



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

KATIA CILENE FERREIRA DIAS

**ESTUDO DO EFEITO ANTIPSICÓTICO DO EXTRATO ETANÓLICO
PADRONIZADO DA *ERYTHRINA VELUTINA* WILLD EM MODELO DE
ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA

2018

KÁTIA CILENE FERREIRA DIAS

ESTUDO DO EFEITO ANTIPSICÓTICO DO EXTRATO ETANÓLICO PADRONIZADO
DA *ERYTHRINA VELUTINA WILL* EM MODELO DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR
CETAMINA EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos

Coorientador: Prof. Dr. José Eduardo Ribeiro Honório Júnior

FORTALEZA

2018

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)

- D532e Dias, Kátia Cilene Ferreira.
Estudo do efeito antipsicótico do extrato etanólico padronizado da Erythina Velutina Willd em modelo de esquizofrenia induzido por cetamina / Kátia Cilene Ferreira Dias. – 2018.
62 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos.
Coorientação: Prof. Dr. José Eduardo Ribeiro Honório Júnior.
1. Erythrina velutina. 2. Esquizofrenia. 3. Antipsicótico. I. Título.

CDD 660.6

KATIA CILENE FERREIRA DIAS

ESTUDO DO EFEITO ANTIPSICÓTICO DO EXTRATO ETANÓLICO PADRONIZADO
DA *ERYTHRINA VELUTINA* WILLD EM MODELO DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO
POR CETAMINA EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em 26 de setembro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos (orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Prof.^a Dr.^a. Eliane Brito Cortez Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a. Francisca Clea Florenço de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Danielle Macedo Gaspar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Márcia Calheiros Chaves
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus que tornou possível o que eu considerava um sonho.

À minha mãezinha que, mesmo sem preceber, esteve sempre me ajudando a realizar esse sonho.

Aos meus queridos e amados irmãos: Márcio, Marcílio, Marcelo e Marcos.

À minha estimada, admirável, amável e incrível orientadora, Prof^ª Silvânia Maria Mendes Vasconcelos, que sempre acreditou em mim em momentos que eu não mais acreditava.

À minha amiga Teresinha Mendes Vasconcelos, que me proporcionou o privilégio de conhecer sua incrível e amada família.

Ao meu bondoso, paciente e maravilhoso coorientador, Prof^º Eduardo Honório Júnior.

À todos da família Neuro, pela cooperação, ajuda e compreensão. Inclusive aos que já não estão no laboratório, mas que continuam em nosso coração: Vilinha, Eliane Brito, Rafael Sampaio, Lena e Narjara.

Aos meus avós: Vicente Ferreira e Maria Santana, que infelizmente já faleceram, mas que chegaram a me dar uma grande ajuda em palavras de otimismo e sempre com muito carinho.

À minha tia Carmélia Loureiro e toda a sua família que me acolheram sempre que precisei.

Ao Sr Sebastião Barros e sua esposa, Maria do Carmo Barros, que estavam sempre dispostos a retirar e enviar as folhar da *Erythrina*, meu muito obrigada.

À minha tia Edina que sempre torce pelo meu sucesso profissional e também à minha prima Valdísia, sempre disposta a ajudar no transporte das folhas de *Erythrina*.

Aos que direta e indiretamente ajudaram neste trabalho, meu eterno MUITO OBRIGADA.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Esquizofrenia é um transtorno mental crônico, caracterizado por sintomas positivos, negativos e cognitivos. Várias plantas foram estudadas para tratar distúrbios do Sistema Nervoso Central, como a *Erythrina velutina* Willd. Estudos mostraram uma ação neuroprotetora e antioxidante desta planta. Nosso objetivo foi estudar os efeitos do extrato padronizado das folhas de *Erythrina velutina* em parâmetros comportamentais, oxidativos e na expressão proteica de fatores inflamatório no modelo de esquizofrenia induzida por cetamina. Camundongos machos receberam administração repetida de cetamina (CET) (25 mg/kg, ip) ou salina por 7 dias. Do 8º ao 14º dia os animais receberam *Erythrina* (ERYT) (100, 200 ou 400 mg/kg, v.o.) ou olanzapina (1 mg/kg, v. o.) 1 hora após a administração de CET. No 14º dia, 30 minutos após a administração de CET, foram realizados testes de campo aberto e inibição pré-pulso (IPP). Os animais foram sacrificados e o córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e corpo estriado (CE) foram dissecados para os testes de estresse oxidativo e nitrérgico. Com a identificação da melhor dose, foi realizado *Western Blotting* do CPF para avaliar a expressão de proteínas relacionadas com a inflamação NFkB, Iba-1, Akt e fosfo-Akt. Os resultados mostram que CET aumentou a atividade locomotora e o número de *grooming* dos animais, quando comparado ao grupo controle e diminuiu o IPP nos três pulsos estudados e estes efeitos foram revertidos pela ERYT ou olanzapina. CET diminuiu o GSH no CPF comparado ao controle e este efeito foi revertido pela associação com ERYT em doses mais baixas. CET reduziu a concentração de GSH em CE e este efeito foi revertido por ERYT na dose mais baixa. CET aumentou a concentração de MDA no CPF e HC em comparação com o controle e este efeito foi revertido por associação com ERYT em todas as doses estudadas. ERYT e Olanzapina reduziram a concentração de MDA no CE, quando comparado ao grupo CET. A concentração de nitrito foi reduzida pela CET no CPF, quando comparado ao grupo controle e este efeito foi revertido pela associação com olanzapina. Houve redução do nitrito no CE nos grupos associados ERYT 200 ou 400+CET quando comparada ao controle. Os resultados mostram que o extrato de *Erythrina velutina* pode reduzir sintomas positivos e negativos semelhantes à esquizofrenia e estresse oxidativo induzido por doses repetidas de CET, sugerindo uma nova perspectiva para o tratamento da esquizofrenia.

Palavras-chave: *Erythrina velutina*. Esquizofrenia. Antipsicótico. Modelo de cetamina.

ABSTRACT

Schizophrenia is a chronic mental disorder characterized by positive, negative and cognitive symptoms. Several plants have been studied to treat disorders of the Central Nervous System, such as Erythrina Velutin Willd. Studies have shown a neuroprotective and antioxidant action of this plant. Our objective was to study the effects of standardized Erythrina velutin leaf extract on behavioral and oxidative parameters and on the protein expression of inflammatory factors in the model of ketamine-induced schizophrenia. Mice received repeated administration of ketamine (CET) (25 mg/kg, ip) or saline for 7 days. From the 8th to 14th day the animals received Erythrina (ERYT) (100, 200 or 400 mg/kg, v.o.) or olanzapine (1 mg/kg, v.o.) 1 hour after administration of TSC. On the 14th day, 30 minutes after administration of TSC, open field tests and pre-pulse inhibition (PPI) were performed. The animals were sacrificed and the prefrontal cortex (CPF), hippocampus (HC) and striated body (EC) were dissected for oxidative and nitric stress tests. With the identification of the best dose, a Western Blotting of the CPF was performed to evaluate the expression of proteins related to NFkB, Iba-1, Akt and phospho-Akt inflammation. The results show that CET increased the locomotor activity and the number of grooming of the animals when compared to the control group and decreased IPP in the three pulses studied and these effects were reversed by ERYT or olanzapine. CET decreased GSH in CPF compared to control and this effect was reversed by association with ERYT in lower doses. CET reduced the concentration of GSH in EC and this effect was reversed by ERYT in the lower dose. CET increased the concentration of MDA in CPF and HC compared to the control and this effect was reversed by association with ERYT in all doses studied. ERYT and Olanzapine reduced the concentration of MDA in EC compared to the CET group. The concentration of nitrite was reduced by CET in the CPF when compared to the control group and this effect was reversed by association with olanzapine. There was a reduction in EC nitrite in the associated ERYT 200 or 400+CET groups when compared to the control group. The results show that Erythrina velutin extract can reduce positive and negative symptoms similar to schizophrenia and oxidative stress induced by repeated doses of TSC, suggesting a new perspective for the treatment of schizophrenia.

Keywords: *Erithrina velutina*. Schizophrenia. Antipsychotic. Ketamine model.

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 08 |
| 1.1 | Fisiopatologia da Esquizofrenia | 09 |
| 1.2 | Cetamina como modelo de Esquizofrenia | 12 |
| 1.3 | Inibição pré-pulso como teste para estudo da Esquizofrenia | 13 |
| 1.4 | Tratamento farmacológico da Esquizofrenia | 14 |
| 1.5 | <i>Erythrina velutina</i> | 15 |
| 1.6 | Sistema imune e Esquizofrenia | 20 |
| 2 | JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA | 22 |
| 3 | OBJETIVOS | 23 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 24 |
| 5 | RESULTADOS | 32 |
| 6 | DISCUSSÃO | 49 |
| 7 | CONCLUSÃO | 53 |
| | REFERÊNCIAS | 54 |

1 INTRODUÇÃO

Os quatro mais sérios transtornos do humor são: esquizofrenia, depressão, mania e estados de ansiedade. Estes transtornos comprometem o pensamento, vontade própria, percepção, afeição e interação social (KAPLAN; SADOCK, 2005).

A esquizofrenia consiste em um transtorno mental crônico, caracterizado por distorções no pensamento, percepção, emoções, linguagem e comportamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Experiências comuns incluem alucinações - ouvir vozes ou ver coisas que não existem e delírios - crenças falsas e fixas (LARSON; WALKER; COMPTON, 2011). O início dos sintomas acontece, em geral, no final da adolescência ou no princípio da vida adulta e o transtorno deixa variados graus de prejuízo residual (FUSAR-POLI; MEYER-LINDENBERG, 2012). Este transtorno mental afeta cerca de 1% da população adulta, principalmente na faixa etária de 15-35 anos. Apesar de a incidência ser baixa (3-10.000), a prevalência é alta devido ao caráter crônico da desordem. Vale salientar que mais de 50% das pessoas com esquizofrenia não recebem cuidados adequados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

A origem da terminologia do transtorno de esquizofrenia foi formulada pelo psiquiatra suíço Eugen Bleuler, em 1911, aplicando-o para indivíduos que exibiam um padrão desorganizado entre os processos de pensamentos e respostas emotivas. Anteriormente, era utilizado o termo “Demência Precoce” definido por Kraepelin, para um quadro psicótico associado a incapacidades, ocorrendo em adultos jovens de início precoce (SILVEIRA, 2009).

Os indivíduos com esquizofrenia têm prejuízo em seu progresso educacional com frequência, geralmente sendo incapazes de concluir a escolarização ou manter um trabalho por períodos prolongados. Seus relacionamentos interpessoais são negativamente afetados e sua autoestima invariavelmente prejudicada. Grande parte das pessoas com esquizofrenia não chega a casar e também chega a limitar seus contatos sociais. A expectativa de vida para essas pessoas é reduzida em relação à da população em geral, sendo o suicídio um relevante fator, já que 10% dos indivíduos com esquizofrenia o cometem devido à qualidade insuportável dos sintomas (TERMORSHUIZEN et al., 2012).

O quadro clínico é integrado por sintomas positivos, negativos e cognitivos, resultantes de modificações da resposta dopaminérgica. Postula-se em sintomas positivos: delírio (forte crença em ideias que são falsas e sem qualquer base na realidade), alucinações

(geralmente alucinações auditivas, por exemplo, ouvir vozes), psicoses, paranoias, pensamentos desordenados e fala desorganizada, relacionados à hiperatividade dopaminérgica na área mesolímbica. Os sintomas negativos incluem desmotivação, isolamento social, comportamento emocional violento, deficiência cognitiva e fala lenta. Esses sintomas estão relacionados à hipoatividade dopaminérgica nas projeções do córtex pré-frontal (MENEGATTI, 2004). E ainda os sintomas cognitivos são caracterizados por déficit de atenção, aprendizagem, memória, entre outros (HOLCOMB et al., 2004).

Em torno de oitenta por cento dos esquizofrênicos referem um conjunto de sintomas, que abrangem mudanças na percepção, cognição, humor, crenças e comportamento, antes de tornarem-se psicóticos. São os chamados sinais prodrômicos da doença. O restante dos pacientes desenvolve quadros psicóticos agudos, sem sinais prodrômicos (GOURZIS; KATRIVANOU; BERATIS, 2002).

1.1 Fisiopatologia da Esquizofrenia

A compreensão da fisiopatologia da esquizofrenia avançou no último século, evoluindo de teoria etiológica unicausal para modelos mais complexos (ARARIPE NETO; BRESSAN; BUSATTO FILHO, 2007). Estudos têm procurado definir o papel de variáveis biológicas específicas, tais como os bioquímicos, fatores genéticos e as alterações na morfologia cerebral (HASAN et al., 2017). No entanto, várias são as teorias que tentam explicar a esquizofrenia, dentre essas as hipóteses dopaminérgica e glutamatérgica têm sido as mais estudadas (VASCONCELOS, 1997).

A descrição mais conhecida e antiga de associação entre fatores neuroquímicos e a manifestação clínica da esquizofrenia é a “hipótese dopaminérgica”. Essa hipótese sugere que o efeito terapêutico das drogas antipsicóticas ocorre devido ao bloqueio de receptores dopaminérgicos tipo D2 (KAPUR; REMINGTON, 2001), além do fato de que a dopamina liberada no sistema nervoso central (SNC), após intoxicação com estimulantes como amfetamina, pode causar sintomas psicóticos que se assemelham à esquizofrenia (TSOI et al., 2008).

Na teoria dopaminérgica, acredita-se que os sintomas positivos da doença ocorrem como resultado de hiperfunção dopaminérgica no corpo estriado (ABI-DARGHAM; MOORE, 2003; YILMAZ et al., 2012), enquanto os sintomas negativos e déficits cognitivos ocorrem devido a uma diminuição de dopamina pré-frontal provavelmente causada por uma hipofunção

glutamatérgica (ANDREASEN, 1999). O desequilíbrio resultante entre os sistemas dopaminérgicos cortical e subcortical com os glutamatérgicos podem precipitar sintomas psicóticos (PIETRASZEK, 2003).

Assim, o antagonismo de receptores do tipo D2-símile parece ser o principal mecanismo de ação relacionado à eficácia terapêutica de alguns antipsicóticos, além disso, surtos psicóticos podem ser induzidos em indivíduos saudáveis por fármacos facilitadores da neurotransmissão dopaminérgica (YILMAZ *et al.*, 2012). A liberação de DA, induzida por fármacos como anfetamina, a atividade da enzima DOPA descarboxilase e densidade de receptores D2 no corpo estriado de esquizofrênicos podem estar aumentadas em comparação com voluntários saudáveis. Semelhantes achados foram confirmados em pacientes fora de tratamentos com antipsicóticos. Todavia, a síndrome desencadeada pela anfetamina se restringe a manifestações de apenas alguns sintomas positivos do transtorno, não sendo desencadeados os sintomas negativos que também são característicos do transtorno (YILMAZ *et al.*, 2012).

A via glutamatérgica também apresenta forte relação com a esquizofrenia. Estudos sobre o envolvimento do sistema glutamatérgico na esquizofrenia centra-se nos receptores ionotrópicos, que são subdivididas em três subtipos: N-metil-D aspartato (NMDA), ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e cainato (LODGE, 2009; SILVEIRA, 2009). O receptor NMDA é o subtipo mais estudado e relevante para entender a fisiopatologia da esquizofrenia (LIN; LANE; TSAI, 2012). A teoria da hipofunção dos receptores NMDA é fundamentada pela evidência de que antagonistas dos receptores NMDA, como a fenciclidina e cetamina, induziram um quadro clínico semelhante à esquizofrenia com a presença de sintomas positivos, negativos e cognitivos, ao contrário da anfetamina, que só gera sintomas positivos (CHINDO *et al.*, 2012; LIN; LANE; TSAI, 2012). Baseado nesta evidência, os pesquisadores propuseram que a hipofunção dos receptores do tipo NMDA estaria envolvida na complexa fisiopatologia da esquizofrenia e que esse seria um modelo farmacológico mais convincente da doença do que o modelo de hiperfunção dopaminérgica (GONZALEZ-BURGOS; LEWIS, 2012).

Outros fatores importantes na fisiopatologia da esquizofrenia são as anormalidades anatômicas que ocorrem no cérebro em alguns casos de esquizofrenia. Essas anormalidades provavelmente resultam de alterações genéticas e podem estar relacionadas ao desenvolvimento da esquizofrenia. Proeminentes anormalidades anatômicas ocorrem no cérebro em alguns casos de esquizofrenia. Vários achados anatômicos sugerem que o hipocampo, córtex pré-frontal e globo pálido (parte do corpo estriado), estruturas que compõem o sistema cognitivo/límbico, se

encontram prejudicados na esquizofrenia, estando envolvidos nos sintomas positivos, cognitivos e negativos deste transtorno mental (HECKE et al., 2012).

