagem das caixas era realizada baseada em uma organização de cerca de 5 ou 7 objetos (a depender do tamanho do brinquedo) eram colocados na caixa, de forma sempre eram colocados um exercitador (rodinha) e pelo menos uma casinha (esconderijo). A posição de cada grupo de objetos na caixa era modificada a cada semana de modo que a exposição de cada tipo de objeto tivesse rotatividade em vários lados da caixa. A exposição ao enriquecimento ambiental tinha duração de 50 dias, cerca de 7 semanas, em todas as semanas houve uma combinação diferente dos objetos dentro da caixa.

Figura 12 - Caixas utilizadas para acondicionamento de animais de laboratório.



Legenda: (A) Caixa em polipropileno utilizada para acondicionamento dos animais em todos os grupos estudados na pesquisa com as seguintes dimensões: 50 x 60 x 22 cm. (B) Microisolador confeccionado em policarbonato para rack ventilado com as seguintes dimensões: 41 x 34 x 16 cm. Imagens comparativas. Fonte: Próprio autor.

Figura 13 - Caixa com algumas das possíveis organizações de enriquecimento ambiental propostos.



Fonte: próprio autor.

No 70º dia foram aplicados os testes comportamentais. Os testes utilizados tinham como objetivo avaliar o comportamento animal quanto o sobressalto animal a um estímulo repetitivo por meio do teste de Inibição Pré-Pulso (IPP) (FIGURA 12), a memória de trabalho pelo Labirinto em Y “*Y-Maze*” (FIGURA 13), hiperlocomção através do teste do Campo Aberto (FIGURA 14) e sociabilidade animal pelo teste de Interação Social (FIGURA 15).

Seguido dos testes comportamentais, o sacrifício e a dissecação dos camundongos foi realizada seguindo respeitosamente as normas e diretrizes do manejo animal. Os animais foram sacrificados por decapitação através de guilhotina, sem uso prévio de anestésicos e o hipocampo (HP) dissecado. Em seguida as áreas foram acondicionadas em -80°C até a realização dos testes bioquímicos *Western Blot* e ensaios de metilação do DNA (epigenética).

4.4 Determinações Comportamentais

O diagnóstico de esquizofrenia é essencialmente clínico. Exames complementares são solicitados para excluir doenças clínicas que possam estar causando sintomas psicóticos. A avaliação neuropsicológica é fundamental para que os psicólogos elaborar melhores estratégias de psicoterapia. Os pontos-chaves desta avaliação estão na capacidade de atenção, memória, funções executivas e sociabilidade (GAEBEL, WOLFGANG, 2011; WYKES *et al.*, 2007).

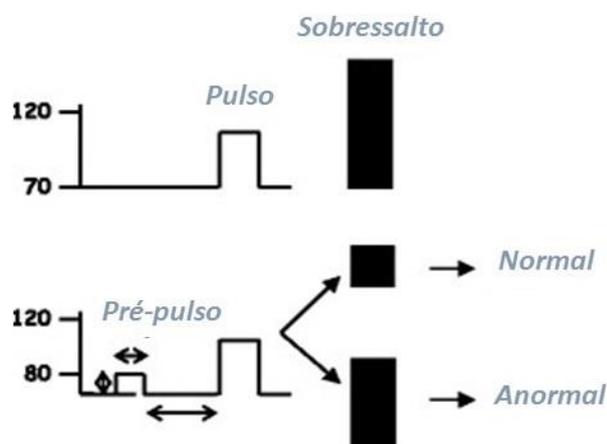
A sinergia de uma vulnerabilidade genética e fatores ambientais geralmente vinculados a insultos pré e perinatais estão fortemente associadas às alterações que expressam déficits neurocognitivos (atenção, memória, percepção, filtro sensorial e funções executivas). (KESHAVAN; KENNEDY; MURRAY, 2004).

4.4.1 Teste de Inibição Pré-pulso (IPP)

O teste de IPP é muito utilizado de forma experimental para testar déficits no filtro sensorio-motor. Déficits de IPP são considerados endofenótipos neurofisiológicos para a esquizofrenia (TURETSKY *et al.*, 2007). IPP é caracterizada pela redução do reflexo de sobressalto a um estímulo acústico intenso (pulso), quando previamente alertado por um estímulo de menor intensidade (pré-pulso) (HOFFMAN; ISON, 1980; SWERDLOW *et al.*, 2008).

A utilização do teste de IPP demonstra vantagens determinantes pois a IPP ocorre em todos os mamíferos. Independente da motivação do sujeito é possível realizar a mensuração, devido a resposta de sobressalto é sensível a manipulações sensoriais, cognitivas e farmacológicas, o que possibilita uma ampla variedade de pesquisas (KOHL *et al.*, 2013).

Figura 14 - Conceito básico de normalidade e anormalidade no teste de inibição pré-pulso.



Nota: em animais normais, o pré-pulso será reconhecido como uma preparação para um possível pulso maior. Desta forma, quando ele escutar um “pré-pulso”, ele terá um sobressalto menor. Fonte: Disponível em:< https://www.researchgate.net/figure/13-Scheme-of-prepulse-inhibition-of-startle-reflex-response_fig9_267205914> Acesso em 08 mar. 2018. Figura modificada).

Para a captação da reação corporal dos camundongos frente ao estímulo acústico foi utilizado um sistema composto por caixa de isolamento acústico ventilada com contensor de camundongo e componentes acessórios da INSIGHT equipamentos científicos – Brasil modelo Startle Sobressalto EP-175.

Os animais foram colocados em um contensor (8,0 x 9,0 x 2,55 cm) consistido de barras de aço inoxidável de 3,0 mm de diâmetro com espaçamento de 0,8 cm de distância. O contensor foi mantido preso sobre uma balança, chamada de plataforma de resposta, por meio 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 x 60 x 40 cm). Procedimentos de calibração foram realizados antes dos experimentos para garantir sensibilidades equivalentes das plataformas de resposta ao longo do período de teste.

Na determinação da IPP, cada camundongo foi colocado na câmara de sobressalto por 5 min para um período de aclimação com um barulho de 68 dB. Após este período, 10 pulsos

de sobressalto (120dB, 40ms de duração) foram feitos com um intervalo de 15 segundos para a definição da reatividade de base do sobressalto individual do animal.

Cada camundongo foi, então, exposto a seis períodos sem estímulo, seis pulsos de sobressalto isolados (120 dB), seis exposições a cada intensidade pré-pulso isolado (72, 76, 80 ou 84 dB) e seis exposições a cada intensidade de pré-pulso seguida por um pulso de sobressalto de 120 dB 80 ms após.

A percentagem de IPP induzida por cada pré-pulso será calculada de acordo de acordo com a seguinte fórmula: $100 \times (PP - PPP) / PP$, com PP sendo a média da amplitude de sobressalto seguida do pulso de sobressalto e PPP sendo a média da resposta de sobressalto seguida da combinação de um certo pré-pulso e o pulso de sobressalto.

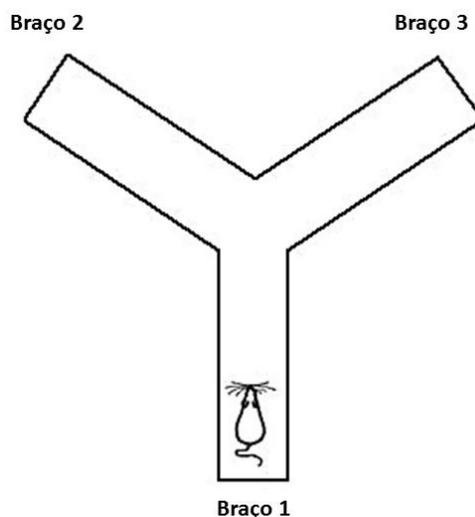
4.4.2 Teste do Labirinto em Y (“Y-Maze”)

O comprometimento da memória de trabalho está relacionado aos sintomas cognitivos da esquizofrenia. O desempenho da memória de trabalho imediato dos animais em experimento foi avaliado por meio da avaliação do comportamento de alternância espontânea dos braços enumerados (1, 2, 3) do labirinto em Y (FIGURA 13), durante uma única sessão (HUGHES, 2004).

Cada animal, novo para o labirinto (30 cm de comprimento e 6 cm de largura por 20 cm de altura), será colocado na extremidade de um braço e poderá mover-se livremente através do labirinto durante uma sessão de 8 min. A série de entradas nos braços será registado visualmente.

O sucesso da alternância dos braços será definido como a entrada dos animais em braços sucessivamente diferentes, exemplo: 123, 321, 132, contabilizado a partir do primeiro braço de entrada e sempre em sequência de três. A percentagem de alternância correta será calculada da seguinte forma: $[(\text{total de alternâncias} / \text{total de entradas nos braços} - 2) * 100]$, como previamente descrito (DALL'LGNA et al, 2007).

Figura 15 - Representação do aparato utilizado no teste do Labirinto em Y (“Y-Maze”).



Disponível em: <http://beachpackagingdesign.com/boxvox/xyz-boxes>. Acesso em 08. Mar. 2018. Figura modificada).

4.4.3 Teste do Campo aberto (“Open Field”)

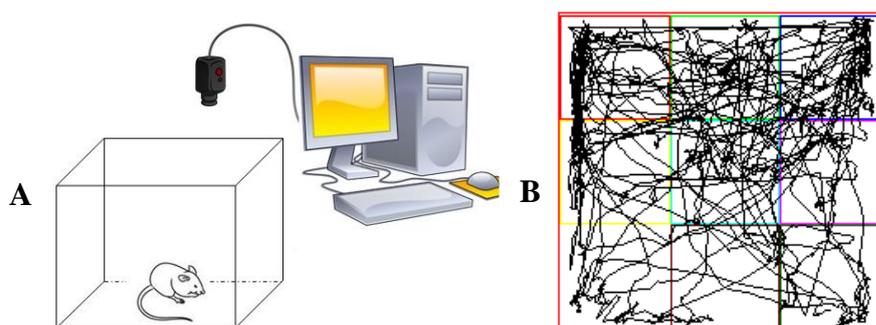
Um dos eventos que pode ser utilizado para a avaliação dos sintomas positivos da esquizofrenia é a hiperlocomção em camundongos. A atividade locomotora foi avaliada por meio do teste de campo aberto (ARCHER, 1973). Este teste foi realizado em um campo de 50 cm × 50 cm rodeado por paredes de 50 cm de altura feito de acrílico.

O software Panlab SMART video tracking system 3.0 (Harvard Apparatus, Barcelona, Espanha) foi utilizado para registro e avaliação do movimento dos camundongos. Sobre o aparato, foi instalado câmera do software anexada a um suporte elevado, a uma distância que permitisse que todas as áreas dos campos abertos fossem visualizadas.

Seguindo as instruções do fabricante, nove zonas foram delimitadas virtualmente (FIGURA 16B) para que os seguintes parâmetros fossem observados: a distância total percorrida no campo pelo animal, preferência por zonas centrais ou periféricas (cruzamentos das linhas coloridas *crossings*, utilizado para determinar a atividade horizontal). No ambiente teste a luz era atenuada e os sons reduzidos ao mais próximo do silêncio. Os animais foram

cuidadosamente colocados no centro do campo para o início do teste. O teste teve duração total de 6 minutos, sendo o primeiro minuto considerado o período de habituação e os 5 minutos restantes tidos como o tempo real de teste.

Figura 16 – Teste do Campo Aberto.



Legenda: A. Representação do Teste de Campo Aberto no aparato utilizando recursos de câmeras de filmagem e o *Software Smart*®. B. Imagem criada a partir da movimentação do animal na arena de teste. Os quadrantes coloridos são as divisões dos quadrantes e o tracejado em preto, refere-se ao percurso do animal.

4.4.4 Teste de Interação Social

A avaliação da interação social do animal em teste se dá em uma caixa acrílica (60 x 40 cm) dividida em três câmaras retangulares, onde as paredes divisórias possuem uma pequena passagem (6x6 cm) que permite o livre acesso a cada câmara. O princípio do teste baseia-se na livre escolha por um camundongo a passar o tempo em qualquer um dos três compartimentos da caixa durante 5 minutos experimentais, onde em uma das câmaras o camundongo em estudo terá contato indireto com um animal desconhecido que está dentro de uma gaiola de tamanho capaz de conter um único camundongo e que permite um pequeno contato entre os animais (RADYUSHKIN *et al.*, 2009).

A câmera central funciona como câmera intercessora entre a câmera com o animal desconhecido e a câmera vazia (FIGURA 15). Para quantificar as tendências sociais do camundongo em teste, as principais tarefas são para medir: a) o tempo gasto na câmera com camundongo estranho e b) tempo gasto na câmera vazia. Assim, o delineamento experimental deste teste permite avaliação aspectos críticos, mas distinguíveis de comportamento social, tais como a motivação a interação social (RADYUSHKIN *et al.*, 2009).

Sociabilidade, neste caso, é definida como a propensão a permanecer um tempo maior com outro camundongo, em comparação com o tempo que permaneceu sozinho em um espaço idêntico, porém onde a câmara está vazia. A preferência por novidade sociais é definido como a propensão a gastar tempo com um camundongo previamente desconhecido em vez de com um camundongo familiarizado. A preferência social foi definida da seguinte forma: $(\% \text{ o tempo gasto no câmara com animal desconhecido}) - (\text{tempo de permanência na câmara sem animal})$ (PARKER-ATHILL *et al.*, 2009).

Figura 17 - Imagem ilustrativa do aparato utilizado para aplicação do teste de interação social.



Nota: Durante o teste, em um dos cilindros é colocado um camundongo desconhecido para avaliar o interesse do animal em avaliação. O cilindro oposto permanece vazio. O teste se dá pela preferência ou não do animal pela câmara que tem um animal desconhecido. FONTE: Disponível em: <<http://www.harvardapparatus.com/social-box-panlab.html>> Acesso em 11 Mai. 2017.

4.5 Determinações neuroquímicas

4.5.1 Expressão das proteínas Iba1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule 1*) e NR2b (Subunidade do receptor de NMDA)

A quantificação da expressão proteica hipocampal Iba1 e NR2b foi avaliada por meio da técnica de *Western Blot*. Seguiram-se sequencialmente as seguintes etapas: extração de proteínas, dosagem de proteínas e técnica de *Western Blot*.

4.5.2 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, 1 µL de inibidor de protease: 100 µL de RIPA). Em seguida, as amostras foram agitadas, 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.

4.5.3 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.

4.5.4 *Western Blot*

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 s, 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-phosphoNR2b subunidade (pTyr1472) (Sigma, USA), anti-habbit IBA1 (WAKO, EUA) e antiDCX (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).

4.6 Perfil de Metilação do gene *Slc6a4*

4.6.1 Extração do DNA genômico

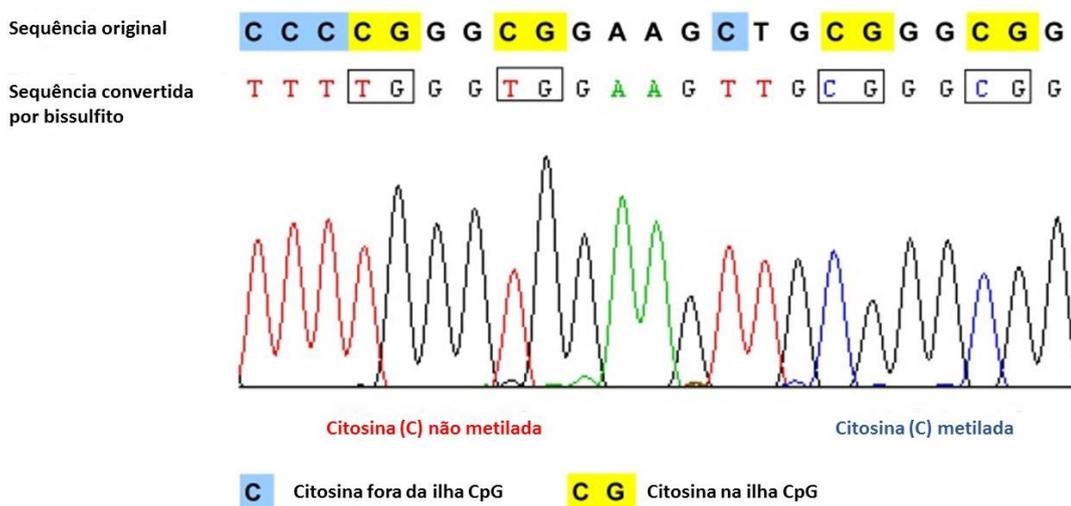
O protocolo de extração seguiu metodologia descrita no *kit ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System*. Resumidamente, foram utilizadas cerca de 25mg de tecido cerebral (hipocampo) que estavam previamente armazenadas em nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram digeridas com 20 µl de proteinase K e 200 µl de tampão de lise celular, a 56°C por 2 horas em bloco aquecido (Thermofisher). Em seguida, foi adicionado 20µl de solução de RNase A à cada amostra, misturado em homogeneizador por 10 segundos (s) seguido por encubação à 56°C por 10 minutos (min). Foi adicionado 250 µl de *Binding Buffer* (BBA) (tampão de ligação) e homogeneizado durante 10s. As amostras foram colocadas em *Binding Column* (coluna de ligação) e centrifugadas por 1 min usando a velocidade de rotação máxima da microcentrifuga. Foram realizadas 3 lavagens com tampão de lavagem (*Column Wash Solution*) cada uma com 500 µl. O DNA purificado foi diluído em água *milli-q nuclease-free* estéril e acondicionado em microcubo (1,5ml) tipo *ependorf®*. A qualidade e quantidade do DNA extraído foi verificado por espectrofotômetro NanoDrop® (Thermofisher) e armazenado a -20°C até a realização das análises.

4.6.2 Modificação do DNA por bissulfito de sódio

A seguinte etapa foi a modificação do DNA por bissulfito de sódio foi realizada utilizando o *kit EZ DNA Methylation™* (Zymo Research) segundo recomendações do fabricante. Para tanto, 10 µl do DNA genômico foram adicionados a 5 µl do tampão de diluição (*M-Dilution Buffer*) e 35 µl de água, para um volume final de 50ul de reação. As amostras ficaram incubadas a 37 °C por 15 minutos. Em seguida, 100 µl do reagente de conversão (*CT Conversion Reagent*) foram acrescentados e homogeneizados. As amostras foram então incubadas em termociclador (95°C por 30 segundos, 50 °C por 60 minutos durante 16 ciclos). Após, as amostras foram incubadas 4°C por 10 minutos. 400 µl do tampão de ligação (*M-Binding Buffer*) foram adicionados em *Zymo-Spin™ IC Column* e homogeneizadas manualmente para serem centrifugadas na velocidade máxima de rotação da microcentrífuga por 30 segundos. Em seguida, 100 µl do tampão de lavagem (*M-Wash Buffer*) foram adicionados e as amostras novamente centrifugadas por mais 30 segundos. Após, 200 µl do tampão de dessulfonação (*M-Desulphonation Buffer*) foram adicionados. As amostras ficaram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas

por 30 segundos para serem lavadas novamente por mais duas vezes com 200 µl de tampão de lavagem. O DNA modificado foi eluído em 15 µl de tampão de diluição (*M-Elution Buffer*) em microtubos de 1,5 mL e armazenados a -20 °C até a realização das análises. O DNA controle (hipometilado/hipermetilado) foi modificado pelo mesmo protocolo que as amostras cerebrais.

Figura 18 - Exemplo do resultado do sequenciamento de nucleotídeos pós modificação por bissulfito de sódio. Após a conversão do bissulfito, as citosinas não metiladas são convertidas em uracila, em seguida. Na etapa de amplificação do DNA, a uracila é lida como timina pela enzima taq DNA polimerase. A metilação protege as citosinas metiladas contra a modificação que permanecem citosinas após a amplificação. Portanto, a citosina metilada e a citosina não metilada (timina) podem ser distinguidas de acordo com o resultado do sequenciamento.

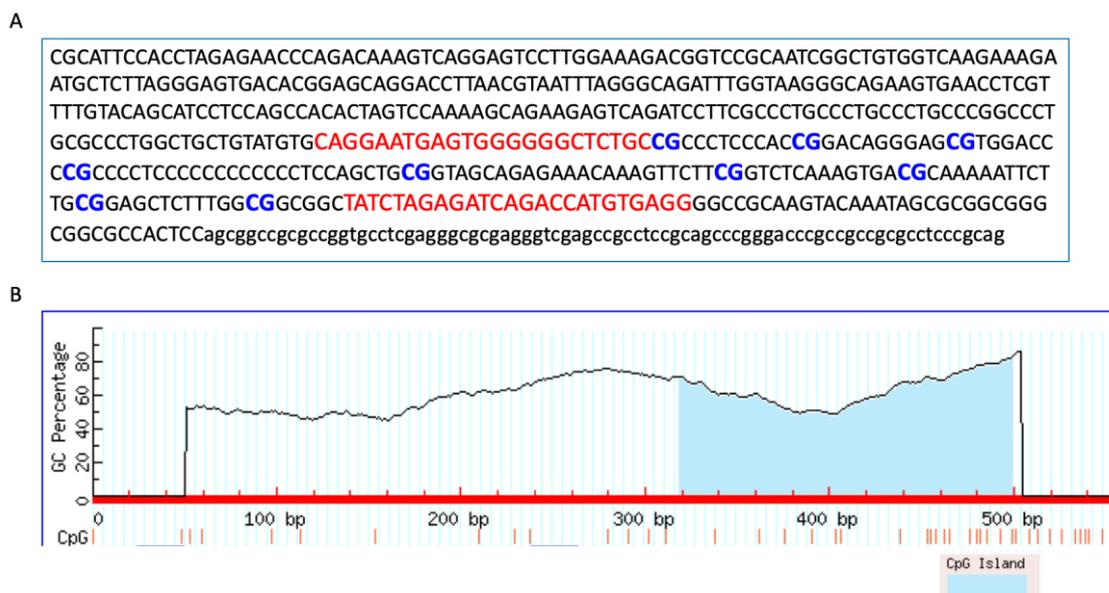


Fonte: Modificado (ZHANG; JELTSCH, 2010).

