



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE BIOMEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

FRANCISCO ELICLÉCIO RODRIGUES DA SILVA

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS
EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO
NEURODESENVOLVIMENTAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR DOIS
DESAFIOS: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO SEXO.

FORTALEZA

2021

FRANCISCO ELICLÉCIO RODRIGUES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS
EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO
NEURODESENVOLVIMENTAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR DOIS
DESAFIOS: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO SEXO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar
Co-orientador: Fabio Miyajima

FORTALEZA

2021

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)

- S58a Silva, Francisco Eliclécio Rodrigues da.
Avaliação das alterações comportamentais e neuroquímicas em camundongos submetidos ao modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia induzido por dois desafios: estudo da influência do sexo. / Francisco Eliclécio Rodrigues da Silva. – 2021.
111 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profa. Dra. Danielle Macedo Gaspar.
Coorientação: Prof. Dr. Fabio Miyajima.
1. Esquizofrenia. 2. Estrogênio. 3. Triptofano. 4. Modelo Animal. 5. Transtornos do Neurodesenvolvimento. I. Título.

FRANCISCO ELICLÉCIO RODRIGUES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS
EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO
NEURODESENVOLVIMENTAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR DOIS
DESAFIOS: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO SEXO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Fabio Miyajima (Co-orientador)
FIOCRUZ - CEARÁ

Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Aline Santos Monte
Universidade da Integração Internacional da
Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Profa. Dra. Alexandra Loppi Zugno
Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC)

Profa. Dra. Giovanna Riello Barbosa Correia
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus e à minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e força para perseverar mesmo nas dificuldades, fazendo enfrentar cada desafio e permitindo chegar até aqui.

À minha família que é a minha base e sempre apoia, principalmente nas oportunidades que a vida não os deu. Sem a ajuda deles não seria possível subir todos os degraus que já subi na vida.

À grande amiga Camila Nayane por ter proporcionado conhecimento, alegrias e a grandiosa amizade que fez com que o caminho se tornasse mais leve.

À todas as amizades novas que tive o dom de ganhar ao entrar na família do Laboratório de Neuropsicofarmacologia. Que me acolheram e me ensinaram que a ciência também é feita de afetos. Em especial Adriana Costa, Germana Vasconcelos, Greicy Coelho, Isabelle Gois, Manuel Alves, Naiara Ximenes, Nayana Soares, Rafaela Cordeiro, Taciana Maia, Aline Monte, Caren Soares, Cid Pinto, Tatiane Araújo, Ingridy Medeiros e Ayane Edwiges.

À grande amiga Giovanna Riello que está sempre presente e me impulsionando a dar sempre meu melhor.

Ao grande amigo Hassã Lemos que apoia e acompanha minha caminhada na pós-graduação há longas datas.

Às amigas Morgana Oliveira e Sabryna Brito que longe ou perto são sempre incentivadoras e companheiras de jornada na ciência.

À melhor orientadora que tive na vida, Profa Danielle Macêdo, que me acolheu no seu grupo e ensinou muito mais que ciência. Uma mulher grandiosa e inspiradora. Meu muito obrigado profa por todas as oportunidades e ensinamentos.

Ao meu co-orientador Prof Fabio Miyajima pelos ensinamentos principalmente na área de biologia molecular.

Aos professores do grupo de neuropsicofarmacologia: Prof^a Silvânia Vasconcelos, Prof^a Cléa Florenço, Prof David Lucena e Prof^a Glauce Viana pelos ensinamentos e acolhimento no grupo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Eu sou parte de uma equipe. Então, quando venço, não sou eu apenas quem vence. De certa forma termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas!” Ayrton Senna

RESUMO

A esquizofrenia é um transtorno mental grave que afeta mais de 21 milhões de pessoas em todo o mundo e que cursa com um conjunto de sintomas agrupados em positivos, negativos e cognitivos. Evidências mostram que essa patologia envolve alterações nos circuitos cerebrais que podem estar relacionadas a dois momentos críticos de poda sináptica (período perinatal e adolescência – hipótese neurodesenvolvimental). O modelo dos dois desafios adotado no presente estudo replica a hipótese neurodesenvolvimental através da infecção perinatal com Poly I:C (PIC), um análogo de RNA sintético de fita dupla que mimetiza uma infecção viral estimulando uma resposta via citocinas, combinado ao estresse imprevisível na adolescência. No geral a incidência da esquizofrenia é maior no sexo masculino do que no feminino, com uma razão de 1,4:1 (homem:mulher), sugere-se que tal fato ocorra pelo possível efeito neuroprotetor causado pelo estrógeno o que embasa a “hipótese do estrógeno”. Além da diferença de sintomas apresentados entre homens e mulheres pode-se observar também diferença no curso da doença e da fase do ciclo estral nas fêmeas, assim como no tratamento farmacológico. Com isso, utilizando o modelo de dois desafios em camundongos o presente estudo teve como objetivo investigar a influência do sexo nas alterações comportamentais (através dos testes de Inibição pré-pulso, labirinto em Y e interação social), bem como avaliar a expressão de proteínas relacionadas a esquizofrenia no hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal (parvalbumina, $\alpha 7$ -nAChR, NR2B-fosforilado e DRD2), assim como determinar alterações de vias metabólicas (Via das quinurenias) e expressão de enzimas relacionadas à sinalização do estrogênio (GPER, ER α , ER β , TSPO e Aromatase). O modelo induziu sintomas tipo positivos, cognitivos e negativos nos animais machos e fêmeas em diestro e os machos apresentaram um maior déficit de sintomas negativo. Nos animais machos foi observado também elevação da expressão de DRD2 (estriado) e NR2B-fosforilado (CPF) nos animais desafiados apenas na adolescência. Nas fêmeas em diestro houve diminuição de parvalbumina (estriado) e $\alpha 7$ -nAChR (CPF) nos animais expostos aos dois desafios (PIC + (E)) e nas fêmeas proestro aumento dessas mesmas proteínas quando expostas apenas ao estresse na adolescência. Nos machos que sofreram dois desafios também observamos aumento da expressão de KYNU, KAT e ACMSD com diminuição de triptofano e aumento de ácido quinolínico. Nas fêmeas em diestro também expostas aos dois desafios foi observado aumento apenas de KYNU e KAT, sem alterações significativas nas fêmeas em proestro. Os machos expostos aos dois desafios tiveram ainda diminuição de GPER, ER α , ER β , TSPO e aromatase. As fêmeas em proestro expostas aos dois desafios tiveram aumento de GPER, TSPO e aromatase, sem alterações significativas nas fêmeas em diestro. Nossos resultados apontam para um possível efeito neuroprotetor do estrógeno, tendo em vista que as fêmeas em proestro não apresentaram sintomas tipo esquizofrenia causados pelo modelo.

Palavras-chave: Esquizofrenia; Estrogênio; Triptofano; Modelo Animal; Transtornos do Neurodesenvolvimento

ABSTRACT

Schizophrenia is a serious mental disorder that affects more than 21 million people worldwide and is associated with a set of symptoms grouped into positive, negative and cognitive. Evidence shows that this pathology involves changes in brain circuits that may be related to two critical moments of synaptic pruning (perinatal period and adolescence - neurodevelopmental hypothesis). The two-hit model adopted in the present study simulates this situation through perinatal infection with Poly I: C (PIC), a synthetic double-stranded RNA analog that mimics a viral infection stimulating a response via cytokines, combined to unpredictable stress in adolescence. The incidence of schizophrenia is generally higher in males than in females, with a ratio of 1.4:1 (male: female). This fact occurs due to the potential neuroprotective effect caused by estrogen, which supports the “estrogen hypothesis”. Besides the difference in symptoms between men and women, variations can be observed in the course of the disease and in the phase of the estrous cycle in females, as well as in the pharmacological treatment. Thus, using the two-hits model in mice, the present study aimed to investigate the influence of sex on behavioral changes (through the pre-pulse inhibition, Y maze and social interaction tests), as well as to evaluate the expression of related proteins schizophrenia in the hippocampus, striatum and prefrontal cortex (parvalbumin, α 7-nAChR, phospho-NR2B and DRD2), as well as determining changes in metabolic pathways (kynurenine pathway) and expression of enzymes related to estrogen signaling (GPER, ER α , ER β , TSPO and Aromatase). The model induced positive, cognitive, and negative symptoms in male and female animals in diestrus. Furthermore, males showed a higher deficit of negative symptoms. In male animals an increase in the expression of DRD2 (striatum) and NR2B (PFC) in animals challenged only in adolescence was also observed. In diestrus females it was observed a decrease in parvalbumin (striatum) and α 7-nAChR (PFC) in animals exposed to both challenges (PIC + (S)), and in proestrus females it was noted an increase in these both proteins when they were exposed only to stress in adolescence. The males exposed to both challenges also presented an increase in the expression of KYNU, KAT and ACMSD with a decrease in tryptophan and an increase in quinolinic acid were also observed. In diestro females, also exposed to both challenges, an increase in KYNU and KAT was noticed with no significant changes in proestrus females. Males exposed to both challenges also had a decrease in GPER, ER α , ER β , TSPO and aromatase. Proestrus females exposed to both challenges had an increase in GPER, TSPO and aromatase without significant changes in diestrus females. Our results lead to a possible neuroprotective effect of estrogen, considering that females in proestrus did not show schizophrenia-like symptoms caused by the model.

Keywords: Schizophrenia; Estrogens; Tryptophan; Models Animal; Neurodevelopmental Disorders

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Vias dopaminérgicas na esquizofrenia.....	22
Figura 2–	Ilustração simplificada da via das quinureninas	32
Figura 3 –	Reação catalisada pela α -amino- β -carboximuconato- ϵ -semialdeído (ACMSD) em um contexto metabólico na via das quinureninas.....	34
Figura 4 –	Biossíntese de estrogênio.....	37
Figura 5 –	Mecanismos de sinalização de estrogênio no cérebro.....	38
Figura 6 –	Protocolo experimental.....	43
Figura 7 –	Ilustração esquemática do teste de inibição pré-pulso.....	46
Figura 8 –	Representação real do aparelho para teste de inibição pré-pulso.....	47
Figura 9 –	Aparato utilizado para o teste de Interação Social.....	49
Figura 10 –	Teste do labirinto em Y.....	50
Figura 11 –	Efeito do estresse, de poly(I:C) e de poly(I:C) + estresse na média da % de IPP de camundongos machos, fêmeas em proestro e fêmeas em diestro.....	58
Figura 12 –	Avaliação da interação social nos camundongos machos e fêmeas submetidos à administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina].....	59
Figura 13 –	Avaliação da memória de trabalho em camundongos machos e fêmeas submetidos à administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina].....	60
Figura 14 –	Avaliação da expressão relativa de parvalbumina no corpo estriado de camundongos machos e fêmeas submetidos à administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina]	61
Figura 15 –	Avaliação da expressão relativa do receptor nicotínico α -7 no córtex pré-frontal de camundongos machos e fêmeas submetidos à administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina].....	62
Figura 16 –	Avaliação da expressão relativa da subunidade NR2B fosforilada do receptor NMDA no córtex pré-frontal de camundongos machos e fêmeas submetidos à administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina].....	63

Figura 17 – Avaliação da expressão relativa do receptor dopaminérgico D2 no corpo estriado de camundongos machos e fêmeas submetidos à administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina].....	64
Figura 18 – Expressão relativa da enzima quinureninase (KYNU) no hipocampo de camundongos machos e fêmeas que receberam administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina].....	66
Figura 19 – Expressão relativa da enzima quinurenina aminotransferase (KAT) no hipocampo de camundongos machos e fêmeas que receberam administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina].....	68
Figura 20 – Expressão relativa da enzima α -amino- β -carboximuconato- ϵ -semialdeído (ACMSD) no hipocampo de camundongos machos e fêmeas que receberam administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina].....	70
Figura 21 – Efeito da exposição a um (poly I:C- PIC) ou a dois desafios (poly I:C combinado a estresse – PIC + E), nos níveis hipocampais de triptofano e ácido quinolínico em camundongos machos e fêmeas que receberam administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina].....	71
Figura 22 – Avaliação da expressão relativa do receptor GPER no hipocampo de camundongos machos e fêmeas submetidos à administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina].....	73
Figura 23 – Expressão relativa do mRNA para o receptor estrogênico GPER no hipocampo de camundongos machos e fêmeas que receberam administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina].....	75
Figura 24 – Expressão relativa do mRNA para o receptor estrogênico ER α no hipocampo de camundongos machos e fêmeas que receberam administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina].....	77

Figura 25 – Expressão relativa do mRNA para o receptor estrogênico ER β no hipocampo de camundongos machos e fêmeas que receberam administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina].....	79
Figura 26 – Expressão relativa do mRNA para a enzima AROMATASE no hipocampo de camundongos machos e fêmeas que receberam administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina].....	81
Figura 27 – Expressão relativa do mRNA para a enzima TSPO no hipocampo de camundongos machos e fêmeas que receberam administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina].....	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Divisão dos grupos experimentais.....	44
Quadro 2 – Primers utilizados forward e reverse para análise de qPCR.....	54
Quadro 3 – Sondas utilizadas forward e reverse para análise de q-PCR.....	54
Quadro 4 – Gradiente de fluxo para determinação simultânea de triptofano e seus metabólitos por HPLC.....	55
Quadro 5 – Quadro 5: Resumo dos resultados encontrados no presente trabalho.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3HAA	Ácido 3-hidroxi- <i>o</i> -antianilicílico
3HK	3-hidroxi- <i>o</i> -quinurenina
Ach	Acetilcolina
ACMS	Alfa-amino-beta-carboximuconato-epsilon-semialdeído
ACMSD	Alfa-amino-beta-carboximuconato-epsilon-semialdeído descarboxilase
AMS	Alfa-aminomuconato semialdeído
AP	Ácido picolínico
AQ	Ácido quinolínico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Cq ou Ct	<i>Threshold cycle</i>
DRD2	Receptor D ₂ de dopamina
E2	17β-estradiol
E	Estresse
ERα	Receptor de estrogênio α ou receptor de estrogênio 1
ERβ	Receptor de estrogênio β ou receptor de estrogênio 2
EUA	Estados Unidos da América
GABA	Gaba gama-aminobutírico
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GnRH	Hormônio liberador de gonadotropina
GPER	Receptor de estrogênio acoplado a proteína G
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IPP	Inibição do pré-pulso
KAT	Quinurenina aminotransferase
KYN	Quinurenina
KYNA	Ácido quinurênico
KYNU	Quinureninase
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LPS	Lipopolissacarídeo
NAD ⁺	Nicotinamida adeninada no nucleotídeo