Mais recentemente o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) tem sido envolvido com a neurobiologia da esquizofrenia. Trabalhos mostram que esta neurotrofina é importante para a transmissão sináptica, de maneira que a presença ou ausência do BDNF resulta em alterações em sinapses excitatórias e inibitórias. Pacientes esquizofrênicos tratados e não-tratados apresentam níveis mais baixos de BDNF, também apresentando polimorfismos para esta neurotrofina (FAVALLI et al., 2012).

Estudos mostram também que o estresse oxidativo tem papel relevante na fisiopatologia da esquizofrenia (PADURARIU et al., 2010) e de outras alterações mentais, uma vez que o cérebro é particularmente vulnerável ao dano oxidativo devido à sua alta utilização de oxigênio, seu alto teor de oxidáveis ácidos graxos poliinsaturados e a presença de metais redox-ativa (Cu e Fe) (DO et al., 2009).

Evidências apontam para uma desregulação do metabolismo dos radicais livres na esquizofrenia, detectado pela atividade anormal de enzimas com atividade antioxidante (superóxido dismutase – SOD, glutathione peroxidase e redutase e catalase). Muitos estudos concluíram que há uma diminuição na atividade de enzimas antioxidantes-chave na esquizofrenia, bem como dano oxidativo de membranas pelo aumento na peroxidação lipídica. Estas alterações estão sendo associadas a certos sintomas clínicos do transtorno, bem como com a eficácia da terapêutica utilizada. Por exemplo, os sintomas positivos estão mais correlacionados à atividade da SOD, visto que baixa atividade da SOD foi vista nos eritrócitos de pacientes não tratados, mas o tratamento com haloperidol aumentou significativamente a atividade desta enzima (FENDRI et al., 2005).

Outro importante antioxidante em sistemas biológicos é o óxido nítrico (NO), uma molécula mensageira envolvida em muitos processos fisiológicos e patológicos no organismo de mamíferos, benéficos e prejudiciais (MUSTAFA; GADALLA; SNYDER, 2009). Estudos *post-mortem* têm demonstrado níveis elevados de NO e NOS em tecidos cerebrais de indivíduos com esquizofrenia e têm sugerido que a NOS pode ser ativada na doença (YAO; LEONARD; REDDY, 2004).

Outro achado importante foi demonstrar que o metabolismo enzimático da dopamina leva à geração de peróxido de hidrogênio, que, através da auto-oxidação da dopamina, leva à produção de ROS, como dopamina quinonas e superóxido (FLECKENSTEIN et al., 2007). Estes ROS podem interagir com superóxido dismutase e glutathione, levando a uma

redução nos níveis dos antioxidantes disponíveis (BITANHIRWE, B. K. Y.; WOO, 2011).

1.2 Cetamina como modelo de Esquizofrenia

A esquizofrenia é uma severa desordem cerebral (OZAWA et al., 2006), caracterizada por uma alta variação na sintomatologia, no curso da doença, no prognóstico e no tratamento. Conseqüentemente, os modelos de esquizofrenia, utilizados em animais, são limitados a certos aspectos da doença (BECKER et al., 2003). Nos últimos anos, a psicofarmacologia tem utilizado o modelo animal para o estudo da doença psiquiátrica no laboratório. Infelizmente, no grupo da esquizofrenia, devido à heterogeneidade da doença e à sua complexidade clínica, existe uma multiplicidade de fatores que não podem ser reproduzidos na realidade dos animais (CHINDO et al., 2012; GEYER; MOGHADDAM, 2002).

Nesta perspectiva, a pesquisa em animais representa uma abordagem para o estudo das bases neurobiológicas do cérebro e dos distúrbios comportamentais relevantes para a esquizofrenia, e para estabelecer e avaliar novas terapias farmacológicas para seu tratamento (MEYER; FELDON, 2010). O uso de modelos animais permite um controle experimental rigoroso e facilita a identificação de fatores neurobiológicos relacionados com a esquizofrenia e outras anormalidades comportamentais (MEYER; FELDON, 2010).

O modelo farmacológico da esquizofrenia consiste na administração aguda ou crônica de cetamina, causando hipofunção desses receptores. Fundamentando-se desta forma, na hipótese glutamatérgica da esquizofrenia, a qual presume que a inibição dos receptores de NMDA modula o sistema dopaminérgico mesolímbico, levando ao quadro de psicose (BUBENÍKOVÁ-VALEŠOVÁ et al., 2008).

Vale salientar que substâncias psicoativas em humanos tais como a anfetamina e antagonistas de receptores de glutamato do tipo NMDA, fenciclidina e cetamina, podem induzir sintomas tipo esquizofrenia-*like*. Esses fármacos modulam de maneira direta ou indireta, a atividade do sistema dopaminérgico, cuja disfunção é importante na esquizofrenia, como demonstrado pela atenuação exercida pelos neurolépticos sobre certas manifestações da doença (SALGADO; HETEM; SANDNER, 2006).

A cetamina é um anestésico dissociativo que age afetando a atividade glutamatérgica via bloqueio do receptor NMDA. Devido ao bloqueio do influxo de Ca^{2+} , os antagonistas do receptor NMDA promovem uma diminuição dos níveis de óxido nítrico

neuronal (BECKER et al., 2003).

Foi demonstrado que a injeção repetida de doses subanestésicas de cetamina induz mudanças sutis na distribuição celular de proteínas “sensor de cálcio”, que em parte se assemelham àquelas descritas em cérebros *post-mortem* de humanos esquizofrênicos (BERNSTEIN; BOGERTS; KEILHOFF, 2005). Além disso, também é conhecido que a cetamina agrava sintomas negativos em alguns pacientes com esquizofrenia e induz ou piora o comprometimento cognitivo (LI et al., 2003).

Os antagonistas dos receptores de NMDA exacerbam sintomas psicóticos em pacientes esquizofrênicos e induzem sintomas positivos e negativos semelhantes a este transtorno em indivíduos saudáveis (D’SOUZA et al., 2012). Dentre os antagonistas NMDA, a cetamina tem recebido atenção em uma série de trabalhos científicos, apresentando validade de face, constructo e preditiva (CHINDO *et al.*, 2012; BECKER *et al.*, 2003).

1.3 Inibição Pré-pulso como teste para estudo da esquizofrenia

Um dos modelos comportamentais mais utilizados para a avaliação dos sintomas da esquizofrenia é o modelo da inibição pré-pulso (IPP) do sobressalto, que oferece uma medida operacional do filtro sensorio-motor refletido pela capacidade de inibição de um reflexo de sobressalto, quando um estímulo sensorial é precedido por outro de menor intensidade (S. HOFFMAN; R. ISON, 1980). Este reflexo pode ser encontrado em diferentes espécies de mamíferos, incluindo seres humanos, primatas e roedor (WEISS; FELDON, 2001). A habilidade de discriminar estímulos externos de relevância fisiológica ou cognitiva, fornecida pelo filtro sensorio-motor, está comprometida em indivíduos com determinados transtornos psiquiátricos (SALUM et al., 2008).

A IPP é uma forma de plasticidade do reflexo do sobressalto, caracterizada por uma redução normal do sobressalto em resposta a um estímulo auditivo intenso (pulso), quando este é precedido imediatamente (30-500 ms) por um estímulo mais fraco (pré-pulso) (WEISS; FELDON, 2001).

O reflexo de sobressalto é uma resposta natural de defesa do animal, que envolve uma rápida contração dos músculos da face e corpo, e ocorre em resposta a um estímulo intenso e inesperado. Esta reação é um resultado incontrollável e espontâneo que pode ser emitida por diferentes modalidades de estímulos (auditivo, tátil ou visual). A ativação de processos cerebrais é intensificada em resposta ao estímulo fraco, impedindo a responsividade a eventos sensoriais

subsequentes durante uma breve janela temporal. Este período protege a informação contida no estímulo inicial, para que seja adequadamente processado, durante o qual, apenas estímulos suficientemente salientes serão capazes de ultrapassar este filtro protetor (GIAKOUMAKI, 2012).

Fármacos indutores de sintomas da esquizofrenia em seres humanos, como a fenciclidina, cetamina, anfetamina, cocaína e a apomorfina reduzem a IPP. Essa ação pode ser revertida pelo tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos, mas nem sempre é abolida (ISSY; SALUM; DEL BEL, 2009). A modulação do sistema dopaminérgica da IPP é complexa e variável entre as espécies. O dano na IPP, causado por fármacos ligados ao sistema dopaminérgico, inclui a estimulação de vários subtipos de receptores para sua completa manifestação (SWERDLOW; GEYER, 1998).

1.4 Tratamento Farmacológico da Esquizofrenia

Até a introdução dos antipsicóticos na prática clínica, o tratamento para a esquizofrenia consistia em fornecer aos pacientes um ambiente seguro e de suporte, como as longas estadias em hospitais psiquiátricos, esperando a remissão espontânea (TANDON; NASRALLAH; KESHAVAN, 2010).

O princípio da psicofarmacologia contemporânea tem como marco inicial a descoberta dos neurolépticos em 1952 (SILVA, 2006). Os medicamentos antipsicóticos (APD) são a primeira linha farmacoterapêutica para o tratamento da Esquizofrenia (MOLTENI et al., 2009). Esses fármacos são classificados em antipsicóticos típicos ou de primeira geração e antipsicóticos atípicos ou de segunda geração (KEEF, 2007). Os antipsicóticos de primeira geração são classificados em fenotiazinas, butirofenonas, difenilbutilpiperidinas, tioxantenos e benzamidas substituídas. Antipsicóticos de segunda geração incluem fármacos como: clozapina, aripiprazol, olanzapina, risperidona, quetiapina e ziprasidona (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

Os antipsicóticos típicos são bem efetivos na redução dos sintomas positivos (alucinações e delírios) em uma grande proporção de pacientes; entretanto, esses medicamentos têm efeitos mínimos contra sintomas negativos e cognitivos, além de causarem uma série de efeitos colaterais sobre o sistema extrapiramidal como a discinesia tardia (TANDON; NASRALLAH; KESHAVAN, 2010). Contudo, os atípicos são eficazes nos sintomas negativos

e de deterioração cognitiva (KEEF, 2007), apresentam menos efeitos colaterais no sistema extrapiramidal, são eficazes no tratamento de pacientes refratários e na diminuição do comportamento suicida (TANDON; NASRALLAH; KESHAVAN, 2010).

Embora o principal mecanismo de ação dos antipsicóticos típicos seja o bloqueio de mais de 80% dos receptores D2. O mecanismo de ação dos atípicos não é tão claro. Esse grupo de fármacos parece exercer seus efeitos antiesquizofrênico através de uma ação em diferentes tipos de receptores (antagonismo D2, antagonismo D4, antagonismo/agonismo 5HT - em diferentes subtipos) (TANDON; NASRALLAH; KESHAVAN, 2010).

Novas drogas antipsicóticas, que não seguem o princípio farmacológico da dopamina e serotonina (BIEDERMANN; FLEISCHHACKER, 2011) são projetadas para agir em outros sistemas de receptores (especialmente sistemas glutamatérgico e colinérgico), como os agentes promissores LY-404039, um agonista seletivo do receptor metabotrópico MGlu 2/3 (PATIL et al., 2007) e AVE 1625, um agonista do receptor canabinoide-1 (BLACK, M.D., STEVENS, R.J., ROGACKI, 2011).

Neste contexto, os antipsicóticos causam uma série de alterações neurológicas, metabólicas, cardiovasculares, gastrintestinais, hematológicos, gênto-urinárias, músculo-esqueléticas, endócrinas e outros efeitos colaterais (TANDON; NASRALLAH; KESHAVAN, 2010). Os antipsicóticos, principalmente os chamados típicos, apresentam importantes eventos adversos, que incluem o parkinsonismo com a tríade clássica tremor, rigidez, bradicinesia ou acinesia e outros sinais psicomotores característicos desta doença como a diminuição dos reflexos posturais e salivação excessiva. Acatisia (ansiedade, inquietação), distonia aguda (espasmos involuntários dos músculos), discinesia tardia (movimentos involuntários anormais da língua, cabeça, face, boca), síndrome neuroléptica maligna (rigidez muscular intensa e aumento da temperatura), convulsões e efeitos periféricos nos sistemas gastrintestinal e cardiovascular também podem acompanhar o uso dos antipsicóticos, além de aumento de peso e dos níveis de prolactina. Além de efeitos colaterais como agranulocitose, hipotensão, ganho de peso e galactorreia relacionados com os antipsicóticos atípicos.

1.5 Erythrina velutina

Historicamente, os produtos naturais têm sido muito promissores como fontes de novas drogas para a prevenção e tratamento de várias doenças, incluindo aquelas do SNC. As plantas medicinais e seus derivados estão entre os principais recursos disponíveis, nos países em desenvolvimento e emergentes, e vêm sendo há muito utilizadas no cuidado a saúde pela população brasileira, seja na medicina tradicional ou nos programas de fitoterapia do sistema único de saúde - SUS.

O Brasil é possuidor de uma rica biodiversidade e conhecimentos tradicionais, porém, apesar dessa grande biodiversidade, somente uma pequena parcela tem sido estudada cientificamente quanto ao seu potencial terapêutico e produção de medicamento fitoterápico.

No Brasil, atualmente, consomem-se fitoterápicos na sua grande maioria desenvolvidos na Europa e nos Estados Unidos. É, portanto, indispensável a formação de recursos humanos qualificados e o desenvolvimento de programas direcionados para a pesquisa científica e tecnológica na área, buscando soluções na privilegiada biodiversidade brasileira, através da descoberta de novas moléculas com atividade terapêutica propondo elucidações na rica biodiversidade brasileira por meio da investigação de novas moléculas com atividade terapêutica ou do desenvolvimento de fitoterápicos genuinamente nacionais (SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

O gênero *Erythrina* é composto de plantas da divisão *Magnoliophyta* (*Angiospermae*), pertencentes à ordem *Fabales* a família *Fabaceae* (CARVALHO; MARCHINI, 1999). A ordem *Fabales* considerada uma das mais importantes, sendo que a família *Fabaceae* (*Leguminosae*) possui um expressivo número de espécies, em todo o planeta. Contudo, sua presença maior encontra-se nas zonas tropicais. Contém aproximadamente 18.000 espécies (uma das maiores ordens) de grande valor econômico, como alimentos (frutos, sementes ou a planta inteira), ou com finalidades medicinal e industrial (gomas, óleos e perfumes), além de serem plantas ornamentais (DI STASI LC, 2002).

Fig 01. Aspectos botânicos da *Erythrina velutina*

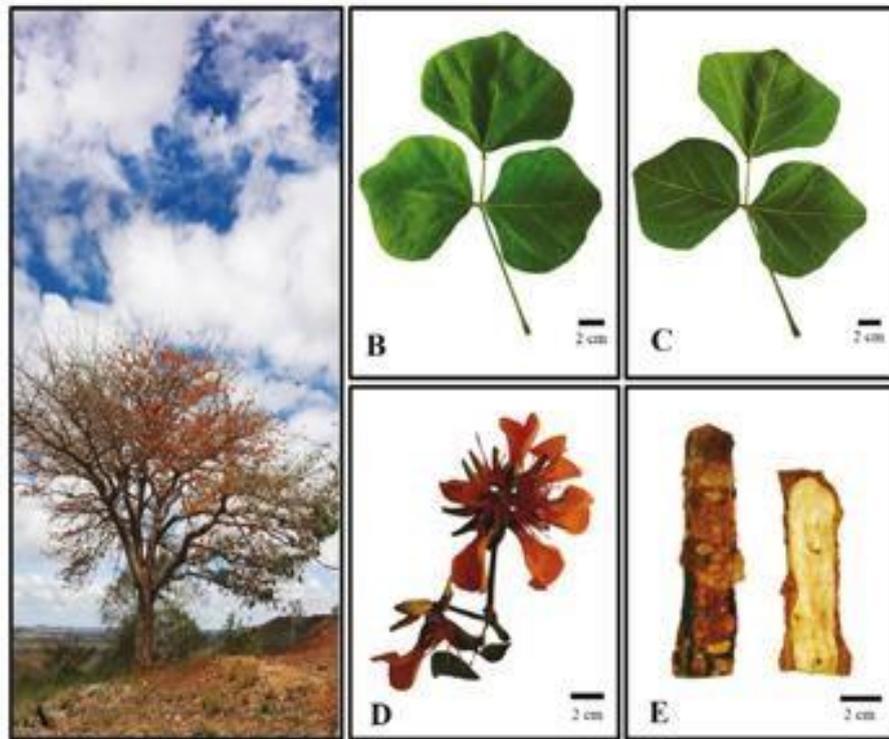


Figura botânica da *Erythrina velutina* Willd. A. Indivíduo no campo; B. superfície adaxial do imparipinado; C. Superfície Abaxial da folha; D. Ramo Florido; E. Aspecto do Caule. Fonte: SILVA *et al.* 2013.

O gênero *Erythrina* é composto por mais de 115 espécies distribuídas através das regiões tropicais do mundo (CARVALHO; MARCHINI, 1999). O nome *Erythrina* origina-se do grego *erythros*, que significa vermelho, em referência à cor das flores das plantas.