4.7 Identificação da ilha CpG e padronização da amplificação do DNA

A identificação da região promotora do gene *Slc6a4* foi identificada utilizando o utilizando sequências do *UCSC Genome Bioinformatics* (<http://genome.ucsc.edu/>) e os sítios CpGs foram determinados pelo programa *MethyPrimer* (FIGURA 19) (LI; DAHIYA, 2002). Os *primers* foram desenhados na ilha GpG mais próxima ao primeiro exon, e as sequências foram validadas *in silico* utilizando o programa *NetPrimer* (Premier Biosoft) e as sequências utilizadas foram: primer forward 5'-TAGGAATGAGTGGGGGTTTTGT-3' e Reverse 5'-CCTCACATAATCTAATCTCTAAATA-3'.

Figura 19 - A) Sequência genômica do *Slc6a4* de camundongo (553 nucleotídeos). Em azul: os dinucleotídeos CpGs analisados (total de 9); em vermelho: as regiões de pareamento dos *primers* utilizados; em letras minúsculas: o primeiro exon. B) Gráfico gerado pelo programa *MethPrimer* evidenciando a Ilha CpG (em azul) em fragmento correspondente ao gene *Slc6a4*.



Fonte: Gráfico gerado pelo programa *MethPrimer* (Li e Dahiya, 2002).

A padronização da reação de amplificação do gene *Slc6a4* foi realizada através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) onde foram testadas concentrações ótimas de *primer* e DNA modificado.

4.8 High Resolution Melting (HRM)

A técnica de *High Resolution Melting (HRM)* é realizada após a modificação por bissulfito e amplificação da sequência do gene alvo. O DNA é amplificado utilizando a técnica de PCR em tempo real (qPCR). As uracilas presentes na molécula de DNA modificado são copiadas nos novos fragmentos como timina, portanto, onde inicialmente no DNA genômico encontrávamos uma citosina, base nitrogenada pirimídica, passamos a encontrar uma timina, base nitrogenada púrica. O fragmento recém-sintetizado passa por um aumento sucessivo e gradual de temperatura até 95° C por 60 segundos para se observar o ponto de dissociação da dupla fita dos fragmentos. A temperatura em que ocorre essa dissociação é chamada de ponto

de dissociação (*melting*) e através dela podemos estimar a porcentagem de metilação do DNA. Quanto maior o número de timinas, mais fácil se dará sua dissociação pois se tratando de uma base púrica realiza somente 2 ligações de hidrogênio no pareamento com a base da fita homóloga de DNA. Contrariamente, quanto mais citosinas, mais tarde se dará sua dissociação, já que, está sendo uma base pirimídica, realiza 3 ligações de hidrogênio, o que torna a fita de DNA mais estável em relação a uma fita rica em timinas e pobre em citosinas.

A amplificação do gene *Slc6a4* foi realizada através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) onde foi utilizado 3,4 µl de água, 1 µl de DNA modificado, 0,3 pmol de cada primer e 5 µl *MeltDoctor™ HRM Master Mix* totalizando um volume de 10 µl por reação. As amostras foram analisadas em duplicata e na mesma placa, foi acrescentada amostra de DNA controle *PCR control DNA Set kit* (Qiagen), metilado e não metilado, contendo DNA com aproximadamente 0% (hipometilado), 50% (parcialmente metilado) e 100% (hipermetilado) metilado. A placa contendo todas as amostras e a curva de referência foi levada ao termociclador *LightCycler® 96 System* da Roche.

A ciclagem temperatura para amplificação do DNA modificado, ocorreu com uma etapa inicial de desnaturação a 95° C por 10 minutos, seguidas de 45 ciclos de desnaturação 95° C por 15 segundos e 60°C por 1 min (anelamento e extensão). Em seguida foi realizada a curva de melting para dissociação das fitas e determinação do perfil de metilação do DNA, nas seguintes condições: desnaturação a 95° C por 10 segundos, anelamento a 60°C por 1 min, HRM a 95° C por 15 segundos e anelamento a 60°C por 15 segundos.

4.10 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), exceto as imagens geradas pelo programa software Panlab SMART vídeo tracking system 3.0.

O software utilizado para análise dos dados foi o *GraphPad Prism* versão 6.0 para Windows, *GraphPad Software Inc.*, San Diego Califórnia EUA Copyright © 1992 – 2012. Os resultados dos estudos comportamentais e neuroquímicos foram expressos como a média ± EPM (erro padrão da média). Para a realização das análises estatísticas foram utilizados os seguintes testes: análise de variância (ANOVA) de duas vias para os testes bioquímicos e comportamentais considerando “EA” (grupos não EA e EA) e modelo de “2Hits” (poly I:C+ estresse), exceto o teste de IPP, que foi analisado por ANOVA de duas vias por medidas repetidas, considerando intensidade de pré-pulso como medida de repetição e grupos, como

fatores. Teste de Tukey post hoc foi utilizado para comparações entre grupos. Em todas as análises estatísticas, foi considerado o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade com valores menores que 0,05. O nível de significância foi definido em $P \leq 0.05$.

Os dados obtidos pelo HRM foram lidos pelo programa LightCycler® 96 SW 1.1 que nos mostra a porcentagem de metilação encontrada em cada amostra através da curva de *Melting*.

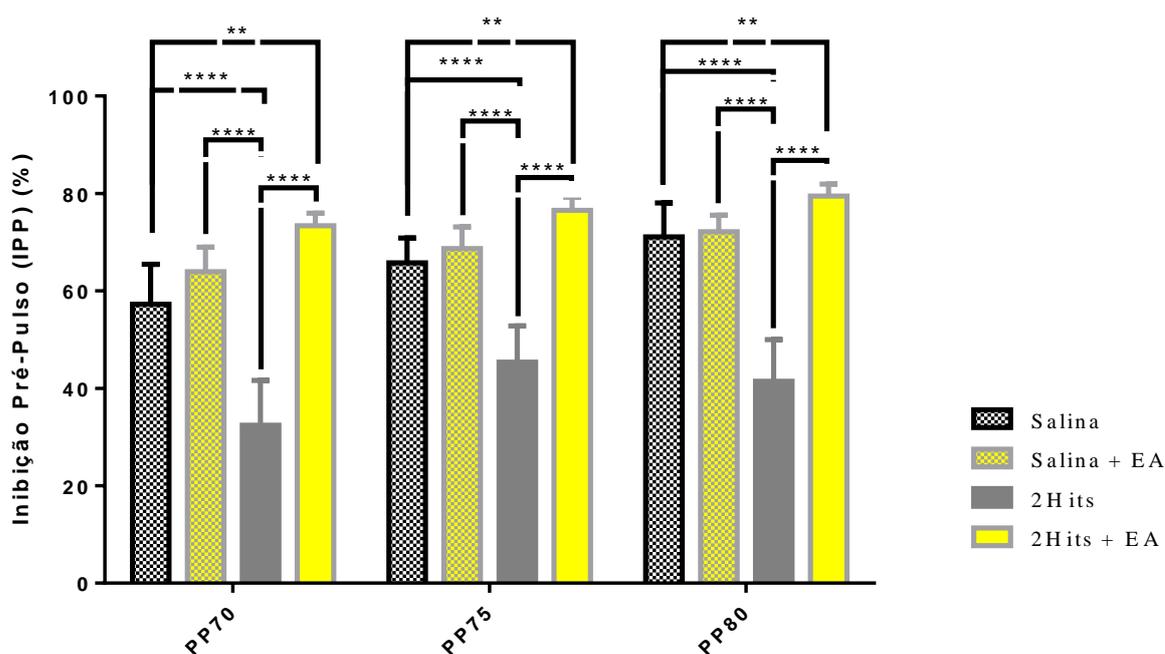
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE 1: SOBRE OS TESTES COMPORTAMENTAIS

5.1. Teste de Inibição Pré-Pulso (IPP)

Os déficits de IPP foram evidentes nos camundongos que pertenciam ao grupo de maior risco para esquizofrenia. A análise de IPP revelou um significativo déficit no filtro sensorio motor dos animais pertencentes ao grupo “2Hits” quando comparados a todos os outros grupos do estudo: Salina vs. 2Hits [68.15±4.665], Salina+ EA vs. 2Hits [68.25±4.779] e 2Hits vs. 2Hits+EA [39.74±4.420].

Figura 20 – Efeito do enriquecimento ambiental na percentagem de inibição pré-pulso de animais submetidos ao modelo de esquizofrenia por “2Hits”.



As barras representam a média ± E.P.M (n= 12-14 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey (**P<0.01, ****P < 0.0001).

Em paralelo o grupo tratado com salina e os grupos submetidos ao enriquecimento ambiental, não apresentaram déficits na avaliação sensorio motor e não demonstraram diferenças significativas entre estes grupos. Portanto, o modelo animal de esquizofrenia do

“2Hits” demonstrou ser eficaz para gerar efeitos esquizotípicos na redução do filtro sensorio motor em animais.

Quando observado os resultados entre o grupo 2Hits vs. 2Hits+EA concluímos que o enriquecimento ambiental foi significativamente importante para a recuperação do filtro sensorio motor nos animais submetidos aos insultos do modelo animal de esquizofrenia.

Na comparação dos grupos Salina vs. 2Hits+EA [$F(1, 60) = 8.856, P = 0,0042$], observamos que o enriquecimento ambiental também demonstrou diferença considerável para reverter as alterações os danos causados pelos insultos nas fases da infância e adolescência. Apesar da diferença entre os grupos submetidos ao EA ser apenas um pouco maior que no grupo salina.

O reflexo de sobressalto acústico é uma resposta primitiva de defesa dos animais após um estímulo sonoro intenso e repentino. A reação de sobressalto é um dos movimentos mais rápidos que o ser humano pode gerar a partir de um estímulo sensorial. Essa resposta é inibida quando um estímulo de baixa intensidade é apresentado previamente (VALLS-SOLE, 2004).

Alguns transtornos neurológicos humanos apresentam danos na resposta de IPP, como por exemplo, a esquizofrenia, devido a déficits em medida operacional de bloqueio do filtro sensorio-motor (GEYER, M. A. *et al.*, 2001).

A inibição por pré-pulso da resposta de sobressalto é uma maneira de mensurar o filtro sensorio-motor, mecanismo utilizado para filtrar o excesso de informação do meio. A resposta de sobressalto pode ser minimizada quando o reflexo ocorrer logo após um estímulo de intensidade mais fraca, caracterizando um condicionamento clássico aprendido, evitando um excesso de informação (DAVIS *et al.*, 1982; GRAHAM, 1975).

Já é bem estabelecido que pacientes com esquizofrenia apresentam uma diminuição da resposta do IPP, uma gama de estudos demonstraram que esses pacientes apresentam uma resposta de sobressalto maior do que pacientes saudáveis mesmo quando o estímulo é apresentado com um pré-pulso anterógrado (BRAFF; GRILLON; GEYER, 1992). Confirmando que essa redução no IPP se dá em função do acentuado déficit no processamento de informações na esquizofrenia (BRAFF; GEYER; SWERDLOW, 2001).

Danos na região do hipocampo são suficientes para produzir significativos comprometimentos da memória em mamíferos. Pacientes com lesões em regiões de CA1 do

hipocampo demonstram danos moderados a graves de amnesia, apresentaram dificuldade em testes de memória como recordar e de reconhecimento (KESNER; MARTINEZ, 2007).

O hipocampo faz parte das estruturas subcorticais e é conhecido por ser uma região crucial para a aquisição e recuperação do condicionamento do medo, desempenha um papel facilitador na indução de reações emocionais adequadas, no processamento do autocontrole das emoções sociais e no reconhecimento de expressões faciais e emocionais (PASCUAL; RODRIGUES; GALLARDO-PUJOL, 2013).

Estudos com neuroimagem estrutural têm replicado os achados de alterações morfofuncionais no cérebro de pacientes esquizofrênicos. Em alguns estudos tais alterações se mostram difusas, em outros, localizadas em porções específicas de córtex temporal e pré-frontal, gânglios da base e tálamo (GUR *et al.*, 1999; SEIDMAN *et al.*, 1999).

Há evidências de comprometimento do circuito córtico-estriado-pálido-pontinho em todas as doenças em que o IPP está abolido, o qual se relaciona a alterações na filtragem da informação sensorial ou cognitiva. Déficits no teste, em parte podem ser explicados, pela incapacidade para prestar atenção ao pré-pulso, de tal modo que poderia ocorrer em todas as condições que incluem prejuízo atencional (BRAFF; GEYER; SWERDLOW, 2001; ELDEN; FLATEN, 2003). Uma melhor resposta de sobressalto para o estímulo condicionado, poderia também estar relacionado com indicadores de um nível elevado de ansiedade (BORSINI; PODHORNA; MARAZZITI, 2002).

Problemas na comunicação entre o sistema límbico e os núcleos da base podem levar ao déficit de IPP (SWERDLOW *et al.*, 1992). O hipocampo pode armazenar memória a longo prazo durante semanas e gradualmente transferi-la para regiões específicas do córtex cerebral (JERALD KAY, 2002). Alterações ao nível de hipocampo, amígdala basolateral e disfunções no córtex medial pré-frontal e no córtex orbitofrontal podem alterar respostas de IPP (KOHL *et al.*, 2013).

Vários estudos identificaram algumas vias neurotransmissoras envolvidas no IPP. A influência da dopamina na resposta de IPP que pode ser comprovada pela grande quantidade de estudos demonstrando que diversos psicoestimulantes agonistas dopaminérgicos como, anfetaminas, apomorfina e cocaína, prejudicam a resposta do sobressalto em roedores (BYRNES; HAMMER, 2000; CULM, 2003; DRUHAN; GEYER; VALENTINO, 1998; FEIFEL *et al.*, 2002; SATAKE *et al.*, 2012). Em contrapartida, drogas antipsicóticas antagonistas de receptores dopaminérgicos são capazes de reverter esse efeito (CÁCEDA *et*

al., 2012; HOFFMAN; DONOVAN, 1994; RIGDON; VIKK, 1991; SWERDLOW *et al.*, 1991).

A excessiva atividade de receptores dopaminérgicos do tipo D2 na via mesoaccumbens provoca redução na resposta de IPP. O aumento dopaminérgico no núcleo accumbens provoca uma redução na liberação de neurotransmissores GABA (ácido gama-aminobutírico) para o pálido ventral (KOCH, 1999; KRETSCHMER; KOCH, 1998).

O sistema glutamatérgico está fortemente relacionado a alterações na resposta de IPP. Antagonistas não-competitivos do receptor glutamatérgico NMDA (N-metil D-aspartato), como a fenciclidina (PCP), quetamina e a dizocilpina (MK-801) provocam déficits no IPP tanto em roedores, quanto em primatas (JAVITT; LINDSLEY, 2001; KEITH; MANSBACH; GEYER, 1991; LINN *et al.*, 2003; LONG; MALONE; TAYLOR, 2006; SCHULZ, BRIGITTE *et al.*, 2001).

Em parte, podemos considerar que a amplitude do espaço em que os animais viviam também pode ser um fator protetor, porém na presença de insultos biológico e ambientais o enriquecimento ambiental foi essencial para proteger e promover uma melhor resposta do filtro sensório motor.

A neurobiologia da cognição envolve os processos de memória e aprendizado. A habituação é parte dos processos de aprendizado e sendo um dos mecanismos mais elementares. Todo estímulo novo requer atenção e um aumento global da vigilância pelo indivíduo ao estímulo. A habituação é uma espécie de aprendizado invertido, pois reduz a reação quando o estímulo já é conhecido, assim permitindo que o animal não seja sobrecarregado de estímulos, sendo essencial a adaptação humana (CORDIER, 2006).

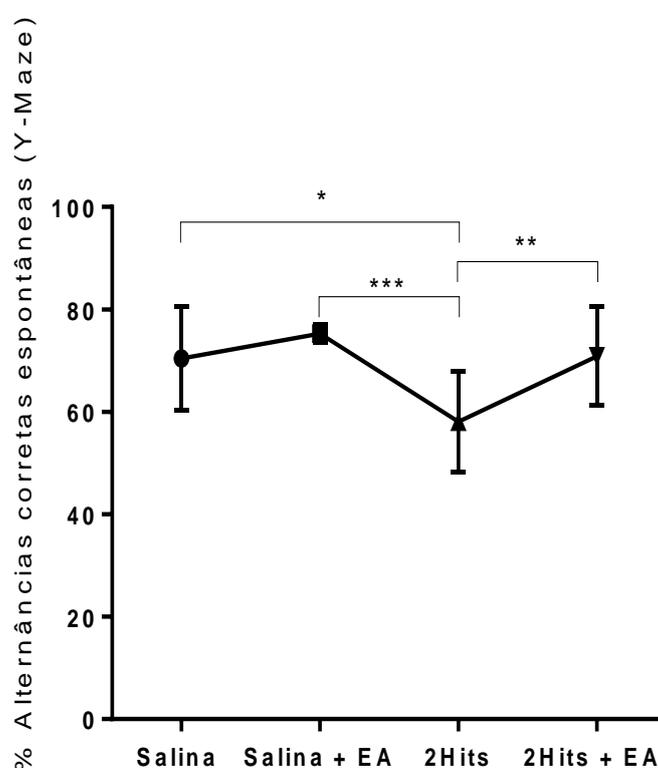
Fatores fundamentais do ambiente como terapia cognitivas, a promoção da independência, qualidade de vida e preservação da funcionalidade dos pacientes sinalizam ser abordagens que previnem uma piora do quadro (LAMBERT, 2014).

Desta forma, o pré-pulso seria considerado uma previa habituação/preparação do animal ao estímulo sensorial de menor intensidade, imediatamente seguido por outro de maior intensidade. Um animal saudável com capacidade normal de aprendizado se espera que a resposta de sobressalto seja menor diante um pulso de maior intensidade quando precedida por um pulso menor, baseado nos processos de memória e aprendizado.

5.2 Teste do Labirinto em Y (*Y-Maze*)

O labirinto em Y é um teste para medir parâmetros comportamentais por quantificar a disposição dos roedores em explorar novos ambientes baseado na sua capacidade de aprendizado e memória, implicada à memória de trabalho. Roedores normalmente preferem investigar um novo braço do labirinto em vez de retornar a um que foi visitado anteriormente. Muitas partes do cérebro, incluindo o hipocampo e córtex pré-frontal, estão implicados nessa tarefa. (“STANFORD MEDICINE SCHOOL OF MEDICINE”, 2018).

Figura 21 – Efeito do enriquecimento ambiental sob a memória de trabalho de animais submetidos ao modelo do “2Hits”.



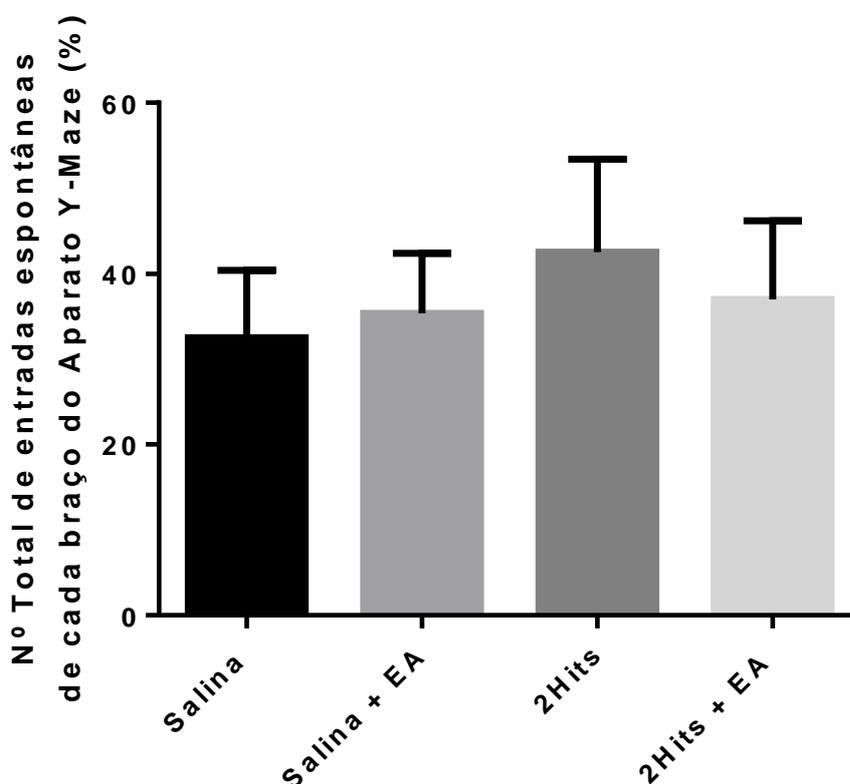
As barras representam a média \pm E.P.M (n= 12-14 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

A comparação entre os grupos quanto ao número de entradas em cada braço demonstra a atividade exploratória dos animais de forma semelhante e confirma que os acertos nas alternâncias espontâneas corretas estão relacionadas com uma condição cognitiva superior dos animais submetidos a estratégia ambiental (FIGURA 21).

Na avaliação dos acertos nos braços alternados no teste *Y-Maze* houve uma significativa interação entre o modelo “*2Hits*” e enriquecimento ambiental [$F(3.35)=7.917$, $p=0,0004$).

A análise do teste *Y-Maze* revelou déficit relevante no aprendizado e memória nos animais pertencentes ao grupo *2Hits* quando comparados a todos os outros grupos do estudo: Salina vs. *2Hits* [70.38 ± 12.29], Salina + EA vs. *2Hits* [75.30 ± 17.21] e *2Hits* vs. *2Hits*+EA [58.09 ± 12.75]. Os grupos incluídos a estratégia de EA não apresentaram diferenças significativas entre grupo Salina+EA vs. *2Hits*+EA [75.30 ± 4.455], os quais também não apresentaram diferença estatística com o grupo Salina, revelando que o enriquecimento ambiental foi decisivo para a normalidade no grupo que sofreu insulto do *2Hits*, porém em grupos que não foram submetidos ao risco permaneceram protegidos.

Figura 22 – Efeito do enriquecimento ambiental sob o número total de entradas espontâneas em cada braço do aparato do teste *Y-Maze* de animais submetidos ao modelo do “*2Hits*”.



As barras representam a média \pm E.P.M (n= 12-14 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey (* $P < 0.05$).