NMDA	N-metil-d-aspartato
NR2B	Subunidade do receptor NMDA
OMS	Organização Mundial da Saúde
PIC	Ácido poliriboinosínico:poliribocitidílico; Poly I:C
PN	Dias pós-natais
PNB	Produto nacional bruto
PPIA	Peptidilprolil isomerase a
Qpcr	Reação em cadeia dapolimerase (quantitativo)
RefSeq	Sequência de referência
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único
SRR	Serina racemase
StAR	Proteína reguladora aguda esteroidogênica
TDO	Triptofano dioxigenase
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TRP	Triptofano
TSPO	Proteína translocadora de 18 kda
VQ	Via das quinureninas
α 7-nAChR	Receptores nicotínicos α 7 da acetilcolina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	Aspectos gerais	19
2.2	Fisiopatologia	20
2.3	Hipótese dopaminérgica	21
2.4	Hipótese glutamatérgica	23
2.5	Hipótese Colinérgica	24
2.6	Fatores genéticos	25
2.7	O pródromo na esquizofrenia	26
2.8	Hipótese Neurodesenvolvimental	27
2.9	Modelo experimental de dois desafios	29
2.10	Metabolismo do Triptofano	30
2.11	Diferença do sexo	35
3	HIPÓTESES	40
4	OBJETIVOS	41
4.1	Objetivo Geral	41
4.2	Objetivos específicos	41
5	METODOLOGIA	42
5.1	Animais	42
5.2	Drogas (primeiro desafio)	42
5.3	Determinação da fase do ciclo estral	42
5.4	Protocolo Experimental	43
5.5	Estímulos estressores (segundo desafio)	44
5.6	Determinações comportamentais	45
5.6.1	Inibição Pré-pulso (IPP)	46
5.6.2	Interação Social.....	48
5.6.3	Labirinto em Y.....	49
5.7	Determinações biomoleculares e neuroquímicas	50
5.7.1	Expressão proteica de GPER, DRD2, Fosfo-NMDA, PARVALBUMINA e ALFA-7.....	50
5.7.1.1	<i>Extração de proteínas</i>	50

5.7.1.2	<i>Método Bradford para dosagem de proteínas</i>	51
5.7.1.3	<i>Western Blotting</i>	51
5.8	Expressão Gênica por qPCR das enzimas KYNU, KAT, ACMSD, GPER, ERα, ERβ, Aromatase e TSPO	52
5.8.1	Preparação das amostras.....	52
5.8.2	Extração do RNA.....	52
5.8.3	Síntese do cDNA.....	53
5.8.4	PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	53
5.9	Quantificação do triptofano e seus metabólitos por HPLC	54
5.10	Análise estatística	55
6	RESULTADOS	57
6.1	O sexo influencia o comportamento de animais adultos expostos ao modelo dos dois desafios	57
6.2	O sexo influencia a expressão proteica de marcadores da esquizofrenia em animais expostos ao modelo de dois desafios	60
6.3	O sexo influencia a expressão de mediadores da via das quinurerinas e do estrógeno em animais expostos ao modelo dos dois desafios	65
7	DISCUSSÃO	85
7.1	O sexo influencia o comportamento de animais adultos expostos ao modelo dos dois desafios	85
7.2	O sexo influencia a expressão proteica de marcadores da esquizofrenia em animais expostos ao modelo de dois desafios	87
7.3	O sexo influencia a expressão de mediadores da via das quinurerinas e do estrógeno em animais expostos ao modelo dos dois desafios	88
	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	93
	ANEXOS	111

1 INTRODUÇÃO

A esquizofrenia é um transtorno mental grave com manifestações complexas e manifestada pela expressão de uma ampla variedade de sintomas e que afeta mais de 20 milhões de pessoas em todo o mundo. A taxa de incidência média no mundo é de 15,2 por 100.000 habitantes. No geral a incidência é maior no sexo masculino do que no feminino, com uma razão de 1,4 entre si.

A teoria neurodesenvolvimental da esquizofrenia propõe que anormalidades no desenvolvimento neuropsicomotor precoce é uma possível causa da doença. Sabe-se que durante o período pré-natal o feto está altamente sensível aos efeitos nocivos induzidos por insultos ambientais. Perturbações induzidas por infecções na gestante durante esse período podem levar a alterações fisiopatológicas no ambiente fetal e afetar negativamente o curso normal do desenvolvimento inicial do cérebro da prole. Isso pode ter consequências a longo prazo para o surgimento de disfunções cerebrais pós-natal devido a lesões cerebrais relevantes ou processos patológicos que ocorram durante o desenvolvimento inicial do cérebro.

A esquizofrenia é rara durante a infância e os sintomas surgem durante a adolescência e início da idade adulta. Estudos com animais usando o modelo conhecido como dois desafios (ativação imune pré-natal e o estresse pré-puberal) têm demonstrado que a associação desses fatores tem efeitos sinérgicos no desenvolvimento de anomalias comportamentais. O estresse é uma resposta individual do organismo a excessivas exigências físicas, emocionais ou intelectuais. O corpo está preparado para lidar com o estresse de curto prazo, mas o estresse prolongado pode prejudicar consideravelmente a saúde mental. Com isso o interesse da comunidade científica sobre as possíveis contribuições das infecções na vida pré-natal associadas ao estresse na adolescência tem aumentado.

Outro tópico relevante é a estreita relação entre hormônios sexuais, como o estrogênio, no funcionamento do sistema nervoso central (SNC) e saúde mental. Evidências sugerem que haja uma “hipótese de proteção do estrogênio”. A hipótese sugere que o estrogênio ajuda a proteger as mulheres de desenvolver doenças mentais graves precocemente, quando comparadas aos homens. Além disso, o declínio do estrogênio advindo com a menopausa pode levar a uma recaída ou início tardio da esquizofrenia em mulheres predispostas.

Por razões éticas e técnicas a investigação epidemiológica humana não consegue estabelecer causalidade direta para a associação entre as infecções e a esquizofrenia e muitas vezes é limitada em sua incapacidade de desvendar os mecanismos celulares e moleculares

que afetam o desenvolvimento normal do cérebro, no entanto, a pesquisa experimental em animais oferece uma oportunidade para superar essas limitações, inclusive com o uso do ácido poliribonucleotídico:poliribocitidílico (Poly I:C), um análogo de RNA viral.

Com isso, usando um modelo animal robusto, o estudo busca contribuir no entendimento da fisiopatologia da esquizofrenia e a influência do sexo no curso da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais

A esquizofrenia é considerada um dos mais graves transtornos psiquiátricos. Em todo o mundo, a esquizofrenia está associada a uma deficiência grave e que pode afetar o desempenho educacional e ocupacional. Pessoas com esquizofrenia têm 2-3 vezes mais chances de morrer mais cedo do que a população em geral. Isso geralmente ocorre devido a doenças evitáveis, como doenças cardiovasculares, metabólicas e infecções. Tais problemas são tão relevantes nos países pobres quanto nos países ricos e está entre as cinco principais causas de incapacidade por problemas mentais no mundo (depressão maior, esquizofrenia, transtornos bipolares, uso de álcool e transtornos obsessivos compulsivos) (WHO, 2020).

Na sua forma mais comum, a esquizofrenia apresenta-se com delírios paranóicos e alucinações auditivas, com aparecimento frequente em adultos jovens (entre 18 e 25 anos, quando o córtex pré-frontal ainda está em desenvolvimento) e com curso crônico. Trata-se de uma síndrome cujo conjunto de sinais e sintomas são agrupados em positivos, negativos e cognitivos. São considerados sintomas positivos ou psicóticos as alucinações, os delírios, as paranoias, a desorganização do pensamento e do comportamento e as anormalidades psicomotoras. Os sintomas negativos incluem anedonia, avolição, ausência de comportamentos sociais, alergia e pobreza de pensamento. A cognição é um termo amplo que abrange vários domínios. Para executar tarefas envolvidas na vida diária é necessário todos ou uma combinação de determinados domínios. Sendo assim os déficits cognitivos envolvem a redução da memória de trabalho e a incapacidade de manter a atenção. Tais distúrbios cognitivos são responsáveis por grande parte da morbidade a longo prazo e pelos maus resultados funcionais (INSEL, 2010).

A recuperação total (compreendida como a apresentação mínima de sintomas da doença em um período de pelo menos seis meses) ocorre apenas em menos de 14% dos pacientes nos cinco anos iniciais após o primeiro episódio psicótico. Os resultados a longo prazo podem ser levemente melhores: um grande estudo internacional de acompanhamento de 25 anos relatou apenas 16% com recuperação na fase tardia (HARRISON et. al., 2001). Já na Europa, menos de 20% das pessoas com esquizofrenia estão empregadas (MARWAHA et. al., 2007).

Em um relatório americano pôde-se observar que aqueles com doenças mentais graves eram três vezes mais propensos a serem encontrados no sistema de justiça criminal do que nos hospitais. Além disso, a ressocialização do paciente é dificultada pela incapacidade causada

pela esquizofrenia nos déficits cognitivos, como problemas de atenção e memória de trabalho, para os quais os medicamentos não conseguem melhorar com êxito (FOLSOM et. al., 2005).

A Organização Mundial da Saúde estimou que os custos diretos da esquizofrenia nos países ocidentais variam de 1,6% a 2,6% do total das despesas com saúde. Esse montante representa entre 7% e 12% do produto nacional bruto (PNB) desses países (CHONG, 2016). Nos EUA a carga econômica da esquizofrenia é superior a US\$ 60 bilhões por ano (MARCUS E OLFSON, 2008).

Para diagnosticar a esquizofrenia no DSM-5 (manual desenvolvido pela Associação Americana de Psiquiatria que auxilia os profissionais de saúde mental a diagnosticar os transtornos mentais), pelo menos 2 dos 5 sintomas característicos são obrigatórios (delírios, alucinações, fala desorganizada, comportamento desorganizado/catatônico ou sintomas negativos), e esses sintomas devem persistir por no mínimo 1 mês., além disso, um deles deve ser delírios, alucinações ou discurso desorganizado. Os sinais da perturbação devem estar presentes por 6 meses (BIEDERMANN & FLEISCHHACKER, 2016).

Embora o tratamento farmacológico tenha melhorado o curso da psicose, as pesquisas voltadas para a doença renderam pouco progresso no entendimento da fisiopatologia da esquizofrenia, que pode ser compreendida como um transtorno heterogêneo com variações no seu mecanismo patológico. Várias hipóteses já foram propostas para sua patogênese, e as evidências na literatura mostram o envolvimento da desregulação de diversos mecanismos na fisiopatologia dessa afecção (INSEL, 2010).

2.2 Fisiopatologia

Desde a descoberta do primeiro fármaco antipsicótico, a clorpromazina, no início dos anos 50, todos os fármacos antipsicóticos eficazes compartilhavam a propriedade comum do antagonismo do receptor D2 da dopamina. No entanto, com a observação de que nem todos os sintomas regrediam com o uso de fármacos voltados para esse neurotransmissor passou-se a integrar a ideia de que outros sistemas poderiam estar envolvidos na fisiopatologia central da doença (STONE E PILOWSKY, 2007).

A partir de então o glutamato (GOFF E COYLE, 2001), a serotonina (AGHAJANIAN E MAREK, 2000), a acetilcolina (RAEDLER et al, 2007), o GABA (BENES, 2015) e até mesmo a inflamação e o estresse oxidativo (FEIGENSON, KUSNECOV E SILVERSTEIN, 2014) ganharam destaque no estudo da fisiopatologia da esquizofrenia.

Em resumo, a fisiopatologia central da doença envolve anomalias nos sistemas de neurotransmissores que se manifesta como disfunção cognitiva, comportamental e social por meio de alterações no funcionamento de uma ampla gama de macro e microcircuitos (YANG E TSAI, 2017). Fatores de risco ambientais, genéticos e de vida precoce e suas interações podem contribuir para essas anormalidades. Infelizmente, nenhum dos sistemas únicos de neurotransmissores poderia explicar o quadro completo da heterogeneidade dos sintomas da esquizofrenia. (MEXAL et. al., 2010).

2.3 Hipótese dopaminérgica

A hipótese dopaminérgica afirma que a desregulação do sistema dopaminérgico está na base etiológica da esquizofrenia e está entre as teorias biológicas mais duradouras da psiquiatria. A primeira versão da hipótese da dopamina poderia ser considerada como a hipótese do receptor de dopamina. Surgiu com a descoberta de Carlsson e Lindqvist, em 1963, mostrando que os antipsicóticos agiam pelo bloqueio de receptores monoaminérgicos. Outras evidências foram observadas mostrando a eficácia antipsicótica de drogas que bloquearam o receptor da dopamina D2. Além disso foram observados efeitos indutores de psicose de drogas liberadoras de dopamina, como anfetamina. O foco da época era o excesso de transmissão da dopamina e bloqueio desses receptores para tratar a psicose, passando a ser considerada um 'distúrbio da dopamina' (HOWES E KAPUR, 2009; INSEL, 2010).

Para melhor entendimento é importante observar que as quatro principais vias dopaminérgicas são: (a) A via nigroestriatal, com os corpos celulares da substância negra para os núcleos da base, especificamente para a porção dorsal do estriado; (b) A via mesolímbica, com fibras que se projetam da área tegmentar ventral (ATV) para o estriado ventral, o que inclui o núcleo accumbens, o núcleo caudado e estruturas do sistema límbico como o hipocampo e a amígdala (envolvida nos sintomas positivos na esquizofrenia); (c) a via mesocortical que tem projeções da ATV para o córtex pré frontal (relacionada com os sintomas cognitivos e negativos na esquizofrenia); e (d) a via tuberoinfundibular, cujas fibras nervosas se projetam do hipotálamo para a hipófise anterior (STAHL, 2013) (Figura 1)

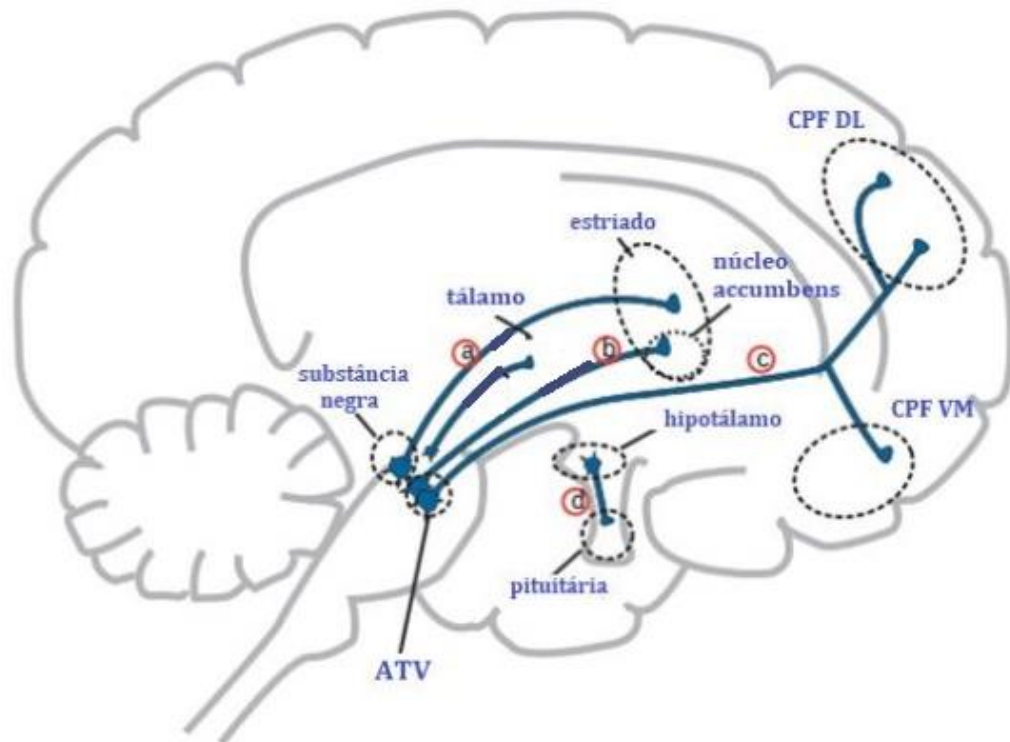


Figura 1: Vias dopaminérgicas na esquizofrenia. a) via nigroestriatal. b) via mesolímbica. c) via mesocortical. d) via tuberoinfundibular. ATV: área tegmentar ventral. CPF DL: córtex pré-frontal dorso-lateral. CPF VM: córtex pré-frontal ventro-medial. Adaptado de Stahl, 2013.