Muitas ações farmacológicas têm sido demonstradas pelo gênero *Erythrina*. Dentre essas podemos citar: osteoproteção- *Erythrina variegata* (ZHANG *et al.*, 2010); antibacteriana- *Erythrina caffra* (CHUKWUJEKWU *et al.*, 2011) e antineoplásico- *Erythrina abyssinica* (NGUYEN *et al.*, 2009).

No Brasil, temos algumas espécies de *Erythrina*, como a *E. velutina* e *E. mulungu*. O gênero *Erythrina* é conhecido como mulungu, a denominação abrange as espécies *E. velutina* e *E. mulungu*. A espécie *E. velutina* é uma árvore nativa da caatinga do Nordeste brasileiro, utilizada casualmente no paisagismo por ser muito ornamental em floração (VASCONCELOS *et al.*, 2004). A *E. velutina* é largamente utilizada na medicina popular brasileira. Segundo LORENZI, H.; MATOS (2002), as cascas do caule da *E. mulungu* são usadas desde muito

tempo, pelas populações indígenas, como sedativo. Na medicina herbária, é considerada um excelente sedativo para diminuir a ansiedade, acalmar a tosse e para outros problemas do sistema nervoso, incluindo agitação psicomotora e a insônia (BRAGA, 1976). É também largamente empregada contra asma, bronquite, hepatite, gengivites, inflamações hepáticas e esplênicas, além de febres intermitentes. Já na *E. velutina*, a casca do caule, folhas e flores são empregadas na medicina popular em algumas regiões do Nordeste, com propriedades sudorífica, calmante, emoliente e peitoral; e o fruto seco que tem ação anestésica local, e usado na forma de cigarro, como odontálgico. Emprega-se o infuso da casca do caule, como sedativo e calmante de tosse e bronquite, bem como para o tratamento de verminoses e hemorroidas; emprega-se seu cozimento (decocto) no tratamento de abscessos nas gengivas (LORENZI, H.; MATOS, 2002).

Estudos científicos com a *E. velutina* têm confirmado seus vários usos populares através das atividades farmacológicas dessas plantas (RIBEIRO et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2011).

Em um trabalho recente, MACHADO *et al.* (2013) demonstraram que inibidores de peptidases isoladas de sementes de *E. velutina* possuem ação anti-inflamatória e anticoagulante. Esse efeito anti-inflamatório também foi observado pelo nosso grupo (VASCONCELOS et al., 2011) após administração oral do extrato (200 ou 400 mg/kg) de *E. velutina* e *E. mulungu* nos modelos de edema de pata induzido por carragininina e dextrano em camundongos.

Várias ações da *E. velutina* são demonstradas no SNC (CARVALHO et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2004). Trabalho realizado por Oliveira *et al.* (2000) mostrou que o extrato aquoso interfere com a atividade locomotora em camundongos e provavelmente afeta mecanismos envolvidos com a formação da memória. Em uma recente dissertação de mestrado realizado pelo nosso grupo foi demonstrado que o extrato padronizado obtido da casca do caule de *E. velutina* (200 ou 400 mg/kg) reverteu o déficit de memória induzido por isquemia cerebral global e apresentou um efeito neuroprotetor em camundongos (RODRIGUES et al., 2017). Ainda sobre essa temática, Santos *et al.* (2012) demonstraram que o extrato aquoso e extrato rico em alcaloides obtidos das folhas de *E. velutina* foram capazes de inibir a atividade das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase em cérebros de camundongos. Analisando esses resultados, podemos sugerir que a *Erythrina velutina* apresenta efeito positivo na memória provavelmente por uma via relacionada com o aumento de acetilcolina no sistema nervoso central.

Erythrina velutina também tem demonstrado ação anticonvulsivante (Moreira *et al.*, 1998). Trabalhos prévios em nosso laboratório também demonstraram efeito anticonvulsivante

da *E. velutina* em modelo de convulsões induzido pelo pentilenotetrazol (VASCONCELOS et al., 2007). Resultado semelhante foi observado por Faggion et al. (2011) onde os alcaloides (+)-erythravine e (+)-11-hidroxi- α erythravine isolados a partir de flores de *Erythrina mulungu* apresentaram um efeito anticonvulsivantes em modelos de convulsão induzidas quimicamente (bicuculina, pentilenotetrazol, ácido cáfnico, N-metil-D-aspartato/NMDA) em ratos.

Dentre as ações farmacológicas pesquisadas sobre *E. velutina*, o efeito ansiolítico é o mais evidente. Estudos realizados por VASCONCELOS et al. (2004) demonstraram que estas espécies possuem ação ansiolítica, no teste de *plus maze* (Labirinto em cruz elevada), quando administrado em doses de 200 a 400 mg/kg em tratamento agudo. RAUPP et al., (2008) também encontraram que a administração crônica do extrato hidroalcoólico da casca do caule de *E. velutina* (100 mg/kg) exercem um efeito ansiolítico em camundongos. Esses resultados são corroborados por (ONUSIC et al. (2003) e RIBEIRO et al. (2006).

A ação ansiolítica também é observada em alcaloides isolados do gênero *Erythrina*. SANTOS ROSA et al. (2012) mostraram que a erisotrina, um alcaloide isolado das flores de *E. mulungu*, apresentou efeito ansiolítico no teste de *plus maze* (Labirinto em cruz elevada). Em um trabalho realizado por Fausino e colaboradores (2007), os pesquisadores encontraram que a administração aguda de eritravine e (+)- 11 α -hydroxy-erythravine, alcaloides isolados das flores de *E. mulungu*, são os responsáveis pela ação ansiolítica do extrato cru dessa planta.

Outra ação importante da *Erythrina velutina* é o efeito depressor do SNC. Vasconcelos e colaboradores (2004) observaram que administração aguda, em doses altas (800 mg/kg, vo ou ip), dos extratos hidroalcoólicos de *E. velutina*, apresentou ação depressora no SNC de camundongos. Efeitos semelhantes foram observados com frações clorofórmicas obtidas da casca do caule da *E. velutina* (VASCONCELOS et al., 2009).

Trabalhos recentes em nosso laboratório (dados não publicados) têm demonstrado que os extratos padronizados obtidos da casca do caule e folhas da *E. velutina* têm demonstrado efeito de catalepsia e prevenção da estereotipia induzida pela apomorfina, o que sugere uma ação no sistema dopaminérgico. Esse sistema é sabidamente associado ao mecanismo da fisiopatologia da esquizofrenia e é alvo para o mecanismo de ação dos fármacos antipsicóticos, principalmente os típicos, como haloperidol.

Baseado no uso popular da planta como sedativo e aos efeitos farmacológicos encontrados no SNC, resolvemos pesquisar, através do presente projeto, os efeitos antipsicóticos do extrato etanólico padronizado (HPLC-PDA) obtido das folhas da *E. velutina* em camundongos avaliando através do modelo de esquizofrenia induzida pela administração

subcrônica de cetamina, e a prevenção das alterações comportamentais desencadeadas por este antagonista NMDA de maneira similar ao protocolos de prevenção. Nestes animais, também serão avaliados os possíveis mecanismos de ação desse extrato.

1.6 Sistema imune e Esquizofrenia

Novas pesquisas têm mostrando uma comunicação bidirecional entre o sistema imune e sistema nervoso central, levando a questionamento de como ocorreria a interação entre cérebro e sistema imune e como essa interação poderia levar ao desenvolvimento de processos neuropatológicos (MAES, 1999; NUNES et al., 2002). Vários trabalhos têm demonstrado que pacientes com esquizofrenia apresentam um aumento do número de células e citocinas pró-inflamatórias, quer na circulação periférica quer no líquido cefalorraquidiano (MEYER, 2011; MILLER et al., 2011; POTVIN et al., 2008). Outros trabalhos têm mostrados aumento nas células Th1 e Th2, e das micróglia, além do aumento da proteína C reativa, que apresentou um aumento associado a prejuízos cognitivos, e não sintomas psiquiátricos em pacientes esquizofrênicos (AGUIAR et al., 2010).

As micróglia, comumente referida como a população de macrófagos especializados do SNC, são células da glia com maior plasticidade, alterando sua morfologia consoante o estado de ativação. Devido à sua morfologia distinta, são necessários usar marcadores específicos para as sua identificação e quantificação como CD45, CD11b, CD68, o *Major Histocompatibility Complex – Class II* (MHC II) e o *Ionized calcium-Binding Adaptor molecule 1* (Iba-1) (BOSCH et al., 2013).

A molécula de ligação ao cálcio IBA-1, descoberta em 1996, é uma proteína de 17kDa consistindo em 147 aminoácidos e codificante para o *Allograft Inflammatory Factor-1* (AIF-1), presente na região do complexo MHC III. A expressão de IBA-1 parece ser específica para a micróglia *in vitro* e *in vivo*, constitutiva e independente do seu estado de ativação, e terá um papel importante na regulação da função da micróglia (especialmente quando ativada) (ITO et al., 2001). ARION e colaboradores (2007) revelaram a nível molecular, utilizando técnica de *microarray*, um aumento da expressão de genes da função imune no cortex pré-frontal de doentes com esquizofrenia.

As citocinas compreendem um grupo heterogêneo de moléculas mensageiras que são produzidas por células imunocompetentes tais como linfócitos e macrófagos, afim de regular a resposta imune. Essas citocinas também podem ser produzidas por astrócitos e micróglia,

além de sua produção já ser encontrada em vários locais do cérebro como regiões circumventriculares, hipotálamo, hipocampo, cerebelo, regiões do prosencéfalo, gânglios basais e núcleos do tronco encefálico. As citocinas podem ser divididas em duas categorias: pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. O primeiro grupo é formado por citocinas com um efeito direto ou indireto no processo inflamatório como interleucinas 1 (IL-1), IL-6, interferon gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (MAES, 1999).

Atualmente, o conhecimento da inflamação é dado pelo estudo da grande família de receptores de IL1 e TNF- α e os receptores de reconhecimento padrão (PRR, no inglês *Pattern Recognition Receptor*) para microorganismos semelhante ao Toll (TLRs, no inglês *Toll-like Microbial Pattern Recognition Receptors*). Os TLR representam um grande sistema de reconhecimento inespecífico fortemente ligado à inflamação. Esses receptores usam um mecanismo semelhante de sinalização transcricional que incluem a ativação da quinase I κ B e do NF- κ B. O NF- κ B apresenta duas via de sinalização, sendo uma denominada de via canônica, pois é a principal via de estimulação por produtos de microorganismos e por citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-1 (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; KARIN; BENNERIAH, 2000; LAWRENCE, 2009).

As citocinas por serem moléculas grandes não são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica em condições fisiológicas. Evidências indicam que essas moléculas podem atravessar a barreira em locais específicos como “*organum vasculosum laminae terminalis*” (OVLT) e na eminência média, podendo também atravessar a barreira por traumas causados por doenças, tais como esclerose múltipla e outras doenças neurodegenerativas, por transporte ativo e até o próprio TNF- α em determinadas condições, poderia ajudar causando danos na barreira (LAWRENCE, 2009).

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A esquizofrenia consiste em um transtorno mental crônico caracterizado por sintomas positivos, negativos e cognitivos (LARSON; WALKER; COMPTON, 2010). O início dos sintomas ocorre geralmente no final da adolescência ou início da vida adulta e o transtorno deixa variados graus de prejuízo residual. Muitos pacientes esquizofrênicos, principalmente os com sintomas negativos, acabam não conseguindo ser reinseridos na sociedade, após o diagnóstico da doença.

Muitos antipsicóticos usados no tratamento da esquizofrenia são ineficazes e outros apresentam efeitos colaterais incapacitantes ao paciente, por exemplo, efeitos catatônicos. Estudos mostram que os pacientes esquizofrênicos têm uma média de vida menor que a população geral. Isso ocorre principalmente pelos efeitos colaterais dos antipsicóticos, principalmente os cardiometabólicos (MITTAL et al., 2014) ou os episódios de suicídios (VERMA, 2012) resultantes dos surtos psicóticos. Assim, novos arsenais terapêuticos precisam surgir para o tratamento da esquizofrenia.

Baseado no fato de que as plantas medicinais podem ser ferramentas importantes para o tratamento de algumas patologias relacionadas ao sistema nervoso central, entre elas os transtornos mentais, principalmente devido à sua baixa toxicidade, fácil acesso pela população e aos estudos prévios que mostram que as espécies do gênero *Erythrina* têm demonstrado ação importante no sistema nervoso central, decidimos investigar sua ação no modelo de esquizofrenia induzida por cetamina. Esse modelo mimetiza sintomas positivos, negativos e cognitivos da esquizofrenia, podendo ser avaliado pelos testes comportamentais (Campo Aberto, IPP), neuroquímicos e pela expressão imune, como ferramentas para a abordagem de sintomas positivos, negativos e cognitivos deste transtorno.

Assim busca-se, com esse estudo, iniciar o processo de produção de um agente terapêutico potencialmente eficaz, viável e de baixo custo que possa ser utilizado no tratamento da esquizofrenia, patologia de curso prolongado e muitas vezes refratária ao tratamento farmacológico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos antipsicóticos do extrato etanólico padronizado (HPLC-PDA) das folhas da *E. velutina* na prevenção das alterações induzidas por cetamina, um modelo farmacológico de esquizofrenia, em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

Verificar a prevenção das alterações comportamentais em animais adultos, submetidos ao modelo de esquizofrenia induzida por cetamina, pelo tratamento com extrato etanólico padronizado das folhas da *E. velutina*, utilizando os testes de campo aberto, inibição pré-pulso (teste padrão para a determinação de sintomas positivos e negativos da esquizofrenia), teste de interação social e nado forçado;

Determinar os níveis de defesas antioxidantes (SOD e GSH e na peroxidação lipídica – TBARS) em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos submetidos ao modelo de esquizofrenia por cetamina e tratados com o extrato etanólico padronizado das folhas da *E. velutina*;

Determinar os marcadores de ativação da micróglia, marcadores inflamatórios e de sinalização protetora através da técnica de *Western Blotting*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 260 camundongos (*Mus musculus*) machos (peso: 20-30 g), provenientes do biotério central da Universidade Federal do Ceará (UFC) dentro do protocolo descrito abaixo. Os animais foram mantidos em grupos de dez animais por caixa (de acordo com o fornecimento do biotério), com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) com um ciclo claro/escuro de 12 h, com água e ração animal *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) já tendo sido aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal (CEPA-UFC) com o nº 67/2014.

4.2 Preparação do extrato

As folhas de *E. velutina* foram coletadas no município de Mulungu-Ceará. A Exsicata da espécie de *E. velutina* (nº 44802) encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará e da *E. Mulungu* Departamento de Biotecnologia vegetal da Universidade de Ribeirão Preto (nº HPM- 0032).

O extrato etanólico da planta foi produzido e padronizado, segundo metodologia desenvolvida anteriormente pelo nosso grupo/Laboratório de Farmacognosia – UFC (VASCONCELOS; REBOUÇAS; FONTELES, 2003). A seguir, após caracterização quanto ao teor de fenóis totais por espectrofotometria e teores dos flavonoides (marcadores: hesperidina e homohesperidina) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo diodo (CLAE-DAD), os extratos foram submetidos a secagem por *spray drying* com incorporação de adjuvantes de secagem (pré- formulação).

4.3 Esquema de indução dos sintomas da esquizofrenia pela administração de cetamina e tratamento dos animais

Foram feitos os protocolos de prevenção para simular a fase de manutenção do

episódio agudo de esquizofrenia (DEROZA et al., 2012). Os animais foram tratados com extrato etanólico de *E. velutina* em três doses (100, 200 e 400 mg/kg, vo) no 1º ao 7º dia (Tabela 1). Em seguida, foi administrada cetamina na dose de 25 mg/kg, i.p do 8º dia ao 14º dia em todos os grupos em associação (DEROZA et al., 2012). Como droga antipsicótica padrão será utilizada a olanzapina 2 mg/kg, v.o do 1º dia ao 14º dia (NINAN; KULKARNI, 1999).

Tabela 1. Divisão dos grupos experimentais

| Protocolos/Grupos | 1º-7º dias de tratamento | 8º - 14º dias de tratamento |
|-------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Prevenção | | |
| Controle | Salina | Salina |
| Extrato | Eryt 100, 200 ou 400; | Eryt 100, 200 ou 400; |
| Sal + Cet | Salina | Salina - 60min – Cetamina |
| Extrato + Cet | Eryt 100, 200 ou 400; | Eryt 100, 200 ou 400;– Cetamina |
| Olanzapina + Cet | Olanz | Olanz – 60 min – Cetamina |

Legenda: Cet = cetamina 25 mg/kg (i.p.); Olanz = Olanzapina; Eryt = Extrato etanólico da *E. velutina*- 100, 200 ou 400 mg/kg, v.o.