Conceitualmente, o EA é definido como uma complexa combinação de estímulos inanimados e sociais (ROSENZWEIG *et al.*, 1978; ROSENZWEIG; BENNETT, 1996), dos quais possuem como componente essencial e típico a possibilidade dos animais de alcançarem altos níveis de atividade física voluntária, cognitiva e exploratória, além de experiências visuais, sociais e somatossensoriais (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; SALE; BERARDI; MAFFEI, 2009). Os comprometimentos cognitivos tornaram-se alvo das pesquisas sobre a esquizofrenia e de tratamentos farmacológicos e psicossociais (SADOCK; SADOCK, 2016).

Estudos com modelos de EA demonstram que nos animais expostos a estímulos sensoriais, motores e cognitivos apresentam comportamento mais ágio, mais perceptivo, reduz ansiedade e melhora a resposta cognitiva. O EA não só é capaz de proteger da ansiedade excessiva em resposta a um estressor presente, mas também atenua os efeitos persistentes ou persistentes gerados por estressores psicogênicos anteriores, como o estresse pré-natal ou a separação materna neonatal (BENAROYA-MILSHTEIN *et al.*, 2004; BRENES; FORNAGUERA, 2008; FOX; MERALI; HARRISON, 2006; HUTCHINSON *et al.*, 2012). O prelúdio desses achados recentes, foram descritos em estudo onde 2 grupos de animais foram comparados, um grupo foi criado livremente em ambiente doméstico e o outro em gaiolas convencionais (HEBB, 1947).

Fortalecendo os achados anteriores, estudos de coorte com pacientes com esquizofrenia, demonstraram de forma consistente, que as crianças que veem a desenvolver esquizofrenia, se diferenciam de seus pares em sua trajetória de desenvolvimento motor, intelectual e linguagem. Nos testes de inteligência e habilidades de verbais esses pacientes apresentam desempenho pior tanto na infância e quanto na adolescência. E ainda, o atraso no desenvolvimento motor e da linguagem foram considerados fortes preditores para o desenvolvimento de psicoses (WELHAM *et al.*, 2009).

A compreensão da psicopatologia da esquizofrenia sobre o prejuízo cognitivo é de alta relevância para o acompanhamento clínico dos pacientes ao nível ambulatorial. O comprometimento cognitivo é o melhor preditor do nível de funcionalidade do que a gravidade dos sintomas psicóticos. Geralmente, paciente esquizofrênicos apresentam disfunção cognitiva sutis nas esferas de atenção, função executiva, memória de trabalho e memória episódica. Mesmo que o quociente ainda esteja considerado normal, é provável que seu

desempenho seria melhor sem a doença. Embora não seja instrumento de diagnóstico, esses comprometimentos são fortemente ligados ao desfecho funcional da doença, mas possuem alto valor clínico para variáveis de diagnóstico e planejamento do tratamento (SADOCK; SADOCK, 2016).

Múltiplas evidências dão solidez a hipótese que os prejuízos cognitivos constituem uma das dimensões da esquizofrenia (KESHAVAN; KENNEDY; MURRAY, 2004). A intensidade dos sintomas negativos e dos prejuízos cognitivos parece predizer uma melhor recuperação dos pacientes. Os tratamentos baseados apenas na farmacoterapia tem ação limitada sobre as dimensões da doença, porém, quando associada a intervenções psicossociais, o tratamento tem-se mostrado mais promissor na qualidade de vida destes pacientes (NOTO, 2009).

Vários estudos apontam os aspectos cognitivos como fatores cruciais na progressão e desfecho funcional do paciente com esquizofrenia (FETT; VIECHTBAUER; DOMINGUEZ, 2011; WYKES *et al.*, 2007). Dados apontam que pacientes que trabalham e estudam apresentam menor sintomatologia, melhor funcionamento e maior nível de qualidade de vida (QV). Como também, o maior tempo dedicado ao trabalho e estudo, aumentam os índices de qualidade de vida. Contrariamente, aos que não desenvolvem nenhuma atividade cognitiva laboral ou de estudo apresentam valores reduzidos de QV e funcionalidade (ÜÇOK, A.; GORWOOD; KARADAYI, 2012).

Os sintomas “cognitivos” foram avaliados nos grupos submetidos ao enriquecimento ambiental, no qual corroboram com os estudos onde demonstram que os efeitos da exposição a um EA estão associados à facilitação cognitiva, tanto em animais saudáveis quanto em modelos animais para diversas desordens, têm sido extensivamente demonstrados e correlacionados às mudanças morfológicas, bioquímicas, moleculares e epigenética no cérebro dos animais (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; PANG; HANNAN, 2013b; SALE; BERARDI; MAFFEI, 2009; SOLINAS *et al.*, 2010).

5.3 Teste de Campo Aberto

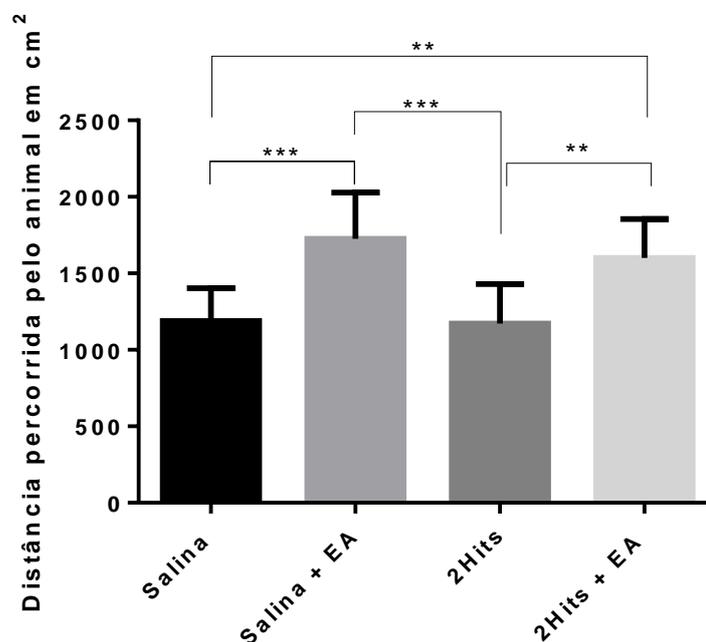
O teste de locomoção do campo aberto é usado principalmente para examinar de forma sistemática a função motora em atividade espontânea observando a exploração de um ambiente novo (HRNKOVA *et al.*, 2007).

A medida mais comumente utilizada de atividade exploratória e locomotora geral é atualmente a distância total percorrida (BUCCAFUSCO, 2001). Os resultados dessa medida nos animais do estudo apresentaram diferenças significativas na interação entre os animais submetidos ao enriquecimento ambiental e os não submetidos [$F(3, 36) = 12,09, p < 0,0001$].

Os animais pertencentes aos grupos de EA apresentaram uma maior atividade locomotora em relação aos grupos que não foram submetidos. A partir dos dados, alguns pontos podem ser verificados: (1) Os animais do grupo de risco *2Hits* não apresentaram um comportamento de hiperatividade locomotora, visto que quando comparados com o grupo Salina não apresentaram diferença estatística relevante [Salina vs *2Hits* [16.5 ± 115.6]]; (2) Os grupos submetidos ao EA apresentaram valores bastante semelhantes [Salina+EA vs. *2Hits*+EA (125.1 ± 115.6)]; (3) As diferenças estatísticas se deram nas comparações entre Salina vs. Salina+EA (-538.4 ± 115.6), Salina vs. *2Hits*+EA (-413.3 ± 115.6), *2Hits* vs. Salina+EA (554.9 ± 115.6) e *2Hits* vs. *2Hits*+EA (-429 ± 115.6).

O enriquecimento ambiental oferece várias possibilidades e diversidade de estímulos visuais, somatossensoriais, olfativos, motores e cognitivos com maior probabilidade de interação social, exploração do ambiente, e ainda, os benefícios da atividade física voluntária (PANG; HANNAN, 2013a).

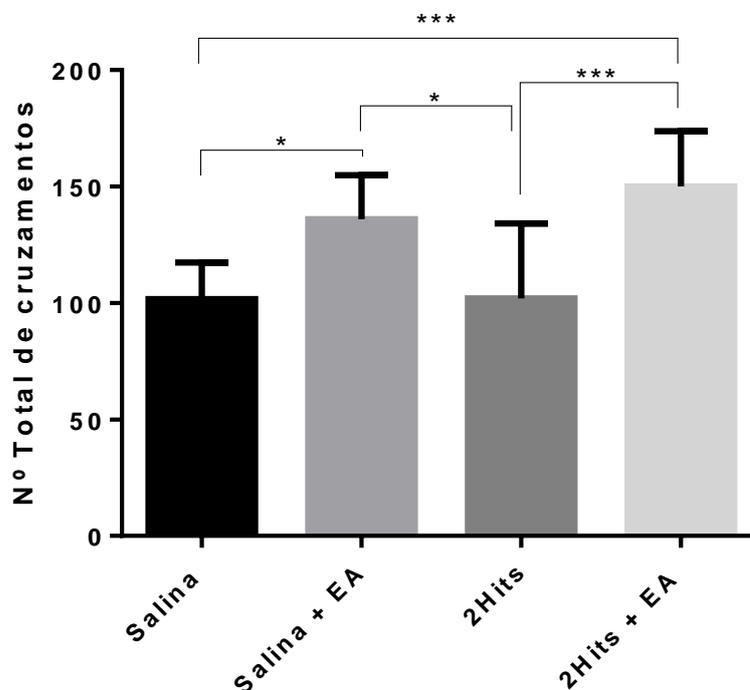
Figura 23 - Efeito do enriquecimento ambiental sob a distância percorrida no campo aberto de animais submetidos ao modelo do “2Hits”.



As barras representam a média \pm E.P.M (n= 12-14 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey (**P<0.01, ***P<0.001).

A hiperlocomoção está entre os sintomas psicóticos, exibindo hiperatividade motora e estereotipia. Tais comportamentos podem ocorrer na esquizofrenia, sobretudo o comportamento estereotipado e as perseverações, embora possa ocorrer também a redução da atividade motora (GEYER; MOGHADDAM, 2002). Baseado nos achados não foi possível relacionar hiperlocomoção com o risco de comportamento esquizotípico nos animais em estudo no momento da avaliação, visto que os animais do enriquecimento ambiental demonstraram maior atividade motora.

Figura 24 - Efeito do enriquecimento ambiental sob o número total de cruzamentos no teste de campo aberto em camundongos submetidos ao modelo de esquizofrenia por “2Hits”.



As barras representam a média \pm E.P.M (n= 12-14 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey (* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$).

É uma característica dos camundongos serem curiosos e terem hábitos exploradores (BRASIL, 2002). Estudos com roedores que vivem livres no campo avaliaram a habilidade de aprendizado espacial relacionada com tamanho da área de vida. Os pesquisadores constataram diferença entre os sexos e entre o modo de vida em espaços mais amplos, onde animais que vivem em espaços mais amplos tem uma maior capacidade de memória de trabalho e que as fêmeas de espécies monogâmicas como os roedores da espécie arganz-do-campo, na qual macho e fêmea vivem juntos, igualam sua performance de aprendizado (ALCOCK, 2016).

Possíveis alterações epigenéticas podem ter ocorrido ao longo do tempo na linhagem de camundongos de laboratório, na qual, podem ter influenciado em seu comportamento relacionado a memória. Porém, mediante estratégias ambientais o estímulo é incrementado para promover um comportamento natural. Da mesma forma, pacientes com esquizofrenia

possuem alta vulnerabilidade a doença visto um componente genético que pode sofrer modificações ao longo da vida, explica a epigenética (GAEBEL; WOLFGANG, 2011).

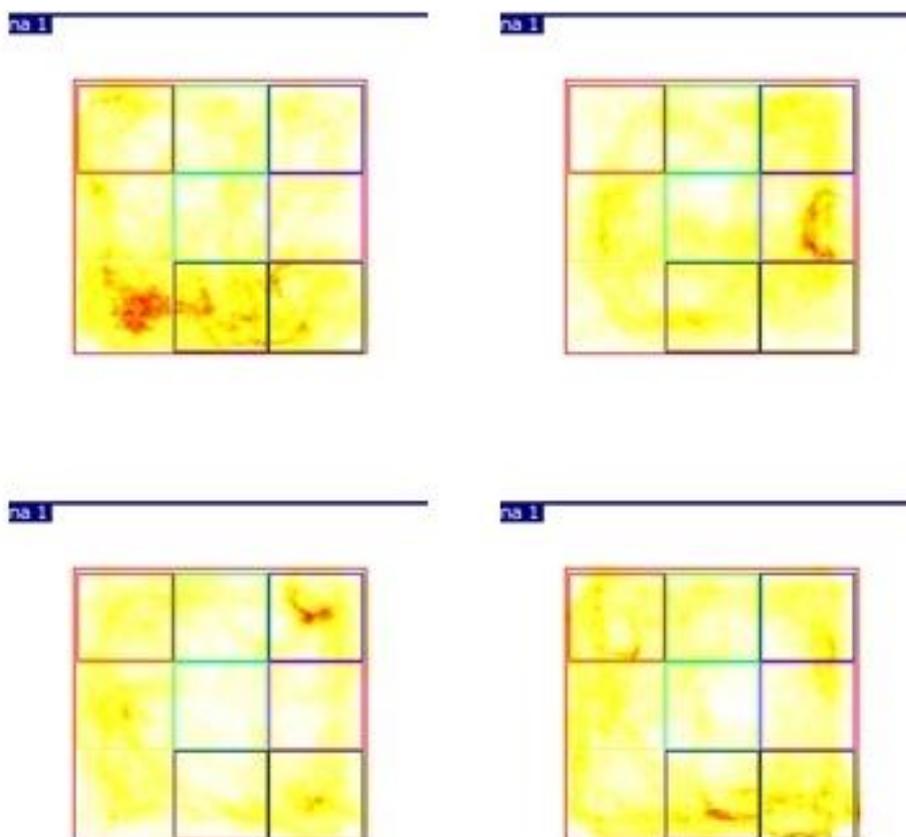
Naturalmente, um aumento no número de cruzamentos seria observado nos grupos de animais que estavam em EA (FIGURA 24), visto que estes também apresentaram um aumento da distância percorrida durante o teste (FIGURA 23). Os animais do grupo de risco *2Hits* comparados com o grupo Salina não apresentaram diferença estatística relevante [Salina vs *2Hits* [-0.3000±10.63]]. Os grupos submetidos ao EA apresentaram valores bastante semelhantes [Salina+EA vs. *2Hits*+EA (-14.10±10.35)]. As diferenças estatísticas se deram nas comparações entre Salina vs. Salina+EA (-34.30±10.35), Salina vs. *2Hits*+EA (-48.40±10.35), *2Hits* vs. Salina+EA (34.00±10.63) e *2Hits* vs. *2Hits*+EA (-48.10±10.63).

Os resultados dos números de cruzamentos dos animais do estudo apresentaram diferenças significativas na interação entre os animais submetidos ao enriquecimento ambiental e os não submetidos [$F(3, 3) = 10.92, p < 0,0001$].

Quanto a observação da atividade no centro da arena, foi avaliado a partir da captura de imagens segundo a predominância do animal em áreas específicas (reveladas na cor vermelha) em contraste com as demais áreas de movimentação (reveladas na cor amarela) e áreas de mínima movimentação (reveladas na cor branca).

É possível explicar como um animal se comporta de um modo particular se entendermos primeiro como ele se desenvolveu durante sua vida e, segundo, como funcionam seus mecanismos internos depois de constituídos. Em outras palavras, quando analisamos os mecanismos internos do animal podemos compreender o que conduz a um determinado comportamento. O desenvolvimento interno e as causas fisiológicas dizem respeito a vida de um indivíduo, estes são chamados de causas imediatas, ou proximais do comportamento. De forma inversa, um outro grupo de características do comportamento são preditas por eventos que ocorrem ao longe de gerações (ALCOCK, 2016).

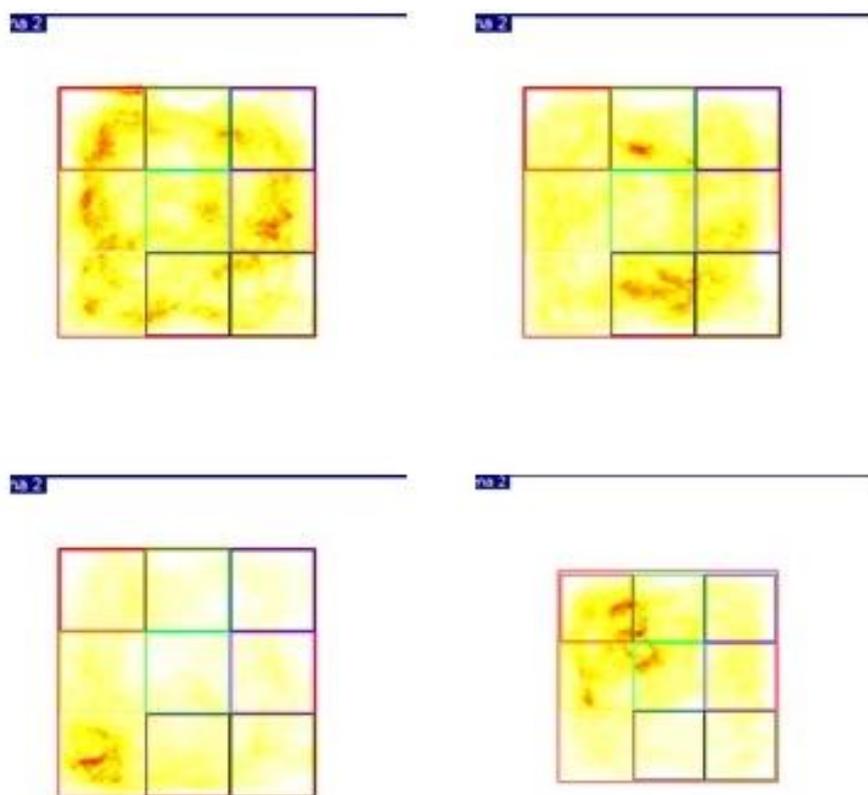
Figura 25 – Imagem sobre a predominância do grupo *2Hits* em zonas do aparato medida pela permanência em áreas da arena teste determinada por cores.



As figuras foram provenientes do programa de computador software Panlab SMART vídeo tracking system 3.0. Áreas em vermelho significam maior predominância do animal em tempo durante o teste e em amarelo, significa áreas em que o animal passou sem maior predominância. Já em branco são áreas com pouquíssima predominância de permanência do animal. Fonte: Próprio autor.

O teste do campo aberto está bem validado para mensurar o comportamento tipo ansioso nos roedores (HALENE *et al.*, 2009). O teste promove um estímulo por meio de um ambiente desconhecido, está sendo uma das duas classes de estímulos, as que sinalizam perigo em potencial de maneira inata, independente de aprendizagem, e as que o fazem por meio de processos de aprendizagem, mediada pelo condicionamento clássico, e, compartilham as mesmas finalidades: sinalizar e antecipar para o organismo alguma situação de perigo potencial no ambiente e deflagrar reações de defesa compatíveis. Os modelos animais de ansiedade fundamentam-se justamente na manipulação experimental desses estímulos e na observação consecutiva das reações comportamentais e fisiológicas decorrentes (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Figura 26 - Imagem sobre a predominância do grupo *2Hits+EA* em zonas do aparato medida pela permanência em áreas da arena teste determinada por cores.



As figuras foram provenientes do programa de computador software Panlab SMART vídeo tracking system 3.0. Áreas em vermelho significam maior predominância do animal em tempo durante o teste e em amarelo, significa áreas em que o animal passou sem maior predominância. Já em branco são áreas com pouquíssima predominância de permanência do animal. Fonte: próprio autor.

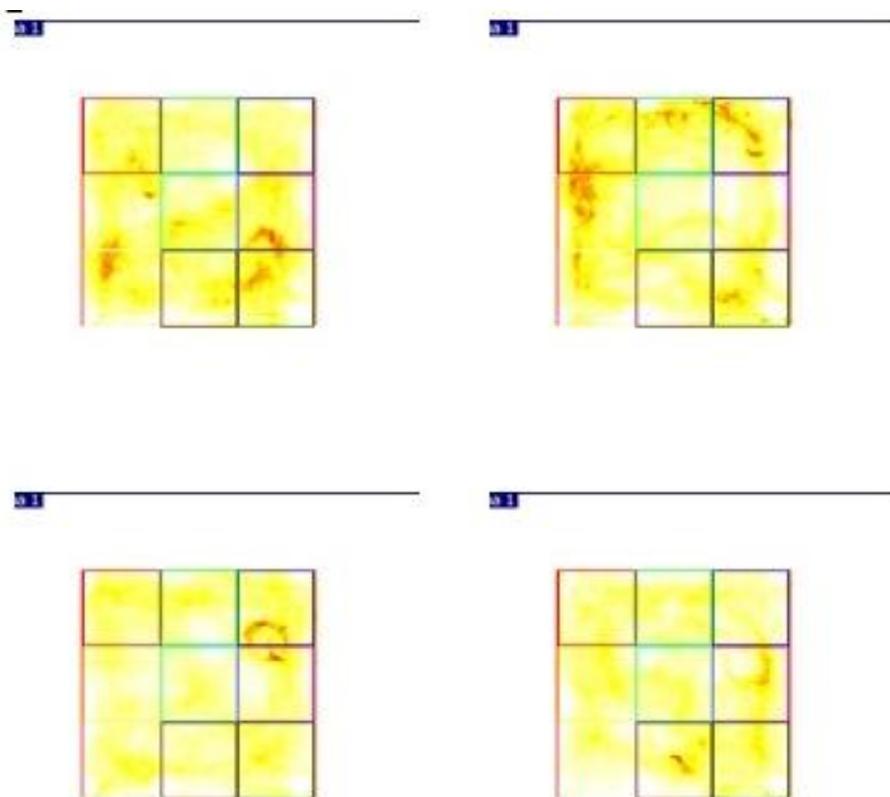
Ainda que não seja possível assegurar que animais não humanos compartilhem das mesmas sensações subjetivas de ansiedade que os seres humanos, é bastante provável que possa existir uma correspondência muito grande entre as espécies, principalmente mamíferos, em relação aos mecanismos neurais e funções comportamentais subjacentes a essa emoção, desde a percepção de situações sinalizadoras de um perigo em potencial até a organização das reações de defesa (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Pesquisas recentes indicam que a ansiedade pode ser uma fonte significativa de morbidade nesse grupo de pacientes. Transtornos de ansiedade são comorbidades presentes em 38,3% dos indivíduos com transtornos do espectro da esquizofrenia. O transtorno de ansiedade mais comum é a fobia social seguida por transtorno de estresse pós-traumático e transtorno obsessivo compulsivo. A presença e a gravidade dos sintomas de ansiedade estão associadas a quadros clínicos mais graves e resultados mais desfavoráveis (BRAGA; REYNOLDS; SIRIS, 2013)

De modo geral, é possível estabelecer causalidade entre ansiedade e memória nos animais em estudo baseado nas evidências pré-clínicas e clínicas da relação da ansiedade com a performance de memória serem inversamente proporcionais (BANNERMAN *et al.*, 2014; FRANÇOISE CORDIER, 2006) corroborando os resultados do teste “*Y-Maze*” com as figuras 21 e 22.