Com isso, o desenvolvimento de medicamentos antipsicóticos aprimorados foi concentrado na busca de bloqueadores de dopamina com base no conceito de que a esquizofrenia é, em parte, um estado hiperdopaminérgico. Mais adiante, os estudos de imagem apoiaram a associação do aumento da transmissão mesolímbica da dopamina com os sintomas positivos da esquizofrenia, apresentando a limitação de que esse achado não é patognomônico devido à heterogeneidade neuroquímica das populações de pacientes com esquizofrenia. Adicionalmente a isso passou-se a observar que os pacientes com esquizofrenia em uso de antipsicóticos com ação no sistema dopaminérgico não tinham efeitos satisfatórios sobre os sintomas negativos e cognitivos, pois na esquizofrenia há também uma hipoatividade dopaminérgica na via mesocortical, responsável pelos sintomas negativos, afetivos e cognitivos (GRUNDER E CUMMING, 2016).

Sendo assim, embora a hiperatividade na função dopaminérgica mesolímbica contribua substancialmente para a manifestação dos sintomas positivos, a disfunção da dopamina e seu tratamento não são suficientes para explicar a psicopatologia da esquizofrenia e seus resultados. (YOTO E COYLE, 2019). A hipótese original da dopamina deve ser

estendida para incluir contribuições de outros sistemas de neurotransmissores na fisiopatologia da esquizofrenia sendo a disfunção dopaminérgica proposta como uma via final comum que leva à psicose na esquizofrenia (HOWES E KAPUR, 2009; KAPUR, 2009; YANG E TSAI, 2017).

2.4 Hipótese glutamatérgica

O glutamato é um dos neurotransmissores excitatórios e o neurotransmissor mais abundante no cérebro. O glutamato é mediado pelos receptores N-metil-d-aspartato (NMDARs) e suas vias se ligam ao córtex, ao sistema límbico e às regiões do tálamo, que estão implicadas na esquizofrenia. Tendo como foco os sintomas cognitivos foi proposta uma hipótese envolvendo o distúrbio de glutamato (YOTO E COYLE, 2019).

A teoria é que a esquizofrenia, particularmente os sintomas do distúrbio cognitivo, pode resultar da baixa atividade do receptor NMDA nos interneurônios inibitórios do GABA no córtex pré-frontal. Alguns estudos relataram concentrações reduzidas de glutamato no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com esquizofrenia, além disso, pacientes que abusam de antagonistas da NMDAR, como fenciclidina ou cetamina, frequentemente apresentam sintomas psicóticos. A partir daí foi proposto que a diminuição da atividade glutamatérgica pode ser um fator etiológico no distúrbio (GOFF E COYLE, 2001).

Estudos de cunho genético complementaram as evidências existentes que implicavam anormalidades na neurotransmissão mediada pelo receptor NMDA na fisiopatologia da esquizofrenia. Em adição a isso, um estudo em animais usando ligantes farmacológicos seletivos ou manipulação transgênica de subunidades dos receptores NMDA também indica um papel para os receptores NMDA em um amplo espectro de comportamentos relevantes para a esquizofrenia (MOGHADDAM, 2003).

O mecanismo da doença em si pode envolver disfunção do receptor NMDA que podem ser modelados pelo bloqueio dos receptores. Uma consequência típica do bloqueio de receptores NMDA é a liberação excessiva de glutamato e acetilcolina no córtex cerebral. Foi proposto que essa liberação excessiva de transmissores excitatórios e conseqüente superestimulação de neurônios pós-sinápticos possa explicar os distúrbios cognitivos e comportamentais associados ao estado de hipofunção dos receptores de glutamato (YANG E TSAI, 2017).

Sabe-se que os receptores NMDA são compostos por um conjunto heterométrico de subunidades, sendo que pelo menos a subunidade NR1 é obrigatória neste conjunto e

combinada com diferentes arranjos da subunidade NR2 e/ou NR3. O domínio N-terminal extracelular das subunidades NR2 contém um sítio de ligação para o glutamato, o ativador primário do receptor NMDA. O NR2B é espacialmente predominante no córtex, estriado e hipocampo (WENZEL et al., 1997; GEDDES, 2015). A literatura aponta que a ativação de NMDA contendo a subunidade NR2B desativa vias de sobrevivência celular e modula negativamente a neurogênese, levando à morte neuronal (HU et al., 2008).

2.5 Hipótese Colinérgica

A neurotransmissão colinérgica desempenha um papel importante na cognição e no processamento sensorial. Há evidências de que existe uma potencial modulação de neurônios dopaminérgicos e glutamatérgicos por receptores muscarínicos colinérgicos, com isso ganha força a hipótese desse sistema desempenhar um papel importante nos déficits cognitivos associados à esquizofrenia (D'SOUZA E MARKOU, 2011).

Várias evidências apontam o envolvimento desse sistema na fisiopatologia da esquizofrenia. A análise cerebral *post-mortem* de pacientes com história de esquizofrenia relatou níveis elevados de colina acetil-transferase, uma enzima envolvida na síntese de acetilcolina, em várias áreas do cérebro como hipocampo em comparação com os controles (MCGEER E MCGEER, 1977; BREESE et al, 2000). Em contraste, foram relatados níveis reduzidos da colina acetil-transferase no núcleo accumbens e ponte em pacientes com esquizofrenia (KARSON et. al., 1993).

Outro estudo *post-mortem* mostrou que esses indivíduos apresentam reduções significativas nos receptores nicotínicos $\alpha 7$ da acetilcolina (nAChRs) em várias áreas do cérebro. A diminuição da função mediada por $\alpha 7$ pode não apenas estar ligada à esquizofrenia, mas também ao aumento do consumo de tabaco (BRUNZELL E McINTOSH, 2012). E estudos genéticos identificaram polimorfismos ligados ao gene do receptor nicotínico $\alpha 7$ de acetilcolina com diagnóstico de esquizofrenia (MEXAL et. al., 2010).

Outra observação clínica foi a de que pacientes esquizofrênicos que fazem uso de tabaco (nicotina) teriam efeitos pró-cognitivos, com melhora da cognição, melhora dos déficits sensoriais e alívio dos efeitos colaterais da terapêutica neuroléptica. A nicotina, um dos principais ingredientes psicoativos do tabaco, se liga aos receptores de canais iônicos que são ativados endogenamente pelo neurotransmissor acetilcolina (ACh) (D'SOUZA E MARKOU, 2011).

Vale ressaltar que na população afetada pela esquizofrenia é encontrada uma alta taxa de fumantes, apresentam sintomas mais graves de abstinência ao parar de fumar, apresentam taxas mais baixas de abstinência do que indivíduos saudáveis e sofrem de morbidade relacionada ao fumo e mortalidade prematura em comparação com a população em geral. Outra hipótese igualmente plausível é que esses indivíduos têm uma vulnerabilidade compartilhada para esquizofrenia e dependência do tabaco. Sendo assim, o processo inibitório mediado por receptores colinérgicos nicotínicos pode representar um potencial alvo de tratamento na esquizofrenia (BRUNZELL E McINTOSH, 2012).

2.6 Fatores genéticos

Uma análise importante que não poderia passar em branco seria o fator genético envolvido na esquizofrenia. Devido à alta herdabilidade da esquizofrenia, tem ocorrido muitos esforços para descobrir os fatores genéticos causadores e os estudos de genes candidatos têm sido uma abordagem importante. Os primeiros estudos sobre genes candidatos avaliaram dezenas de marcadores genéticos em centenas de indivíduos (ALLEN et. al., 2008; FARREL et. al., 2015).

Embora na "era genômica" essa associação fosse inevitável, ela também foi pressagiada por uma geração de estudos com gêmeos e famílias demonstrando alta herdabilidade. Se um dos pais sofre dessa condição a probabilidade de que ela seja passada para os descendentes é de 13%. Se estiver presente em ambos os pais a chance é superior a 20%. Se a esquizofrenia se desenvolver em um gêmeo monozigótico, há mais de 50% de chance de o outro também ser afetado (JANOUTOVA, 2016). No entanto, essa taxa nunca chega a 100% que seria o esperado de um distúrbio mendeliano. Foram indicados pelo menos 43 genes candidatos, mas os tamanhos de efeitos individuais são consistentemente modestos, especialmente em relação à evidência de alta herdabilidade (INSEL, 2010).

Estudos de associação em todo o genoma identificaram mais de cem polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados ao risco de esquizofrenia (YANG E TSAI, 2017). Certos genes já foram os alvos de medicamentos para a esquizofrenia, como o gene que codifica a serina racemase (SRR), que sintetiza D-serina (uma molécula que atua na sinalização neuronal ativando os receptores NMDA no cérebro), e foi observado um resultado benéfico com o uso de antipsicóticos (MOGHADDA E JAVITT, 2012).

Outros genes como DISC1, NOS1, NOS1AP, GRM, Pdxdc1 ou ZNF804A, foram implicados no alvo de tratamento para a esquizofrenia em estudos pré-clínicos (YANG E

TSAI, 2017). Evidências também mostram que os genes envolvidos na migração celular, proliferação celular, crescimento axonal, mielinização, sinaptogênese e apoptose são afetados em indivíduos com esquizofrenia, apontando insultos no desenvolvimento neurológico (FATEMI E FOLSON, 2009).

Contudo, os próprios genes não são suficientes para induzir esquizofrenia; eles também interagem com o meio ambiente, como: complicações da gravidez materna, infecção materna pré-natal, abuso na infância, ambiente urbano, uso de maconha, eventos estressantes da vida etc. Isso significa que também é necessário estudar as interações gene-ambiente (HOSAK, 2013).

2.7 O pródromo na esquizofrenia

O estágio prodrômico é aquele que se estende desde o surgimento do primeiro sinal de doença até a manifestação do primeiro sintoma positivo totalmente desenvolvido. Acredita-se que os déficits neurobiológicos associados ao início da esquizofrenia podem ser mais ativos e prejudiciais nos estágios iniciais da doença, fato que chamou atenção da pesquisa e do trabalho clínico para os estágios iniciais ou prodrômicos desse distúrbio (MILLER et al, 1999).

A hipótese do neurodesenvolvimento é apoiada por estudos de coorte que mostraram sutis atrasos neuromotores, de fala, de interação social e menores notas nos testes educacionais de crianças que desenvolveram esquizofrênia quando adultos (JONES et. al., 1994).

Outra evidência foi observada em dados de um estudo longitudinal onde foram relatados leves sintomas psicóticos no início da adolescência e que previu um risco aumentado de psicose na idade adulta, também mostrou como as crianças destinadas a desenvolver psicoses esquizofrênicas gradualmente perdiam as capacidades cognitivas quando comparadas com crianças normais, tais perdas iam desde a infância até a adolescência (REICHENBERG et. al., 2010).

Embora nos últimos anos a fase prodrômica tenha sido cada vez mais relacionada com a severidade do curso da doença, ainda são necessários maiores estudos para entender essa correlação. A detecção precoce de um pródromo ainda é difícil porque os sintomas clínicos devem ser interpretados no contexto de outros fatores de risco (MILLER et al, 1999).

2.8 Hipótese Neurodesenvolvimental

De acordo com a hipótese do neurodesenvolvimento, a etiologia da esquizofrenia pode envolver processos patológicos causados por fatores genéticos e ambientais que começam antes que o cérebro se aproxime do seu estado anatômico adulto, o que ocorre na adolescência. Foi sugerido que essas anormalidades do neurodesenvolvimento desenvolvem-se no útero a partir do segundo trimestre da gestação e que levaria à ativação de circuitos neurais patológicos durante a adolescência ou a idade adulta jovem (às vezes devido a estresse intenso), o que poderia levar ao surgimento de sintomas típicos da esquizofrenia (FATEMI E FOLSON, 2009).

A idéia de que doenças mentais graves em adultos têm origem em alterações no desenvolvimento do sistema nervoso foi fortificada com o surgimento de várias evidências. No início, pensava-se que a hipótese neurodesenvolvimental baseava-se em genes com alterações que causavam riscos neurais precoces, mas depois passou-se a incluir ideias sobre alterações na poda sináptica na adolescência (OWEN et. al., 2011; MURRAY et. al., 2017).

Alguns estudos relataram que complicações obstétricas estavam associados a anormalidades estruturais do cérebro em pacientes esquizofrênicos (STEFANIS et. al., 1999; MURRAY et. al., 2017), mostrando assim que insultos precoces à formação do cérebro podem resultar no desenvolvimento de circuitos neuronais se reorganizando até a idade adulta. Assim, a conectividade neural patológica em alguns adultos com esquizofrenia pode ser o resultado de múltiplos mecanismos compensatórios operados ao longo do desenvolvimento (REICHENBERG et. al., 2010).

Estudos mostraram que o risco de esquizofrenia aumentou em 50% em indivíduos finlandeses cujas mães foram expostas à influenza A em 1957 durante o segundo trimestre da gravidez. Posteriormente, 9 dos 15 estudos realizados replicaram esses achados. Onde havia uma associação positiva entre exposição pré-natal à influenza e esquizofrenia (MACHON, MEDNICK E SCHULSINGER, 1983; MEDNICK, MACHON E HUTTUNEN, 1988, FATEMI, 2005).

Em estudos sorológicos, foram comparados soros retirados de mulheres grávidas cujos filhos mais tarde desenvolveram esquizofrenia com um grupo controle de mulheres cujos filhos não desenvolveram o transtorno, sendo encontrado um aumento de sete vezes no risco de esquizofrenia entre os filhos de mulheres que foram expostas à gripe durante a gravidez (BROWN et. al. 2004; MANJUNATHA, 2011).

Esses estudos de associação mostraram que a exposição durante o 4º ao 7º mês de gestação oferece uma janela de oportunidade para o vírus influenza causar seus efeitos anormais no cérebro embrionário. Além disso, 3 em 5 estudos de coorte e caso-controle apóiam uma associação positiva entre esquizofrenia e exposição materna à influenza no pré-natal (WRIGHT et. al., 1995).

Infecções perinatais associadas com outros micro-organismos também já foram relatados na literatura, como o vírus da rubéola, *Toxoplasma gondii* e outros. Dados na literatura mostraram que havia um risco de 10 a 20 vezes maior de desenvolver esquizofrenia após exposição pré-natal à rubéola. A exposição pré-natal à gripe no primeiro trimestre aumentou as chances em 7 vezes, a presença de anticorpos maternos contra o *Toxoplasma gondii* leva a um risco 2,5 vezes maior (BROWN, 2006)

Outra evidência surgiu com dados sugestivos de um possível papel para retrovírus na patogênese da esquizofrenia. Estudos identificaram sequências de nucleotídeos homólogas aos genes da polimerase retroviral no líquido cefalorraquidiano de 28,6% dos indivíduos com esquizofrenia no primeiro surto e em 5% dos indivíduos com esquizofrenia crônica. Por outro lado essas seqüências retrovirais não foram encontradas em indivíduos normais (KARLSSON et. al., 2001).

Filhos de mães com níveis elevados de imunoglobulina G e imunoglobulina M, bem como anticorpos para o vírus herpes simplex tipo 2, durante a gravidez têm um risco aumentado de esquizofrenia. Citocinas como IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral α (TNF- α) são elevadas nas gestantes após infecção materna. Todas essas citocinas são conhecidos por regular o desenvolvimento cerebral normal e têm sido implicados na corticogênese anormal (BUKA, 2001; YOON, 2003).