No 14º dia de tratamento do protocolo de prevenção, as determinações comportamentais foram realizadas em diferentes grupos de animais, por exemplo, os animais que realizaram os testes de nado forçado foram submetidos apenas a esta metodologia, os animais que se submeterem ao teste de inibição pré-pulso foram submetidos, após este experimento, ao teste de interação social. Estes testes foram aplicados individualmente 60 min após a última injeção das drogas. Os animais foram sacrificados, por decapitação, após os testes comportamentais, para coleta das seguintes áreas cerebrais córtex pré-frontal- CPF, hipocampo- HC e corpo estriado-CE, as quais foram rapidamente congeladas e armazenadas a -80° C até as análises neuroquímicas.

4.4 Testes comportamentais

4.4.1 Teste de Campo Aberto (ARCHER, 1973)

Com a finalidade de avaliar a atividade locomotora, comportamento exploratório e ansiedade dos camundongos, foi aplicado o Teste de Campo Aberto- TCA. A atividade motora geral dos animais foi avaliada por meio de observação direta dos mesmos no campo aberto. O campo aberto para camundongos é feito de acrílico, paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm, dividido em 9 quadrantes iguais. A metodologia de Archer, desenvolvida no ano de 1973, foi utilizada para avaliar a atividade exploratória do animal. Cada camundongo foi colocado no centro do aparato e em um período de cinco minutos, após um minuto de habituação, foram registados os seguintes parâmetros: número de cruzamentos com as quatro patas (Atividade Locomotora Espontânea-ALE) e número de comportamentos de autolimpeza (“grooming”). Antes da introdução de cada animal para a área, o aparato foi limpo com álcool 10% para eliminar possível viés devido aos odores que poderiam permanecer nas superfícies dos animais anteriores (RODRIGUES *et al.*, 2002).

4.4.2 Teste de Inibição Pré-pulso (IPP) (LEVIN et al., 2011)

A reação corporal dos roedores a um estímulo acústico foi monitorada em uma câmara (INSIGHT equipamentos científicos – Brasil modelo EP-175) conectada a um tubo (diâmetro 8,2 cm, comprimento 20 cm) montada em uma caixa fechada ventilada.

Os camundongos foram colocados em um contensor (4,5×5,0×5,5 cm) consistindo de barras de aço inoxidável de 3,0 mm de diâmetro com espaçamento de 0,8 centímetros de distância. O contensor foi mantido preso sobre uma balança, chamada plataforma de resposta, através de quatro 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 colocados dentro de uma câmara acústica ventilada (64×60×40 cm). Procedimentos de calibração foram realizados antes dos experimentos para garantir sensibilidades equivalentes das plataformas de resposta ao longo do período de teste.

A sessão de testes começa ao se colocar um animal no contensor para a aclimação, que consiste em uma exposição de 5 minutos ao ruído de fundo (65 dB). Após o período de

aclimatação os camundongos foram apresentados a uma série de 10 estímulos de treino (pulso sozinho - 120 dB, 50 ms de duração), com um ensaio de intervalo de 20s. O objetivo desta fase foi permitir a habituação da resposta de sobressalto do animal. Posteriormente, a modulação IPP de sobressalto foi testada no seguinte protocolo: 74 ensaios pseudorandomizados divididos em oito categorias diferentes, apresentados com um intervalo inter-estímulos de 20 s: 20 apresentações de pulso sozinho (120 dB, 50 ms de duração), 8 apresentações de cada intensidade de pré-pulso sozinho (70,75 e 80 dB, frequência 3000 Hz, 20 ms de duração), 10 apresentações de cada intensidade de pré-pulso + intensidade de pulso (com intervalo de 50ms entre pré-pulso e pulso) e ausência de estímulo, nesse bloco o animal só recebe o estímulo de ruído de fundo (adaptado de GURURAJAN *et al.*, 2010).

A média da amplitude de resposta de sobressalto aos ensaios de pulso sozinho (P) e pré-pulso + pulso (PP+P) foram calculados pelo *software* para cada animal. O nível de IPP em cada camundongo foi definido como a porcentagem da redução da amplitude do sobressalto nos ensaios de PP + P em comparação com a amplitude do sobressalto nos ensaios de P, de acordo com a seguinte fórmula: $\% \text{ PPI} = 100 - [100 \times (\text{PP} + \text{P} / \text{P})]$. Usando esta fórmula, um valor de IPP de 0% denota que não houve diferença entre a amplitude da resposta de sobressalto do pulso sozinho e do pré-pulso + pulso, conseqüentemente, não houve IPP (LEVIN *et al.*, 2011). Espera-se que o grupo de animais administrados apenas cetamina apresentem déficits neste teste comportamental.

4.4.3 Teste de interação social

Para a avaliação dos sintomas negativos pelo teste de interação social, os animais foram colocados em uma caixa com 3 compartimentos. Em um dos compartimentos laterais havia um animal do mesmo sexo e idade dentro de uma gaiola, na outra lateral havia uma gaiola semelhante sem animal no seu interior, o meio da caixa permaneceu livre. Foi avaliado neste teste o tempo que o animal permaneceu explorando o compartimento com animal e sem animal durante 5 minutos (KOSHIMIZU; LEITER; MIYAKAWA, 2012). Foi medido o tempo gastado em cada uma das três câmaras e a preferência social foi definida como: $(\% \text{ o tempo gastado na câmara social}) - (\% \text{ o tempo gastado na câmara oposta})$.

4.4.4 Nado forçado

O tempo de imobilidade foi avaliado através do teste de Nado Forçado. Esse teste foi realizado de acordo com o modelo de Porsolt *et al.* (1977). Os animais foram colocados no cilindro com água, e a duração total da imobilidade (em segundos) foi registrada durante cinco minutos. O camundongo foi considerado imóvel quando ele permaneceu flutuando passivamente em posição vertical, podendo fazer até leves movimentos para manter-se acima do nível da água.

4.5 Testes de Estresse Oxidativo

Após o último teste de comportamento, os animais foram sacrificados por rápida decapitação e seus cérebros foram removidos e lavados em solução salina gelada. O tempo de morte dos animais foi semelhante ao tempo de observação dos testes comportamentais, com objetivo de estudar uma possível associação entre esses efeitos. As regiões cerebrais importantes na fisiopatologia da esquizofrenia [córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e corpo estriado (CE)] foram dissecadas, congeladas e armazenadas a -80°C até serem utilizadas para os ensaios. As áreas selecionadas foram homogeneizadas a 10% de solução tampão para realização dos experimentos neuroquímicos descritos a seguir.

4.5.1 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)(GRIFFITH, 1980)

Os homogenatos foram adicionados a ácido tricloroacético a 50%, agitados e centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida o sobrenadante foi recolhido e acrescido de tampão Tris-HCl 0,4M, pH 8,9 e DTNB 0,01M. Após 1 minuto da reação, a leitura foi feita em leitor de placas em 412nm. A concentração de glutathiona reduzida foi expressa em ng de GSH/g de tecido, tendo por base uma curva padrão.

4.5.2 Avaliação da peroxidação lipídica (MAYAS *et al.*, 2002)

Foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15 %. Um valor de 0,25 mL do homogenato foi misturado a 1 mL de solução de ácido tricloroacético a 10% e acrescido de 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Após a agitação, essa mistura foi mantida em um banho de água fervente (95 -100°C) por 15 min., adicionado o n-butanol (2:1 v/v), a seguir resfriada em banho de gelo por alguns minutos e posteriormente centrifugada (800 x g, 5 min). O conteúdo de TBARS foi determinado em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos em micromol de malondialdeído (MDA)/g de tecido.

4.5.3 Determinação dos níveis de Nitrito (GREEN *et al.*, 1981)

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

4.6 Técnica de *Western Blotting*

A evolução da biologia molecular trouxe contribuições relevantes para o entendimento de diversas doenças. A técnica de *Western Blotting*, definidas também como: *protein blotting* ou *immunoblotting* é muito utilizada na biologia molecular para detecção de proteínas específicas em um homogenato (células trituradas) ou em um extrato de um tecido biológico. A referida técnica é considerada como um método altamente sensível, específico e de rápido resultado, consiste na detecção, caracterização e quantificação de múltiplas proteínas

(KURIEN; SCOFIELD, 2006).

O resumo do protocolo básico de *Western Blotting* pode ser identificado nas seguintes etapas: preparação das amostras e fracionamento de proteínas, execução da eletroforese em gel, transferência das proteínas separadas do gel para uma membrana adsorvente, bloqueio de ligações inespecíficas, adição de anticorpo específico e detecção da reação (MIGUEL; MENEZES; ARAÚJO, 2012).

No presente estudo para avaliar a expressão das proteínas NFκB (fração citoplasmática e nuclear), IBA-1 (proteína marcadora de micróglias), AKT (Proteína quinase B) e fosfo-AKT, foram realizados ensaios de imunoblotting com os extratos hipocâmpais. Para isso, uma amostra de 100 µl do extrato foi preparada com tampão de amostra (composto de SDS 2,1%, glicerol 26,3%, azul de bromofenol 0,01%, Tris-HCl 65,8mM, pH6,82 e para redução das proteínas foi adicionado mercaptoetanol 1:19) e submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE a 60V durante 15 minutos e 120V por 1 h e 30 minutos em tampão de corrida (Tris Base 0,25 M, Glicina 1,92 M e SDS 0,1%). O gel de concentração utilizado foi: 5% de acrilamida/bisacrilamida 29:1, Tris-HCl 0,4M, pH 6,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,005%. O gel de separação consistiu de 10% de acrilamida/bisacrilamida 29: 1; Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8; SDS 0,15%; persulfato de amônia 0,1% e TEMED 0,005%. Ao término da corrida prosseguiremos com a transferência das proteínas por eletroforese do gel para uma membrana de PVDF (Polivinilideno difluorido). Para tal, foi utilizado tampão de transferência (Tris 48m M; 39 glicina 39 mM; metanol 20%) e um sanduíche composto de papéis filtro, esponja e a membrana de PVDF. Para reduzir as ligações inespecíficas, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% em tampão de lavagem (150 mM de NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, e 0,05% de Tween 20) durante 1 hora e, em seguida, incubadas com o anticorpo primário, em tampão de lavagem contendo 1% de BSA overnight. As membranas foram então lavadas 3 vezes por 10 min com tampão de lavagem. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário em tampão de lavagem contendo 1% de BSA durante 1h em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas três vezes por 10 min com tampão de lavagem. A detecção dos imunoblots foi realizada pelo processo de quimioluminescência, utilizando o Kit Ecl Plus Bio Rad por 5 minutos.

4.6.1 Experimento para a realização do *Western Blotting*

Para a realização da Técnica de *Western Blotting* foram utilizados 16 animais distribuídos em 04 grupos, conforme descrito a seguir:

Grupo 01 – Salina + Salina (controle – Salina por via i.p. por 21 dias)

Grupo 02 - Salina + *Erythrina* (Salina por i.p. por 7 dias e *Erythrina* por via oral por 14 dias)

Grupo 03 – Cetamina + Salina (Salina por i.p. por 7 dias e *Erythrina* por via oral por 14 dias)

Grupo 04 – Cetamina + *Erythrina* (Salina por i.p. por 7 dias e *Erythrina* por via oral por 14 dias).

4.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi acompanhada por um computador PC, utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0*. Os resultados foram analisados por one- way ANOVA seguida de teste de Student-Newman-Keuls *post hoc* ou two-way ANOVA com teste de Bonferroni *post hoc* no caso dos testes que envolvem medidas repetidas. Os resultados que não seguirem uma distribuição normal serão analisados por teste não paramétrico U de Mann-Whitney. O critério de significância será de $p < 0,05$.

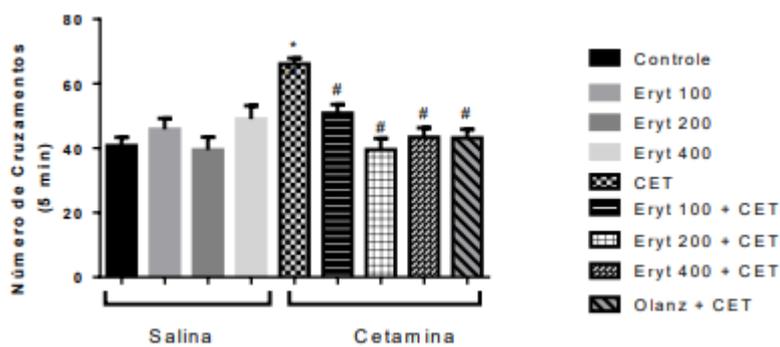
5 RESULTADOS

5.1 Testes comportamentais

5.1.1 Teste de Campo Aberto

Os resultados do teste de campo aberto demonstraram que a administração de CET aumentou a atividade locomotora espontânea (Figura 2A) e o número de *grooming* (Figura 2B) dos animais quando comparados ao grupo controle. Este efeito foi significativamente revertido pela administração de Eryt, em todas as doses estudadas, (Eryt + CET) na atividade locomotora [F (8, 91) = 6,891; $p < 0,0001$] e somente nos grupo associados de Eryt (Eryt 400 + CET) ou Olanzapina (Olanz + CET) no número de *grooming* [F (8, 91) = 4,199; $p = 0,0003$].

A



B

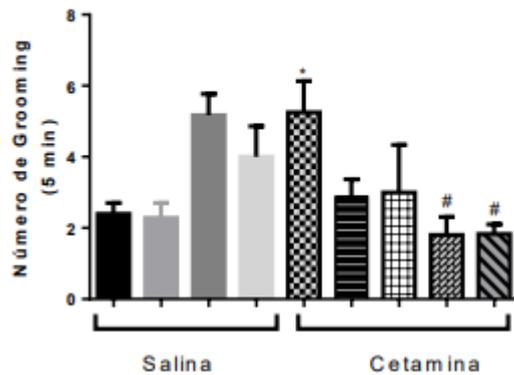
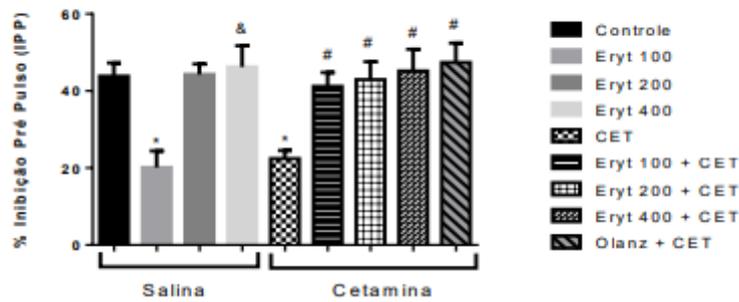


Fig. 2. Número de cruzamentos (A) e *grooming* (B) dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por Cetamina (CET 20 mg/kg) e tratados com Eryt (100, 200 or 400 mg/kg) ou Olanz (1mg/kg). Barra representa a média \pm EPM do número de cruzamentos e *grooming* ($n = 8-20$ animais/grupo). * ($p < 0,05$) versus salina; # ($p < 0,05$) versus CET de acordo com *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey *post hoc* test. CET = Cetamina, Eryt = *Erythrina velutina*, Olanz- Olanzapina.

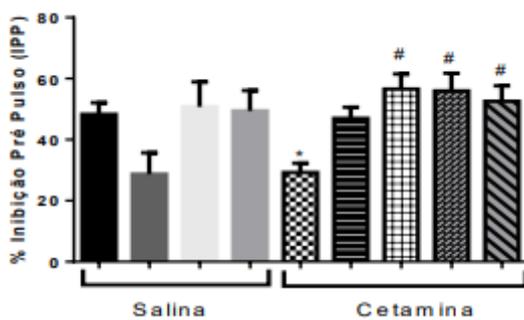
5.1.2 Teste de Inibição Pré-pulso (IPP)

Os resultados do teste IPP (Figura 3) mostraram que a CET, como esperado, diminuiu o IPP nos três pulsos estudados 70 [F (8, 89) = 7,078; $p < 0,0001$]; 75 [F (8, 89) = 4,844; $p < 0,0001$] ou 80 [F (8, 89) = 7,981; $p < 0,0001$]. Este efeito foi revertido pela associação com Eryt ou olanzapina. Observou-se também que Eryt 100, administrado isoladamente, reduziu o IPP de maneira semelhante à CET.

A



B



C

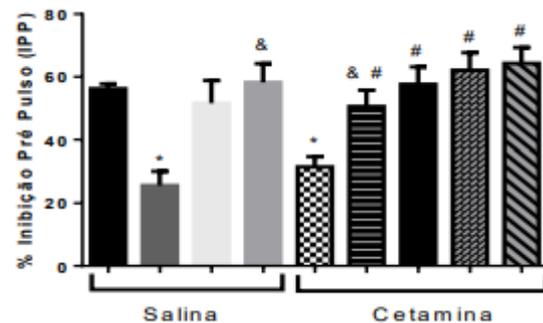


Fig. 3. Efeito em percentagem da Inibição do Pré-Pulso em PP70 (A), PP75 (B) ou PP80 (C) dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por CET (20 mg/kg) e tratados com Eryt (100, 200 or 400 mg/kg) ou Olanz (1 mg/kg). Barra representa a média \pm EPM do IPP (n = 8-27 animais/grupo). * ($p < 0,05$) versus salina; # ($p < 0,05$) versus CET; & ($p < 0,05$) versus Eryt 100 de acordo com *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey *post hoc test*. CET = Cetamina, Eryt = *Erythrina velutina*, Olanz- Olanzapina.