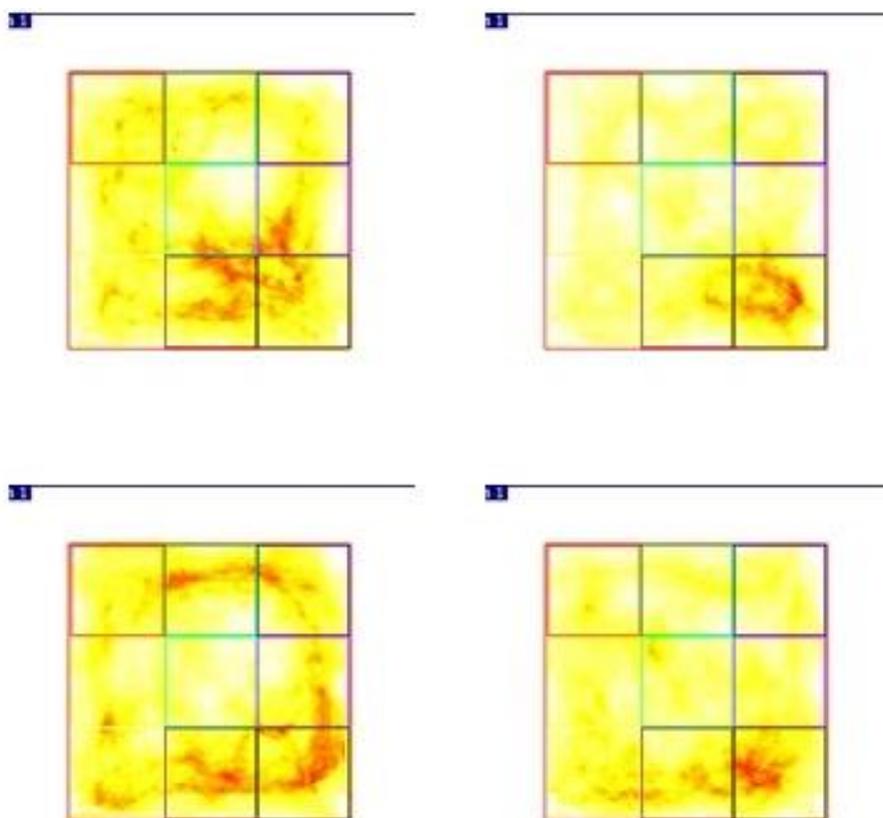
Em comparação dos achados encontrados nas imagens (FIGURAS 25, 26, 27 e 28) podemos sugerir que os animais submetidos ao modelo de enriquecimento ambiental, demonstraram uma maior tendência a explorar os espaços centrais da arena, contrariamente aos animais não submetidos ao enriquecimento ambiental. A exploração de espaços centrais sugere um componente de bem-estar, não ansioso, do contrário, a predominância de do animal nas periferias do aparato, sugerem um comportamento ansioso (PRUT; BELZUNG, 2003; WALSH; CUMMINS, 1976). Em associação aos achados, um dos efeitos mais robustos do enriquecimento ambiental é a redução dos níveis de ansiedade (SZTAINBERG; CHEN, 2010).

Figura 27 – Imagem sobre a predominância do grupo Salina em zonas do aparato medida pela permanência em áreas da arena teste determinada por cores.



As figuras foram provenientes do programa de computador software Panlab SMART vídeo tracking system 3.0. Áreas em vermelho significam maior predominância do animal em tempo durante o teste e em amarelo, significa áreas em que o animal passou sem maior predominância. Já em branco são áreas com pouquíssima predominância de permanência do animal. Fonte: próprio autor.

Figura 28 - Imagem sobre a predominância do grupo Salina+EA em zonas do aparato medida pela permanência em áreas da arena teste determinada por cores.



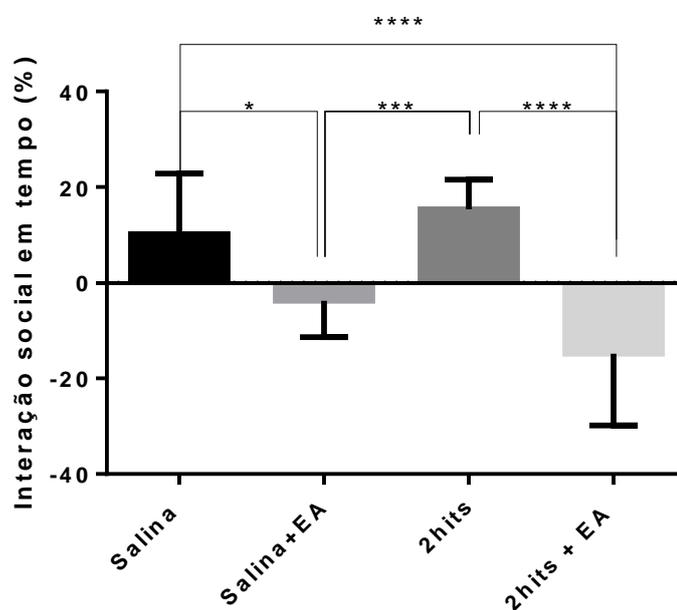
As figuras foram provenientes do programa de computador software Panlab SMART vídeo tracking system 3.0. Áreas em vermelho significam maior predominância do animal em tempo durante o teste e em amarelo, significa áreas em que o animal passou sem maior predominância. Já em branco são áreas com pouquíssima predominância de permanência do animal. Fonte: próprio autor.

O condicionamento de medo é um teste amplamente utilizado para medir a aprendizagem associativa dependente do hipocampo. Acredita-se que este teste seja sensível à aprendizagem associada à emoção e, portanto, é uma medida útil da comunicação amigdalino-hipocampal. Muitos dos modelos de animais apresentam alterações no medo e na ansiedade, que são principalmente uma função da amígdala. Estas duas áreas estão intimamente envolvidas na esquizofrenia (SADOCK; SADOCK, 2016; BUCCAFUSCO, 2001).

5.4 Teste de Interação Social

O isolamento social é um dos sintomas negativos que aparece no início da doença e com muita frequência na esquizofrenia. Modelos para estudar a interação social em animais de laboratório têm sido testados, mas são limitados pela forte diferença com a interação humana, imposta pelo papel da linguagem nesta última. Os testes consistem, em geral, na medida da distância média entre os indivíduos ao longo do dia (ELLENBROEK; COOLS, 1990; GEYER; MOGHADDAM, 2002).

Figura 29 - Efeito do enriquecimento ambiental na interação social de animais submetidos ao modelo de esquizofrenia por “2Hits”.



As barras representam a média \pm E.P.M (n= 12-14 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de *one-way* ANOVA seguida pelo teste de Tukey (*P< 0.05, ***P < 0.001, ****P < 0.0001).

Os resultados dessa medida nos animais do estudo apresentaram diferenças significativas na interação entre os animais submetidos ao enriquecimento ambiental e os não submetidos [F(3,47)=19,99, p<0,0001].

Os animais pertencentes aos grupos de EA apresentaram uma menor tendência a interação social em relação aos grupos que não submetidos. Os animais do grupo de risco 2Hits apresentaram um comportamento mais inclinado a interação social, valores também

semelhantes quando comparados com o grupo Salina, visto que não apresentaram diferença estatística entre estes dois grupos Salina *vs.* 2Hits (-5,191±-4,723). Os grupos submetidos ao EA apresentaram comportamentos semelhantes, e quando comparados, não demonstraram diferença estatística Salina+EA *vs.* 2Hits+EA (11,06±4,321). As diferenças estatísticas se deram nas comparações entre Salina *vs.* Salina+EA (13,98±4,723), Salina *vs.* 2Hits+EA (25,04±4,431), 2Hits *vs.* Salina+EA (-19,17±4,619) e 2Hits *vs.* 2Hits+EA (30,23±4,321).

O conceito de funcionalidade estabelece um paralelo entre uma observação idealizada e uma teoria, entendendo como funcionalidades aspectos como uma vida independente com realização social, habilidades psicossociais e o aprendizado. Atualmente, o manejo da esquizofrenia se expandiu além do tratamento de sintomas psicóticos, incluindo o gerenciamento da qualidade de vida e funcionalidade, a fim de aumentar as chances de um paciente alcançar um desfecho favorável (ACOSTA *et al.*, 2014; GREEN *et al.*, 2000; LAMBERT, 2014; ÜÇOK; GORWOOD; KARADAYI, 2012; ÜÇOK *et al.*, 2013).

Paciente com esquizofrenia geralmente apresentam sintoma negativo de embotamento social (SADOCK; SADOCK, 2016). Porém, a partir dos dados analisados dos grupos do estudo, podemos presumir que os animais que faziam parte do grupo de maior risco para esquizofrenia, grupo 2Hits, quando comparados com os outros grupos em estudo, apresentaram uma maior inclinação a interação social, porém, não houve diferença significativamente com o grupo Salina.

Os grupos submetidos ao enriquecimento ambiental demonstraram na avaliação estatística menor interesse na interação social em comparação com os grupos Salina e o grupo 2Hits. Todavia, nos desenhos criados a partir do software Panlab SMART vídeo tracking system 3.0 é possível observar que os animais dos grupos submetidos ao enriquecimento ambiental expressaram interesse no animal desconhecido, mas também dedicaram tempo a exploração do ambiente desconhecido (FIGURAS 30A, 30B, 31C e 31D).

É relevante mencionar que animais machos adultos possuem comportamento de dominância social natural. Uma vez que percebe um novo animal macho em condição de privação de deslocamento, após identificação do animal e da condição de privação de deslocamento deste indivíduo, o animal em estudo pode avaliar como estímulo “desinteressante”, e uma subordinação na estrutura hierárquica de camundongos (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A capacidade de distinguir pistas moleculares emitidas por outros indivíduos é uma característica fundamental das interações sociais, como encontrar e identificar um parceiro, estabelecer hierarquias sociais e iniciar comportamentos defensivos interespecies. Em roedores, essa habilidade envolve o órgão vomeronasal, uma estrutura quimiorreceptiva distinta que faz parte do sistema olfativo gera respostas inatas em animais e está presente em todos os vertebrados terrestres. O órgão está envolvido na geração de diversos comportamentos, sejam eles sexuais, de agressividade e do medo (PAPES; LOGAN; STOWERS, 2010).

A associação de grandes subconjuntos de receptores vomeronasais com estímulos cognatos, etologicamente e fisiologicamente relevantes estabelece a base molecular da codificação da informação vomeronasal e abre novos caminhos para investigar mais detalhadamente os mecanismos neurais subjacentes à especificidade do comportamento (ISOGAI *et al.*, 2011).

Os odores são formados de compostos complexos, em concentração muito baixa. Em roedores a quantidade de moléculas detectadas pelo sistema olfativo é muito mais ampla que as faixas do espectro de luz. No caso dos humanos, o sistema visual suplantou a capacidade olfativa, mas para todas as espécies de mamíferos o olfato é o principal sistema sensorial (PAPES; LOGAN; STOWERS, 2010).

O comportamento dominante está relacionado com um comportamento mais ativo e elevado para atividades motoras e exploratórias (OLIVEIRA, 2012). Associado a isso, capacidade de distinguir pistas moleculares emitidas por outros indivíduos, serão determinantes ao comportamento dos camundongos. Provavelmente, os animais em teste, tanto o que estava em situação de privação de liberdade em ambiente e gaiola desconhecidos estariam liberando algum tipo de informação relacionada ao medo. Em contrapartida, o animal em teste que estava também em ambiente e gaiola desconhecidos, porém estava em situação superior, pois estava em liberdade por todo o aparato de teste, portanto em condição de dominância do ambiente.

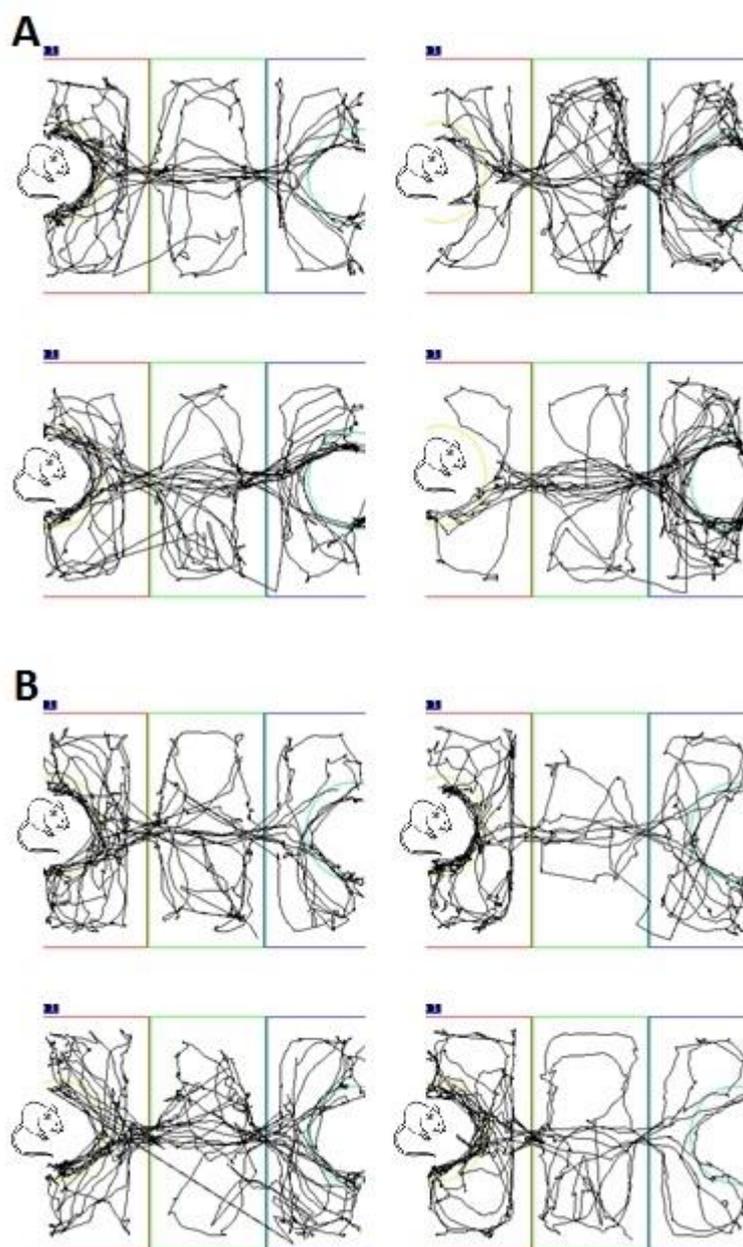
Percepções de mamíferos indicam que dois circuitos neurais são de importância crucial neste contexto: a rede de comportamento social e o sistema de recompensa mesolímbico, ressaltando que esses sistemas já estavam presentes nos primeiros vertebrados. Estes circuitos formam uma rede maior de tomada de decisão social que regula o comportamento adaptativo, visto que todos os animais avaliam estímulos externos e os

integram com informações fisiológicas internas em comportamento adaptativo (O'CONNELL; HOFMANN, 2011).

Desta forma, os animais do grupo de maior risco para esquizofrenia, o grupo *2Hits*, apresentaram uma performance diferente dos grupos submetidos ao EA, por estarem possivelmente com disfunção dos sistemas de percepção, sistemas de recompensa da área mesolímbica e do comportamento social.

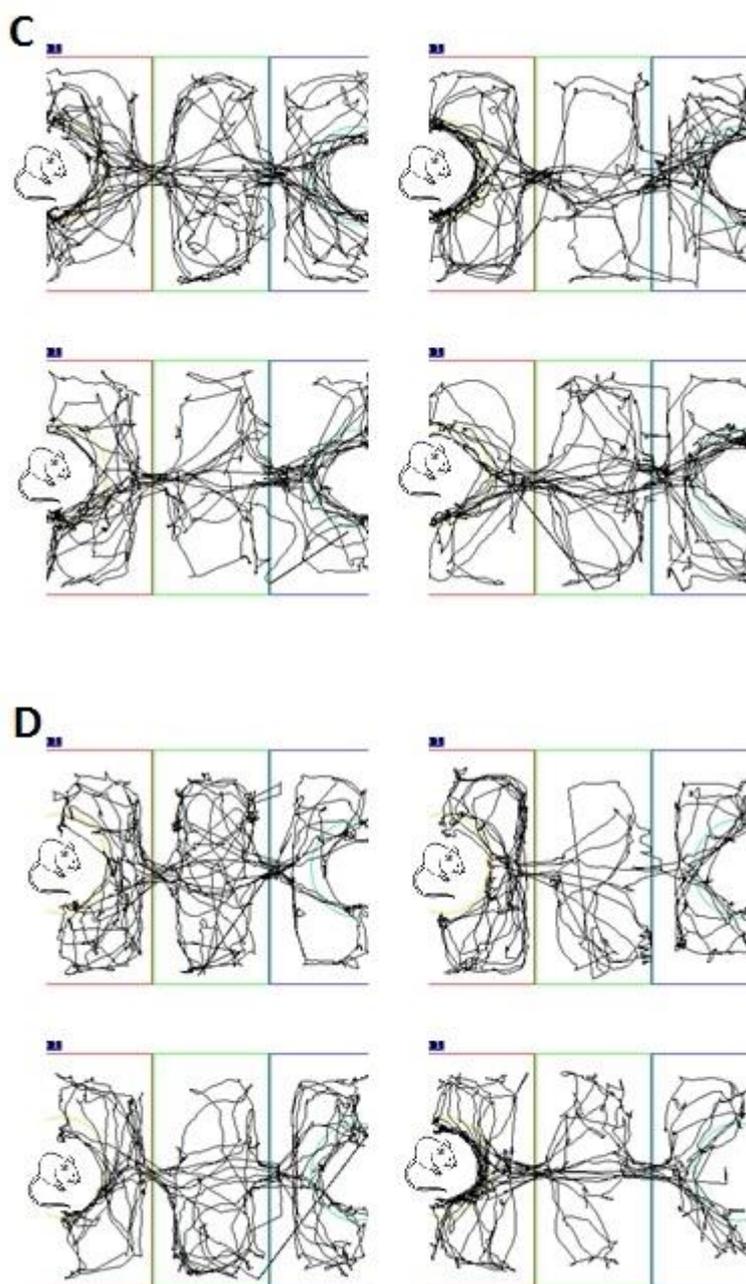
A comunicação do órgão vomeronasal e as características da detecção do sinal de feromônios pelos neurônios vomeronasais ainda não estão claras (ZUFALL; KELLIHER; LEINDERS-ZUFALL, 2002). Todavia, sua participação em respostas inatas, sobrevivência do animal e reforço positivo, devem certamente implicar na comunicação neuroquímica de outras áreas cerebrais envolvidas com o comportamento como como o sistema córtico-mesolímbico (PAPES; LOGAN; STOWERS, 2010; QUEVEDO, 2009).

Figura 30 - A figura abaixo representa a movimentação dos animais submetidos ao modelo animal de esquizofrenia “2Hits”.



A figura (A) representa o grupo que recebeu a estratégia ambiental, EA. A figura (B) representa o grupo que não submetido ao EA. As figuras foram provenientes do programa de computador software Panlab SMART vídeo tracking system 3.0, no qual avaliou e coletou os dados do estudo. Fonte: próprio autor.

Figura 31 - A figura abaixo representa a movimentação dos animais pertencentes aos grupos Salina e Salina+EA.



A figura (C) representa o grupo que recebeu a estratégia ambiental (EA). A figura (D) representa o grupo que não submetido ao EA. As figuras foram provenientes do programa de computador software Panlab SMART vídeo tracking system 3.0, no qual avaliou e coletou os dados do estudo.

PARTE 2: SOBRE OS TESTES BIOMOLECULARES

5.5 Avaliação proteica de células da micróglia por determinação de Iba1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule-1*)

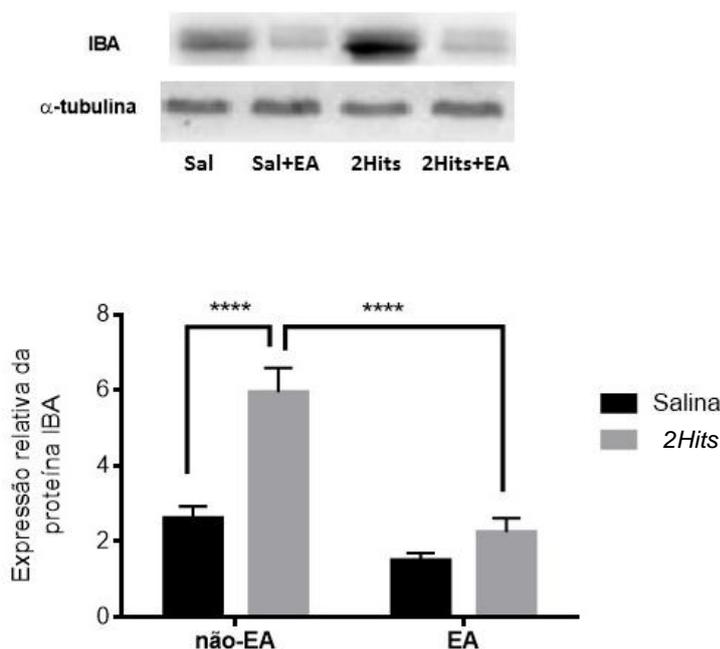
As células da glia (ou neuroglia) prestam suporte, nutrição e proteção aos neurônios. A neuroglia é dividida em micróglia e macróglia. As células da glia constituem cerca da metade da massa cerebral e da medula espinhal, assim sendo cerca de 5 a 10 vezes mais numerosa que neurônios (LEWIS; HEITKEMPER; DIRKSEN, 2013).