Acredita-se que existam pelo menos dois mecanismos que podem ser responsáveis pela transmissão dos efeitos virais da mãe para o feto. (1) Por infecção viral direta: há relatos clínicos, bem como experimentais, mostrando que a infecção viral por influenza A de uma mãe grávida pode causar passagem transplacentária da carga viral para o feto (ARONSSON, 2002), (2) ou através da indução da produção de citocinas: vários relatórios clínicos e experimentais mostram a capacidade da infecção pelo influenza humano em induzir a produção de citocinas sistêmicas pelo sistema imunológico materno, pela placenta ou mesmo pelo feto (YOON, 2003).

Mais adiante passou-se a pensar na ideia de que o processo crítico pode ser uma poda sináptica anormal durante a adolescência. Essa evidência foi apoiada pelos achados em

trabalhos que mostraram que as variações em genes podem induzir poda sináptica excessiva e evidências de que a perda de volume cortical parece ocorrer à medida que a psicose começa a surgir na adolescência (CANNON et. al., 2015; SEKAR et. al., 2016).

Um ponto de partida para o mapeamento da fisiopatologia da esquizofrenia pode começar com o crescente reconhecimento de que se trata de um distúrbio do neurodesenvolvimento, ou talvez uma coleção de distúrbios do neurodesenvolvimento que envolvem alterações nos circuitos cerebrais em momentos onde este desenvolvimento cerebral esteja vulnerável a insultos principalmente externos (INSEL 2010).

Talvez a mudança mais fundamental da redefinição da esquizofrenia como um distúrbio do desenvolvimento neurológico seja a noção de trajetória da doença. Se o distúrbio começa na vida pré-natal ou perinatal, a psicose do final da adolescência não deve ser vista como o início, mas como um estágio tardio do distúrbio (SEKAR et. al., 2016).

2.9 Modelo experimental de dois desafios

O modelo experimental de dois desafios tenta se aproximar do que se postula na teoria neurodesenvolvimental da esquizofrenia. Este modelo é composto pelo primeiro “desafio”: insultos no desenvolvimento precoce, que podem levar à disfunção de redes neurais específicas que representam sinais e sintomas pré-mórbidos observados em indivíduos que mais tarde desenvolveriam esquizofrenia. E pelo segundo “desafio” que ocorre na adolescência quando a eliminação excessiva de sinapses e perda de plasticidade pode explicar o surgimento dos sintomas (GIOVANOLI et. al., 2013).

Uma série de estudos relevantes em diferentes modelos animais para esquizofrenia mostram que a infecção materna por Poly I:C, um RNA sintético de fita dupla que mimetiza uma infecção viral que estimula uma resposta via citocinas, pode causar anormalidades na inibição do pré-pulso (IPP), ou após exposição materna ao lipopolissacarídeo (LPS) de endotoxina da parede celular de *E. coli* causam interrupção do bloqueio sensorimotor na prole. Esses modelos sugerem que a estimulação direta da produção de citocinas por infecções ou agentes imunogênicos causa perturbações em vários índices estruturais ou comportamentais do cérebro relevantes para a esquizofrenia (BORRELL et. al., 2002; GIOVANOLI et. al., 2013; MONTE et al. 2017).

A ativação imunológica pré-natal e a exposição ao estresse durante a adolescência tem sido associada ao desenvolvimento de alterações de formação neuronal no cérebro com desenvolvimento de psicopatologias na fase adulta. Haja vista que os períodos vulneráveis

durante o desenvolvimento do sistema nervoso são sensíveis a insultos ambientais porque dependem do surgimento de processos críticos de desenvolvimento (isto é, proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese, mielinização e apoptose) (RICE E BARONE, 2000; DAVIS, 2016).

Em geral, a sequência de eventos de desenvolvimento neuronal é comparável entre as espécies, embora as escalas de tempo sejam consideravelmente diferentes. Diferentes domínios comportamentais (por exemplo, funções sensoriais, motoras e diversas funções cognitivas) são organizados por diferentes áreas do cérebro. Embora haja diferenças importantes entre o cérebro de um roedor e o de um humano, podem ser identificadas organizações análogas (BORRELL et. al., 2002).

Para a avaliação de riscos de fatores ambientais é fundamental que tenhamos uma boa compreensão do desenvolvimento neural normal em humanos e em outras espécies utilizadas nos estudos animais. Os precursores celulares do cérebro e da medula espinhal, que compõem o sistema nervoso central (SNC), começam a se desenvolver no início da embriogênese através do processo chamado neurulação (FRANKLIN, SAAB E MANSUY, 2012).

Os gradientes de maturação do desenvolvimento de regiões do sistema nervoso em ratos e nos seres humanos seguem a mesma sequência geral, no entanto com diferença de tempo. O período da adolescência é um tempo de alta densidade sináptica em todos os primatas superiores, incluindo humanos, posteriormente a densidade sináptica diminui em todas as áreas do córtex. É importante reiterar que o sistema nervoso se desenvolve por um período muito longo, que se estende desde o período embrionário até a puberdade, com sinaptogênese e mielinização continuando pela puberdade em animais e humanos (RICE E BARONE, 2000).

2.10 Metabolismo do Triptofano

A via das quinureninas (VQ) desempenha um papel importante na geração de energia celular na forma de nicotinamida adeninada no nucleotídeo (NAD⁺). Como os requisitos de energia aumentam excessivamente durante uma resposta imune, a via das quinureninas é um regulador chave do sistema imunológico. Muitas quinureninas são neuroativas e modulam a neuroplasticidade e/ou exercem efeitos neurotóxicos em parte por seus efeitos na sinalização do receptor NMDA e na neurotransmissão glutamatérgica (SAVITZ 2019).

As quinureninas são produzidas em muitos tecidos diferentes e é regulada parcialmente pelas enzimas indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e triptofano 2,3 dioxigenase

(TDO), sendo a IDO capaz de ser ativada por interferon- γ (IFN- γ), mostrando assim que uma desregulação de citocinas (como no estresse ou inflamação) podem levar a ativação dessa enzima (KANAI et. al., 2009).

Apenas uma pequena porcentagem de triptofano (TRP) é metabolizada em serotonina. Mais de 95% do TRP é convertido em quinurenina (KYN) e seus produtos de decomposição, culminando na geração de NAD⁺ (BENDER, 1983).

A VQ tem dois ramos principais (Fig. 2). Sob condições fisiológicas, a KYN é preferencialmente convertida em 3-hidroxiquinurenina (3HK), em seguida, em ácido 3-hidroxi-5-anilicídico (3HAA), depois em ácido quinolínico (AQ) e, finalmente, em NAD⁺. O saldo remanescente do KYN é convertido em ácido quinurênico (KYNA) pelas enzimas quinurenina aminotransferase (KAT) (CERVENKA, AGUDELO E RUAS, 2017).

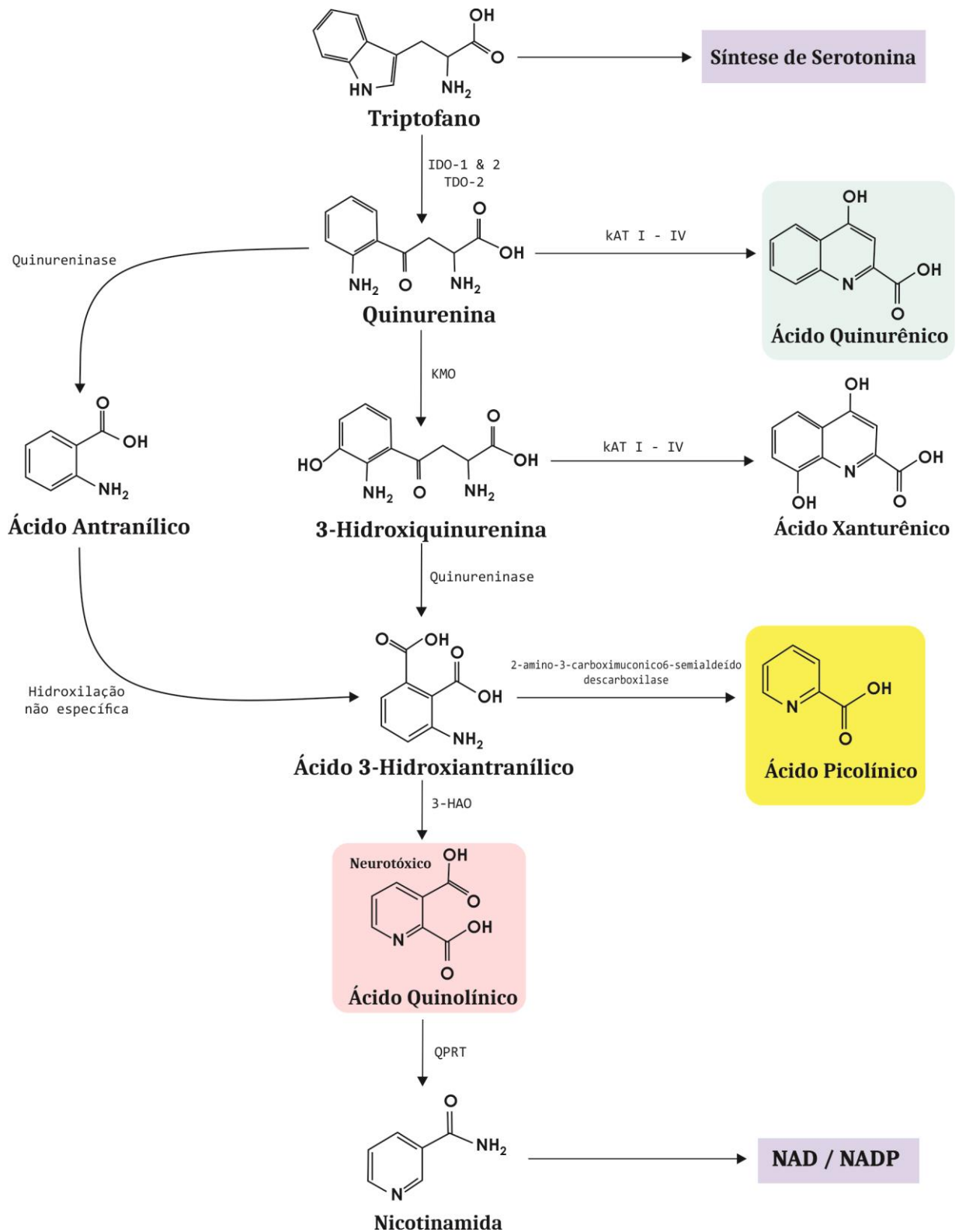


Fig. 2. Ilustração simplificada da via das quinureninas. Adaptado de SAVITZ, 2019.

Sabe-se que as enzimas IDO e TDO existem em níveis mais altos na periferia, em comparação com o SNC, além disso a KYN atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, no entanto, devido à sua estrutura polar, o KYNA não atravessa a barreira hematoencefálica.

Assim, o KYNA cerebral é predominantemente derivado do KYN cerebral. A conversão de KYN a KYNA ocorre principalmente dentro dos astrócitos, pois essas células contêm KATs, mas não KMO e, portanto, não podem degradar KYN em 3-HK e seus metabólitos (PLITMAN et. al., 2017), já o QUIN é produzido nas células da microglia (HEYES et al, 1997)

O KYNA é um antagonista endógeno dos receptores NMDA e receptores nicotínicos $\alpha 7$ da acetilcolina ($\alpha 7nAChR$), além disso o KYNA funciona como eliminador de radicais livres e antioxidante (PERKINS E TONE, 1982; SAVITZ, 2019). Já o ácido quinolínico é um agonista do receptor NMDA que pode inibir adicionalmente a recaptção de glutamato pelos astrócitos, levando à excitotoxicidade (STONE E PERKINS, 1981; HILMAS et. al., 2001).

Embora a esquizofrenia seja caracterizada por sintomas positivos, negativos e cognitivos, as anormalidades neurometabólicas também foram identificadas como características-chave da doença. Evidências sugerem que níveis anormais de KYNA estão envolvidos na fisiopatologia da esquizofrenia (PLITMAN et. al., 2017). A conversão de KYN a KYNA ocorre principalmente dentro dos astrócitos, pois essas células contêm KATs, mas não KMO e, portanto, não podem degradar KYN em 3-HK e seus metabólitos (GUILLEMIN et. al., 2001).

Na vias das quinurenias algumas enzimas têm papel chave nesse metabolismo, são elas:

KYNU: A quinureninase é uma enzima que catalisa a clivagem da L-quinurenina e L-3-hidroxiquinurenina em ácido antranílico, precursor do ácido quinolínico, considerado neurotóxico (SAVITZ, 2019).

KAT: A quinurenina aminotransferase tem atividade que envolve a transaminação da quinurenina para produzir o ácido quinurênico (KYNA), que possui propriedades neuroprotetoras. (SAVITZ, 2019).

ACMSD: A enzima alfa-amino-beta-carboximuconato-epsilon-semialdeído descarboxilase (ACMSD) é uma amido-hidrolase que participa da formação do ácido picolínico (AP). (SAVITZ, 2019).

O ACMSD controla o destino metabólico do catabolismo do triptofano ao longo da via das quinureninas. Converte alfa-amino-beta-carboximuconato-epsilon-semialdeído (ACMS) em alfa-aminomuconato semialdeído (AMS). Na presença de ACMSD, o ACMS é convertido em AMS, um catabolito benigno. O ACMS pode ser convertido não enzimaticamente em ácido quinolínico. De fato, a enzima fica em um ponto de ramificação do caminho do triptofano para o NAD e determina o destino final do aminoácido, ou seja, transformação em

ácido picolínico, oxidação completa através do ciclo do ácido cítrico ou conversão em NAD através da síntese de ácido quinolínico (Fig. 3) (GARAVAGLIA et. al., 2009).

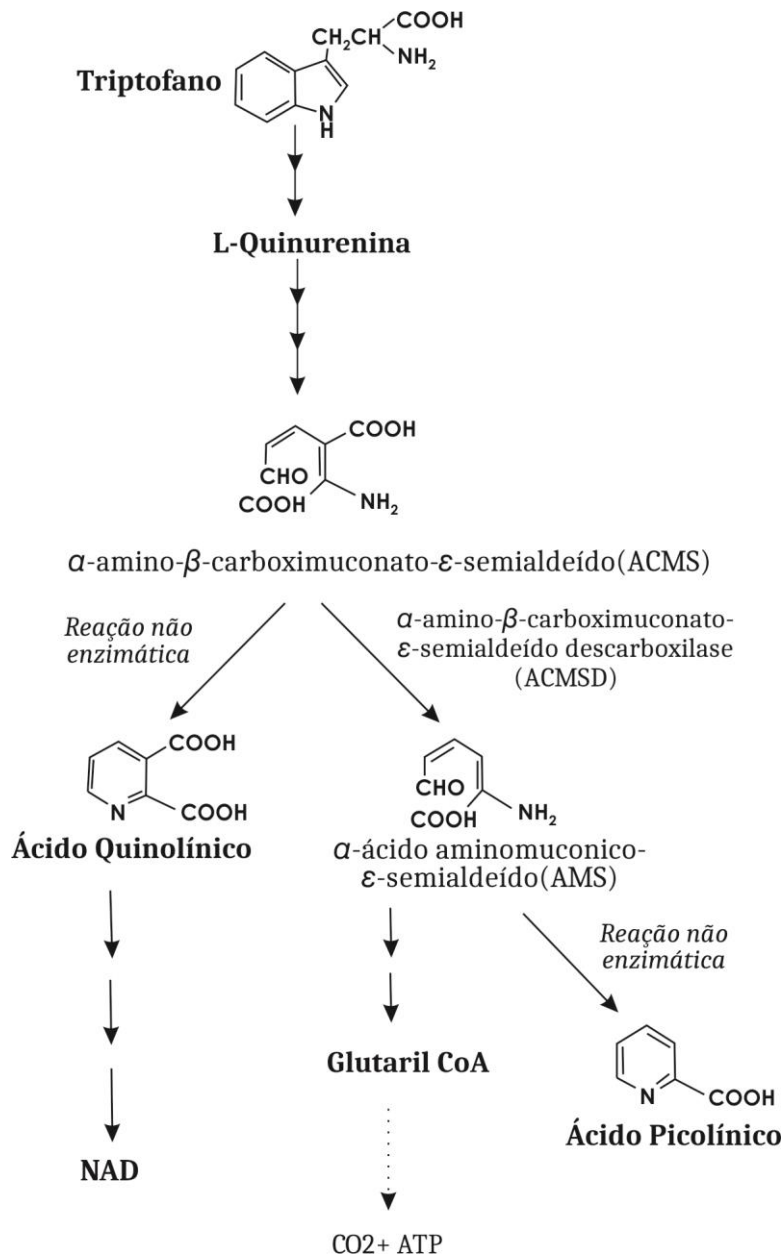


Figura 3. Reação catalisada pela α -amino- β -carboximuconato- ϵ -semialdeído (ACMSD) em um contexto metabólico na via das quinureninas. Dependendo da atividade da ACMSD o resultado final possui vários destinos metabólicos (Adaptado de GARAVAGLIA et. al., 2009).