5.1.3 Interação Social

Os resultados da interação social (Figura 4) demonstraram que os animais que receberam CET apresentaram uma redução na percentagem de interação social quando comparado ao grupo controle [F(8, 75)= 4,181; $p=0,0004$. Esse efeito somente foi revertido pela associação da Eryt na maior dose (Eryt 400 + CET).

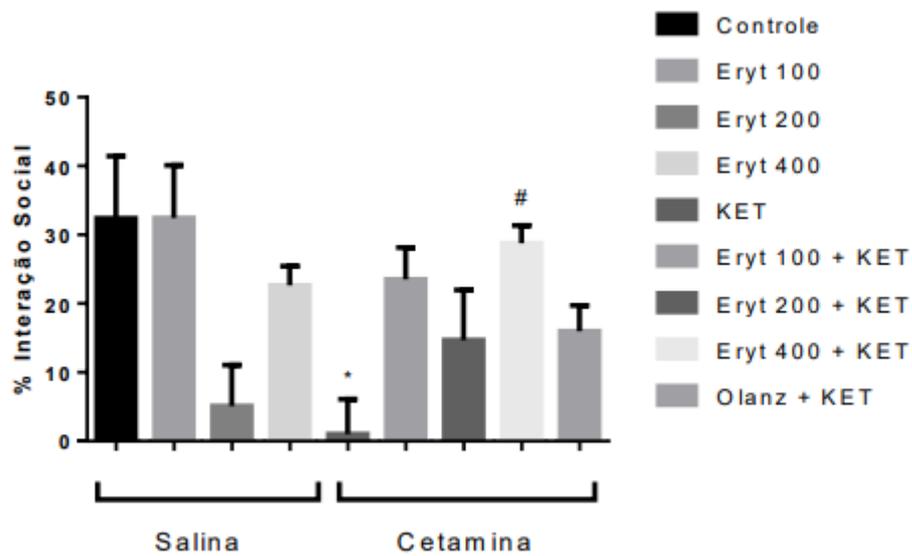


Fig. 4. Percentagem de interação social dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por CET (20mg/kg) e tratados com Eryt (100, 200 or 400 mg/kg) ou Olanz (1 mg/kg). Barra representa a média \pm EPM (n = 8-27 animais/grupo). * ($p < 0,05$) versus salina; # ($p < 0,05$) versus CET; de acordo com *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey's *post hoc test*. CET = Cetamina, Eryt = *Erythrina velutina*, Olanz- Olanzapina.

5.1.4 Nado forçado

No teste de nado forçado os animais tratados com CET apresentaram um aumento no tempo de imobilização quando comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$). Esse efeito foi revertido pela administração associada com Eryt, somente na menor dose, e com olanzapina [F(8,73)= 22,67; $p < 0,00001$]. De maneira semelhante ao grupo CET, administração de Eryt, na maior dose, aumentou o tempo de imobilização dos animais.

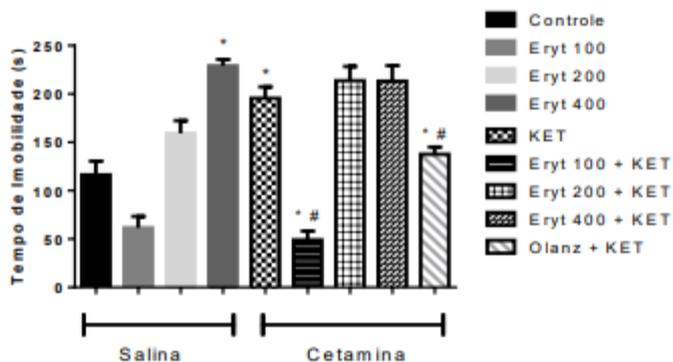


Fig. 5. Tempo de imobilização (segundos) no teste de nado forçado dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por CET (20 mg/kg) e tratados com Eryt (100, 200 or 400 mg/kg) ou Olanz (1 mg/kg). Barra representa a média \pm EPM (n= 7-18 animais/grupo). * ($p < 0,05$) versus salina; # ($p < 0,05$) versus CET de acordo com *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey *post hoc* test. CET = Cetamina, Eryt = *Erythrina velutina*, Olanz- Olanzapina.

5.2 Estresse Oxidativo/Nitrérgico

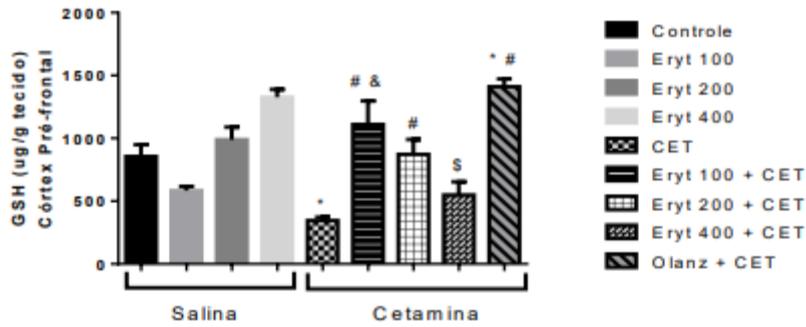
5.2.1 Avaliação da GSH - Glutathiona Peroxidase

Os resultados do GSH no córtex pré-frontal (Figura 4A) demonstraram que a CET reduziu as concentrações de GSH quando comparado ao grupo controle [F (8, 110) = 8,949, $P < 0,0001$]. Este efeito foi revertido pela associação com *Erytrina velutina* (Eryt) nas doses mais baixas (Eryt 100 ou 200 + CET) e no grupo da olanzapina (Olanz + CET). Um aumento de GSH em Eryt 100 + CET e uma diminuição em Eryt 400 + CET também foram observados quando comparados com grupos que receberam apenas Eryt 100 ou Eryt 400, respectivamente.

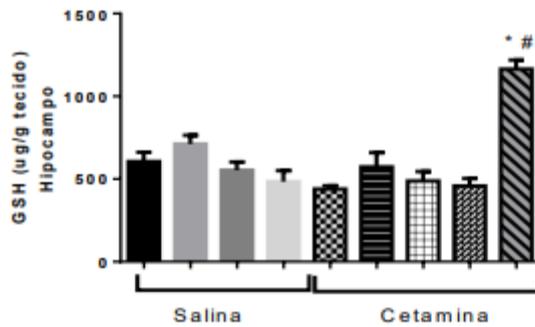
Nenhuma mudança nas concentrações de GSH foi observada no hipocampo (Figura 4B) dos animais que receberam CET ou Eryt, isoladamente, quando comparados ao controle. Contudo, um aumento em GSH [F (8, 110) = 12,26, $p < 0,0001$] foi observado em animais que receberam a combinação Olanzapina + CET em comparação ao controle e CET.

Em relação ao corpo estriado (Figura 4C), foi verificado uma redução nas concentrações de GSH no grupo CET quando comparado ao controle [F(8,110)= 5,597; $p < 0,0001$]. Este efeito revertido na associação com Eryt (100 mg/kg) e olanzapina.

A



B



C

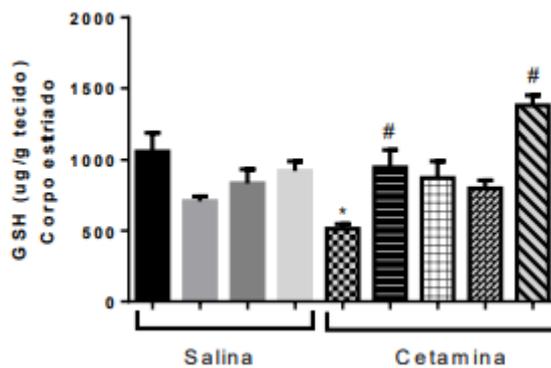


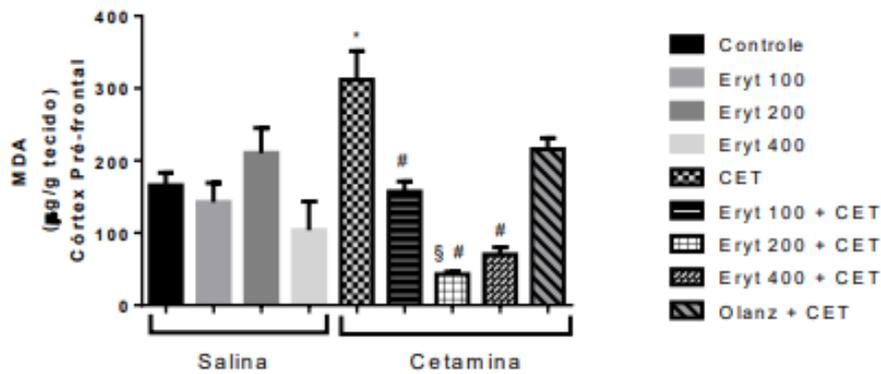
Fig. 6. Os níveis de glutathiona redutase (GSH) do córtex pré-frontal (A), hipocampo (B) e corpo estriado (C) dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por CET (20 mg/kg) e tratados com Eryt (100, 200 or 400 mg/kg) ou Olanz (1 mg/kg). Barra representa a média \pm EPM (n = 8-23 animais/grupo). * ($p < 0,05$) versus salina; # ($p < 0,05$) versus CET de acordo com *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey's *post hoc test*. CET = Cetamina, Eryt = *Erythrina velutina*, Olanz- Olanzapina.

5.2.2 Avaliação do Malondialdeído - TBARs

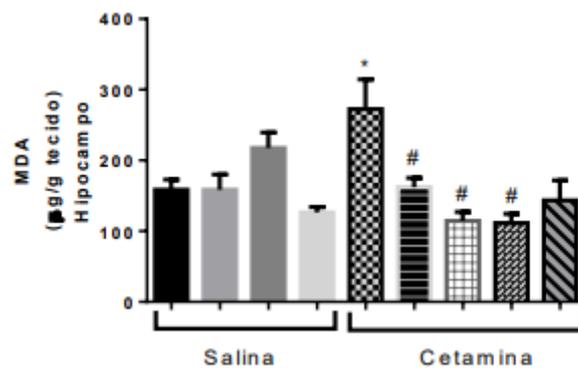
As concentrações de MDA, um marcador de peroxidação lipídica, foram demonstradas na Figura 7. No córtex pré-frontal [$F(8, 100) = 7,759; p < 0,0001$] e hipocampo [$F(8, 119) = 4,098; p = 0,0002$] os animais que receberam CET apresentaram um aumento nas concentrações de MDA quando comparados aos grupos controle. Esse efeito foi revertido pela associação com Eryt em todas as doses estudadas (Figuras 5A e 5B). No córtex pré-frontal, uma redução ($p < 0,01$) das concentrações de MDA no grupo da associação Eryt 200 + CET foi observada quando comparada ao grupo Eryt 200 sozinho.

Em outra área de estudo, corpo estriado (Figura 7C), a CET não causou um aumento significativo nas concentrações de MDA quando comparado ao grupo controle. No entanto, reduções nessas concentrações foram observadas nos grupos associados com Eryt e olanzapina em comparação com o grupo CET [$F(8, 121) = 5,174; p < 0,0001$].

A



B



C

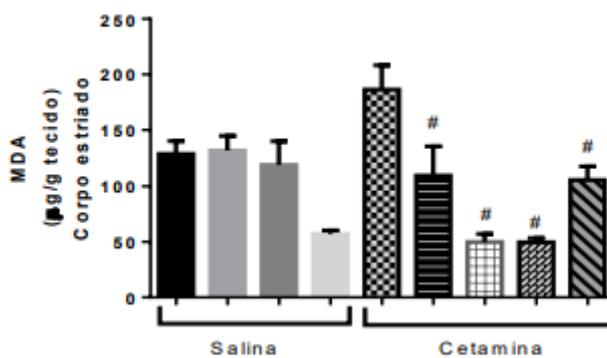


Fig. 7. Níveis de peroxidação lipídica no cortex pré-frontal (A), hipocampo (B) e corpo estriado (C) dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por CET (20 mg/kg) e tratados com *Erythrina* (100, 200 or 400 mg/kg) ou Olanz (1 mg/kg). Barra representa a média \pm EPM (n = 8-23 animais/grupo). * ($p < 0,05$) versus salina; # ($p < 0,05$) versus CET, § $p < 0,05$ versus Eryt 200 de acordo com *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey's *post hoc test*. CET= Cetamina; Eryt = *Erythrina velutina*, Olanz- Olanzapina.

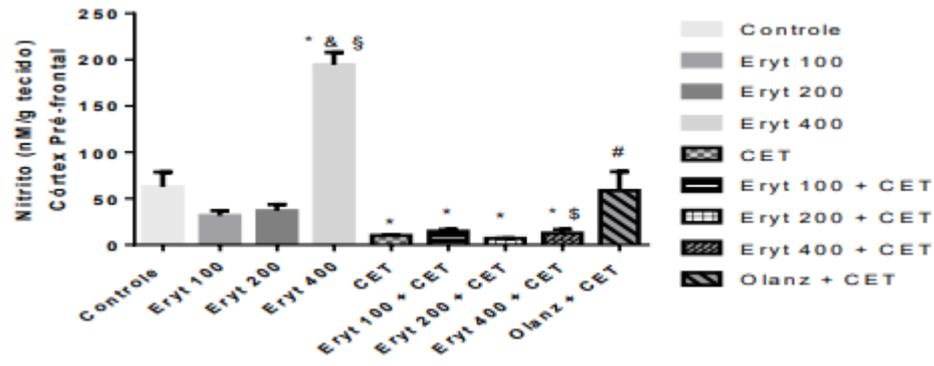
5.2.3 Avaliação do Nitrito

As concentrações de nitrito foram reduzidas pela administração de CET apenas no córtex pré-frontal quando comparado ao grupo controle (Figura 8A). Este efeito foi revertido pela associação com olanzapina (Olanz + CET). Eryt 400 mostrou um aumento nas concentrações de nitrito no córtex pré-frontal quando comparado com os grupos controle, Eryt 100 ou 200 e na associação de Eryt 400 + CET [$F(8, 93) = 33,84; p < 0,0001$].

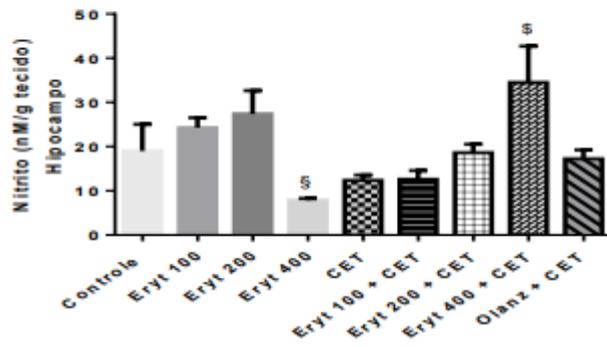
Nenhum efeito foi observado no hipocampo (Figura 8B). Exceto por uma diminuição nas concentrações de nitrito no grupo Eryt 400 quando comparado com Eryt 200 ou na associação de Eryt 400 com CET (Eryt + CET) [$F(8, 85) = 3,448; p = 0,0017$].

Em relação ao corpo estriado (Figura 8C), observou-se uma redução das concentrações de nitrito nos grupos Eryt associados (Eryt 200 ou 400 + CET) quando comparado ao controle [$F(8, 85) = 11,21; p < 0,0001$].

A



B



C

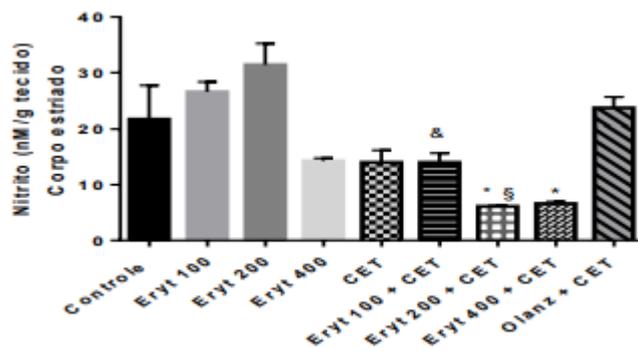


Fig. 8. Níveis de nitrito do córtex pré-frontal (A), hipocampo (B) e corpo estriado (C) dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por CET (20 mg/kg) e tratados com Eryt (100, 200 or 400 mg/kg) ou Olanz (1 mg/kg). Barra representa a média \pm EPM (n = 8-18 animais/grupo). * ($p < 0,05$) versus salina; # ($p < 0,05$) versus CET, & versus Eryt 100, § versus Eryt 200 e \$ $p < 0,05$ versus Eryt 400 de acordo com *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey's *post hoc test*. CET = Cetamine, *Erythrina velutina*= Erythrina, Olanz- Olanzapina.