Estudos recentes sobre origem microglial indicam que essas células surgem precocemente durante o desenvolvimento de progenitores hematopoéticos (macrófagos primitivos) no saco vitelino embrionário que semeiam o rudimento do cérebro, tornando-se independentes da medula óssea e, notavelmente, demonstra-se persistir na idade adulta (GINHOUX *et al.*, 2013). Uma vez estabelecidas no parênquima cerebral, a microglia passa a apresentar alta especificidade com alto potencial de autorenovação e proliferação, tornando-as especialmente distintas dos macrófagos encontrados em outras regiões cerebrais (SOULAS *et al.*, 2009).

A microglia é a população residente de macrófagos do sistema nervoso central (SNC), pertencentes ao sistema mononuclear fagocitário, fagocitando resíduos e células lesadas. A microglia não é apenas as primeiras sentinelas imunitárias da infecção, contribuindo tanto para as respostas imunes inatas quanto adaptativas, mas também estão envolvidas na manutenção da homeostase cerebral (GINHOUX *et al.*, 2013). Elevam a proteção contra microrganismos, vírus e tumores. A micróglia ainda apresentam antígenos, secretam citocinas e fatores tóxicos promovendo morte celular principalmente de neurônios (JOTZ, 2017; GARTNER, 2012)

A micróglia são as principais células a responderem a lesões cerebrais e no reparo cicatricial do tecido. As células da micróglia produzem quimioativos capazes de recrutar leucócitos através da barreira hematoencefálica para iniciar doenças neuroimunológicas. Essas células interagem entre si para modular o início e a progressão das respostas imunológicas. A função microglial adequada é crucial para um SNC saudável. Desequilíbrios nesses mecanismos de interações entre as células conduz a uma autoimunidade e inflamação direcionada ao sistema nervoso central (GINHOUX *et al.*, 2013; KIERSZENBAUM, 2007).

Figura 32 – Quantificação proteica de Iba1 no hipocampo (HC) de animais expostos ao enriquecimento ambiental e submetidos ao modelo de “2Hits”.



As barras representam a média \pm E.P.M (n= 6-8 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Na avaliação da ativação microglial observamos uma interação significativa entre “EA” e modelo do “2Hits” [F (1, 32) = 11,11, $P = 0,0022$, com efeito principal significativo do fator “EA” [F (1, 32) = 38,86, $P < 0,0001$] e modelo do “2Hits” [F (1, 32) = 27,88, $P < 0,0001$]. A análise grupo a grupo mostrou que os animais submetidos ao “2Hits” apresentaram maior ativação microglial (maior expressão de IBA1) em comparação com todos os outros grupos em estudo ($P < 0,0001$). A exposição dos animais do grupo 2Hits ao EA reduziu significativamente a expressão de IBA1 quando comparado ao grupo 2Hits ($P < 0,0001$).

A partir desses dados obtidos podemos afirmar que o enriquecimento ambiental demonstrou relevância preventiva e terapêutica respectivamente para os animais que, viveram livres de insultos e submetidos ao EA (grupo Salina+EA), como aqueles que tiveram insultos e também viveram em EA (grupo 2Hits+EA).

Os efeitos morfológicos e funcionais robustos estimulados pela EA no nível neuronal foram relatados como sendo acompanhados por melhorias no desempenho cognitivo.

Recentemente, demonstrou-se que a EA acelera o desenvolvimento do sistema visual e melhora a plasticidade do córtex visual na idade adulta. Estas novas descobertas destacam o potencial da EA como uma estratégia não invasiva promissora para melhorar os déficits na maturação do sistema nervoso e promover a recuperação das funções sensoriais normais em condições patológicas que afetam o cérebro adulto (SALE; BERARDI; MAFFEI, 2009).

Os resultados demonstrados (FIGURA 32) do marcador Iba1 para o grupo *2Hits* com níveis superiores a todos os grupos testados, sugere um incremento e hiperativação de micróglia, corroborando com os relatos da literatura para desordens neuropsiquiátricas. Os grupos que foram submetidos ao enriquecimento ambiental, demonstram menos valores desta ativação, até mesmo, quando comparado ao grupo salina.

Iba1 é uma proteína de ligação ao cálcio específica para microglia/macrófagos. Iba1 tem atividade de agrupamento de actina e participa de esfregaços de membrana e fagocitose em microglia ativada. O Iba1 é utilizado como marcador de micróglia no tecido humano e animal (CORREALE, 2014; FRANK *et al.*, 2007; LI, QINGYUN; BARRES, 2017; NAYAK; ROTH; MCGAVERN, 2014).

A plasticidade neuronal é um tema central da neurobiologia moderna, desde mecanismos celulares e moleculares de formação de sinapses. Os estímulos necessários para provocar a plasticidade são considerados dependentes de atividade. As consequências comportamentais e neurobiológicas de elementos específicos de enriquecimento, especialmente exercício e aprendizado, refletem diretamente sobre a resposta neurogênica no SNC (MOHAMMED *et al.*, 2002; SZTAINBERG; CHEN, 2010; VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000).

As células micróglia tem importante papel na regulação da neurogênese, sinaptogênese, na mielinização e vascularização. No cérebro adulto, estão em maior parte em estado quiescente, mas são extremamente sensíveis à alterações no microambiente cerebral, estando constantemente em alerta, e, a sinais de desordens na homeostase do tecido nervoso, podem voltar rapidamente ao fenótipo macrofágico, fenômeno conhecido como ativação microglial (JOTZ, 2017).

É crescente o número de estudos populacionais que fornecem evidências mais robustas de uma associação fatores biológicos com ambientais. Em especial, interesse na relação entre o trauma na primeira infância e o risco de psicose na vida adulta (LANDER *et al.*, 2001). Estudos apontam que essa vulnerabilidade pode estar ligada a polimorfismos onde

os fatores de risco aumentam com uma exposição a eventos potencialmente traumáticos (AUXÉMÉRY, 2012).

Uma pesquisa que acompanhou paciente psiquiátricos por 3 anos, apontaram que aqueles que sofreram abuso ou negligência emocional, física ou sexual antes dos 16 anos tinham maior probabilidade de relatarem sintomas psicóticos (JANSSEN; KRABBENDAM; BAK, 2004). O estresse também foi implicado a induzir a liberação de dopamina em estudos com animais, e em estudos epidemiológicos demonstraram que as tensões sociais podem precipitar a esquizofrenia. Assim, os estresses, como o uso de drogas e a adversidade social, na adolescência ou no início da vida adulta podem impulsionar o indivíduo com comprometimento do desenvolvimento neural a passar de um limiar para a psicose (HOWES *et al.*, 2004).

Portanto, a influência do ambiente tem forte impacto sobre o risco de esquizofrenia e por sua vez, o estresse, um componente ambiental que possui forte impacto, desencadeia uma serie de respostas podendo induzir uma ativação microglial (FRANK *et al.*, 2007; TYNAN *et al.*, 2010). Uma vez que o estresse é bem conhecido por seu papel como precipitante para episódios psiquiátricos em paciente predispostos (CHECKLEY, 1996). Portanto, está envolvido na resposta das alterações do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância no desenvolvimento da depressão (JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004). A depressão também é identificada como parte do complexo contexto da esquizofrenia (SADOCK; SADOCK, 2016).

A micróglia está relacionada a plasticidade sináptica, e quando ativada, pode participar do processo de “poda sináptica” que significa a eliminação das sinapses. Isso pode ocorrer durante uma resposta a estímulos inflamatórias. As células da micróglia são as primeiras a serem ativadas frente a um insulto ao SNC, podendo estabelecer uma hiperatividade microglial generalizada, conhecida como microgliose (HANISCH; KETTENMANN, 2007; KETTENMANN; KIRCHHOFF; VERKHRATSKY, 2013).

Portanto, a micróglia apresenta funções altamente especializadas e demonstram, notoriamente, a coexistência de efeitos oposto dependendo da condição do microambiente cerebral, visto que ela participa desde a promoção da neuroproteção, *downregulation* da inflamação e estimulação do reparo tecidual à neurodegeneração mediada por inflamação durante os estágios agudo e crônico de doenças do SNC. A modulação da ativação microglial

para fins terapêuticos deve suprimir os efeitos deletérios dessas células, ao mesmo tempo que preserva suas funções protetoras (CORREALE, 2014).

Estudos apontam que a vulnerabilidade da microglia à disfunção e propõem que as células mielomonocíticas possam ser utilizadas no tratamento de distúrbios neurológicos e psiquiátricos caracterizados por microgliopatia primária ou secundária (PRINZ; PRILLER, 2014). Estudos comprovam que a microglia exibe diminuição da proliferação, produção de citocinas e apresentação de antígeno após tratamento com glicocorticóides *in vitro*. Os glicocorticóides possuem forte capacidade farmacológica de controle de citocinas inflamatórias que também são liberadas em situação de estresse (NAIR; BONNEAU, 2006).

Há evidências crescentes apontando neuroinflamação e imunogenética como parte da fisiopatologia da esquizofrenia (MONJI; KATO; KANBA, 2009). A ativação do sistema imunológico periférico é chave para essa comunicação imune a cerebral. A microglia interpreta e propaga sinais inflamatórios no cérebro que influenciam as respostas fisiológicas e comportamentais (NORDEN *et al.*, 2016). O sistema cerebral, endócrino e imune estão intrinsecamente ligados. As moléculas imunes têm um poderoso impacto na função neuroendócrina, incluindo interações hormonais-comportamentais, tanto na saúde como na doença. Da mesma forma, as alterações nos hormônios, como durante o estresse, podem impactar poderosamente a função ou reatividade imune (BILBO; SCHWARZ, 2012).

Apesar do fato de a microglia compreender apenas menos de 10% do total de células cerebrais, ela responde rapidamente até mesmo a alterações patológicas menores no cérebro e pode contribuir diretamente para a degeneração neuronal, produzindo várias citocinas pró-inflamatórias e radicais livres. Neste contexto, a neuropatologia da esquizofrenia está intimamente associada à ativação microglial. Estudos anteriores mostraram os efeitos inibitórios de alguns antipsicóticos na liberação de citocinas inflamatórias e radicais livres pela microglia ativada, ambos recentemente conhecidos por causar uma diminuição na neurogênese (MONJI; KATO; KANBA, 2009).

5.6 Avaliação da expressão proteica NR2b (*Subunidade do receptor de NMDA*)

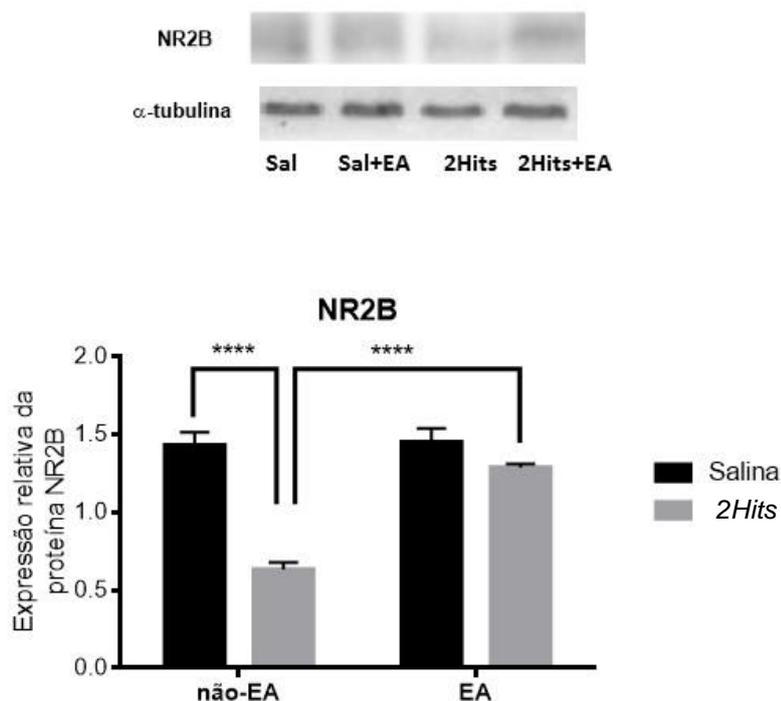
O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), agindo tanto em receptores do tipo inotrópicos quanto metabotrópicos. O receptor NMDA (N-metil-D-Aspartato) de glutamato é um dispositivo molecular complexo do SNC e é clinicamente importante por ter papel relevante no controle das sinapses, plasticidade neuronal, aprendizado e memória (BAYNES, 2015; ZHUO, 2009).

Disfunção de receptores de NMDA e subunidades em vários distúrbios neurológicos e psiquiátricos, incluindo esquizofrenia. Pesquisas demonstram que disfunção de receptores glutamatérgicos induzidas por doenças autoimunes, como também, distúrbios de humor. (YAMAMOTO *et al.*, 2015). Evidências sugerem que a esquizofrenia está relacionada a anormalidades moleculares glutamatérgicas, possivelmente envolvendo receptores NMDA. Expressões corticais diminuídas de subunidades do receptor NMDA foram observadas na esquizofrenia, embora não consistentemente (CATTS *et al.*, 2016).

O receptor de N-metil D-aspartato (NMDA) é composto de várias subunidades. Entre eles, o NR2B é de interesse, dado o seu domínio nas primeiras fases do desenvolvimento e seu impacto significativo no funcionamento do canal neuronal e a formação ou manutenção da arquitetura celular (ENDELE *et al.*, 2010). Os polimorfismos específicos de nucleotídeo nos genes que codificam as subunidades do receptor NMDA foram associados a alguns distúrbios neuropsiquiátricos envolvendo transmissão alterada de glutamato, mas a forma como esses polimorfismos afetam a função sináptica em seres humanos é desconhecida (MORI *et al.*, 2011).

Na análise dos dados da subunidade NR2b observamos uma interação significativa entre o fator EA e o modelo “2Hits” [F (1, 30) = 19,79, P = 0,0001]. Isto significa que os animais do grupo 2Hits apresentaram menor expressão protéica de subunidades NR2b dos receptores NMDA em comparação com todos os outros grupos em estudo (FIGURA 33). A exposição dos animais do grupo 2Hits ao EA preveniu as alterações observadas neste receptor (P < 0,0001).

Figura 33 – Expressão proteica da subunidade NR2b do receptor de glutamato no hipocampo (HC) de animais expostos ao enriquecimento ambiental e submetidos ao modelo de esquizofrenia por “2Hits”.



As barras representam a média \pm E.P.M (n= 6-8 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey (* $P < 0,05$, **** $p < 0,0001$).
 Legenda: EA – enriquecimento ambiental; PIC – poly I:C.

Podemos sugerir que o enriquecimento ambiental exibiu efeito protetor sobre os receptores NMDA, diante da comparação dos grupos *2Hits* vs. *2Hits+EA* (**** $p < 0,0001$) e a pequena diferença grupos Salina+EA vs. *2Hits+EA* (* $p < 0,05$) sugere que em condições normais e de EA pode promover manutenção de uma neurotransmissão saudável, reverberando no bem-estar dos animais.

Evidências sugerem função anômala dos receptores NMDA na esquizofrenia está relacionada a anormalidades glutamatérgicas. Expressões corticais diminuídas de subunidades do receptor NMDA foram observadas na esquizofrenia em cérebros *posmortem*, embora estes achados ainda não sejam consistentemente (DAWEI; HE, 2007).

Nos últimos anos, um número crescente de estudos tem demonstrando a importância da subunidade NR2b em uma variedade de eventos de sinalização sináptica e interações proteicas. A subunidade NR2b foi implicada na modulação de funções como aprendizado,

processamento de memória, percepção de dor e comportamento alimentar, além de estar envolvida em vários distúrbios humanos, como a esquizofrenia (LOFTIS; JANOWSKY, 2003).

O córtex pré-frontal (PFC) é uma região do cérebro com função de memória de trabalho na qual apresenta distinta maturação tardia, circuito neuronal único e funções característica do receptor NMDA, em especial a subunidade NR2b. Tem sido demonstrado a importância da interação entre a memória de trabalho, o PFC e os receptores NMDA. Em particular, estudos apontam o NR2b relacionado na manutenção de atividades persistentes, perceber e interpretar riscos, tarefa esta que é uma das habilidades do domínio cognitivo que solicitam a interpretação de um contexto, e, a vulnerabilidades para o desenvolvimento de distúrbios neuropsiquiátricos relacionadas ao NR2b. Ademais, estudos também apontam a vulnerabilidade deste receptor a insultos ambientais e sua relação com fatores de risco para transtornos psiquiátricos (MONACO; GULCHINA; GAO, 2015).

Bonneau *et al.*, avaliou o aumento da ativação microglial em animais por um modelo de estresse para elevar os níveis de corticosterona. A corticosterona induz uma ativação de receptores NMDA no SNC, uma vez que o bloqueio da síntese de corticosterona, o receptor dos glucocorticóides ou o receptor NMDA impediram cada um o aumento do número de microglia induzido pelo estresse. Adicionalmente, o antagonista do receptor de NMDA, MK-801, preveniu o aumento da microglia. Portanto, sugerem que o estresse é capaz de induzir uma resposta pró-inflamatória dentro do SNC mediada por receptores NMDA e corticóides (NAIR; BONNEAU, 2006).

A exposição ao estresse aumenta a atividade dopaminérgica em várias regiões cerebrais, em especial no sistema dopaminérgico mesocortical (ABERCROMBIE *et al.*, 1989). O sistema glutamatérgico e dopaminérgico possuem uma grande interação no SNC (MOORE; WEST; GRACE, 1999). Alterações no sistema glutamatérgico do córtex pré-frontal estão associadas à disfunção dopaminérgica observada na esquizofrenia (MEYER-LINDENBERG *et al.*, 2002). Em condições fisiológicas, os neurônios glutamatérgicos na via mesolímbica, regulam a atividade de interneurônios gabaérgicos que inibem a liberação de dopamina. (DEUTSCH *et al.*, 1989; NETO; BRESSAN; BUSATTO FILHO, 2007; STAHL, 2007).

Muitas pesquisas sugerem que os estressores sociais do contexto urbano podem ser fatores de risco para pessoas com vulnerabilidade genética. Estudos epidemiológicos em

esquizofrenia foram correlacionados a prevalência com a densidade populacional local em cidades com populações de mais de 1 milhão de pessoas. O estudo demonstrou que a correlação é mais fraca em cidades com população com 100 mil a 500 mil habitantes e é ausente em cidades com menos de 10 mil habitantes. A relação da densidade populacional é congruente com a observação de que a incidência de esquizofrenia em filhos de um ou dois pais com o transtorno é duas vezes maior em cidades do que comunidades rurais (SADOCK, SADOCK, 2016).

Estudos recentes fortalecem as evidências que receptores NMDA estão profundamente envolvidos na excitabilidade neural, plasticidade e déficits sinápticos em doenças como esquizofrenia. O entendimento da função e controle dos receptores de NMDA nas sinapses centrais podem fornecer indícios para estratégias no tratamento de desordens psiquiátricas que comprometem essas funções (FEI; TSIEN, 2009; YAMAMOTO *et al.*, 2015).

É importante inter-relacionar a função dos receptores NMDA com as regiões cerebrais alvos na patogênese da esquizofrenia. As áreas de lobo temporal medial, incluindo hipocampo e os giros parahipocampais (sistema límbico), associação do córtex heteromodal (região de confluência de vários lobos) incluindo região pré-frontal, parietal e giro temporal superior são regiões que demonstram em sua maioria declínio morfofuncional na esquizofrenia (HAIJMA *et al.*, 2013; WRIGHT *et al.*, 2000).

O hipocampo é uma área que faz parte do sistema límbico que está intrinsicamente envolvida com a memória e as emoções, e é uma área de extremo interesse no estudo e tratamento da esquizofrenia (WRIGHT *et al.*, 2000). Determinadas vias sinápticas do hipocampo tornam-se mais ativas quando estimuladas de forma crônica, fenômeno conhecido como potencialização a longo prazo. Representando um modelo possível de fixação da memória que requer receptores de NMDA (BAYNES, 2015).

Níveis adequados de atenção são fundamentais para os processos cognitivos, e as diferenças individuais no funcionamento da atenção estão relacionadas a variações na interação dos neurotransmissores. A teoria da rede de atenção aponta a atenção como um conjunto não homogêneo de redes neurais separadas: alerta, orientador e conflitante. Estudos genéticos com 324 paciente revelou o papel das variações na GRIN2B, que codifica a subunidade NR2b dos receptores NMDA, observando a interação da regulação excitatória e atenção pela comparação da eficiência das três redes de atenção (alerta, orientador e

conflitante), sinalizando que os paciente não alcançam estados de alertas quando estão em excesso da atividade glutamatergica (SCHULZ *et al.*, 2012).

Um estudo feito em camundongos eliminou seletivamente a subunidade NR1 essencial do receptor NMDA (NMDAR) em 40-50% dos interneurônios corticais e hipocampais no início do desenvolvimento pós-natal. De forma consistente com a teoria da esquizofrenia envolvendo os receptores NMDA e atividade glutamatergica, após a adolescência, foi observado uma hipofunção dos receptores, sintomas distintos relacionados à esquizofrenia surgiram, incluindo hiperlocomoção induzida por novidade, anedonia e comportamentos semelhantes à ansiedade. Muitos desses comportamentos foram exacerbados pelo estresse de isolamento social (BELFORTE *et al.*, 2010).