Outras investigações demonstraram claramente que as alterações na atividade da ACMSD são prontamente refletidas pelos níveis de ácido quinolínico no soro e no tecido (SHIN et. al., 2006). Além disso, o ÁCIDO PICOLÍNICO exibe importantes propriedades

imunomoduladoras, capaz de estimular a apoptose (OGATA et. al., 200). ativar macrófagos em processos pró-inflamatórios (BOSCO et. al., 2003)

2.11 Diferença do sexo

A observação clínica mostra que homens e mulheres são diferentes em prevalência, sintomas e respostas ao tratamento de vários distúrbios psiquiátricos. A hipótese relacionada é de que os hormônios gonadais estão envolvidos nas diferenças sexuais na esquizofrenia. Por exemplo, acredita-se que o estrogênio possa desempenhar papéis neuroprotetores contra a patologia da esquizofrenia nas mulheres (COHEN et. al., 1999; RENA et. al., 2016).

É evidente que os homens têm uma idade de pico única para o início dos sintomas (entre 18 e 24 anos) e as mulheres têm dois picos, primeiro pico entre 25 e 30 anos e o segundo após a menopausa (ANGERMEYER E KÜHN, 1988; NOWROUZI et. al., 2015).

De fato, a deficiência de estrogênio está altamente relacionada à gravidade dos sintomas psiquiátricos em mulheres durante a menopausa. Outra evidência é que pacientes com esquizofrenia do sexo feminino geralmente apresentam sintomas mais graves na fase de baixo estrogênio do ciclo menstrual (HALLONQUIST et. al., 1993; GRIGORIADIS E SEEMAN, 2002; CHOI, KANG E JOE, 2001). A gravidez geralmente é, embora nem sempre, um período menos sintomático para as mulheres, mas as recidivas são frequentes após o parto (KENDALL, CHALMERS E PLATZ, 1987).

Relatos nos mostram que homens com esquizofrenia parecem ter mais sintomas negativos e características clínicas mais graves do que as mulheres que apresentam mais sintomas do tipo positivo e afetivo (RIETSCHEL et. al., 2015). Além disso, Fineberg et al 2016 mostrou que os fetos masculinos são mais vulneráveis a adversidades do que os femininos e que complicações obstétricas acontecem mais em bebês masculinos do que femininos. Outro dado importante é que os homens estão mais propensos ao segundo desafio proposto no tópico anterior, pois são mais propensos do que as mulheres a usar quase todos os tipos de drogas ilícitas (CBHSQ, 2016).

Um estudo sugere que, nas faixas etárias mais jovens, as mulheres necessitam de doses antipsicóticas mais baixas do que os homens, mas que após a menopausa elas exigem doses mais altas (SEEMAN, 1983). Vale salientar que já foi relatado na literatura dados que mostram que o hormônio pode interagir com antipsicóticos. O estudo demonstrou que a terapia com estrogênio isolada ou como terapia adjuvante aos antipsicóticos provoca uma melhora mais rápida em homens e mulheres com esquizofrenia (KULKARNI et. al., 2011).

As fontes potenciais de estrogênio no cérebro incluem estrogênios circulantes produzidos fora do SNC, conversão local de precursores androgênicos circulantes e síntese direta do colesterol nos neurônios e células gliais. Todas as enzimas envolvidas na biossíntese de 17β -estradiol estão presentes no cérebro e são expressas em ambos os neurônios e astrócitos (CERSOSIMO E BENARROCH, 2015).

A esteroidogênese cerebral é regulada independentemente da esteroidogênese periférica e os níveis de esteroides do plasma não refletem os níveis esteroidais do cérebro. No entanto, o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), que estimula a síntese de 17β -estradiol (E2) no ovário, também ativa a síntese de E2 no hipocampo (CARUSO ET AL, 2013; PRANGE-KIEL ET AL, 2013)

O primeiro passo da esteroidogênese é a conversão do colesterol em pregnenolona na membrana mitocondrial interna (figura 4). Esse processo envolve a proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR) e a proteína translocadora de 18 kDa (TSPO), que transportam o colesterol da membrana mitocondrial externa para a interna, onde a enzima de clivagem do citocromo P450 colesterol lateral transforma o colesterol em pregnenolona. No retículo endoplasmático, a pregnenolona é então convertida em outros esteróides em uma série de etapas consecutivas. A 7α -hidroxilase metaboliza a pregnenolona em desidroepiandrosterona, que é então metabolizada sequencialmente em androstenediol e testosterona; a AROMATASE p450 transforma testosterona em E2. A atividade da aromatase é baixa para a biossíntese de E2; essa enzima é amplamente expressa no cérebro quando está localizada tanto na fase pré-sináptica quanto na pós-sináptica (CERSOSIMO E BENARROCH, 2015).

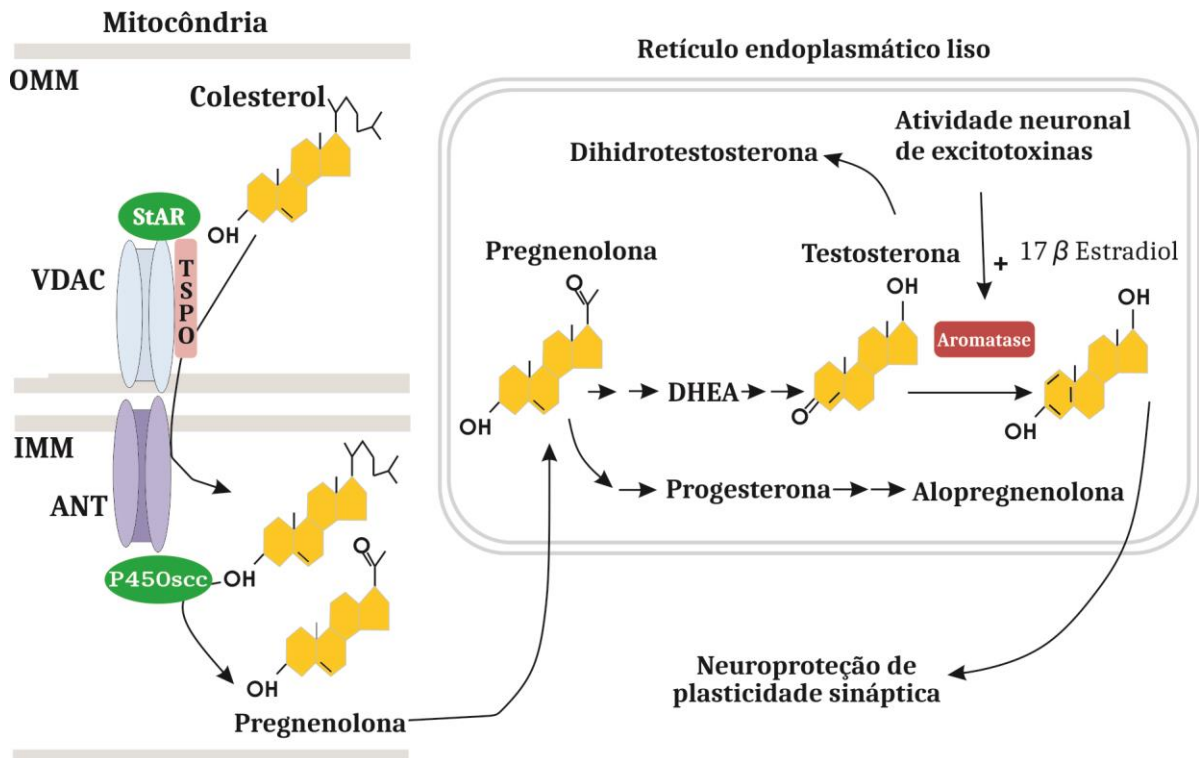


Fig. 4. Biossíntese de estrogênio. O primeiro passo da biossíntese do estradiol envolve a proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR) e a proteína translocadora de 18 kDa (TSPO), que transportam o colesterol da membrana mitocondrial externa (OMM) para a membrana mitocondrial interna (IMM), onde o citocromo P450 colesterol A enzima de clivagem da cadeia lateral (P450scc) transforma o colesterol em pregnenolona. Essas 3 proteínas formam um complexo molecular com o canal aniônico dependente de voltagem (VDAC) e o translocador de nucleotídeo de adenina (ANT). No retículo endoplasmático liso, a pregnenolona é então convertida em outros esteróides por uma série de etapas consecutivas que levam à formação de desidroepiandrosterona (DHEA), que é então metabolizada sequencialmente em testosterona; a aromatase p450 transforma testosterona em estradiol. Pregnenolona também é a fonte de progesterona, o que leva à produção do neurosteróide alopregnenolona. Tanto a atividade neuronal quanto a lesão promovem a síntese de estradiol no cérebro. Adaptado de (CERSOSIMO E BENARROCH, 2015).

O estradiol exerce dois tipos de ação no cérebro: efeitos genômicos a longo prazo e efeitos rápidos mediados pela membrana. Ambos os efeitos são mediados pelos Receptores de Estrogênio (ERs). Existem duas classes de receptores diferentes: receptores nucleares α e β (ER α e ER β , respectivamente) e receptores acoplados a proteína G, sendo o principal desta classe o GPER. Esses receptores possuem nível de expressão variável no cérebro e são ativados por agonistas seletivos (NOVAC E HEINZEL, 2004).

Na ausência de ligação ao E2 os receptores ER α e ER β são encontrados como monômeros. A ligação a E2 desencadeia a fosforilação e alterações conformacionais que

promovem sua homodimerização ou heterodimerização e translocação para o núcleo. No núcleo, os ERs interagem com os elementos de resposta ao estrogênio nas sequências reguladoras dos genes alvo para ativar ou inibir sua transcrição por meio de interações com diferentes cofatores. Além disso, A ativação de ERs de membrana desencadeia múltiplas vias de proteína quinase que também são capazes de regular essa transcrição (LISSE, HEWISON E ADAMS, 2011).

Existe uma conversa cruzada entre os efeitos genômicos a longo prazo e os efeitos rápidos mediados pela membrana para regulação do mecanismo de transcrição. Por exemplo, os ERs não apenas atuam diretamente no nível do núcleo, mas também indiretamente através da ativação de cascatas (Ex.: MAPK/ERK e PI3K/AKT) que levam à fosforilação e ativação de fatores de transcrição como CREB (Fig. 5) (VASUDEVAN E PFAFF, 2008).

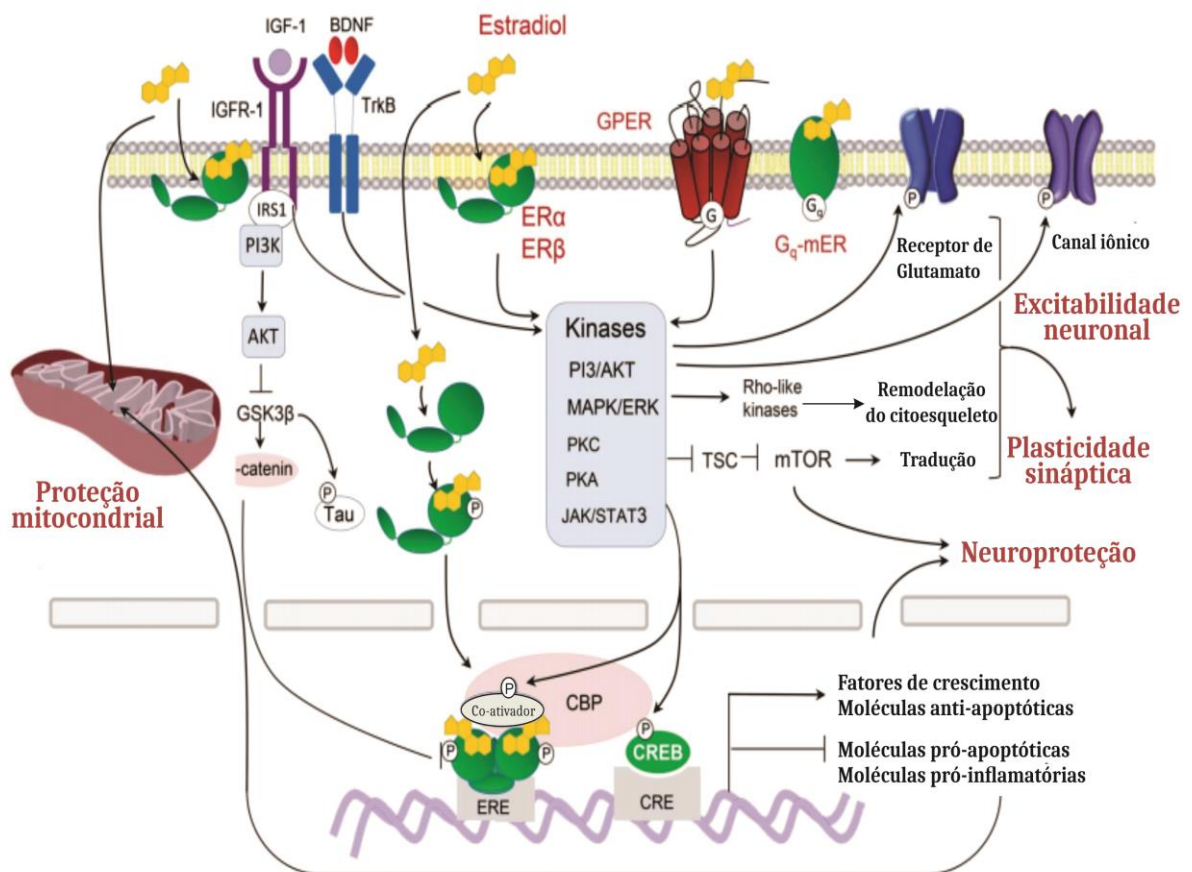


Fig. 5: Mecanismos de sinalização de estrogênio no cérebro (Adaptado de CERSOSIMO E BENARROCH, 2015).

As diferenças entre o homem e a mulher que já foram descritas na esquizofrenia são importantes, pois podem lançar uma direção sobre os fatores que contribuem para a expressão

da doença, além disso podem ter implicações importantes tanto em pesquisas sobre a fisiopatologia e etiologia da esquizofrenia quanto na prática clínica (JONES et al, 2011).