5.3 Marcadores de ativação de micróglia, inflamatórios e de sinalização protetora

5.3.1 Ativação de micróglia

Para verificar a ativação de micróglia foi utilizado como marcador o *ionised calcium binding adaptor molecule 1* (Iba1) no córtex pré-frontal de camundongos. Os resultados não mostraram interação entre os grupos estudados [F (1, 12) = 0,05201; $p=0,8234$]. Assim, os animais submetidos a administração de CET sozinha ou associada com Eryt 400 foram semelhantes ao grupo controle.

5.3.2 Níveis de expressão de NFkB e AKT

Também nenhuma interação foi observada nos níveis de expressão de NFkB [F(1,11)= 0.02843; $p=0,8692$] ou AKT [F(1,12)= 0,03106; $p=0,8630$] no hipocampo dos animais que receberam CET ou Eryt 400 em relação ao grupo controle (Figuras 10 e 11, respectivamente).

Em relação a percentagem de fosforilação de AKT (Figura 12), foi observado uma tendência de redução nessa percentagem nos grupos de animais que receberam CET quando comparado ao grupo controle e Eryt + CET. Contudo não foi confirmado pelo two-way ANOVA (F(1,11)= 1,886; $p=0,1970$).

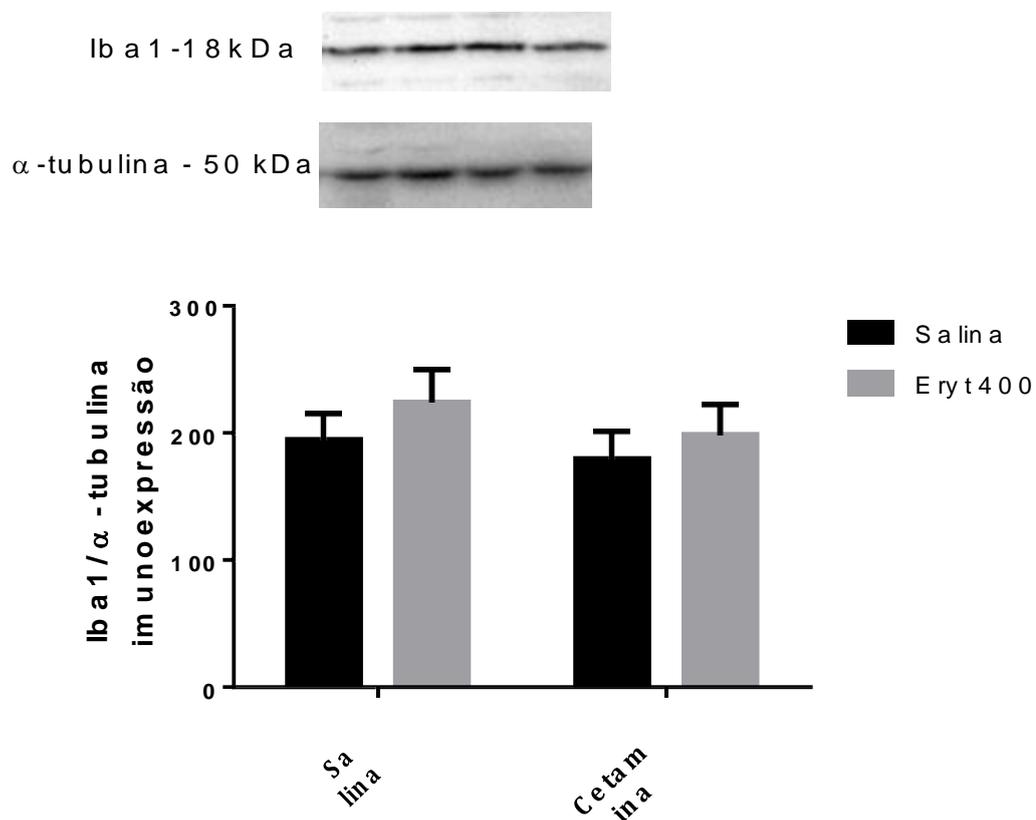


Fig. 9. Nível de expressão proteica de Iba1 no córtex pré-frontal dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por CET (20 mg/kg) e tratados com Eryt (400 mg/kg). Barra representa a média \pm EPM (n = 4 animais/grupo). Teste estatístico utilizado foi *two-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey *post hoc test*. KET = Cetamina, *Erythrina velutina*= Eryt.

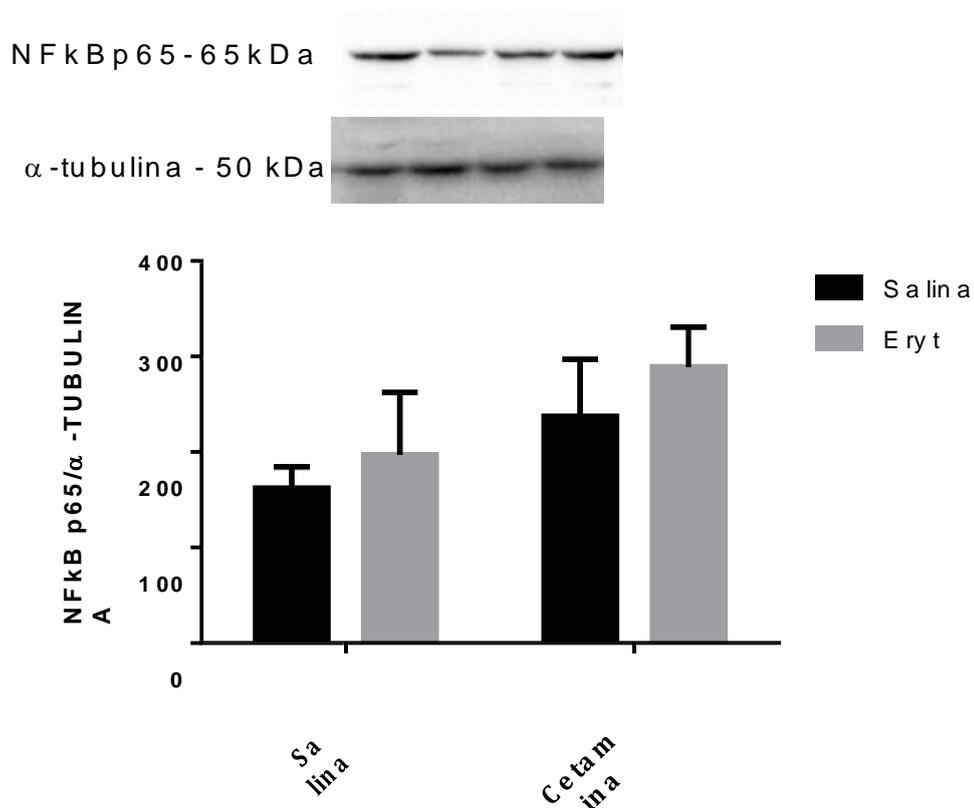


Fig. 10. Níveis de expressão de NFkB no córtex pré-frontal dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por CET (20 mg/kg) e tratados com Eryt (400 mg/kg). Barra representa a média \pm EPM (n = 3-4 animais/grupo). Teste estatístico utilizado foi *two-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey *post hoc test*. CET = Cetamina, *Erythrina velutina*= Eryt.

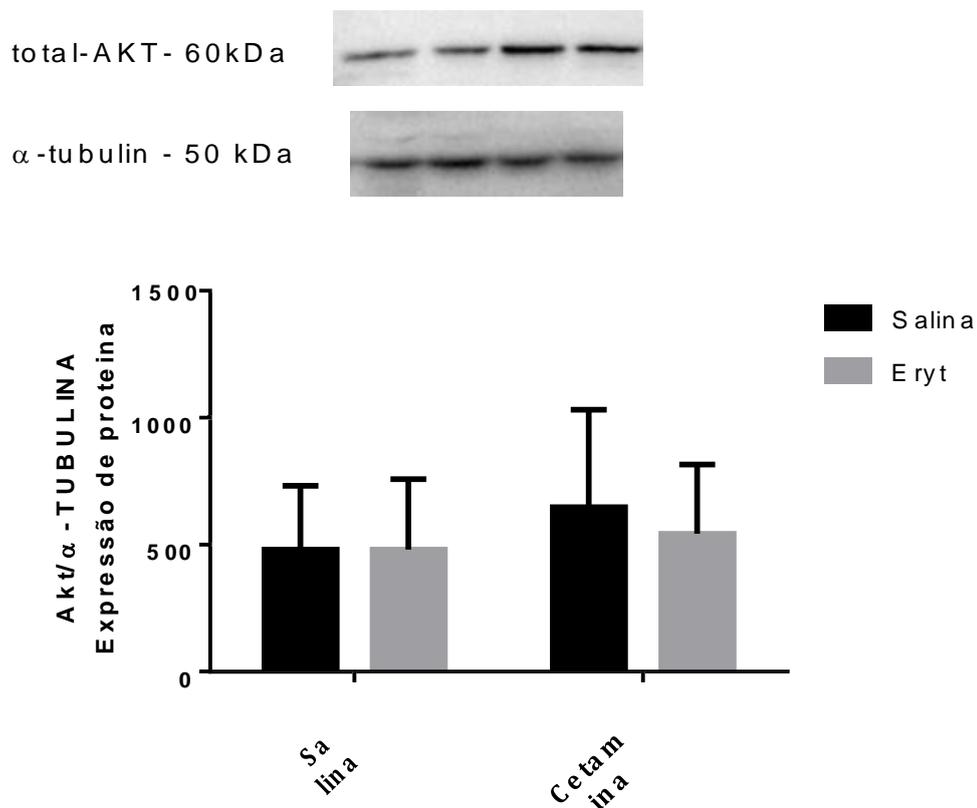


Fig. 11. Níveis de expressão de Akt no córtex pré-frontal dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por CET (20 mg/kg) e tratados com Eryt (400 mg/kg). Barra representa a média \pm EPM ($n = 3-4$ animais/grupo). Teste estatístico utilizado foi *two-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey *post hoc test*. CET = Cetamina, *Erythrina velutina*= Eryt.

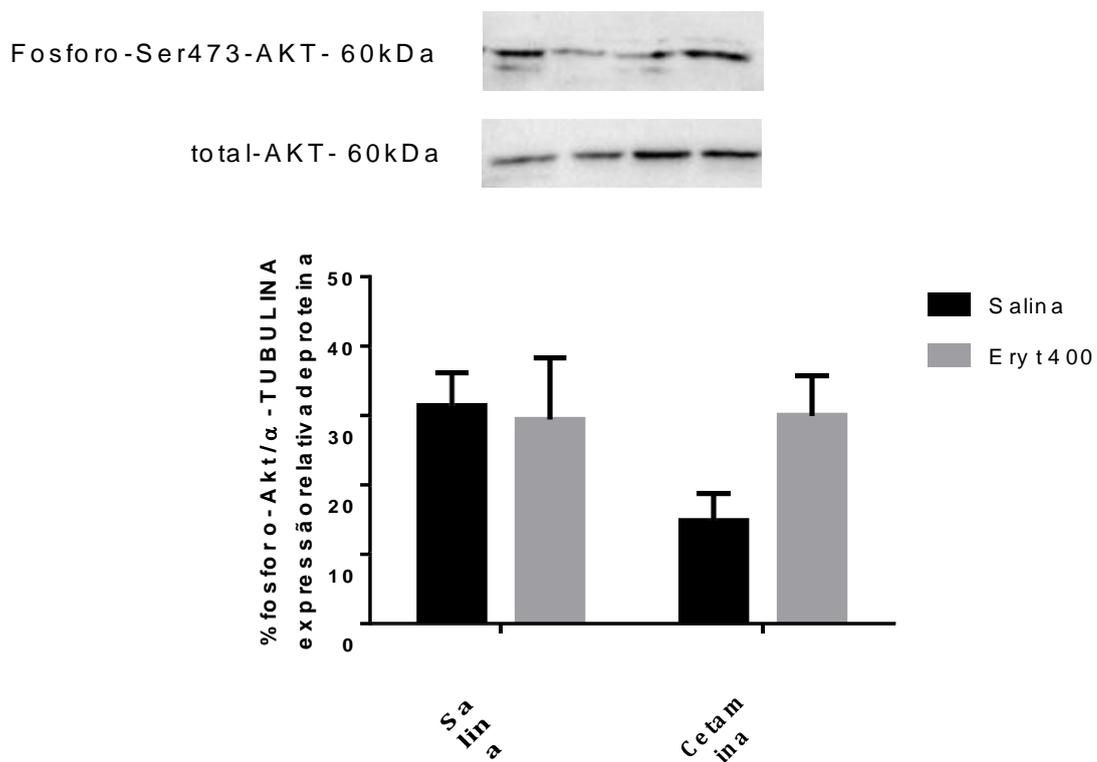


Fig. 12. Percentagem de fosforilação de Akt córtex pré-frontal dos animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por CET (20 mg/kg) e tratados com Eryt (400 mg/kg). Barra representa a média \pm EPM (n = 3-4 animais/grupo). Teste estatístico utilizado foi *two-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey *post hoc test*. CET = Cetamina, *Erythrina velutina*= Eryt.

6 DISCUSSÃO

Está bem descrito na literatura que a administração repetida de CET, um antagonista não competitivo dos receptores NMDA de glutamato, é usada como um modelo animal para induzir comportamentos como a esquizofrenia (CHINDO et al., 2012; DE OLIVEIRA VIANA ARRUDA et al., 2008; THAKER, 2007; VASCONCELOS et al., 2015). Esse modelo mimetiza sintomas positivos, negativos e cognitivos da esquizofrenia (FROHLICH; VAN HORN, 2014). Vários testes comportamentais são utilizados para estudar os sintomas positivos e negativos-*like* da esquizofrenia nos animais. Entre esses modelos comportamentais, podemos destacar a inibição pré-pulso (IPP), interação social e nado forçado (CHATTERJEE; JAISWAL; PALIT, 2012; DA SILVA ARAÚJO et al., 2017). Os déficits de IPP e hiperlocomoção induzidos por CET estão relacionados a sintomas positivos e negativos da esquizofrenia (CHINDO et al., 2012; MONTE et al., 2013; THAKER, 2007). Enquanto interação social e nado forçado estão relacionados a sintomas negativos em roedores (CHATTERJEE; JAISWAL; PALIT, 2012).

Nossos resultados demonstraram que a CET causou uma hiperlocomoção no teste de campo aberto, diminuição na percentagem de inibição pré-pulso. Sinais positivos-*like*, induziu sintomas negativos por reduzir o número de interações sociais e aumento do tempo de imobilização dos animais no teste de nado forçado. Esses efeitos comportamentais, para sintomas positivos e negativos da esquizofrenia, foram revertidos pela ERYT com resultados comparáveis aos obtidos com a olanzapina, uma droga antipsicótica atípica amplamente utilizada na clínica psiquiátrica.

Outro achado importante foi o aumento no comportamento de *grooming* dos animais que receberam CET. A dopamina, que é um importante modulador nos sistemas nigroestriatal e mesolímbico, é fundamental para a função locomotora, a autolimpeza e outros comportamentos padronizados complexos (BERRIDGE; ALDRIDGE, 2000; BERRIDGE; WHISHAW, 1992; CROMWELL; BERRIDGE, 1996).

Em roedores, a administração sistêmica de agonistas do receptor de dopamina D1 amplifica a superestereotipia comportamental complexa, levando tanto à produção excessiva de cadeias de autoalisamento, quanto a cadeias de autoalisamento mais rígidas (BERRIDGE; ALDRIDGE, 2000; TAYLOR et al., 2010). A coadministração sistêmica do haloperidol, antagonista do receptor da dopamina D2, previne a superestereotipia sequencial que é induzida pelo agonista D1 SKF38393 (TAYLOR et al., 2010). Estes resultados ilustram a importância de um equilíbrio entre os sistemas D1 e D2 do estriado na regulação do autoalisamento. Desde

que a esquizofrenia tem sido associada ao aumento da transmissão de dopamina (HOWES; KAPUR, 2009; KEGELES et al., 2008; SEEMAN; GUAN, 2009), comportamentos como *grooming*, em roedores, são importantes para o entendimento dessa doença. Segundo a *American Psychiatric Association* (2013) e Kalueff e colaboradores (2016), o comportamento hiperexcitativo observado em pacientes com esquizofrenia está relacionado ao fenótipo de autoestimulação de roedores. Assim, o teste de *grooming* em animais é importante para relacionar os efeitos dopaminérgicos da esquizofrenia.

Em relação ao teste de *grooming*, nossos resultados também demonstraram que ERYT, na dose mais alta, foi capaz de reverter o aumento no comportamento de *grooming* induzido por KET. Esses resultados podem sugerir um efeito farmacológico de bloqueio dos receptores dopaminérgicos por ERYT. A olanzapina, usada em nosso estudo como um controle positivo, também reduziu o número de *grooming*. Está bem descrito na literatura que a olanzapina possui vários sítios de ligação, incluindo bloqueadores dos receptores dopaminérgicos (D1-D4), serotoninérgicos (5-HT), muscarínicos (subtipos 1-5), adrenérgicos (α_1) e histaminérgicos (H_1) (OLIVERIA 2000; SEEMAN, 2002).