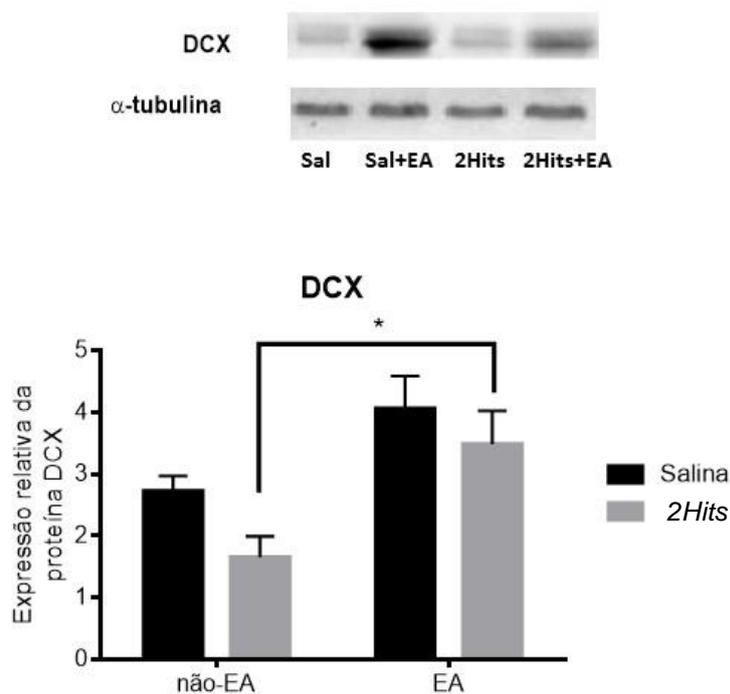
A memória social, a memória de trabalho espacial e a inibição do pré-pulso também foram prejudicadas. A expressão reduzida da enzima glutamato descarboxilase (DAG) e da parvalbumina foi acompanhada pela desinibição dos neurónios excitatórios corticais e pela redução da sincronia neuronal. A deleção pós-adolescente de NR1 não resultou em tais anormalidades. Esses achados sugerem que a inibição pós-natal precoce da atividade dos receptores NMDA em interneurônios GABAérgicos corticolímbicos é parte do complexo mecanismo fisiopatológico dos transtornos relacionados à esquizofrenia (BELFORTE *et al.*, 2010).

5.7 Avaliação da proteína DCX marcador de neurogênese.

O gene DCX codifica informações para produzir uma proteína que atua na mobilização neural, a doublecortina (DCX) (FRANCIS *et al.*, 1999). A DCX indica a presença de neurônios imaturos e é um marcador endógeno de células mitóticas (MING; SONG, 2005). Portanto, indicando o desenvolvimento de neurogênese na área cerebral estudada.

Esta proteína está envolvida no movimento dos neurônios para suas localizações apropriadas no cérebro em desenvolvimento, um processo chamado migração neuronal. A DCX é parte do processo de transformação dos neuroblastos. Ela liga-se aos microtúbulos neurais que são estruturas de forma tubular constituídas por polímeros de proteínas (citoesqueleto). A interação de DCX com microtúbulos promove a estabilidade neuronal impulsionado e indicando direções específicas à morfogênese neuronal (BROWN *et al.*, 2003; GÖTZ, 2003; HORESH *et al.*, 1999; MOORES *et al.*, 2004).

Figura 34 - Expressão proteica de DCX em animais submetidos ao enriquecimento ambiental como estratégia de prevenção para as alterações induzidas pelo modelo do “2Hits”.



As barras representam a média \pm E.P.M (n= 4 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de *one-way* ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Legenda: EA – enriquecimento ambiental; PIC – poly I:C.

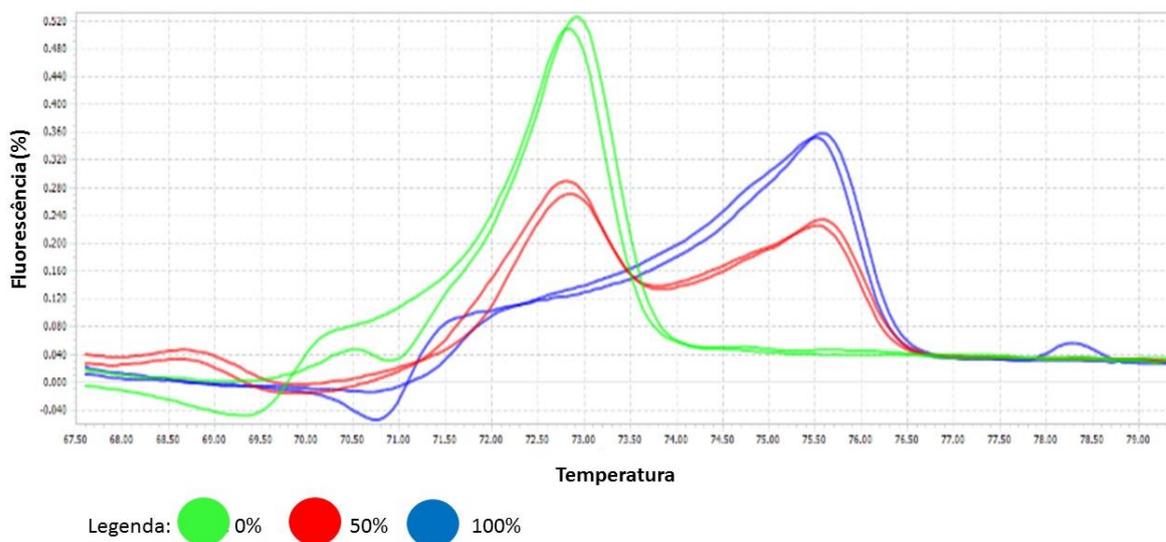
Na avaliação da expressão de DCX foi observado um efeito significativo do fator EA [F (1, 27) = 13,26, P = 0,0011]. Neste contexto, observamos que os animais expostos ao EA apresentaram aumento da expressão de DCX, mostrando a influência do enriquecimento ambiental na neurogênese hipocampal.

PARTE 3: SOBRE AS ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS

5.8 Perfil de metilação do gene do transportador de serotonina (*Slc6a4*)

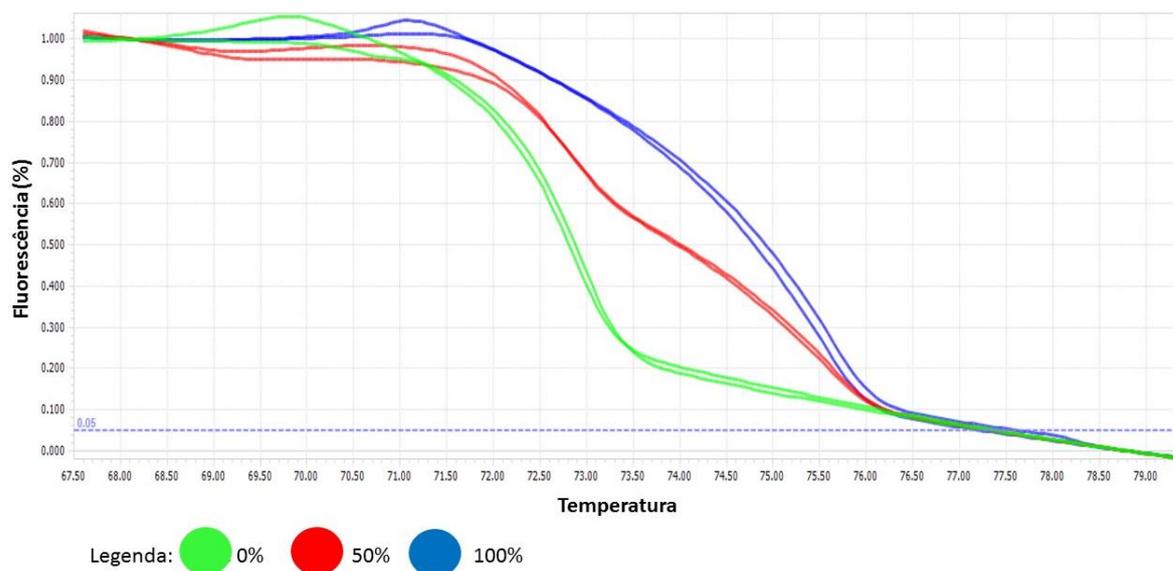
A curva de porcentagens de metilação segundo o padrão comercial estão apresentadas nas figuras 35 e 36, em que é possível observar a separação das curvas de acordo com o DNA 0% (hipometilação), 50% (metilação parcial) e 100% (hipermetilação).

Figura 35 - Picos de *Melting* normalizados do DNA controle.



Fonte: Próprio autor adaptado do LightCycler® 96 SW 1.1.

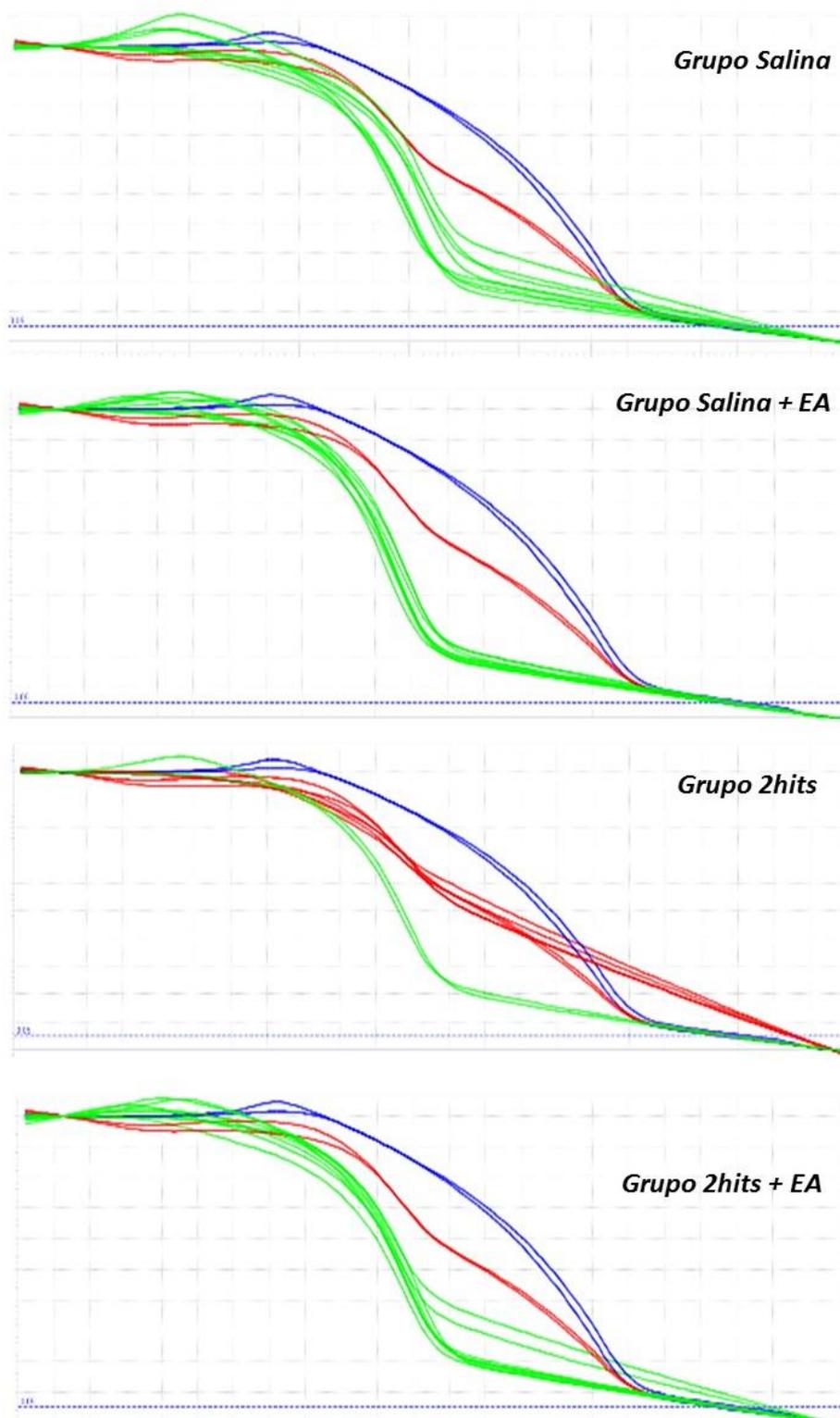
Figura 36 - Curvas de *Melting* do DNA controle.



Fonte: Próprio autor adaptado do LightCycler® 96 SW 1.1.

Os grupos Salina, Salina+EA e 2hit+EA demonstram um padrão de metilação correspondente ao DNA controle hipometilado nas amostras cerebrais de hipocampo, apresentando aproximadamente 0% de metilação. Em contrapartida, no grupo *2Hits* foi observado um perfil correspondente ao DNA parcialmente metilado, com porcentagem de metilação de aproximadamente 50% para o gene *Slc64a* (FIGURA 37).

Figura 37 – Representação das curvas de *Melting* nos grupos em estudo. Em verde: DNA hipometilado (0%), em vermelho, DNA parcialmente metilado (50%), em azul, DNA hipermetilado (100%)



Fonte: Próprio autor adaptado do LightCycler® 96 SW 1.1.

Como a metilação do DNA geralmente está relacionada ao silenciamento gênico ou a redução da sua atividade (BESTOR, 2000; KIM; SAMARANAYAKE; PRADHAN, 2009; KURIHARA *et al.*, 2008; WU; TAO; SUN, 2012), o gene *Slc6a4* parcialmente metilado tem sua expressão genica comprometida, e funcionamento alterado nos animais do no grupo *2Hits*, resultado que fortalece o papel dos fatores de risco ambientais no desenvolvimento da esquizofrenia (MARIC; SVRAKIC, 2012).

A modulação epigenética da atividade gênica é um mecanismo molecular bem estabelecido, o qual é altamente afetado pelas modificações ambientais (CHAMPAGNE, 2008). Estudos com gêmeos indicam que há até 50% da variação na felicidade entre indivíduos pode ser atribuída à influências genéticas (BARTELS; BOOMSMA, 2009; LYKKEN; TELLEGEN, 1996).

Uma grande quantidade de estudos sobre associação genética sugerem que a serotonina e o proteína transportadora de serotonina (*Slc6a4*) têm um papel importante na saúde mental (HARIRI *et al.*, 2002; HARIRI; HOLMES, 2006; HEILS *et al.*, 2002). Fatores genéticos e ambientais têm interações e efeitos conjuntos sobre o bem-estar, suscetíveis a profundas mudanças ao longo da vida (GÄRTNER *et al.*, 2018).

A regulação do gene *Slc6a4* é um candidato promissor para melhor compreensão da heterogeneidade individual no bem-estar subjetivo e na felicidade, que em humanos, é medida pelo nível de satisfação com a vida. O estudo de polimorfismos funcionais foram previamente associado à saúde mental e ao processamento seletivo de estímulos emocionais positivos e negativos (DE NEVE, 2011).

Um estudo de associação caso-controle em uma amostra representativa de americanos (N = 2574) evidenciou que indivíduos com a versão transcricionalmente ativa do gene *SLC6A4* relataram níveis significativamente mais altos de satisfação com a vida (DE NEVE, 2011).

O resultado de outro estudo também promoveu a hipótese do bem-estar com o sistema serotoninérgico quando descobriu que o polimorfismos no gene *Slc6a4* está associado a alterações na ativação de estímulos positivos, sugerindo um papel geral no processamento emocional (CANLI *et al.*, 2005). O *Slc6a4* induziu variação na anatomia e na função de um circuito de feedback da amígdala-cingulado que é crítico para estados

emocionais e implica em suscetibilidade genética para a depressão (PEZAWAS *et al.*, 2005).

Avaliação do funcionamento do gene *Slc6a4* pode estabelecer uma associação direta com a depressão, e a interação genótipo-ambiente produz uma associação significativa com as emoções. Pesquisas futuras podem produzir novos *insights* ao explorar como os fatores ambientais moderam a associação entre o *Slc6a4* e a felicidade (CASPI *et al.*, 2003; DE NEVE, 2011).

Evidências sugerem que a variação genética no gene transportador da serotonina (*Slc6a4*) pode estar associada à esquizofrenia e ao comportamento suicida. Em um estudo caso-controle que avaliou o envolvimento do gene *Slc6a4* em pacientes com esquizofrenia que tentaram suicídio, mostrou que sete polimorfismos de nucleotídeo único *Slc6a4* (SNPs) foram genotipados em 837 pacientes com esquizofrenia e 1.473 indivíduos controle. O gene *Slc6a4* parece estar envolvido na ideação suicida entre os pacientes com esquizofrenia, uma vez que o sistema da serotonérgico desempenha um papel central no circuito da cognição e das emoções (LINDHOLM CARLSTRÖM *et al.*, 2012).

As relação aos sistemas neurotransmissores dopaminérgicos e serotonérgicos são sustentados por uma série da interação entre os subtipos de receptores de dopamina e serotonina em uma variedade de estruturas cerebrais-chave, tais como o córtex pré-frontal, tálamo, estriado, amígdala, hipocampo e os núcleos do tronco encefálico, a partir dos quais os corpos celulares de neurônios contendo monoaminérgicos se originam (MAREK, 2007).

No córtex pré-frontal, níveis aumentados de doadores do grupo metil (CH₃), como a redução significativa de proteínas GABAérgicas concomitantes ao aumento de DNA metiltransferase 1 (DNMT1) na região cortical, hipocampo e estriado foram encontrado em cérebro de pacientes com esquizofrenia (RUZICKA *et al.*, 2007).

Estudo do perfil de metilação global no córtex frontal em cérebros *post-mortem* de pacientes esquizofrênicos e bipolares e encontraram epimutações, metilação aberrante do DNA, em cerca de 100 *loci*, incluindo genes que regulam os sistemas glutamatérgico e GABAérgicos, genes para estresse resposta e genes para o neurodesenvolvimento (MILL *et al.*, 2008).

Outro aspecto a ser considerado é a suscetibilidade genética para esquizofrenia por envolver centenas e até milhares de genes, sendo esta uma doença multifatorial e complexa (INTERNATIONAL SCHIZOPHRENIA CONSORTIUM *et al.*, 2009; MILL *et al.*, 2008).

Uma meta-análise integrada por estudos de varredura genômica, polimorfismos e associação genômica foi um marco para elucidação que não há apenas um único gene envolvido no risco para esquizofrenia (LEWIS *et al.*, 2003).

O desafio da compreensão do complexo de interações importantes da relação do sistema serotoninérgico, esquizofrenia, genética, ambiente e bem-estar parece ainda estar no início. Atualmente, desenvolver uma terapêutica que possa aperfeiçoar tratamento dos sintomas negativos, como avolição e anedonia, e também abordar um dos sintomas mais influentes no declínio funcional, o comprometimento cognitivo, são uma das maiores necessidades ponto vista clínico no campo da esquizofrenia do (MAREK, 2007).

Um estudo com animais mostrou que exposição pré-natal à depressão materna influenciou variações epigenéticas na prole, avaliando a metilação neonatal do gene do receptor de glicocorticoide humano (*Nr3c1*). Foi observado aumento de respostas de estresse e alterou a reatividade ao estresse no eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HPA) (OBERLANDER *et al.*, 2008).

Fortalecendo esse achado, mudanças no glicocorticoide hipocampal são determinadas como sendo o resultado de uma cascata de eventos celulares e moleculares envolvendo hormônios tireoidianos, turnover de serotonina e ligação do fator de transcrição ao gene *Nr3c1*, levando ao aumento de RNAm e proteína glicocorticoide (CHAMPAGNE, 2013).

Já é claramente estabelecido a relação eventos de vida estressantes crônicos são fatores de risco para o desenvolvimento de depressão maior, cuja fisiopatologia está fortemente ligada a prejuízos na neurotransmissão da serotonina (*Slc6a4*) (CHAOULOFF, 2000; CHAOULOFF; BERTON; MORMÈDE, 1999; MAHAR *et al.*, 2014), como também da relação do estresse com a vulnerabilidade dos sintomas em paciente esquizofrenicos (BITANHIRWE; WOO, 2011; BUCKLEY *et al.*, 2009; VAN WINKEL; STEFANIS; MYIN-GERMEYS, 2008).

Comorbidades psiquiátricas são comuns em pacientes com esquizofrenia (BUCKLEY *et al.*, 2009). Comportamental passivo e a anedonia em modelos animais, juntamente com muitos outros sintomas afetivos, cognitivos e comportamentais são compartilhados pelos sintomas clínicos da depressão e esquizofrenia. A heterogeneidade desses sintomas representa a pluralidade de estruturas corticolímbicas envolvidas na regulação

dos mecanismos da doença e que são adversamente afetadas em ambas as desordem (MAHAR *et al.*, 2014; QUEVEDO, 2009).

Essa relação é robustecida pela hipótese que sistema serotonérgico seria um modulador do sistema dopaminérgico, uma vez que classe de antipsicóticos de segunda geração que usam um possivelmente mecanismos que interagem em uma combinação de sistemas de neurotransmissores envolvidos na esquizofrenia (ELKIS, 2009; MELTZER *et al.*, 2003; OLIJSLAGERS *et al.*, 2006; WERKMAN *et al.*, 2006).

Modelos animais de estresse na primeira infância e variação na experiência social ao longo da vida veem contribuindo para compreensão da regulação do ambiente sobre o cérebro em desenvolvimento. A plasticidade nas vias neurobiológicas que regulam a responsividade do estresse, a cognição e o comportamento reprodutivo vão desde o o período pré-natal e continua até a idade adulta (GUDSNUK; CHAMPAGNE, 2012).

Em animais, o estresse causa mudanças transgeracionalmente estáveis na expressão gênica do cérebro, comportamento e sensibilidade do eixo HPA (JENSEN, 2014).

Ainda não é possível definir mecanismo que medeiam efeitos ambientais sobre o DNA e SNC em paciente com esquizofrenia, todavia desregulação epigenética do genoma e possíveis lesões do SNC são provavelmente os principais mecanismos para mediar influencias ambientais pré-natais (por exemplo, vírus, etanol ou deficiência nutricional), enquanto os fatores de risco pós-natais (por exemplo, estresse, urbanidade, uso de maconha) também podem influenciar, potencializando vias vulneráveis do SNC implicadas em esquizofrenia (MARIC; SVRAKIC, 2012).

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que a exposição de animais ao enriquecimento ambiental desde fases iniciais da vida até a idade adulta é capaz de prevenir alterações comportamentais relacionadas à esquizofrenia em animais submetidos ao modelo do “*2Hits*”. Além disso, esta proteção evidenciada nos grupos expostos ao ambiente enriquecido foi acompanhada de um efeito anti-inflamatório, neurogênico e de maior ativação sináptica (evidenciada pelo aumento na expressão da subunidade NR2b do receptor NMDA) no hipocampo dos animais. De forma geral, os resultados obtidos no presente trabalho têm uma grande validade translacional, pois evidenciam o efeito benéfico da exposição, em idades iniciais da vida, de indivíduos com vulnerabilidade para o desenvolvimento da esquizofrenia (submetidos a um desafio imune neonatal) a um ambiente enriquecido. Os dados apresentados da metilação do DNA para o gene *Slc6a4*, fortalecem que os fatores ambientais sozinhos muito dificilmente são suficientes para desencadear a esquizofrenia, porém atuam paralelamente ou em sinergia com o risco genético subjacente. Estudos dos efeitos epigenéticos sobre aspectos fisiopatológicos dos sintomas positivos e negativos da esquizofrenia e suas relações com ambiente são promissores como um novo expoente para guiar as pesquisas sobre a doença.