O protagonista sugerido para contribuir com estas diferenças são os hormônios sexuais, mais especificamente o estrogênio. O papel dos hormônios sexuais pode ser dividido entre os efeitos organizacionais e de ativação. Os efeitos organizacionais ocorrem durante um período crítico na vida fetal e influenciam de forma permanente no cérebro em desenvolvimento. Os efeitos ativacionais são as influências diretas dos hormônios circulantes que aparecem quando os níveis hormonais aumentam e diminuem (SEEMAN E LANG, 1990). No entanto, estudar a influência do sexo sobre o neurodesenvolvimento torna-se uma tarefa quase impossível em humanos, o que nos faz buscar nos modelos animais robustos uma forma de encontrar respostas e contribuir no estudo da esquizofrenia (JONES et al, 2011).

Sabe-se que há períodos vulneráveis durante o desenvolvimento do sistema nervoso que pode ser perturbado por estímulos externos, sendo esse estímulo considerado um estresse (definido classicamente como uma condição que perturba seriamente o equilíbrio fisiológico e psicológico de um indivíduo) e que o neurodesenvolvimento inicia-se no período embrionário e vai até a adolescência. Portanto, insultos como infecções perinatais e estresse na adolescência poderiam alterar os processos de proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese, mielinização e apoptose no SNC (RICE E BARONE, 2000; FRANKLIN, SAAB E MANSUY, 2012)

Assim o modelo de dois desafios utilizado no estudo mimetiza insultos nestes períodos vulneráveis para o neurodesenvolvimento e mostra-se um modelo com validade de face (quando apresenta homologia de sintomas), de constructo (quando apresenta a capacidade de mimetizar a teorica neurobiologia da doença) e de validade preditiva (quando o modelo consegue mostrar uma resposta farmacológica ao tratamento com antipsicóticos conhecidos, seja uma resposta esperada ou a falta dela). Apesar de não apresentarmos a validade preditiva no nosso estudo, o seu valor já foi bem demonstrado na literatura (JONES et al, 2011; DAVIS et al, 2016; MONTE et al, 2017).

Nesse contexto, o presente estudo pretende contribuir para compreensão da influência do sexo e de fatores externos durante o neurodesenvolvimento, influenciando assim proteínas e vias metabólicas correlacionadas com a neurobiologia da esquizofrenia.

3 HIPÓTESES

O modelo dos dois desafios em camundongos através da administração neonatal de Poly I:C + estresse na adolescência induz diferentes alterações comportamentais e neuroquímicas nos animais o que contribui para elucidação da etiopatogenia da esquizofrenia em humanos. Estas alterações são diferentes em camundongos machos e fêmeas onde o hormônio estrogênio possa conferir algum nível de proteção e influenciar nas vias metabólicas possivelmente envolvidas na fisiopatologia da esquizofrenia.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Investigar a influência do sexo em parâmetros comportamentais e neuroquímicos em camundongos submetidos ao modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia induzido por desafio imune neonatal associado a estresse na adolescência.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar a influência do sexo no desenvolvimento de sintomas do tipo positivo (IPP), negativo (interação social) e cognitivo (labirinto em Y) da esquizofrenia em animais adultos expostos ao modelo dos dois desafios;
- Determinar alterações na expressão de proteínas relacionadas à neurobiologia da esquizofrenia no corpo estriado (parvalbumina e DRD2) e no córtex pré-frontal (α 7-nAChR e NR2B-fosforilado) em machos e fêmeas submetidos ao modelo de dois desafios;
- Avaliar as alterações da via das quinureninas (via de degradação do triptofano) no hipocampo de animais expostos ao modelo de dois desafios usando as técnicas de HPLC e qPCR, observando a influência do sexo nas alterações;
- Avaliar a expressão de proteínas relacionadas aos hormônios estrogênicos (GPER, ER- α , ER- β , TSPO e Aromatase) no hipocampo animais expostos ao modelo de dois desafios.

5. METODOLOGIA

5.1. Animais

Os animais utilizados nos experimentos foram matrizes de camundongos Swiss adultos machos e fêmeas (20-30 g) oriundos do biotério da Universidade Federal do Ceará. As matrizes adultas recebidas foram ambientadas por uma semana e colocadas para acasalamento (machos:fêmeas = 1:3) para a obtenção dos filhotes utilizados nos experimentos. As fêmeas prenhas foram monitoradas para o dia do parto, que foi contado como dia pós-natal 0 (PN0). Os animais foram mantidos a uma temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), com ciclos claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 7:00 da manhã) e com alimento e água *ad libitum*, exceto durante os experimentos.

O projeto teve aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal (CEUA-UFC) sob número 08/15 e os experimentos seguiram os requisitos legais e éticos fornecidos pelo Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (NIH, 1996) bem como de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

5.2. Drogas (primeiro desafio)

O análogo de RNA viral, Polyinosinic:polycytidylic (Poly (I:C)) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) foi diluído em salina para a concentração de 2mg/kg de peso e administrado em um volume de injeção de 30 μl /8 g de peso, via intraperitoneal (i.p). A dose de Poly (I:C) foi baseada em estudos anteriores (GIOVANOLI et al., 2013). O Poly(I:C) foi utilizado por se tratar de um polímero de RNA de fita dupla, um padrão molecular associado à infecção viral por ser produzida pela maioria dos vírus em algum momento durante a replicação, sendo reconhecido por receptores Toll-like3 responsáveis por ativar as vias de sinalização intracelular que serão efetoras da resposta imune contra patógenos virais (BSIBSI et al, 2012).

5.3. Determinação da fase do ciclo estral

Com o intuito de observar a influência do estrogênio na esquizofrenia, foi realizado a verificação do ciclo estral das fêmeas da prole no período da manhã através de esfregaço vaginal a fresco entre o PN 70 a PN 78 (para encontrar o período do diestro ou proestro) seguindo protocolo previamente estabelecido por Marcondes et al, 2002, e observado em microscópio óptico nas objetivas de 10 e 40x. O ciclo estral tem uma duração média entre

quatro e cinco dias e pode ser dividido em quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro, sendo na fase de proestro onde encontra-se o pico hormonal de estradiol e na fase de diestro encontram-se os níveis mais baixos do hormônio (Marcondes et al, 2002).

5.4. Protocolo Experimental

Os experimentos foram conduzidos conforme o protocolo experimental do modelo de esquizofrenia dos dois desafios induzido por estimulação imune pós-natal (primeiro desafio) e estresse na adolescência (segundo desafio) (GIOVANOLI et al., 2013. BROWN *et al.* 2004).

Após o acasalamento e o nascimento da prole, os filhotes foram divididos de forma randomizada em 2 grupos iniciais (salina ou Poly (I:C) como descrito na figura 6.

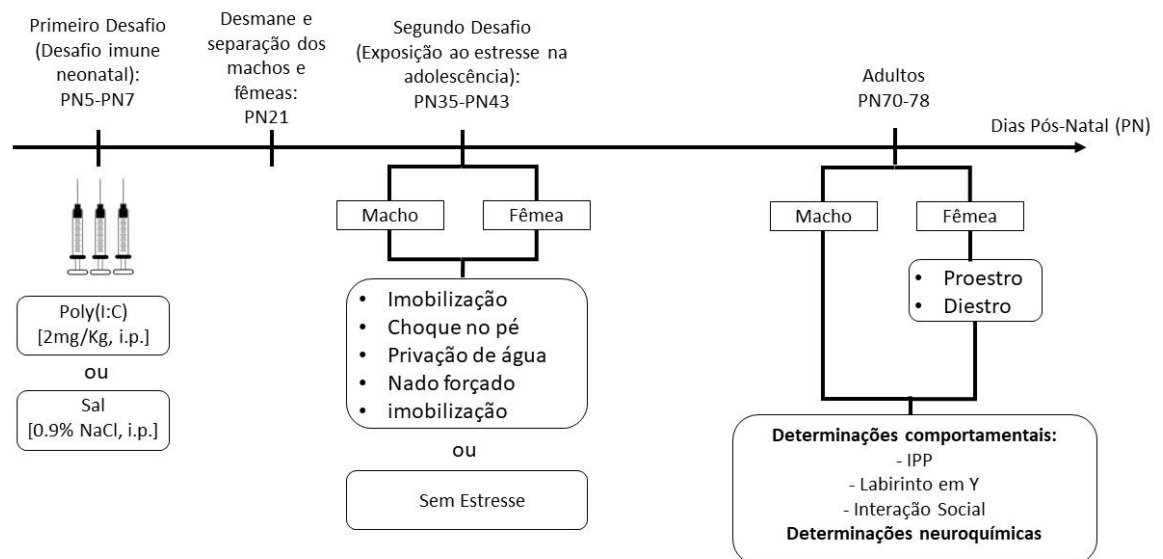


Fig. 6. Protocolo experimental (Fonte: própria).

No primeiro desafio, o análogo de RNA viral, Poly (I:C) 2 mg/kg, foi administrado via i.p. nos camundongos nos dias pós-natais (PN) 5, 6 e 7. Estes dias equivalem ao fim do terceiro trimestre da gravidez para os seres humanos (SEMPLE et al., 2013), que corresponde a um período vulnerável para distúrbios de desenvolvimento, uma vez que o acometimento de infecções virais nessa fase da gestação humana está associado a um risco aumentado para a psicose na prole quando adulta (BROWN et al. 2004; BUKA et al., 2008). Para os animais controles foi administrada solução salina. Os animais tratados com Poly(I:C) ou salina foram tratados com um volume de 30 µl/ 8 g de peso corporal.

Os filhotes foram mantidos com suas respectivas genitoras em gaiolas, até o PN21 (desmame), onde foram separados de acordo com o sexo, tratamento e organização para o segundo desafio (com estresse ou sem estresse), de maneira que cada grupo contivesse um “n” de 10 a 15 animais oriundos de pelo menos seis proles diferentes. O modelo experimental contou com um total de 12 grupos (Quadro 1).

Sexo	Primeiro desafio (primeiro desafio - PN 5-7)	Segundo desafio (segundo desafio - PN 35 - 43)	Ciclo estral (PN 70-78)	Grupo
Macho	Salina	sem estresse (-)	-	Macho Salina
Macho	Salina	com estresse (+)	-	Macho Salina + (E)
Macho	Poly (I:C)	sem estresse (-)	-	Macho PIC
Macho	Poly (I:C)	com estresse (+)	-	Macho PIC + (E)
Fêmea	Salina	sem estresse (-)	Diestro	Diestro Salina
Fêmea	Salina	com estresse (+)	Diestro	Diestro Salina + (E)
Fêmea	Poly (I:C)	sem estresse (-)	Diestro	Diestro PIC
Fêmea	Poly (I:C)	com estresse (+)	Diestro	Diestro PIC + (E)
Fêmea	Salina	sem estresse (-)	Proestro	Proestro Salina
Fêmea	Salina	com estresse (+)	Proestro	Proestro Salina (E)
Fêmea	Poly (I:C)	sem estresse (-)	Proestro	Proestro PIC
Fêmea	Poly (I:C)	com estresse (+)	Proestro	Proestro PIC + (E)

Quadro 1: Divisão dos grupos experimentais. PN: dia pós-natal.

Para a indução dos dois desafios os animais foram submetidos, além da injeção de poly I:C no período pós-natal, a eventos estressantes na adolescência (segundo desafio). As avaliações comportamentais dos animais e o ciclo estral foram realizadas entre os PN70 e 78 (idade adulta). Seguindo as determinações comportamentais, os camundongos foram eutanasiados por decapitação para os ensaios neuroquímicos e retirados o hipocampo, o córtex pré-frontal e o corpo estriado rapidamente, congelados e armazenados a -70°C até os ensaios.

5.5 Estímulos estressores (segundo desafio)

O protocolo de estresse sub-crônico variável incluiu cinco eventos estressores imprevisíveis realizados entre PNs 35 a 43, com intervalo de 1 dia entre cada evento estressor: PN35 - Imobilização, PN37 – Choque no pé, PN39 – Privação de água, PN41 – Nado forçado e PN43 – Imobilização. Esse período é compatível à idade de 12 a 18 anos em seres humanos (SEMPLE et al., 2013) e é particularmente crítico em relação à associação entre exposição a

experiências traumatizantes e doenças subsequentes relacionadas à psicose na idade adulta (FISHER et al., 2010; JIA et al., 2010), fato que traz uma validade translacional maior ao modelo. O estresse no período da adolescência foi induzido através dos cinco eventos descritos a seguir (GIOVANOLI et al., 2013):

D35: Imobilização: Os camundongos foram mantidos em tubos de plástico foscos individuais (diâmetro: 6 cm, comprimento: 13 cm) por 45 min. Os tubos contensores tinham furos (2 mm de diâmetro), de modo a facilitar o fornecimento de oxigênio. Os animais foram imediatamente devolvidos para suas gaiolas ao final do procedimento.

D37: Choque no pé: Os camundongos passaram por 3 estímulos de choques de intensidade de 3mA durante 1 segundo, separados por 3 minutos de descanso, no aparelho de Esquiva Passiva (INSIGHT equipamentos científicos – Brasil modelo EP- 104-MC). A sessão termina com um período de adicional de 3 minutos, no qual não há estímulo de choque.

D39: Privação de água: Os animais foram submetidos a privação de água durante 16 horas. Para isso, no 39º as garrafas de água foram retiradas as 16:00 horas e repostas as 8:00 horas do 40º dia do protocolo. Os animais tiveram livre acesso à comida durante todo o período de privação de água.

D41: Nado forçado: Os animais foram submetidos a duas sessões de nado forçado, cada uma com duração de 1 minuto. Para isso, eles foram colocados individualmente em cilindros de acrílico (50 cm de altura, 18 cm de diâmetro) contendo 30 centímetros de profundidade de água a temperatura ambiente. As sessões foram separadas por um intervalo de 3 minutos. Terminadas as sessões, os camundongos foram secos com uma toalha e imediatamente levados de volta para suas gaiolas.

D43: Imobilização: Os animais passaram pelo mesmo estímulo estressor aplicado no dia 35.

5.6 Determinações comportamentais

Anteriormente à realização dos testes de comportamentos, os animais foram transportados cuidadosamente até a sala do teste para uma prévia ambientação. Todos os testes foram realizados entre 09:00 e 17:00 horas em salas com iluminação atenuada. No período de intervalo entre o teste de cada animal, o aparato foi limpo com álcool etílico 10% para prevenir o viés de pistas olfatórias deixadas pelos outros animais e as fêmeas tiveram o ciclo estral avaliado para confirmação do pico hormonal (Proestro) ou não (Diestro).

5.6.1 Inibição Pré-pulso (IPP)

O reflexo de sobressalto é uma resposta involuntária primitiva e protetora do corpo a um estímulo acústico intenso e inesperado. A reação envolve uma ativação de músculos esqueléticos e faciais que ocorre dentro de poucos milissegundos, acarretando um recuo do corpo inteiro em roedores (DAVIS, 1984). A Inibição Pré-Pulso (IPP) é caracterizada pela redução do reflexo de sobressalto a um estímulo acústico intenso (pulso), quando imediatamente precedido por um estímulo de menor intensidade (pré-pulso) (Fig. 7) (HOFFMAN; ISON, 1980a; SWERDLOW et al., 2008). Visto isso, o teste de IPP foi aplicado para determinar déficits no filtro sensorio motor, um endofenótipo da esquizofrenia (TURETSKY et al., 2007).