Como existe uma forte relação entre desequilíbrio oxidativo e fisiopatologia da esquizofrenia (GYSIN et al., 2007; REDDY; YAO, 1996; SILVA et al., 2016) e o extrato de *E. velutina* tem mostrado efeito neuroprotetor em estudos prévios (RODRIGUES et al., 2017a; SINGH et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2004), decidimos estudar compostos oxidativos e nítricos em várias áreas do cérebro, como o CPF, HC e CE, relacionados à neurobiologia desse transtorno mental (DE OLIVEIRA VIANA ARRUDA et al., 2008; MONTE et al., 2013; SAMPAIO et al., 2018a; VASCONCELOS et al., 2015) em animais submetidos ao modelo CET de esquizofrenia e tratados com diferentes doses do extrato padronizado de folhas de *E. velutina* (ERYT). Vários são os mecanismos cerebrais para manter a homeostase entre processos oxidativos e antioxidantes. A GSH é uma enzima que possui efeitos antioxidantes e propriedades protetoras do sistema nervoso central. Comprometimento na síntese de GSH está associado à esquizofrenia (GYSIN et al., 2007; KULAK; CUENOD; DO, 2012). Nossos resultados demonstraram que CET diminuiu significativamente os níveis de GSH no CPF e CE de camundongos e que esses efeitos foram revertidos por ERYT e olanzapina. Esses achados corroboram aos trabalhos anteriores do nosso grupo (MONTE et al., 2013; SAMPAIO et al., 2018b) que relataram que a administração repetida de CET a camundongos adultos diminui os níveis de GSH em CPF e CE e que substâncias antioxidantes, como vitamina E, revertem essa ação.

Estudos de estresse oxidativo demonstram um aumento nos níveis de MDA em pacientes com esquizofrenia em comparação com pacientes controle (ZHANG et al., 2010a). Nos nossos resultados, CET também aumentou os níveis de MDA, um marcador de peroxidação lipídica, nas três áreas estudadas. Esse efeito foi revertido pelo pré-tratamento com ERYT ou olanzapina. O gênero *Erythrina* demonstrou ação antioxidante em estudos biológicos (AKTER et al., 2016; INTIQUILLA et al., 2016; SILVA et al., 2016). Essa ação antioxidante parece estar relacionada às flavanonas presentes no gênero *Erythrina* (BEDANE et al., 2016). Outro achado importante desta pesquisa foi a demonstração de que o efeito antioxidante da ERYT foi mais importante no CPF e no CE. Vale a pena notar que não há nenhum estudo anterior investigando a ação antioxidante de *E. velutina* em diferentes áreas do cérebro.

O óxido nítrico (NO) também está relacionado à fisiopatologia da esquizofrenia. Em pacientes esquizofrênicos tanto diminuições quanto aumentos na atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) foram observados (BERNSTEIN; BOGERTS; KEILHOFF, 2005). Em nossos resultados, demonstramos que a administração repetida de CET diminuiu o nitrito, apenas no CPF, e este efeito foi revertido pela olanzapina. No entanto, a administração de ERYT sozinha na dose mais alta aumentou a concentração de nitrito nessa área do cérebro. Curiosamente, nos últimos anos, a administração de doadores de NO a pacientes esquizofrênicos está trazendo resultados importantes no controle dos sintomas agudos (MAIA DE OLIVEIRA et al., 2012).

Desde que a esquizofrenia é considerada uma doença neuroinflamatória e neurodegenerativa do sistema nervoso central (MONJI et al., 2013; RIBEIRO et al., 2013; WOODS, 1998), resolvemos investigar marcadores relacionados a essas vias, através de ativação microglial (Iba-1), NFkB e AKT no córtex pré-frontal dos animais submetidos ao modelo de CET e tratados com a ERYT na maior dose deste estudo (400 mg/kg). O córtex pré-frontal foi a área escolhida devido à sua relação com os sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia (PIETRASZEK, 2003).

A neuroinflamação possui um papel de grande relevância na esquizofrenia (MONJI; KATO; KANBA, 2009). Estudos demonstram que pacientes com esquizofrenia apresentam um aumento de citocinas pró-inflamatórias no sangue e no líquido cérebro espinhal (MAES et al., 2002; THEODOROPOULOU et al., 2001). O aumento nos níveis de citocinas é causado por várias vias, como ativação das células microgliais e expressão do fator de transcrição NFkB em células gliais. Pesquisas realizadas em cérebros *post-mortem* de pacientes esquizofrênicos (RADEWICZ et al., 2000) e *in vivo* em pacientes com esquizofrenia de início

recente (VAN BERCKEL et al., 2008) encontraram uma ativação dessas células microgлияis. A ativação de NFkB também está relacionado à formação de genes pró-inflamatórios, como Cox-2, interleucina e TNF- α no SNC (BARNES; KARIN, 1997). Sendo a ativação do NFkB relacionada com doenças neuropsiquiátricas (GLEZER et al., 2000; HYMAN, SE., 1996; HYMAN, 1996; MORINOBU et al., 1998).

Estudos recentes demonstram a importância da ativação de micróglia, vias de sinalização intracelular (EX. NFkB) e sobrevivência celular para o entendimento da fisiopatologia da esquizofrenia. Nossos resultados não demonstraram nenhum efeito da CET ou ERYT nesses parâmetros. Contudo, vale salientar que o número de animais para cada experimento foi em uma média de três a quatro animais por grupo. Nós consideramos esse número de animais um fator delimitante na nossa pesquisa.

Os resultados da presente pesquisa demonstraram um aumento na atividade locomotora espontânea, número de *grooming* e no tempo de permanência no teste de nado forçado nos animais que receberam administração de CET. Também foi observada, nesses animais, uma redução no teste de IPP e na percentagem de interação social. Esses efeitos comportamentais foram acompanhadas de um aumento nos parâmetros de estresse oxidativo no pré-frontal, no hipocampo e corpo estriado de camundongos, sem nenhuma alteração no marcador de ativação de micróglia (Iba-1), inflamatório (NFkB) e de sinalização protetora (AKT) no córtex pré-frontal. Aqui também demonstramos que o extrato padronizado de *Erythina velutina* (ERYT) e Olanzapina revertem as alterações comportamentais, pró-oxidantes e nitrérgicas induzidas pela administração repetida de CET.

7 CONCLUSÃO

Estes resultados demonstram que o extrato etanólico padronizado de *Erythrina velutina* nos testes comportamentais consegue reverter os efeitos da cetamina em todas as doses, assim prevenindo sintomas positivos e negativos semelhantes à esquizofrenia. No estresse oxidativo, observamos que as três doses conseguem proteger as três áreas estudadas, mas a dose de 100 mg/Kg se destaca no CPF e CE, mais uma vez protegendo possíveis agravos para sintomas negativos e cognitivos. Na inflamação, não foi possível observar alterações significantes, necessitando de mais investigação desse extrato etanólico de *E. velutina* nessa via. Assim, nosso estudo promove uma nova perspectiva do uso do extrato etanólico de *Erythrina velutina* para o tratamento da esquizofrenia.

REFERÊNCIAS

- ABI-DARGHAM, A.; MOORE, H. Prefrontal DA Transmission at D1 Receptors and the Pathology of Schizophrenia. **The Neuroscientist**. [sl]. v. 9, n. 5, p. 404–416, out. 2003.
- AGUIAR, C. C. T. et al. Esquizofrenia: uma doença inflamatória? **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**. [sl].v. 59, n. 1, p. 52–57, 2010.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**. [sl].v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.
- AKTER K, BARNES EC, LOA-KUM-CHEUNG WL, et al. Antimicrobial and antioxidant activity and chemical characterisation of *Erythrina stricta* Roxb. (Fabaceae). **J Ethnopharmacol**. [sl]. 2016;185:171-181. doi:10.1016/j.jep.2016.03.011
- ANDREASEN, N. C. A unitary model of schizophrenia: Bleuler's "fragmented phrene" as schizencephaly. **Arch Gen Psychiatry**. [sl].1999;56(9):781-787. doi:10.1001/archpsyc.56.9.781.
- ARARIPE NETO, A. G. DE A.; BRESSAN, R. A.; BUSATTO FILHO, G. Fisiopatologia da esquizofrenia: aspectos atuais. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**. [sl]. v. 34, p. 198–203, 2007.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review, **Animal Behaviour**. [sl]. Volume 21, Issue 2, May 1973, Pages 205-235.
- ARION, D. et al. Molecular Evidence for Increased Expression of Genes Related to Immune and Chaperone Function in the Prefrontal Cortex in Schizophrenia. **Biological Psychiatry**. [sl]. v. 62, n. 7, p. 711–721, out. 2007.
- BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear Factor- κ B — A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. **New England Journal of Medicine**. [sl]. v. 336, n. 15, p. 1066–1071, abr. 1997.
- BECKER, A. et al. Cetamina-induced changes in rat behaviour: A possible animal model of schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. [sl]. v. 27, n. 4, p. 687–700, jun. 2003.
- BEDANE, K. G. et al. Flavanones of *Erythrina livingstoniana* with antioxidant properties. **Fitoterapia**. [sl]. v. 108, p. 48–54, jan. 2016.
- BERNSTEIN, H. G.; BOGERTS, B.; KEILHOFF, G. The many faces of nitric oxide in schizophrenia. A review. **Schizophrenia Research**. [sl]. v. 78, n. 1, p. 69–86, 2005.
- BERRIDGE, K. C.; ALDRIDGE, J. W. Super-stereotypy I: Enhancement of a complex movement sequence by systemic dopamine D1 agonists. **Synapse**. [sl]. v. 37, n. 3, p. 194–204, 2000.

- BERRIDGE, K. C.; WHISHAW, I. Q. Cortex, striatum and cerebellum: control of serial order in a grooming sequence. **Experimental Brain Research**. [sl]. v. 90, n. 2, p. 275–290, 1992.
- BIEDERMANN, F.; FLEISCHHACKER, W. W. Emerging drugs for schizophrenia. **Expert Opinion on Emerging Drugs**. [sl]. v. 16, n. 2, p. 271–282, jun. 2011.
- BITANIHIRWE, B. K. Y.; WOO, T.-U. W. Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. **Neuroscience Biobev Rev**. [sl]. v. 35, n. 3, p. 878–893, 2011.
- BLACK, M.D., STEVENS, R.J., ROGACKI, N. ET AL. AVE1625, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, as a co-treatment with antipsychotics for schizophrenia: improvement in cognitive function and reduction of antipsychotic-side effects in rodents. **Psychopharmacology**. [sl].v. 215, n. 149, 2011.
- BOSCH, B. et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class II-Peptide Complexes Arrive at the Plasma Membrane in Cholesterol-rich Microclusters. **The Journal of Biological Chemistry**. [sl]. v. 288, n. 19, p. 13236–13242, maio 2013.
- BRAGA, R. **Plantas do nordeste, especialmente do Ceará**. Fortaleza: Departamento Nacional de Obras Contra as Secas, 1976.
- BUBENÍKOVÁ-VALEŠOVÁ, V. et al. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. [sl]. v. 32, n. 5, p. 1014–1023, jul. 2008.
- CARVALHO, A. C. C. S. et al. Evidence of the mechanism of action of Erythrina velutina Willd (Fabaceae) leaves aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**. [sl]. v. 122, n. 2, p. 374–378, 2009.
- CARVALHO, C. A. L. DE; MARCHINI, L. C. Plantas visitadas por Apis mellifera L. no vale do rio Paraguaçu, Município de Castro Alves, Bahia. **Revista Brasileira de Botânica**. [sl]. v. 22, p. 333–338, out. 1999.
- CHATTERJEE, M.; JAISWAL, M.; PALIT, G. Comparative Evaluation of Forced Swim Test and Tail Suspension Test as Models of Negative Symptom of Schizophrenia in Rodents. **ISRN Psychiatry**. [sl]. v. 2012, p. 595141, jan. 2012.
- CHINDO, B. A. et al. Cetamina-enhanced immobility in forced swim test: A possible animal model for the negative symptoms of schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. [sl]. v. 38, n. 2, p. 310–316, 2012.
- CHUKWUJEKWU ET AL. Antibacterial activity of flavonoids from the stem bark of Erythrina caffra thunb. **Phytotherapy Research**. [sl]. v. 25, n. 11, p. 46–48, 2011.
- CROMWELL, H. C.; BERRIDGE, K. C. Implementation of action sequences by a neostriatal site: a lesion mapping study of grooming syntax. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. [sl]. v. 16, n. 10, p. 3444–58, 1996.
- D'SOUZA, D. C. et al. Nicotine Fails to Attenuate Cetamina-Induced Cognitive Deficits

and Negative and Positive Symptoms in Humans: Implications for Schizophrenia. **Biological Psychiatry**. [sl]. v. 72, n. 9, p. 785–794, nov. 2012.

DA SILVA ARAÚJO, T. et al. Reversal of schizophrenia-like symptoms and immune alterations in mice by immunomodulatory drugs. **Journal of Psychiatric Research**. [sl]. v. 84, p. 49–58, jan. 2017.

DE OLIVEIRA VIANA ARRUDA, M. et al. Activities of the antipsychotic drugs haloperidol and risperidone on behavioural effects induced by Cetamina in mice. **Scientia Pharmaceutica**. [sl]. v. 76, n. 4, p. 673–687, 2008.

DEROZA, P. F. et al. Effect of cigarette smoke exposure in the behavioral changes induced by Cetamina. **Schizophrenia Research**. [sl]. v. 141, n. 1, p. 104–105, out. 2012.

DI STASI LC, H.-L. C. **Plantas medicinais na Amazônia**. São Paulo: Editora UNESP, 2002.

DO, K. Q. et al. Redox dysregulation, neurodevelopment, and schizophrenia. **Current Opinion in Neurobiology**. [sl]. v. 19, n. 2, p. 220–230, abr. 2009.

FAVALLI, G. et al. The role of BDNF in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. **Journal of Psychiatric Research**. [sl]. v. 46, n. 1, p. 1–11, 2012.

FENDRI, C. et al. **Oxidative stress involvement in schizophrenia pathophysiology: A review**. [s.l.: s.n.]. v. 32.

FLECKENSTEIN, A. E. et al. New insights into the mechanism of action of amphetamines. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. [sl]. v. 47, p. 681–698, 2007.

FROHLICH, J.; VAN HORN, J. D. REVIEWING THE CETAMINA MODEL FOR SCHIZOPHRENIA. **Journal of psychopharmacology**. Oxford, v. 28, n. 4, p. 287–302, abr. 2014.

FUSAR-POLI, P.; MEYER-LINDENBERG, A. Presynaptic dopamine alterations in schizophrenia: Functional or structural defect? **Psychiatry Research: Neuroimaging**. [sl]. v. 202, n. 3, p. 271–272, jun. 2012.

GEYER, M.; MOGHADDAM, B. Animal models relevant to schizophrenia disorders. **Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress**. [sl]. p. 689–701, 2002.

GIAKOUMAKI, S. G. Cognitive and Prepulse Inhibition Deficits in Psychometrically High Schizotypal Subjects in the General Population: Relevance to Schizophrenia Research. **Journal of the International Neuropsychological Society**, [sl]. v. 18, n. 04, p. 643–656, jul. 2012.

GLEZER, I. et al. O fator de transcrição NF-kappaB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [sl].v. 22, n. 1, p. 26–30, mar. 2000.

GONZALEZ-BURGOS, G.; LEWIS, D. A. NMDA receptor hypofunction, parvalbumin-positive neurons, and cortical gamma oscillations in schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**,

[sl].v. 38, n. 5, p. 950–957, 2012.

GOURZIS, P.; KATRIVANOU, A.; BERATIS, S. Symptomatology of the initial prodromal phase in schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, [sl].v. 28, n. 3, p. 415–429, 2002.

GYSIN, R. et al. Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: Convergent genetic and functional evidence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [sl]. v. 104, n. 42, p. 16621–16626, 2007.

HASAN, A. et al. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for biological treatment of schizophrenia – a short version for primary care. **International Journal of Psychiatry in Clinical Practice**, [sl]. v. 21, n. 2, p. 82–90, abr. 2017.

HECKE, J. et al. **Towards a solution for performance related confounds: Frontal, striatal and parietal activation during a continuous spatiotemporal working memory manipulation task.** [*s.l.: s.n.*]. v. 7.

HOLCOMB, H. H. et al. Parametric study of accuracy and response time in schizophrenic persons making visual or auditory discriminations. **Psychiatry Research**, [sl]. v. 127, n. 3, p. 207–216, jul. 2004.

HOWES, O. D.; KAPUR, S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: Version III - The final common pathway. **Schizophrenia Bulletin**, [sl]. v. 35, n. 3, p. 549–562, 2009.