REFERÊNCIAS

- ABERCROMBIE, E D *et al.* Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. *Journal of neurochemistry*, v. 52, n. 5, p. 1655–1658, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2709017>>.
- ACOSTA, Francisco J. *et al.* Influence of antipsychotic treatment type and regimen on the functionality of patients with schizophrenia. *Nordic Journal of Psychiatry*, v. 68, n. 3, p. 180–188, 2014.
- ALCOCK, John. *Comportamento Animal: Uma Abordagem Evolutiva*. [S.l.]: Artmed Editora, 2016.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *DSM 5*. [S.l.: s.n.], 2013.
- ANDREASEN, Nancy C. *et al.* Symptoms of Schizophrenia: Methods, Meanings, and Mechanisms. *Archives of General Psychiatry*, v. 52, n. 5, p. 341–351, 1995.
- ANGRIST, B.; KAMMEN, D. P. *van.* *CNS stimulants as tools in the study of schizophrenia. Trends in Neurosciences*. [S.l.: s.n.], 1984
- ANTONIO EGIDIO NARDI, JOÃO QUEVEDO, Antônio Geraldo da Silva. *Esquizofrenia: Teoria e clínica*. [S.l.: s.n.], 2015.
- AUXÉMÉRY, Y. [Posttraumatic stress disorder (PTSD) as a consequence of the interaction between an individual genetic susceptibility, a traumatogenic event and a social context]. *L'Encéphale*, v. 38, n. 5, p. 373–80, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23062450>>.
- BANNERMAN, David M. *et al.* *Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. Nature Reviews Neuroscience*. [S.l.: s.n.], 2014
- BARRETT, Kim E.; RAYBOULD, Helen E. *Berne & Levy Physiology*. [S.l.: s.n.], 2010.
- BARTELS, Meike; BOOMSMA, Dorret I. Born to be happy? the etiology of Subjective well-being. *Behavior Genetics*, 2009.
- BELFORTE, Juan E. *et al.* Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nature Neuroscience*, v. 13, n. 1, p. 76–83, 2010.
- BENAROYA-MILSHTEIN, N. *et al.* Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *European Journal of Neuroscience*, v. 20, n. 5, p. 1341–1347, 2004.
- BENJAMIN J. SADOCK, VIRGINIA A. SADOCK, Pedro Ruiz. *Compêndio de Psiquiatria - Ciência do Comportamento e Psiquiatria Clínica*. 11. ed. [S.l.: s.n.], 2016.
- BENROS, M E; MORTENSEN, P B; EATON, W W. Autoimmune diseases and infections as risk factors for schizophrenia. *Neuroimmunomodulation in Health and Disease II*, v. 1262, p. 56–66, 2012.

BENROS, Michael E *et al.* Autoimmune diseases and severe infections as risk factors for schizophrenia: a 30-year population-based register study. *The American journal of psychiatry*, v. 168, n. 12, p. 1303–10, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22193673>>.

BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics*, 2000.

BILBO, Staci D.; SCHWARZ, Jaclyn M. *The immune system and developmental programming of brain and behavior. Frontiers in Neuroendocrinology*. [S.l.: s.n.], 2012

BIRCH, Amy M.; MCGARRY, Niamh B.; KELLY, Áine M. Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner. *Hippocampus*, v. 23, n. 6, p. 437–450, 2013.

BITANHIRWE, Byron K.Y.; WOO, Tsung Ung W. *Oxidative stress in schizophrenia: An integrated approach. Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. [S.l.: s.n.], 2011

BLISS, T V; COLLINGRIDGE, G L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, v. 361, n. 6407, p. 31–39, 1993.

BORON, W F; BOULPAEP, E L. *Fisiologia Médica*. [S.l.]: Elsevier Editora Ltda., 2015. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=aFjzDAAAQBAJ>>.

BORSINI, Franco; PODHORNA, Jana; MARAZZITI, Donatella. *Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? Psychopharmacology*. [S.l.: s.n.], 2002

BRAFF, D. L.; GEYER, M. A.; SWERDLOW, N. R. *Human studies of prepulse inhibition of startle: Normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. Psychopharmacology*. [S.l.: s.n.], 2001

BRAFF, David L.; GRILLON, Christian; GEYER, Mark A. Gating and Habituation of the Startle Reflex in Schizophrenic Patients. *Archives of General Psychiatry*, v. 49, n. 3, p. 206–215, 1992.

BRAGA, Raphael J.; REYNOLDS, Graham P.; SIRIS, Samuel G. *Anxiety comorbidity in schizophrenia. Psychiatry Research*. [S.l.: s.n.], 2013

BRASIL. *Manual de controle de roedores*. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRENES, Juan C.; FORNAGUERA, Jaime. Effects of environmental enrichment and social isolation on sucrose consumption and preference: Associations with depressive-like behavior and ventral striatum dopamine. *Neuroscience Letters*, v. 436, n. 2, p. 278–282, 2008.

BROOM, D. M. Indicators of poor welfare. *British Veterinary Journal*, v. 142, n. 6, p. 524–526, 1986.

BROWN, Alan S.; PATTERSON, Paul H. Maternal infection and schizophrenia: Implications for prevention. *Schizophrenia Bulletin*, v. 37, n. 2, p. 284–290, 2011.

BROWN, Jason P. *et al.* Transient Expression of Doublecortin during Adult Neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology*, v. 467, n. 1, p. 1–10, 2003.

BUCCAFUSCO, J. *Methods of behaviour analysis in neuroscience*. [S.l.: s.n.], 2001.

BUCKLEY, Peter F. *et al.* Psychiatric comorbidities and schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 2009.

BUKA, Stephen L. *et al.* Maternal Exposure to Herpes Simplex Virus and Risk of Psychosis Among Adult Offspring. *Biological Psychiatry*, v. 63, n. 8, p. 809–815, 2008.

BYRNES, John J.; HAMMER, Ronald P. The disruptive effect of cocaine on prepulse inhibition is prevented by repeated administration in rats. *Neuropsychopharmacology*, v. 22, n. 5, p. 551–554, 2000.

CÁCEDA, Ricardo *et al.* The role of endogenous neurotensin in psychostimulant-induced disruption of prepulse inhibition and locomotion. *Schizophrenia Research*, v. 136, n. 1–3, p. 88–95, 2012.

CANLI, T. *et al.* Beyond affect: A role for genetic variation of the serotonin transporter in neural activation during a cognitive attention task. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005.

CANLI, Turhan; LESCH, Klaus Peter. *Long story short: The serotonin transporter in emotion regulation and social cognition*. *Nature Neuroscience*. [S.l.: s.n.], 2007

CASPI, Avshalom *et al.* Influence of life stress on depression: Moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*, 2003.

CATTS, Vibeke S. *et al.* A quantitative review of the postmortem evidence for decreased cortical N-methyl-d-aspartate receptor expression levels in schizophrenia: How can we link molecular abnormalities to mismatch negativity deficits? *Biological Psychology*, v. 116, p. 57–67, 2016.

CHAMPAGNE, Frances A. Early environments, glucocorticoid receptors, and behavioral epigenetics. *Behavioral Neuroscience*, 2013.

CHAMPAGNE, Frances A. *Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care*. *Frontiers in Neuroendocrinology*. [S.l.: s.n.], 2008

CHAOULOFF, Francis. Serotonin, stress and corticoids. 2000, [S.l.: s.n.], 2000.

CHAOULOFF, Francis; BERTON, Olivier; MORMÈDE, Pierre. Serotonin and stress. *Neuropsychopharmacology*, 1999.

CHECKLEY, Stuart. *The neuroendocrinology of depression*. *International Review of Psychiatry*. [S.l.: s.n.], 1996

Combating schizophrenia. *Nature Neuroscience*, v. 468, n. 133, 2010.

CORREALE, Jorge. *The role of microglial activation in disease progression*. *Multiple Sclerosis*. [S.l.: s.n.], 2014

CRISTIANO S. NOTO; RODRIGO A. BRESSAN. *Esquizofrenia. Avanços no Tratamento Multidisciplinar*. 2. ed. [S.l: s.n.], 2009.

CROW, T. J. Molecular pathology of schizophrenia: More than one disease process? *British Medical Journal*, v. 280, n. 6207, p. 66–68, 1980.

CRUZ, Antonio Pedro de Mello; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. *Métodos em Neurociência*. [S.l: s.n.], 2012. p. 192–217.

CULM, K. E. Recovery of Sensorimotor Gating without G Protein Adaptation after Repeated D2-Like Dopamine Receptor Agonist Treatment in Rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 308, n. 2, p. 487–494, 2003. Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/jpet.103.057158>>.

CUSTÓDIO, Charllyany Sabino *et al.* Neonatal Immune Challenge with Lipopolysaccharide Triggers Long-lasting Sex- and Age-related Behavioral and Immune/Neurotrophic Alterations in Mice: Relevance to Autism Spectrum Disorders. *Molecular Neurobiology*, p. 1–14, maio 2017.

DAVID L. FELTEN & ANIL N. SHETTY. *Netter Atlas de Neurociência*. 2. ed. [S.l: s.n.], 2010.

DAVIS, Kenneth L. *et al.* Dopamine in schizophrenia: A review and reconceptualization. *American Journal of Psychiatry*, v. 148, n. 11, p. 1474–1486, 1991.

DAVIS, Michael *et al.* A primary acoustic startle circuit: lesion and stimulation studies. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 2, n. 6, p. 791–805, 1982.

DAWKINS, Marian Stamp. From an animal's point of view: Motivation, fitness, and animal welfare. *Behavioral and Brain Sciences*, v. 13, n. 1, p. 1–9, 1990.

DE BARTOLOMEIS, A.; BUONAGURO, E. F.; IASEVOLI, F. *Serotonin-glutamate and serotonin-dopamine reciprocal interactions as putative molecular targets for novel antipsychotic treatments: From receptor heterodimers to postsynaptic scaffolding and effector proteins*. *Psychopharmacology*. [S.l: s.n.], 2013

DE NEVE, Jan Emmanuel. Functional polymorphism (5-HTTLPR) in the serotonin transporter gene is associated with subjective well-being: Evidence from a US nationally representative sample. *Journal of Human Genetics*, 2011.

DEUTSCH, S. I. *et al.* A “glutamatergic hypothesis” of schizophrenia. *Rationale for pharmacotherapy with glycine*. *Clinical Neuropharmacology*. [S.l: s.n.], 1989

DIANE E. PAPALIA, Ruth D. Feldman. *Desenvolvimento Humano*. [S.l.]: Artmed Editora, 2013.

DRUHAN, J. P.; GEYER, M. A.; VALENTINO, R. J. Lack of sensitization to the effects of d-amphetamine and apomorphine on sensorimotor gating in rats. *Psychopharmacology*, v. 135, n. 3, p. 296–304, 1998.

EDWARDS, John R. *et al.* *DNA methylation and DNA methyltransferases. Epigenetics and Chromatin*. [S.l: s.n.], 2017

ELDEN, Ake; FLATEN, Magne a. Similar effects of attention directed to acoustic and tactile stimuli on prepulse inhibition of acoustic startle. *Scandinavian journal of psychology*, v. 44, n. 4, p. 363–72, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887558>>.

ELKIS, M.R.L.N.H. *Psiquiatria Básica*. [S.l.]: Artmed Editora, 2009. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=RaNGhzGWjJQC>>.

ELLENBROEK, B A; COOLS, A R. *Animal models with construct validity for schizophrenia. Behavioural pharmacology*. [S.l: s.n.], 1990

ENDELE, Sabine *et al.* Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nature Genetics*, v. 42, n. 11, p. 1021–1026, 2010.

FEIFEL, David *et al.* Sensorimotor gating effects produced by repeated dopamine agonists in a paradigm favoring environmental conditioning. *Psychopharmacology*, v. 162, n. 2, p. 138–146, 2002.

FERNANDA DA SILVA OLIVEIRA, FREDERICO VILLAS BOAS RODRIGUES, KELLY CRISTINA DEMARQUE, JANAÍNA ALVES RANGEL, TATHIANA A. ALVARENGA, WANDERSON SILVA BATISTA, LUCAS DOS SANTOS GAMEIRO, Gabriel Melo de Oliveira. Caracterização da dominância e subordinação na estrutura hierárquica de camundongos Swiss Webster em biotério. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, v. 2, n. 2, 2013.

FETT, AK; VIECHTBAUER, W; DOMINGUEZ, MD *et al.* The relationship between neurocognition and social cognition with functional out comes in schizophrenia: a meta-analysis. *Neurosciences*, v. 35, n. 3, p. 573–88, 2011.

FOX, Cosette; MERALI, Zul; HARRISON, Catherine. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. v. 175, p. 1–8, 2006.

FRANCIS, Fiona *et al.* Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*, v. 23, n. 2, p. 247–256, 1999.

FRANÇOISE CORDIER, Daniel Gaonach. *Aprendizagem e memória*. [S.l: s.n.], 2006.

FRANK, Matthew G. *et al.* Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 21, n. 1, p. 47–59, 2007.

GAEBEL, W. *Schizophrenia: Current science and clinical practice*. [S.l.]: Wiley, 2011. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=j6Crk14nZvYC>>. (World Psychiatric Association).

GAEBEL, Wolfgang. *Schizophrenia: Current Science and Clinical Practice*. [S.l: s.n.], 2011.

GÄRTNER, Matti *et al.* The interplay of genetic and environmental factors in shaping well-

being across the lifespan: Evidence from the serotonin transporter gene. *Aging and Mental Health*, 2018.

GEIMAN, Theresa M.; MUEGGE, Kathrin. *DNA methylation in early development. Molecular Reproduction and Development*. [S.l: s.n.], 2010

GEYER, M. A. *et al. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: A decade in review. Psychopharmacology*. [S.l: s.n.], 2001

GEYER, Ma; MOGHADDAM, B. Animal models relevant to schizophrenia disorders. *Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress*, p. 689–701, 2002. Disponível em: <http://www.acnp.org/Docs/G5/CH50_689-702.pdf>.

GINHOUX, Florent *et al. Origin and differentiation of microglia. Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 7, 2013. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2013.00045/abstract>>.

GIOVANOLI, Sandra *et al. Stress in puberty unmasks latent neuropathological consequences of prenatal immune activation in mice. Science (New York, N.Y.)*, v. 339, n. 6123, p. 1095–1099, 2013.

GOGHARI, Vina M.; SPONHEIM, Scott R.; MACDONALD, Angus W. *The functional neuroanatomy of symptom dimensions in schizophrenia: A qualitative and quantitative review of a persistent question. Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. [S.l: s.n.], 2010

GONZALEZ-RECIO, Oscar. Epigenetics: A New Challenge in the Post-Genomic Era of Livestock. *Frontiers in genetics*, v. 2, p. 106, 2011.

GÖTZ, Magdalena. *Doublecortin finds its place. Nature Neuroscience*. [S.l: s.n.], 2003

GRAHAM, F. K. The more or less startling effects of weak prestimulation. *PSYCHOPHYSIOLOGY*, v. 12, n. 3, p. 238–248, 1975.

GREEN, M. F. *et al. Neurocognitive Deficits and Functional Outcome in Schizophrenia: Are We Measuring the “Right Stuff”? Schizophrenia Bulletin*, v. 26, n. 1, p. 119–136, 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/schizophreniabulletin/article-lookup/doi/10.1093/oxfordjournals.schbul.a033430>>.

GUDSNUK, K.; CHAMPAGNE, F. A. Epigenetic Influence of Stress and the Social Environment. *ILAR Journal*, 2012.

GUR, Raquel E. *et al. Reduced gray matter volume in schizophrenia. Archives of General Psychiatry*, v. 56, n. 10, p. 905–911, 1999.

HAIJMA, Sander V. *et al. Brain volumes in schizophrenia: A meta-analysis in over 18 000 subjects. Schizophrenia Bulletin*, v. 39, n. 5, p. 1129–1138, 2013.

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. 661–675, 2009.

HANISCH, Uwe Karsten; KETTENMANN, Helmut. *Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nature Neuroscience*. [S.l: s.n.], 2007

- HARIRI, Ahmad R. *et al.* Serotonin transporter genetic variation and the response of the human amygdala. *Science*, 2002.
- HARIRI, Ahmad R.; HOLMES, Andrew. *Genetics of emotional regulation: the role of the serotonin transporter in neural function. Trends in Cognitive Sciences*. [S.l: s.n.], 2006
- HEBB, D. O. The effects of early experience on problem-solving at maturity. *American Psychologist*, v. 2, p. 306–7, 1947.
- HEILS, Armin *et al.* Allelic Variation of Human Serotonin Transporter Gene Expression. *Journal of Neurochemistry*, 2002.
- HEINZ, Andreas; SCHLAGENHAUF, Florian. *Dopaminergic dysfunction in schizophrenia: Salience attribution revisited. Schizophrenia Bulletin*. [S.l: s.n.], 2010
- HELD, Suzanne D.E.; ŠPINKA, Marek. *Animal play and animal welfare. Animal Behaviour*. [S.l: s.n.], 2011
- HOFFMAN, Diane C.; DONOVAN, Hilary. D1 and D2 dopamine receptor antagonists reverse prepulse inhibition deficits in an animal model of schizophrenia. *Psychopharmacology*, v. 115, n. 4, p. 447–453, 1994.
- HOFFMAN, Howard S.; ISON, James 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. 175–189, 1980.
- HORESH, David *et al.* Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Human Molecular Genetics*, v. 8, n. 9, p. 1599–1610, 1999.
- HOWES, Oliver D. *et al.* Pathways to schizophrenia: The impact of environmental factors. 2004, [S.l: s.n.], 2004.
- HRNKOVA, Miroslava *et al.* Neurodegeneration caused by expression of human truncated tau leads to progressive neurobehavioural impairment in transgenic rats. *Brain Research*, v. 1130, n. 1, p. 206–213, 2007.
- HUTCHINSON, Katie M. *et al.* Environmental enrichment protects against the effects of chronic stress on cognitive and morphological measures of hippocampal integrity. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 97, n. 2, p. 250–260, 2012.
- INSEL, Thomas R. *Rethinking schizophrenia. Nature*. [S.l: s.n.], 2010
- INTERNATIONAL SCHIZOPHRENIA CONSORTIUM *et al.* Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia that overlaps with bipolar disorder. *Nature*, 2009.
- ISOGAI, Yoh *et al.* Molecular organization of vomeronasal chemoreception. *Nature*, v. 478, n. 7368, p. 241–245, 2011.
- JABLENSKY, A *et al.* Schizophrenia - Manifestations, Incidence and Course in Different Cultures - a World-Health-Organization 10-Country Study. *Psychological Medicine*, p. 1–97, 1992. Disponível em: <file:///WOS:A1992HM22200001>.

JABLENSKY, Assen. *Towards ICD-11 and DSM-V: Issues beyond “harmonisation”*. *British Journal of Psychiatry*. [S.l: s.n.], 2009

JANSSEN, I; KRABBENDAM, L; BAK, M. Childhood abuse as a risk factor for psychotic experiences. *Acta Psychiatrica*, v. 109, n. 1, p. 38–45, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14674957>%5Cn<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.0001-690X.2003.00217.x/full>>.

JAVITT, D. C.; LINDSLEY, R. W. Effects of phencyclidine on prepulse inhibition of acoustic startle response in the macaque. *Psychopharmacology*, v. 156, n. 2–3, p. 165–168, 2001.

JEFFREY A. LIEBERMAN, T. SCOTT STROUP, Diana O. Perkins. *Fundamentos da Esquizofrenia*. [S.l: s.n.], 2009.

JENSEN, Per. Behaviour epigenetics - The connection between environment, stress and welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, 2014.

JERALD KAY, Allan Tasman. *Psiquiatria*. [S.l: s.n.], 2002.

JOHN BAYNES, Marek H. Dominiczak. *Bioquímica Médica*. 4. ed. [S.l: s.n.], 2015.

JOTZ, Geraldo Pereira. *Neuroanatomia Clínica e Funcional*. [S.l: s.n.], 2017.

JUNIOR, CARLOS VALÉRIO DA ROCHA. *PADRÃO DE METILAÇÃO DO RECEPTOR DE PROGESTERONA (PGR) EM ENDOMÉTRIO EUTÓPICO DE PACIENTES COM INFERTILIDADE RELACIONADA À ENDOMETRIOSE DURANTE A FASE SECRETORA*. 2015. 77 f. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2015.

JURUENA, Mario Francisco; CLEARE, Anthony J.; PARIANTE, Carmine M. *O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão*. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. [S.l: s.n.], 2004

KAY, J; TASMÁN, A; LIEBERMAN, J A. *Psiquiatria*. [S.l.]: Editora Manole, 2002. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=7skqPFPrxLoC>>.

KEITH, Valli A.; MANSBACH, Robert S.; GEYER, Mark A. Failure of haloperidol to block the effects of phencyclidine and dizocilpine on prepulse inhibition of startle. *Biological Psychiatry*, v. 30, n. 6, p. 557–566, 1991.

KESSLER, Ronald C *et al.* Lifetime Prevalence and Age-of-Onset Distributions of DSM-IV Disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of General Psychiatry*, v. 62, n. 6, p. 593, 2005. Disponível em: <<http://archpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archpsyc.62.6.593>>.

KETTENMANN, Helmut; KIRCHHOFF, Frank; VERKHRATSKY, Alexei. *Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper*. *Neuron*. [S.l: s.n.], 2013

KIERSZENBAUM, A L. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. [S.l.]: Mosby Elsevier, 2007. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=GTXhS0xyYUQC>>.

KILTS, C D. The changing roles and targets for animal models of schizophrenia. *Biological*

psychiatry, v. 50, n. 11, p. 845–855, 2001.