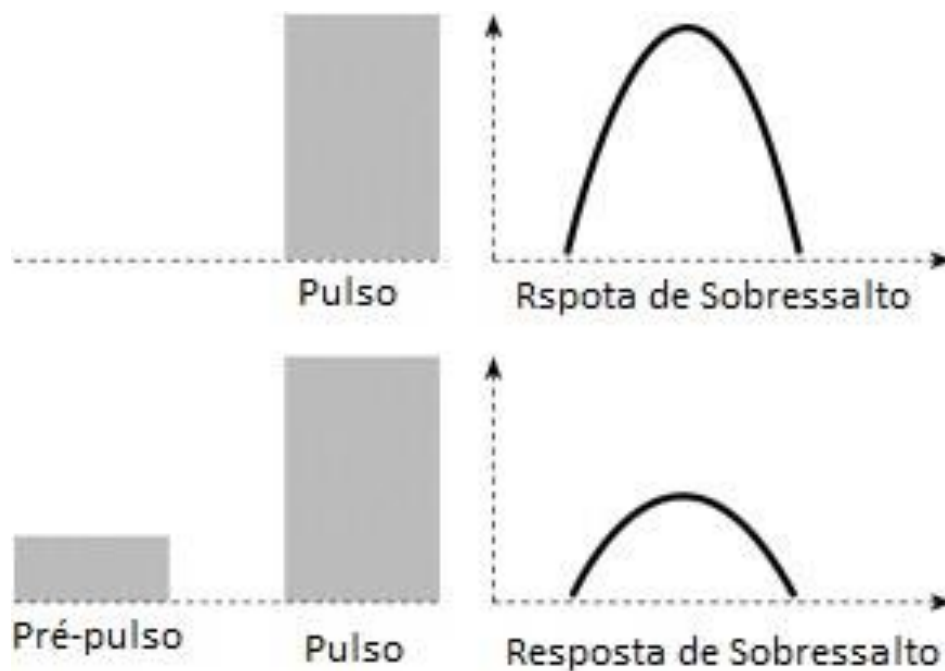


Fig. 7. Inibição pré-pulso (IPP) é a diminuição da resposta de sobressalto quando o estímulo de sobressalto eliciador, o pulso, é precedido por um estímulo sensorial mais fraco, o pré-pulso. Fonte: Adaptado de (KOHL et al., 2013).

No presente estudo, a reação corporal dos animais a um estímulo acústico foi monitorada em uma câmara (INSIGHT equipamentos científicos – Brasil modelo EP-175) montada em uma caixa fechada ventilada. Para isso, os camundongos foram colocados em um contensor (4,5 × 5,0 × 5,5 cm) consistido de barras de aço inoxidável de 3,0 mm de diâmetro com espaçamento de 0,8 centímetros de distância. O contensor foi mantido preso sobre uma

balança, chamada de plataforma de resposta, através de quatro pequenos parafusos. Um altofalante localizado a 15 cm do contensor foi utilizado para fornecer os estímulos de pulso, pré-pulso e ruído de fundo. O contensor, a plataforma e o alto-falante são localizados dentro de uma câmara acústica ventilada ($64 \times 60 \times 40$ cm). Procedimentos de calibração foram realizados antes dos experimentos para garantir sensibilidades equivalentes das plataformas de resposta ao longo do período de teste (Fig. 8).



Fig. 8. Representação real do aparelho para teste de inibição pré-pulso.

A sessão de testes começou ao colocar um animal no contensor para a aclimatação, este procedimento consistiu 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 inter-intervalo de 20s.

O objetivo desta fase foi permitir a habituação da resposta de sobressalto do animal. Posteriormente, a modulação IPP de sobressalto foi testada no seguinte protocolo: 74 ensaios pseudorandomizados dividido em oito categorias diferentes, apresentados com um intervalo inter-estímulos de 20s: 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 (LEVIN et al., 2011). São utilizadas três intensidades

de pré-pulso diferentes para que o teste tenha maior veracidade, como se o mesmo fosse feito em triplicata.

A média da amplitude de resposta de sobressalto aos ensaios de pulso sozinho (P) e pré-pulso + pulso (PP + P) foi calculada para cada animal. O nível de IPP 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).

5.6.2 Interação Social

Os comportamentos de interações sociais são componentes adaptativos e fundamentais da biologia de várias espécies de animais. O reconhecimento social de animais da mesma espécie é importante para manutenção da hierarquia social e escolha de parceiros para o acasalamento. O prejuízo na sociabilidade e reconhecimento social está presente em uma variedade de transtornos neuropsiquiátricos como, por exemplo, a esquizofrenia (WILSON; KOENIG, 2014). O teste de interação social é caracterizado por um paradigma padrão para estudar o comportamento social geral, além de ser uma ferramenta valiosa nos testes de *screening* de substâncias ansiolíticas e antipsicóticas (SAMS-DODD, 1995). O aparato do teste consiste em uma caixa de acrílico 60 × 40 cm dividida em três câmaras. Como representado na figura 9, os animais testados foram alocados no compartimento central do aparato, podendo explorar livremente as outras câmaras através de uma pequena abertura (6 × 6 cm) nos divisores. Nas câmaras das extremidades havia uma gaiola de ferro, uma com um animal desconhecido e do mesmo sexo (câmara social) e outra vazia (câmara oposta) (Fig. 9). Os animais testes foram colocados na câmara central, cada um teve um tempo de 5 min de exploração na caixa (RADYUSHKIN et al., 2009). Foi medido o tempo que o animal passou em cada uma das três câmaras e a porcentagem de interação social foi definida como: (porcentagem de tempo gasto na câmara social) - (porcentagem de tempo gasto na câmara oposta).



Fig 9. Aparato utilizado para o teste de Interação Social.

5.6.3 Labirinto em Y

A memória de trabalho foi avaliada por meio de um teste de Labirinto em Y, que permite avaliar o comportamento cognitivo exploratório através da percepção do desempenho de alternância espontânea (MAURICE; LOCKHART; PRIVAT, 1996). O labirinto consiste em 3 braços idênticos de 40 cm de comprimento, 25 cm de altura e 6 cm de largura cada convergindo a um ângulo igual de 120° (Fig. 10). Cada camundongo foi colocado na extremidade de um braço e deixado para explorar o ambiente por 8 minutos. A sequência dos braços em que os animais entraram foi então anotada e as informações analisadas de forma a determinar o número de entradas no braço sem repetição. Uma alternância foi considerada correta se o animal visitou um novo braço e não retornou ao braço anteriormente visitado (exemplo de alternância correta: braços 1,2,3 ou 3,1,2; exemplo de alternância incorreta: 1,2,1 ou 3,1,3). Assim, a porcentagem das alternâncias corretas foi calculada como a razão entre as alternâncias corretas (n) e o número de visitas realizadas durante o período de observação ($n-2$), multiplicado por 100 (DALL'IGNA et al., 2007; YAMADA et al., 1996).

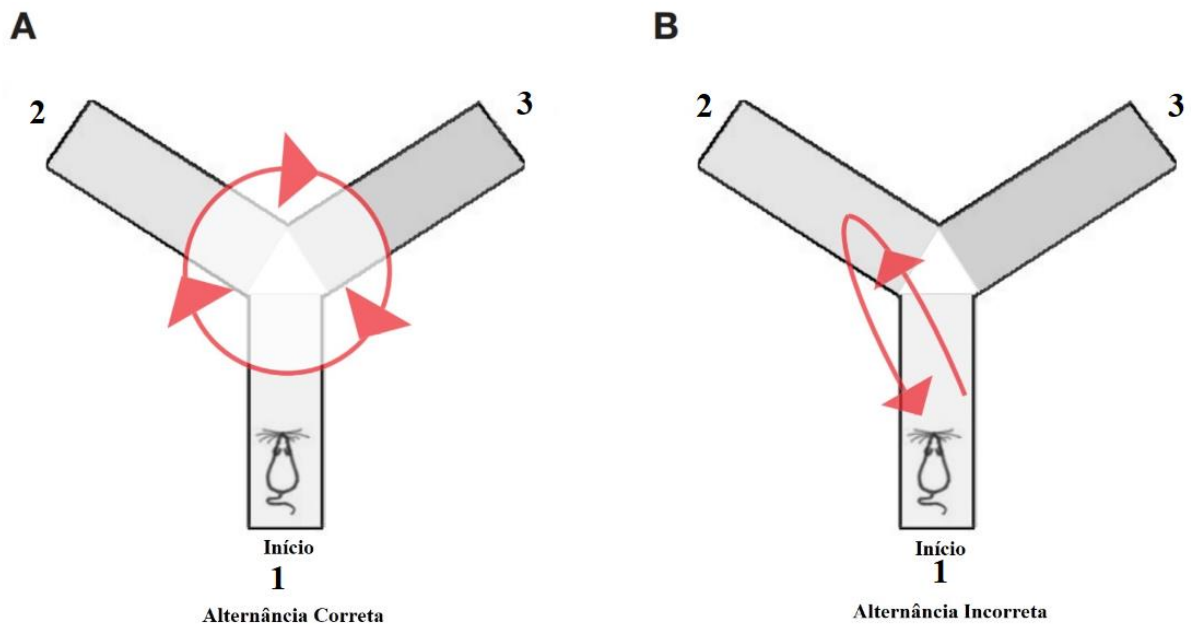


Fig. 10: Teste do labirinto em Y. Lado A representa a sequência de alternância de entradas corretas e o Lado B representa um exemplo de sequência de alternância incorreta. Adaptado de MOMENI, SEGERSTRÖM, E ROMAN, 2015)

5.7 Determinações biomoleculares e neuroquímicas

5.7.1 Expressão proteica de GPER, DRD2, NR2B-fosforilado, PARVALBUMINA e ALFA-7

A quantificação da expressão proteica no hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal foi feita através da técnica de Western Blotting. Seguiram-se sequencialmente as seguintes etapas: extração de proteínas, dosagem de proteínas e Western Blotting.

5.7.1.1 Extração de proteínas

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

5.7.1.2 Método Bradford para dosagem de proteínas

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

5.7.1.3 Western Blotting

Inicialmente, preparou-se 50 µg de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e β-mecaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10 segundos, aquecendo no banho maria (95°C, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4°C, 30s). Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 V nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 V para o restante da corrida, onde foi utilizado gel a 10% para todas as proteínas, com exceção do gel para determinação das proteínas que foi de 7%), e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Após a corrida, efetuou-se a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100 V por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina TrisHCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween20). Em seguida, realizou-se a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 10 min cada. Na etapa seguinte, as diferentes membranas foram incubadas, overnight a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos primários Anti-GPR30 (1:1000; Abcam, USA), anti-parvalbumina (1:1000; Abcam, USA), anti-NR2B fosforilado (1:1000; Abcam, USA) Anti-Nicotinic Acetylcholine Receptor alpha 7 (1:1000; Abcam, USA), mouse anti- Dopamine DRD2 IgG primary antibody (1:1000; Abcam, USA) e mouse anti-α-tubulin IgG primary antibody (1:4000; Sigma, USA) diluídos em 1% de BSA em TBS-T. Após esta etapa, realizaram-se três lavagens de 10 min cada com TBS-T. As membranas

foram incubadas com os anticorpos secundários HRP-goat anti-rabbit IgG (1:1000; Invitrogen, USA) ou HRP-goat anti-mouse IgG (1:1000; Sigma, USA) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas 4 vezes, duração de 10 min cada, com TBS-T. Enfim, adicionou-se o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, Clarity western ECL blotting substrate) e as membranas foram agitadas por 5 min. As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ImageQuant 300 Imager (GE 75 Healthcare, EUA). A densidade das bandas foi mensurada por meio do software Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA).

5.8 Expressão Gênica por qPCR das enzimas KYNU, KAT, ACMSD, GPER, ER α , ER β , Aromatase e TSPO

5.8.1 Preparação das amostras

Os fragmentos das áreas cerebrais dos animais foram retirados e macerados em nitrogênio líquido. Posteriormente, os fragmentos macerados foram adicionados em microtubo com 300 μ L de RNA *later* (Sigma, EUA). Em seguida, foram armazenados no freezer a -80°C até sua utilização para extração do RNA.

5.8.2 Extração do RNA

O RNA total de cada amostra foi isolado usando kit de extração de RNA (Promega). Resumidamente, as amostras com 100 μ L tampão de lise foram misturadas cinco vezes por inversão. Adicionou-se às amostras 350 μ L de tampão de diluição do RNA, sendo homogeneizadas quatro vezes por inversão. Em seguida, as amostras foram aquecidas por três minutos a 70°C, com o objetivo de romper as ligações dos ácidos nucleicos, e centrifugadas por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um microtubo. Adicionou-se 200 μ L de etanol a 95%. Na fase seguinte, a mistura foi transferida para *spin basket* acoplado a um microtubo coletor de 2 mL e centrifugado a 11200 RPM por um minuto. Adicionou-se 600 μ L de solução de lavagem e em seguida os tubos foram centrifugados por 11200 RPM por um minuto. Na etapa seguinte, as amostras foram tratadas com DNase para reduzir a contaminação com o DNA, sendo incubadas em temperatura ambiente por 15 min. Decorrido este tempo, 200 μ L de DNase *stop solution* foram adicionados e as amostras foram centrifugadas por 1 min a 11200 RPM. Logo em seguida, inseriu-se tampão de lavagem e as amostras foram

centrifugadas, conforme relatado anteriormente. Adicionou-se 250 μL de tampão de lavagem seguida de centrifugação por 2 min em 11200 RPM. Na etapa seguinte, o *spin* foi inserido em novo microtubo de 1,5 mL, 40 μL de H_2O livre de nuclease foram adicionados e os microtubos foram centrifugados por 1 minuto. Por fim, o *spin basket* foi descartado e o RNA extraído foi armazenado no freezer -70°C . Após a extração do RNA de cada amostra, efetuou-se a sua quantificação, com 1 μL de RNA de cada amostra, utilizando Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, EUA). Concomitante a dosagem em $\text{ng}/\mu\text{L}$, realizou-se a avaliação da qualidade do RNA extraído, a qual foi obtida por meio da relação 260/280, fornecida pelo programa relacionado ao aparelho. A avaliação da quantidade de RNA presente em cada amostra é de extrema importância para a obtenção da quantidade de amostra adequada para realização da próxima etapa, a saber: síntese do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA).

5.8.3 Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado de acordo com o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems, USA). O volume final de cada amostra foi de 20 μL : 2 μL do reagente 10x tampão da enzima; 0,8 μL de oligonucleotídeos; 2 μL de primer; 1 μL da enzima transcriptase reversa; 1ng de RNA, onde o volume utilizado em μL foi dependente da concentração inicial extraída; H_2O livre de RNase e DNase para completar 20 μL . O protocolo da reação foi realizado à 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, 85°C por 5 min. O cDNA foi armazenado em freezer a -20°C até a sua utilização no qPCR.

5.8.4 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A expressão gênica foi avaliada por meio do sistema de PCR em tempo real (Light cycler 96, Roche), utilizando kit de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies). Para os ensaios com sondas foram utilizados o Master Mix da IDT® Probe-Based qPCR Master Mix seguindo as instruções do fabricante. O gene de referência utilizado foi o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e o Peptidilprolil Isomerase A (PPIA). Todos os primers utilizados estão apresentadas no quadro 2 e as sondas no quadro 3.

Foram adquiridos ensaios pre-desenhados da companhia IDT DNA (Prime Time predesigned qPCR assays). O quadro 3 lista detalhes de cada ensaio, gene e região alvo,

sequência de referência (RefSeq), e configuração de fluoróforo. Os ensaios foram selecionados baseados em amplificação de todas as isoformas/variantes dos genes alvos, tendo como controle interno (expressão endógena) o gene PPIA.

Os valores de *Threshold cycle* (Cq ou Ct), obtidos pelo software do equipamento, dos genes avaliados foram exportados para o Office Excel Microsoft 2010, no qual os níveis relativos de RNAm foram calculados de acordo com a metodologia descrita por Livak e Schmittgen (2001) usando o grupo salina sem estresse como referência para comparação de expressão gênica.