HYMAN, SE., N. E. Initiation and adaptation: a paradigm for understanding psychotropic drug action. **American Journal of Psychiatry**, [sl]. v. 153, n. 2, p. 151–162, fev. 1996.

HYMAN, S. E. Addiction to Cocaine Minireview and Amphetamine. **Neuron**, [sl]. v. 16, p. 901–904, 1996.

INTIQUILLA, A. et al. Erythrina edulis (Pajuro) Seed Protein: A New Source of Antioxidant Peptides. **Natural product communications**, [sl]. v. 11, p. 781–786, 2016.

ISSY, A. C.; SALUM, C.; DEL BEL, E. A. Nitric oxide modulation of methylphenidate-induced disruption of prepulse inhibition in Swiss mice. **Behavioural Brain Research**, [sl]. v. 205, n. 2, p. 475–481, dez. 2009.

ITO, D. et al. Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. **Stroke**, [sl]. May;32(5):1208-15, 2001.

KAPUR, S.; REMINGTON, G. Atypical Antipsychotics: New Directions and New Challenges in the Treatment of Schizophrenia. **Annual Review of Medicine**, [sl]. v. 52, n. 1, p. 503–517, 2001.

KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity. **Annual Review of Immunology**, [sl]. v. 18, n. 1, p. 621–663, abr. 2000.

KEEF, R. S. Cognitive deficits in patients with schizophrenia: effects and treatment. **J Clin Psychiatry**, [sl]. v. 68, n. Suppl 8-13, 2007.

KEGELES, L. S. et al. Dose-occupancy study of striatal and extrastriatal dopamine D2receptors by aripiprazole in schizophrenia with PET and [18F] fallypride. **Neuropsychopharmacology**, [sl]. v. 33, n. 13, p. 3111–3125, 2008.

KOSHIMIZU, H.; LEITER, L. M.; MIYAKAWA, T. M4 muscarinic receptor knockout mice display abnormal social behavior and decreased prepulse inhibition. **Molecular brain**, [sl]. v. 5, n. 1, p. 10, jan. 2012.

KULAK, A.; CUENOD, M.; DO, K. Q. Behavioral phenotyping of glutathione- deficient mice: Relevance to schizophrenia and bipolar disorder. **Behavioural Brain Research**, [sl]. v. 226, n. 2, p. 563–570, 2012.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Western blotting. **Methods**, [sl]. v. 38, n. 4, p. 283–293, abr. 2006.

LARSON, M. K.; WALKER, E. F.; COMPTON, M. T. Early signs, diagnosis and therapeutics of the prodromal phase of schizophrenia and related psychotic disorders. **Expert review of neurotherapeutics**, [sl]. v. 10, n. 8, p. 1347–1359, ago. 2010.

LARSON, M. K.; WALKER, E. F.; COMPTON, M. T. Schizophrenia and Related Psychotic Disorders. **Expert review of neurotherapeutics**, [sl]. v. 10, n. 8, p. 1347–1359, 2011.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, [sl]. v. 1, n. 6, p. 1–10, 2009.

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

LI, Z. et al. Effect of repeated administration of phencyclidine on spatial performance in an eight-arm radial maze with delay in rats and mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [sl]. v. 75, n. 2, p. 335–340, maio 2003.

LIN, C.-H.; LANE, H.-Y.; TSAI, G. E. Glutamate signaling in the pathophysiology and therapy of schizophrenia. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [sl]. v. 100, n. 4, p. 665–677, fev. 2012.

LODGE, D. The history of the pharmacology and cloning of ionotropic glutamate receptors and the development of idiosyncratic nomenclature. **Neuropharmacology**, [sl]. v. 56, n. 1, p. 6–21, jan. 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MACHADO RJA, MONTEIRO NKV, MIGLIOLO L, ET AL. Characterization and Pharmacological Properties of a Novel Multifunctional Kunitz Inhibitor from Erythrina velutina Seeds. **PLoS ONE**, [sl]. v. 8, n. 5, p. 63571, 2013.

MAES, M. Major Depression and Activation of The Inflammatory Response System. In: DANTZER, R.; WOLLMAN, E. E.; YIRMIYA, R. (Eds.). . **Cytokines, Stress, and Depression**. Boston, MA: Springer US, 1999. p. 25–46.

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

MAIA DE OLIVEIRA, J. P. et al. Nitric oxide plasma/serum levels in patients with schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [sl]. v. 34, n. SUPPL2, p. 149–155, 2012.

MENEGATTI, R. ET AL . Esquizofrenia: quarenta anos da hipótese dopaminérgica sob a ótica da Química Medicinal. **Quím. Nova**, [sl]. v. 27, n. 3, p. 447–455, 2004.

MEYER, U. Anti-inflammatory signaling in schizophrenia. **Brain, Behavior, and Immunity**, [sl]. v. 25, n. 8, p. 1507–1518, nov. 2011.

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

MIGUEL, M. P.; MENEZES, L. B. DE; ARAÚJO, E. G. DE. Western Blotting: a Técnica E Aplicações Na Pesquisa E Rotina Diagnóstica Em Medicina Veterinária. **Enciclopédia Biosfera**, [sl]. v. 8, n. 15, p. 1704–1719, 2012.

MILLER, B. J. et al. Meta-Analysis of Cytokine Alterations in Schizophrenia: Clinical Status and Antipsychotic Effects. **Biological Psychiatry**, [sl]. v. 70, n. 7, p. 663–671, out. 2011.

MITTAL, V. A. et al. Neurological Soft Signs Predict Abnormal Cerebellar-Thalamic Tract Development and Negative Symptoms in Adolescents at High Risk for Psychosis: A Longitudinal Perspective. **Schizophrenia Bulletin**, [sl]. v. 40, n. 6, p. 1204–1215, nov. 2014.

MOLTENI, R. et al. Antipsychotic drug actions on gene modulation and signaling mechanisms. **Pharmacology & Therapeutics**, [sl]. v. 124, n. 1, p. 74–85, out. 2009.

MONJI, A. et al. Neuroinflammation in schizophrenia especially focused on the role of microglia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [sl]. v. 42, p. 115–121, abr. 2013.

MONJI, A.; KATO, T.; KANBA, S. Cytokines and schizophrenia: microglia hypothesis of schizophrenia. **Psychiatry Interpersonal and Biological Processes**, [sl]. v. 63, n. January, p. 257–265, 2009.

MONTE, A. S. et al. Prevention and reversal of Cetamina-induced schizophrenia related behavior by minocycline in mice: Possible involvement of antioxidant and nitrenergic pathways. **Journal of Psychopharmacology**, [sl]. v. 27, n. 11, p. 1032–1043, 2013.

MORINOBU, S. et al. Regulation of c-Fos and NGF1-A by antidepressant treatments. **Synapse**, [sl]. v. 25, n. 4, p. 313–320, dez. 1998.

MUSTAFA, A. K.; GADALLA, M. M.; SNYDER, S. H. Signaling by Gasotransmitters. **Science Signaling**, [sl]. v. 2, n. 68, p. re2 LP-re2, abr. 2009.

NGUYEN, P. H. et al. Cytotoxic and PTP1B inhibitory activities from *Erythrina abyssinica*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [sl]. v. 19, n. 23, p. 6745–6749, dez. 2009.

NINAN, I.; KULKARNI, S. K. Differential effects of olanzapine at dopamine D 1 and D 2 receptors in dopamine depleted animals. **Psychopharmacology**, [sl]. v. 142, p. 175–181, 1999.

NUNES, S. O. V. et al. Immune and hormonal activity in adults suffering from depression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [sl]. v. 35, n. 5, p. 581–587, maio 2002.

OLIVEIRA, M.I. Antipsicóticos Atípicos: farmacologia e Uso clínico. **Rev.Bras. Psiquiatr.**, [sl]. v.22, p. 38-40, 2000.

ONUSIC, G. M. O. et al. Effects of Chronic Treatment with a Water – Alcohol Extract from *Erythrina mulungu* on Anxiety-Related Responses in Rats. **Biol. Pharm. Bull.**, [sl]. v. 26, n. 11, p. 1538–1542, 2003.

OZAWA, K. et al. Immune Activation During Pregnancy in Mice Leads to Dopaminergic Hyperfunction and Cognitive Impairment in the Offspring: A Neurodevelopmental Animal Model of Schizophrenia. **Biological Psychiatry**, [sl]. v. 59, n. 6, p. 546–554, mar. 2006.

PADURARIU, M. et al. Evaluation of antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation in schizophrenic patients treated with typical and atypical antipsychotics. **Neuroscience Letters**, [sl]. v. 479, n. 3, p. 317–320, ago. 2010.

PATIL, S. T. et al. Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. **Nature Medicine**, [sl]. v. 13, p. 1102, set. 2007.

PIETRASZEK, M. Significance of dysfunctional glutamatergic transmission for the development of psychotic symptoms. **Polish journal of pharmacology**, [sl]. v. 55, n. 3, p. 133–154, 2003.

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

RADENOVIC, L.; SELAKOVIC, V. Differential effects of NMDA and AMPA/kainate receptor antagonists on nitric oxide production in rat brain following intrahippocampal injection. **Brain Research Bulletin**, [sl]. v. 67, n. 1–2, p. 133–141, set. 2005.

RADEWICZ, K. et al. Increase in HLA-DR immunoreactive microglia in frontal and temporal cortex of chronic schizophrenics. **Journal of Neuropathology and Experimental**

Neurology, [sl]. v. 59, n. 2, p. 137–150, 2000.

RAUPP, I. M. et al. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test. **Journal of Ethnopharmacology**, [sl]. v. 118, n. 2, p. 295–299, jul. 2008.

REDDY, R. D.; YAO, J. K. Free radical pathology in schizophrenia: A review. **rostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, [sl]. v. 55, n. 1–2, p. 33–43, 1996.

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**, [sl]. v. 151, n. 1, p. 12–19, dez. 2013.

RIBEIRO, M. D. et al. Effect of *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in rats submitted to animal models of anxiety and depression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [sl]. v. 39, n. 2, p. 263–270, 2006.

RODRIGUES, F. T. S. et al. Effects of standard ethanolic extract from *Erythrina velutina* in acute cerebral ischemia in mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [sl]. v. 96, n. September, p. 1230–1239, 2017a.

RODRIGUES, F. T. S. et al. Effects of standard ethanolic extract from *Erythrina velutina* in acute cerebral ischemia in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [sl]. v. 96, p. 1230–1239, dez. 2017b.

S. HOFFMAN, H.; R. ISON, J. **Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input**. [s.l: s.n.]. v. 87.

SALGADO, J. V.; HETEM, L. A.; SANDNER, G. Modelos experimentais de esquizofrenia: uma revisão. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [sl]. v. 28, n. 2, p. 135–141, jun. 2006.

SALUM, C. et al. Modulation of dopamine uptake by nitric oxide in cultured mesencephalic neurons. **Brain Research**, [sl]. v. 1198, p. 27–33, mar. 2008.

SAMPAIO, L. R. L. et al. Advantages of the Alpha-lipoic Acid Association with Chlorpromazine in a Model of Schizophrenia Induced by Cetamina in Rats: Behavioral and Oxidative Stress evidences. **Neuroscience**, [sl]. v. 373, p. 72–81, 2018a.

SAMPAIO, L. R. L. et al. Average spectral power changes at the hippocampal electroencephalogram in schizophrenia model induced by Cetamina. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, [sl]. v. 32, n. 1, p. 60–68, 2018b.

SANTOS ROSA, D. et al. Erysothrine, an alkaloid extracted from flowers of *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth: Evaluating its anticonvulsant and anxiolytic potential. **Epilepsy & Behavior**, [sl]. v. 23, n. 3, p. 205–212, mar. 2012.

SEEMAN, P. Atypical antipsychotics: mechanism of action. **Can J Psychiatry**, [sl]. v. 47, n. 1, p. 27–38, 2002.

SEEMAN, P.; GUAN, H.-C. Glutamate agonist LY404,039 for treating schizophrenia has affinity for the dopamine D2High receptor. **Synapse**, [sl]. v. 63, n. 10, p. 935–939, jul. 2009.

SILVA, A. H. et al. Pharmacognostical Analysis and Protective Effect of Standardized Extract and Rizonic Acid from *Erythrina velutina* against 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells. **Pharmacognosy magazine**, [sl]. v. 12, n. 48, p. 307–312, 2016.

SILVEIRA, R. D. Psicanálise e psiquiatria nos inícios do século XX: A apropriação do conceito de esquizofrenia no trabalho de Hermelino Lopes Rodrigues. **Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental**, [sl]. v. 12, n. 3, p. 582–596, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [sl]. v. 12, n. 1, p. 35–40, 2002.

SINGH, A. et al. A preliminary study of association of genetic variants with early response to olanzapine in schizophrenia. **Indian Journal of Psychiatry**, [sl]. v. 59, n. 4, p. 457–464, 2017.

SWERDLOW, R.; GEYER, M. Using an Animal Model of Deficient Sensorimotor Gating to Study the Pathophysiology and New Treatments of Schizophrenia. **Schizophr Bull.** Oxford, 24(2):285-301, 1998.

TANDON, R.; NASRALLAH, H. A.; KESHAVAN, M. S. Schizophrenia, “just the facts” 5. Treatment and prevention. Past, present, and future. **Schizophrenia Research**, [sl]. v. 122, n. 1, p. 1–23, set. 2010.

TAYLOR, J. L. et al. Dopamine receptor modulation of repetitive grooming actions in the rat: Potential relevance for Tourette syndrome. **Brain Research**, [sl]. v. 1322, p. 92–101, 2010.

TERMORSHUIZEN, F. et al. Psychosis and suicide risk by ethnic origin and history of migration in the Netherlands. **Schizophrenia Research**, [sl]. v. 138, n. 2–3, p. 268–273, 2012.

THEODOROPOULOU, S. et al. Cytokine serum levels, autologous mixed lymphocyte reaction and surface marker analysis in never medicated and chronically medicated schizophrenic patients. **Schizophrenia Research**, [sl]. v. 47, n. 1, p. 13–25, jan. 2001.

TSOI, D. T.-Y. et al. Humour experience in schizophrenia: relationship with executive dysfunction and psychosocial impairment. **Psychological Medicine**, [sl]. v. 38, n. 06, p. 801–810, jun. 2008.

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

VASCONCELOS, S. M. M. et al. Central activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [sl]. v. 56, n. 3, p. 389–393, 2004.

VASCONCELOS, S. M. M. et al. Anticonvulsant activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu*. **Journal of Ethnopharmacology**, [sl]. v. 110, n. 2, p. 271–274, 2007.

VASCONCELOS, S. M. M. et al. Behavioral study with *Erythrina velutina* fractions. **Asian Pac J Trop Med**, [sl]. v. 2, n. 5, p. 30–33, 2009.

VASCONCELOS, S. M. M. et al. Anti-inflammatory activities of the hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *E. Mulungu* in mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [sl]. v. 21, n. 6, p. 1155–1158, 2011.

VASCONCELOS, S. M. M.; REBOUÇAS, G.; FONTELES, A. Antinociceptive Activities of the Hydroalcoholic Extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in Mice. **Biol. Pharm. Bull.** [sl]. v. 26, n. 7, p. 946–949, 2003.

VASCONCELOS S.M.M et al. Central activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. **J Pharm Pharmacol**, [sl]. v. 56, n. 3, p. 389–393, 2004.

VERMA, R. Schizophrenia and Suicide. **East Asian Arch Psychiatry**, [sl]. v. 22, n. January, p. 126–33, 2012.

WEISS, I. C.; FELDON, J. Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. **Psychopharmacology**, [sl]. v. 156, n. 2–3, p. 305–26, 2001.

WOODS, B. T. Is Schizophrenia a Progressive Neurodevelopmental Disorder? Toward a Unitary Pathogenetic Mechanism. **American Journal of Psychiatry**, [sl]. v. 155, n. 12, p. 1661–1670, dez. 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The Global Burden of Disease: 2004 update. **2004 Update**, [sl]. p. 146, 2008.

YAO, J. K.; LEONARD, S.; REDDY, R. D. Increased nitric oxide radicals in postmortem brain from patients with schizophrenia. **Schizophr Bull**, [sl]. v. 30, n. 4, p. 923–934, 2004.

YILMAZ, Z. et al. Antipsychotics, dopamine D₂ receptor occupancy and clinical improvement in schizophrenia: a meta-analysis. **Schizophrenia research**, [sl]. v. 140, n. 1–3, p. 214–20, set. 2012.

ZHANG, M. et al. A meta-analysis of oxidative stress markers in schizophrenia. **Science China Life Sciences**, [sl]. v. 53, n. 1, p. 112–124, 2010a.

ZHANG, Y. et al. *Erythrina variegata* extract exerts osteoprotective effects by suppression of the process of bone resorption. **British Journal of Nutrition**, [sl]. v. 104, n. 07, p. 965–971, out. 2010.