KIM, J. K.; SAMARANAYAKE, M.; PRADHAN, S. *Epigenetic mechanisms in mammals. Cellular and Molecular Life Sciences*. [S.l: s.n.], 2009

KOCH, M. *The neurobiology of startle. Progress in Neurobiology*. [S.l: s.n.], 1999

KOHL, S. *et al. Prepulse inhibition in psychiatric disorders - Apart from schizophrenia. Journal of Psychiatric Research*. [S.l: s.n.], 2013

KOKNAROGLU, H.; AKUNAL, T. Animal welfare: An animal science approach. *Meat Science*, v. 95, n. 4, p. 821–827, 2013.

KRETSCHMER, Beate D.; KOCH, Michael. The ventral pallidum mediates disruption of prepulse inhibition of the acoustic startle response induced by dopamine agonists, but not by NMDA antagonists. *Brain Research*, v. 798, n. 1–2, p. 204–210, 1998.

KURIHARA, Yukiko *et al.* Maintenance of genomic methylation patterns during preimplantation development requires the somatic form of DNA methyltransferase 1. *Developmental Biology*, 2008.

KUROKI, Toshihide; NAGAO, Naoko; NAKAHARA, Tatsuo. *Neuropharmacology of second-generation antipsychotic drugs: a validity of the serotonin-dopamine hypothesis. Progress in Brain Research*. [S.l: s.n.], 2008

LAMBERT, M. Quality of life and functionality in schizophrenia. *European Neuropsychopharmacology*, v. 24, p. S763, 2014. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L71641862>>.

LANDER, E S *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, v. 409, n. 6822, p. 860–921, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11237011> %5Cn<http://www.nature.com/nature/journal/v409/n6822/pdf/409860a0.pdf>>.

LARUELLE, Marc *et al.* *Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. Biological Psychiatry*. [S.l: s.n.], 1999

LAVIOLA, Giovanni *et al.* *Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. Neurobiology of Disease*. [S.l: s.n.], 2008

LESLIE P. GARTNER, James I. Hiatt. *Histologia Essencial*. [S.l: s.n.], 2012.

LEWIS, Cathryn M. *et al.* Genome Scan Meta-Analysis of Schizophrenia and Bipolar Disorder, Part II: Schizophrenia. *The American Journal of Human Genetics*, 2003.

LI, Dawei; HE, Lin. *Association study between the NMDA receptor 2B subunit gene (GRIN2B) and schizophrenia: A HuGE review and meta-analysis. Genetics in Medicine*. [S.l: s.n.], 2007

LI, Fei; TSIEN, Joe Z. Memory and the NMDA Receptors. *New England Journal of Medicine*,

v. 361, n. 3, p. 302–303, 2009. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMcibr0902052>>.

LI, Qingyun; BARRES, Ben A. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology*, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nri.2017.125>>.

LIDDLE, P. F. The symptoms of chronic schizophrenia. A re-examination of the positive-negative dichotomy. *British Journal of Psychiatry*, v. 151, n. AUG., p. 145–151, 1987.

LIEBERMAN, J. A.; KANE, J. M.; ALVIR, J. Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. *Psychopharmacology*, v. 91, n. 4, p. 415–433, 1987.

LINDENMAYER, Jean Pierre; GROCHOWSKI, Sandra; HYMAN, Ruth B. Five factor model of schizophrenia: Replication across samples. *Schizophrenia Research*, v. 14, n. 3, p. 229–234, 1995.

LINDHOLM CARLSTRÖM, Eva et al. Association between a genetic variant in the serotonin transporter gene (SLC6A4) and suicidal behavior in patients with schizophrenia. **Behavioral and Brain Functions**, [s. l.], 2012.

LINN, Gary S. *et al.* Reversal of phencyclidine-induced prepulse inhibition deficits by clozapine in monkeys. *Psychopharmacology*, v. 169, n. 3–4, p. 234–239, 2003.

LIPMAN, Terri; TIEDJE, Linda Beth. *Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins*. *MCN The American Journal of Maternal/Child Nursing*. [S.l: s.n.], 2006

LOCK, Margaret. Epigenetics. *Routledge Handbook of Genomics, Health and Society*. [S.l: s.n.], 2018. .

LOFTIS, Jennifer M.; JANOWSKY, Aaron. The N-methyl-d-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 97, n. 1, p. 55–85, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725802003029>>.

LONG, Leonora E.; MALONE, Daniel T.; TAYLOR, David A. Cannabidiol reverses MK-801-induced disruption of prepulse inhibition in mice. *Neuropsychopharmacology*, v. 31, n. 4, p. 795–803, 2006.

LYKKEN, David; TELLEGEN, Auke. Happiness is a stochastic phenomenon. *Psychological Science*, 1996.

MAHAR, Ian *et al.* *Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects*. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. [S.l: s.n.], 2014

MAREK, Gerard J. *Serotonin and Dopamine Interactions in Rodents and Primates: Implications for Psychosis and Antipsychotic Drug Development*. *International Review of Neurobiology*. [S.l: s.n.], 2007

MARIC, Nadja P.; SVRAKIC, Dragan M. *Why schizophrenia genetics needs epigenetics: A review*. *Psychiatria Danubina*. [S.l: s.n.], 2012

MATCHERI S. KESHAVAN, JAMES L. KENNEDY, ROBIN M. MURRAY, Murray R. *Neurodevelopment and Schizophrenia*. [S.l: s.n.], 2004.

MCGUFFIN, P; GOTTESMAN, I I. *Risk Factors for Schizophrenia . The New England Journal of Medicine* . [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://qut.summon.serialssolutions.com/2.0.0/link/0/eLvHCXMwnV1LS8NAEB5sBfHiuxqrkoPgxWiy900JylSESEeRE8iS7PdBbVNa1P_vzvJpkaLPXjOhjxmZ_ab1zcAlFz43i-bgLVQsUGnioTMqBeVxndm2pdcU0V5McOvHn-rWCGstCsjWVjuwVhi0PySIHIXbADP1eTDwylSmG21IzUasBpwP0ZnLCFJjU7KwmEbUfpxFlm>. , 1999

MELTZER, Herbert Y. *et al.* Serotonin receptors: Their key role in drugs to treat schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2003.

MEYER-LINDENBERG, Andreas *et al.* Reduced prefrontal activity predicts exaggerated striatal dopaminergic function in schizophrenia. *Nature Neuroscience*, v. 5, n. 3, p. 267–271, 2002.

MILL, Jonathan *et al.* Epigenomic Profiling Reveals DNA-Methylation Changes Associated with Major Psychosis. *American Journal of Human Genetics*, 2008.

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

MING, Guo-li; SONG, Hongjun. ADULT NEUROGENESIS IN THE MAMMALIAN CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *Annual Review of Neuroscience*, v. 28, n. 1, p. 223–250, 2005. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459>>.

MOGHADDAM, Bitá. *Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: Implications for dopamine-associated psychiatric disorders. Biological Psychiatry*. [S.l: s.n.], , 2002

MOHAMMAD, Faizaan; MONDAL, Tanmoy; KANDURI, Chandrasekhar. *Epigenetics of imprinted long noncoding RNAs. Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society*. [S.l: s.n.], , 2009

MOHAMMED, A. H. *et al.* Environmental enrichment and the brain. 2002, [S.l: s.n.], 2002. p. 109–133.

MOHN, Amy R. *et al.* Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell*, v. 98, n. 4, p. 427–436, 1999.

MONACO, Sarah A.; GULCHINA, Yelena; GAO, Wen Jun. *NR2B subunit in the prefrontal cortex: A double-edged sword for working memory function and psychiatric disorders. Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. [S.l: s.n.], , 2015

MONJI, Akira; KATO, Takahiro; KANBA, Shigenobu. Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, v. 63, n. 3, p. 257–265, 2009.

MONTE, A.S. *et al.* Two-hit model of schizophrenia induced by neonatal immune activation

and peripubertal stress in rats: Study of sex differences and brain oxidative alterations. *Behavioural Brain Research*, v. 331, 2017.

MOORE, Holly; WEST, Anthony R.; GRACE, Anthony A. *The regulation of forebrain dopamine transmission: Relevance to the pathophysiology and psychopathology of schizophrenia*. *Biological Psychiatry*. [S.l: s.n.], 1999

MOORES, Carolyn A. *et al.* Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin. *Molecular Cell*, v. 14, n. 6, p. 833–839, 2004.

MORI, F. *et al.* Genetic variants of the NMDA receptor influence cortical excitability and plasticity in humans. *Journal of Neurophysiology*, v. 106, n. 4, p. 1637–1643, 2011. Disponível em: <<http://jn.physiology.org/cgi/doi/10.1152/jn.00318.2011>>.

MÜLLER, Norbert *et al.* Beneficial antipsychotic effects of celecoxib add-on therapy compared to risperidone alone in schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, v. 159, n. 6, p. 1029–1034, 2002.

MÜLLER, Norbert. Immunological aspects of the treatment of depression and schizophrenia. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, v. 19, n. 1, p. 55–63, 2017.

MURRAY, C J L; LOPEZ, A D. Evidence-based health policy--lessons from the global burden of disease study. *Science*, v. 274, n. 5288, p. 740–743, 1996. Disponível em: <http://0-search.proquest.com.alpha2.latrobe.edu.au/docview/213558434?accountid=12001%5Cnhttp://cm8ek7zy3d.search.serialssolutions.com/?ctx_ver=Z39.88-2004&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&rft_id=info:sid/ProQ:healthcompleteshell&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx>.

NAIR, Aji; BONNEAU, Robert H. Stress-induced elevation of glucocorticoids increases microglia proliferation through NMDA receptor activation. *Journal of Neuroimmunology*, v. 171, n. 1–2, p. 72–85, 2006.

NAYAK, Debasis; ROTH, Theodore L.; MCGAVERN, Dorian B. Microglia Development and Function. *Annual Review of Immunology*, v. 32, n. 1, p. 367–402, 2014. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-032713-120240>>.

NETO, Ary Gadelha De Alencar Araripe; BRESSAN, Rodrigo Affonseca; BUSATTO FILHO, Geraldo. *Fisiopatologia da esquizofrenia: Aspectos atuais*. *Revista de Psiquiatria Clinica*. [S.l: s.n.], 2007

NITHIANANTHARAJAH, Jess; HANNAN, Anthony J. *Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system*. *Nature Reviews Neuroscience*. [S.l: s.n.], 2006

NOBLE, D. Conrad Waddington and the origin of epigenetics. *Journal of Experimental Biology*, 2015.

NORDEN, Diana M. *et al.* Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *GLIA*, v. 64, n. 2, p. 300–316, 2016.

O'CONNELL, Lauren A.; HOFMANN, Hans A. *The Vertebrate mesolimbic reward system*

and social behavior network: A comparative synthesis. *Journal of Comparative Neurology*. [S.l.: s.n.], 2011

OBERLANDER, Tim F. *et al.* Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. *Epigenetics*, 2008.

OLIJSLAGERS, J. *et al.* Modulation of Midbrain Dopamine Neurotransmission by Serotonin, a Versatile Interaction Between Neurotransmitters and Significance for Antipsychotic Drug Action. *Current Neuropharmacology*, 2006.

OLIVEIRA, Gabriel Melo De. Avaliação da atividade motora e exploratória de camundongos que apresentam comportamento agressivo em ambiente laboratorial. *RESBCAL*, v. 1, n. 1, p. 24–32, 2012.

OLNEY, John W.; FARBER, Nuri B. Nmda antagonists as neurotherapeutic drugs, psychotogens, neurotoxins, and research tools for studying schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, v. 13, n. 4, p. 335–345, 1995.

PANG, Terence Y C; HANNAN, Anthony J. *Enhancement of cognitive function in models of brain disease through environmental enrichment and physical activity*. *Neuropharmacology*. [S.l.: s.n.], 2013a

PANG, Terence Y C; HANNAN, Anthony J. Neuropharmacology Enhancement of cognitive function in models of brain disease through environmental enrichment and physical activity. *Neuropharmacology*, v. 64, p. 515–528, 2013b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.06.029>>.

PAPES, Fabio; LOGAN, Darren W.; STOWERS, Lisa. The Vomeronasal Organ Mediates Interspecies Defensive Behaviors through Detection of Protein Pheromone Homologs. *Cell*, v. 141, n. 4, p. 692–703, 2010.

PASCUAL, Leo; RODRIGUES, Paulo; GALLARDO-PUJOL, David. How does morality work in the brain? A functional and structural perspective of moral behavior. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, v. 7, 2013. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnint.2013.00065/abstract>>.

PEZAWAS, Lukas *et al.* 5-HTTLPR polymorphism impacts human cingulate-amygdala interactions: A genetic susceptibility mechanism for depression. *Nature Neuroscience*, 2005.

PINHEIRO, Marta. *Comportamento humano - interação entre genes e ambiente*. Curitiba: Educar em Revista, 1994.

PRINZ, Marco; PRILLER, Josef. *Microglia and brain macrophages in the molecular age: From origin to neuropsychiatric disease*. *Nature Reviews Neuroscience*. [S.l.: s.n.], 2014

PRUT, Laetitia; BELZUNG, Catherine. *The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review*. *European Journal of Pharmacology*. [S.l.: s.n.], 2003

QUEVEDO, Flávio Kapczinski. Iván Izquierdo. João. *Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos: Uma Abordagem Translacional*. [S.l.]: Artmed Editora, 2009.

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

RAKIC, S Qoldman; SELEMON, Lynn D. Functional and Anatomical Aspects of Prefrontal Pathology in Schizophrenia. n. September, p. 437–458, 2017.

RAYMOND P. KESNER, JOE L. MARTINEZ, Jr. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2. ed. [S.l: s.n.], 2007.

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, 2013.

RIGDON, Greg C.; VIKK, Kaido. Prepulse inhibition as a screening test for potential antipsychotics. *Drug Development Research*, v. 23, n. 1, p. 91–99, 1991.

ROSENZWEIG, Mark R. *et al.* Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain Research*, v. 153, n. 3, p. 563–576, 1978.

ROSENZWEIG, Mark R.; BENNETT, Edward L. Psychobiology of plasticity: Effects of training and experience on brain and behavior. *Behavioural Brain Research*, v. 78, n. 1, p. 57–65, 1996.

RUZICKA, W. B. *et al.* Selective epigenetic alteration of layer I GABAergic neurons isolated from prefrontal cortex of schizophrenia patients using laser-assisted microdissection. *Molecular Psychiatry*, 2007.

SALE, Alessandro; BERARDI, Nicoletta; MAFFEI, Lamberto. *Enrich the environment to empower the brain. Trends in Neurosciences*. [S.l: s.n.], 2009

SÁNCHEZ, M. Mar; LADD, Charlotte O.; PLOTSKY, Paul M. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: Evidence from rodent and primate models. *Development and Psychopathology*, v. 13, n. 3, p. 419–449, 2001.

SATAKE, Susan *et al.* Effects of microinjections of apomorphine and haloperidol into the inferior colliculus on prepulse inhibition of the acoustic startle reflex in rat. *Neuroscience Letters*, v. 509, n. 1, p. 60–63, 2012.

SCHULZ, Brigitte *et al.* Sensitization of prepulse inhibition deficits by repeated administration of dizocilpine. *Psychopharmacology*, v. 156, n. 2–3, p. 177–181, 2001.

SCHULZ, Stefanie *et al.* N-methyl-D-aspartate receptor 2B subunit (GRIN2B) gene variation is associated with alerting, but not with orienting and conflicting in the Attention Network Test. *Neuropharmacology*, v. 63, n. 2, p. 259–265, 2012.

SEEMAN, P. *et al.* Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature*, v. 261, n. 5562, p. 717–719, 1976.

SEIDMAN, Larry J. *et al.* Thalamic and amygdala-hippocampal volume reductions in first-degree relatives of patients with schizophrenia: An MRI-based morphometric analysis. *Biological Psychiatry*. [S.l: s.n.], 1999

SEMPLE, Bridgette D. *et al.* *Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. Progress in Neurobiology.* [S.l: s.n.], 2013

SEONG, Eunju; SEASHOLTZ, Audrey F; BURMEISTER, Margit. Mouse models for psychiatric disorders. *Trends in genetics : TIG*, v. 18, n. 12, p. 643–650, 2002.

SHARON L. LEWIS, MARGARET M. HEITKEMPER, SHANNON RUFF DIRKSEN, Linda Bucher. *Tratado de Enfermagem Médico-Cirúrgica: Avaliação e Assistência dos Problemas Clínicos.* 8. ed. [S.l: s.n.], 2013.

SMITH, Zachary D.; MEISSNER, Alexander. *DNA methylation: Roles in mammalian development. Nature Reviews Genetics.* [S.l: s.n.], 2013

SOLINAS, Marcello *et al.* *Prevention and treatment of drug addiction by environmental enrichment. Progress in Neurobiology.* [S.l: s.n.], 2010

SOULAS, Caroline *et al.* Genetically modified CD34+hematopoietic stem cells contribute to turnover of brain perivascular macrophages in long-term repopulated primates. *American Journal of Pathology*, v. 174, n. 5, p. 1808–1817, 2009.

STAHL, Stephen M. *Beyond the dopamine hypothesis to the NMDA glutamate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. CNS Spectrums.* [S.l: s.n.], 2007

Stanford Medicine School of Medicine. Disponível em: <<https://med.stanford.edu/sbfnl/services/bm/lm/y-maze.html>>.

STRACHAN, T; READ, A. *Genética Molecular Humana.* [S.l: s.n.], 2016. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=xTJLDQAAQBAJ>>.

SUZUKI, Kanzo *et al.* Effects of a ketamine metabolite on synaptic NMDAR function. *Nature*, v. 546, n. 7659, p. E1–E3, 2017.

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, 1992.

SWERDLOW, N R *et al.* Effects of spiperone, raclopride, SCH 23390 and clozapine on apomorphine inhibition of sensorimotor gating of the startle response in the rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 256, n. 2, p. 530–6, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1825226>>.

SWERDLOW, Neal R. *et al.* *Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research. Psychopharmacology.* [S.l: s.n.], 2008

SZTAINBERG, Yehezkel; CHEN, Alon. *An environmental enrichment model for mice. Nature Protocols.* [S.l: s.n.], 2010

TANNENBAUM, J. Ethics and animal welfare: the inextricable connection. *J Am Vet Med Assoc.*, v. 198(8), n. Apr 15, p. 1360–76., 1991.

TOOMEY, R *et al.* Negative, positive, and disorganized symptom dimensions in

schizophrenia, major depression, and bipolar disorder. *The Journal of nervous and mental disease*, v. 186, n. 8, p. 470–476, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9717864>>.

TOOMEY, Rosemary *et al.* Revisiting the factor structure for positive and negative symptoms: Evidence from a large heterogeneous group of psychiatric patients. *American Journal of Psychiatry*, v. 154, n. 3, p. 371–377, 1997.

TURETSKY, Bruce I. *et al.* Neurophysiological endophenotypes of schizophrenia: The viability of selected candidate measures. *Schizophrenia Bulletin*. [S.l: s.n.], 2007

TYNAN, Ross J. *et al.* Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 24, n. 7, p. 1058–1068, 2010.

ÜÇÖK, A.; GORWOOD, P.; KARADAYI, G. Employment and its relationship with functionality and quality of life in patients with schizophrenia: EGOFORS Study. *European Psychiatry*, v. 27, n. 6, p. 422–425, 2012.

ÜÇÖK, Alp *et al.* Anticipated discrimination is related to symptom severity, functionality and quality of life in schizophrenia. *Psychiatry Research*, v. 209, n. 3, p. 333–339, 2013.

VALERO, Jorge *et al.* Short-term environmental enrichment rescues adult neurogenesis and memory deficits in APPSw,Ind transgenic mice. *PLoS ONE*, v. 6, n. 2, 2011.

VALLS-SOLE, J. Function and dysfunction of the startle reaction in humans. *REVISTA DE NEUROLOGIA*, v. 39, n. 10, p. 946–955, 2004.

VAN PRAAG, H; KEMPERMANN, G; GAGE, F H. Neural consequences of environmental enrichment. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 1, n. December, p. 191–198, 2000.

VAN WINKEL, Ruud; STEFANIS, Nicholas C.; MYIN-GERMEYS, Inez. Psychosocial stress and psychosis. A review of the neurobiological mechanisms and the evidence for gene-stress interaction. *Schizophrenia Bulletin*. [S.l: s.n.], 2008

VARESE, Filippo *et al.* Childhood adversities increase the risk of psychosis: A meta-analysis of patient-control, prospective-and cross-sectional cohort studies. *Schizophrenia Bulletin*, v. 38, n. 4, p. 661–671, 2012.

WADDINGTON, C. H. Canalization of Development and the Inheritance of Acquired Characters. *Nature*, 1942.

WALSH, Roger N.; CUMMINS, Robert A. The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin*, v. 83, n. 3, p. 482–504, 1976.

WEAVER, Ian C G *et al.* Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience*, 2004.

WELHAM, Joy *et al.* The antecedents of Schizophrenia: A review of birth cohort studies. *Schizophrenia Bulletin*. [S.l: s.n.], 2009

WERKMAN, T R *et al.* Dopamine Receptor Pharmacology: Interactions with Serotonin

Receptors and Significance for the Aetiology and Treatment of Schizophrenia. *CNS & Neurological Disorders -Drug Targets*, 2006.

WRIGHT, Ian C. *et al.* Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, v. 157, n. 1, p. 16–25, 2000.

WU, Hao; TAO, Jifang; SUN, Yi Eve. Regulation and function of mammalian DNA methylation patterns: A genomic perspective. *Briefings in Functional Genomics*, 2012.

WYKES, Til *et al.* Cognitive remediation therapy in schizophrenia : Randomised controlled trial AUTHOR ' S PROOF Cognitive remediation therapy in schizophrenia Randomised controlled trial. *British Journal of Psychiatry*, p. 421–427, 2007.

YAMAMOTO, H *et al.* Specific Roles of NMDA Receptor Subunits in Mental Disorders. *Current molecular medicine*, v. 15, n. 3, p. 193–205, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25817860>>.

ZHANG, Yingying; JELTSCH, Albert. *The application of next generation sequencing in DNA methylation analysis*. *Genes*. [S.l: s.n.], , 2010

ZHUO, Min. Plasticity of NMDA receptor NR2B subunit in memory and chronic pain. *Molecular Brain*, v. 2, n. 1, 2009.

ZUFALL, Frank; KELLIHER, Kevin R.; LEINDERS-ZUFALL, Trese. Pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Microscopy Research and Technique*, v. 58, n. 3, p. 251–260, 2002.