Quadro 2 - Primers utilizados forward e reverse para análise de q-PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
AROMATASE	MUS-FW:5'- AACTCACCATCTTCAAGAGTCCA	RV: 5'-GAGTGGCATGGCACTGACAGT
TSPO	MUS-FW: 5'- AGAAACCCTCTTGGCATCCG	RV: 5'-CGTCCTCTGTGAAACCTCCC
ER α	MUS-FW: 5'- TGGAGATGTTGGATGCCCCAC	RV: 5'-TCAGATCGTGTGGGGAAGC
ER β	MUS-FW: 5'- GGTGTCTGGTCTGTGAAGG	RV: 5'-GGCTTTGTTTCAGGCAATGCA
GPER ou GPER	MUS-FW: 5'- TGAGGATGATCTTCGCAAGT	RV: 5'-TCCACTGCAGTAGGTGGACA
GAPDH	MUS-FW: 5'-TTAGCCCCCTGGCCAAGG	RV: 5'-CTTACTCCTTGGAGGCCATG

Quadro 3 - Sondas utilizadas forward e reverse para análise de q-PCR

Gene	Dye	Assay ID	Ref Seq	Exon Location
PPIA	Cy5	Mm.PT.39a.2.gs	NM_008907(1)	4-5
GPER	6-FAM	Mm.PT.58.43936136	NM_029771(1)	2-3
KYNU	HEX	Mm.PT.58.5830347	NM_027552(1)	6-8
AADAT	HEX	Mm.PT.58.9477839	NM_011834(1)	3-5
ACMSD	6-FAM	Mm.PT.58.41971417	NM_001033041(1)	3-5

5.9 Quantificação do triptofano e seus metabólitos por HPLC

Os níveis cerebrais de triptofano e ácido quinolínico foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Waters Alliance, e2695). Foi utilizado o hipocampo para preparar os homogenatos a 20%, que foi macerado em ácido perclórico (HClO₄) a 1% por 40 segundos e centrifugado por 15 minutos, 12.000rpm, 4°C. O sobrenadante foi separado e uma alíquota de 10µl foi injetado no HPLC.

Para determinar a concentração do triptofano e ácido quinolínico foi utilizada uma coluna C18, 150 x 4,6 mm, 4 μ (PHENOMENEX®). A fase móvel foi composta de duas fases: A (acetato de sódio grau HPLC-SIGMA® - 0,1M, pH 6,2); B (acetonitrila grau HPLC (TEDIA®) 100%). Correu em gradiente de fluxo conforme quadro 4:

Quadro 4: Gradiente de fluxo para determinação simultânea de triptofano e seus metabólitos por HPLC

Tempo (min)	Fluxo (μ l)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	0,5	94	6
4	0,5	80	20
10	0,5	80	20
11	1	80	20
18:30	1	80	20
19	0,5	94	6
24	0,5	94	6

Fonte: própria

As soluções padrão de triptofano e ácido quinolínico (SIGMA®) foram preparados com fase móvel A nas concentrações de 0,2mM. Os cromatogramas foram registrados e quantificados pelo software (Empower 3 Chromatography Data Software: Waters). As concentrações de ácido quinolínico e triptofano no hipocampo foram determinadas por comparação com os padrões injetados no HPLC no dia do experimento (PRESITS & MOLNÁR-PERL, 2003).

5.10 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média utilizando o *software* SPSS (Versão 23 para Windows). Os resultados foram analisados por ANOVA de três vias seguida por análise de *post hoc* de comparações múltiplas utilizando o teste de Bonferroni para explorar as interações significativas e revelar as diferenças específicas entre os grupos. Os fatores utilizados para estas análises foram "sexo" (macho e fêmea), "tratamento neonatal" (salina e poly(I:C)) e "estresse na adolescência" (exposição ao estresse e não exposição ao estresse).

A análise dos resultados de expressão proteica foi realizada por ANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Fisher's LSD. A análise dos resultados de IPP foi realizada por ANOVA de

duas vias utilizando cada intensidade de decibéis que cada animal foi exposto. O nível de significância foi definido em $*P \leq 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 O sexo influencia o comportamento de animais adultos expostos ao modelo dos dois desafios

Para avaliar a função sensório-motora foi realizado o teste de inibição pré-pulso (BRAFF; LIGHT, 2005). A análise da média de sobressalto nas três intensidades de pré-pulso avaliadas (Fig. 11) revelou uma interação significativa entre os fatores sexo e desafio [$F(6, 73) = 3.778, p = 0.0025$]. Os animais machos adultos desafiados apenas com o PIC ou a combinação PIC + estresse apresentaram redução na média de IPP quando comparados com o grupo controle (não expostos aos dois desafios) (PIC: $P < 0,05$; PIC + (E): $P < 0,01$). Em relação as fêmeas em fase de alto estrógeno (proestro) submetidas ao desafio com PIC e em combinação de PIC + estresse não apresentaram alterações de déficits de IPP quando comparados com o grupo controle. Entretanto, na fase de baixo estrógeno (diestro), as fêmeas submetidas aos dois desafios apresentaram déficit de IPP significativos em relação ao grupo salina ($P < 0,001$), salina + (E) ($P < 0,001$) e em relação ao grupo desafiada apenas com PIC ($P < 0,05$). Vale destacar que as fêmeas diestro expostas aos dois desafios apresentaram um déficit de IPP em relação as fêmeas proestro expostas também aos dois desafios ($P < 0,05$).

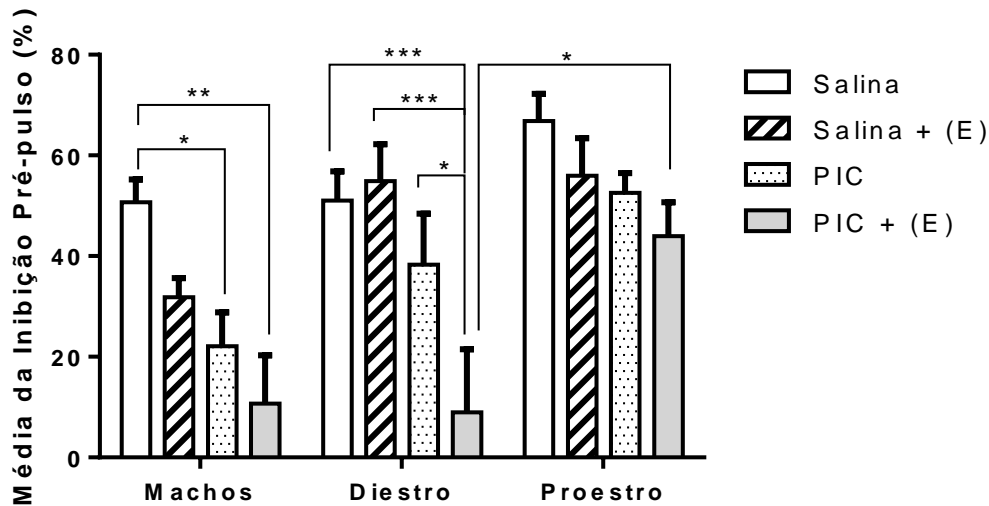


Fig. 11. Efeito do estresse, de poly(I:C) e de poly(I:C) + estresse na média da % de IPP de camundongos machos, fêmeas em proestro e fêmeas em diestro. Parte dos animais foi desafiada ou não com estresse (E) na adolescência. As fêmeas na idade adulta foram avaliadas em fases diferentes do ciclo. Os dados são expressos como média \pm EPM de 10-15 animais por grupo. ANOVA de duas vias por medidas repetidas foi realizada com teste de Bonferroni post hoc considerando como fatores: sexo e média da intensidade de inibição pré-pulso (PP) + grupos experimentais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Abreviações: E: expostos ao estresse; PIC: poly I:C.

Com relação ao comportamento de sociabilidade ou interação social (Fig. 12), a análise estatística revelou uma significativa interação entre sexo e desafio $F(6, 75) = 2.808$, $p = 0.0161$. Nos animais machos adultos, a exposição ao PIC sozinho e a exposição aos dois desafios reduziu a interação social quando comparados aos animais sem desafio (PIC: $P < 0,001$; PIC + (E): $P < 0,0001$). Adicionalmente, foi possível perceber que os animais machos submetidos aos dois desafios apresentaram maior déficit de interação social em relação aos animais desafiados apenas com o estresse durante a adolescência ($P < 0,001$). Em relação as fêmeas em fase proestro não foi possível observar nenhuma alteração significativa entre os grupos. Entretanto, na fase diestro, as fêmeas submetidas aos dois desafios apresentaram déficit de interação social significativo em relação ao grupo salina ($P < 0,01$).

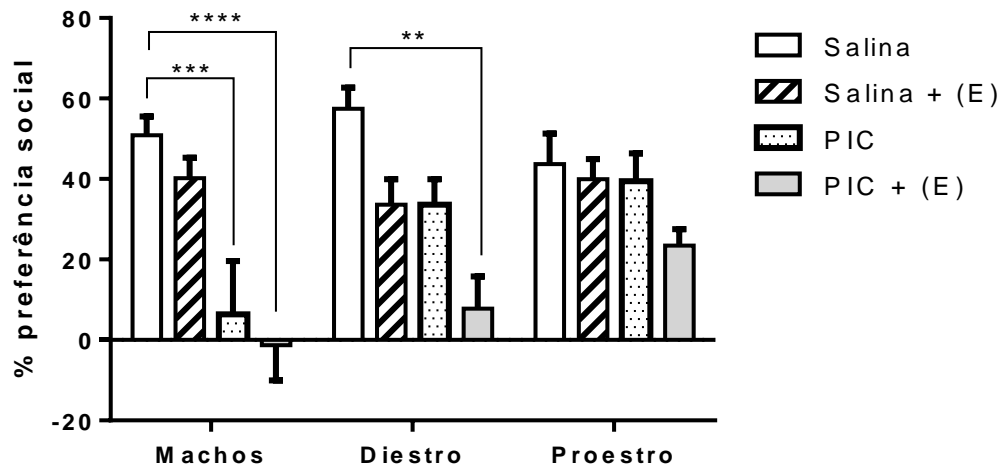


Fig. 12. Avaliação da interação social nos camundongos machos e fêmeas submetidos à administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina]. Parte dos animais foi desafiada ou não com estresse (E) na adolescência. As fêmeas na idade adulta foram avaliadas em fases diferentes do ciclo, ou seja, diestro ou proestro. Os dados são expressos como média \pm EPM de 10-15 animais por grupo. ANOVA de duas vias por medidas repetidas foi realizada com teste de Bonferroni post hoc considerando como fatores: sexo e % de preferência social + grupos experimentais. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. Abreviações: E: expostos ao estresse; PIC: polyI:C

Em relação à memória de trabalho avaliada pela porcentagem de alterações corretas no teste de labirinto em Y (Fig. 13), a análise univariada revelou uma interação significativa entre sexo e desafio $F(6, 84) = 2.507, P = 0.0279$. Nos animais machos adultos, a exposição ao PIC sozinho ou ao estresse sozinho durante a adolescência ou a exposição aos dois desafios combinados reduziu a porcentagem de alterações corretas quando comparados aos animais sem desafio (Salina + (E): $P < 0,01$; PIC: $P < 0,05$; PIC + (E): $P < 0,01$). Nas fêmeas adultas em fase proestro não foi possível observar nenhuma alteração significativa entre os grupos. No entanto, na fase diestro, as fêmeas submetidas aos dois desafios apresentaram redução significativa no percentual de alterações corretas em relação ao grupo salina ($P < 0,05$).

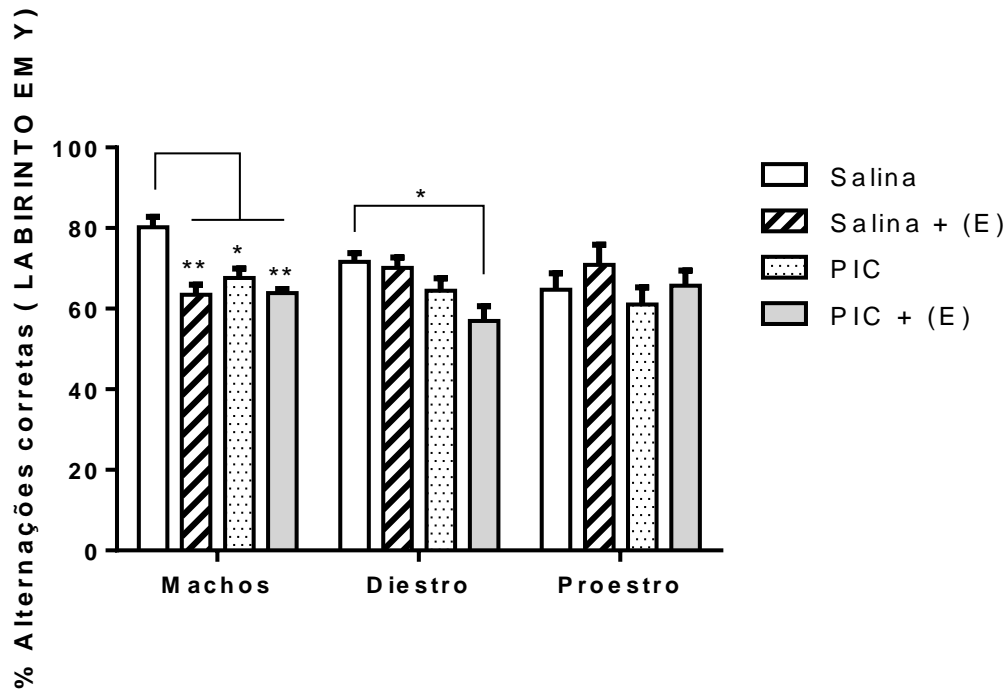


Fig. 13. Avaliação da memória de trabalho em camundongos machos e fêmeas submetidos à administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina]. Parte dos animais foi desafiada ou não com estresse (E) na adolescência. As fêmeas na idade adulta foram avaliadas em fases diferentes do ciclo, ou seja, diestro ou proestro. Os dados são expressos como média \pm EPM de 10-15 animais por grupo. ANOVA de duas vias por medidas repetidas foi realizada com teste de Bonferroni post hoc considerando como fatores: sexo e % de alterações corretas + grupos experimentais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Abreviações: E: expostos ao estresse; PIC: polyI:C

6.2 O sexo influencia a expressão proteica de marcadores da esquizofrenia em animais expostos ao modelo de dois desafios

Na avaliação da expressão estriatal de parvalbumina (Fig. 14) foi observada uma interação significativa entre os fatores sexo e desafio imune [$F(6, 39) = 2.625, P = 0.0310$]. Nos camundongos machos submetidos apenas ao desafio de PIC observou-se aumento da expressão dessa proteína quando comparados aos animais sem desafio ($P < 0,0001$) e aos animais submetidos apenas ao estresse na adolescência (Salina + (E): $P < 0,0001$). Em relação às fêmeas na fase de diestro houve redução da expressão de parvalbumina nos animais submetidos aos dois desafios PIC + (E) ($P < 0,001$) e animais submetidos apenas ao estresse na adolescência (Salina + (E): $P < 0,001$) quando comparados com o grupo de animais sem desafios. O perfil de expressão dos animais fêmeas em fase de proestro se assemelhou ao perfil apresentados nos animais macho, mostrando aumento de expressão da proteína em fêmeas submetidas apenas ao desafio de PIC quando comparadas às fêmeas expostas apenas ao

estresse na adolescência (Salina + (E): $P < 0,0001$) ou sem exposição a eventos estressores (Salina: $P < 0,0001$).

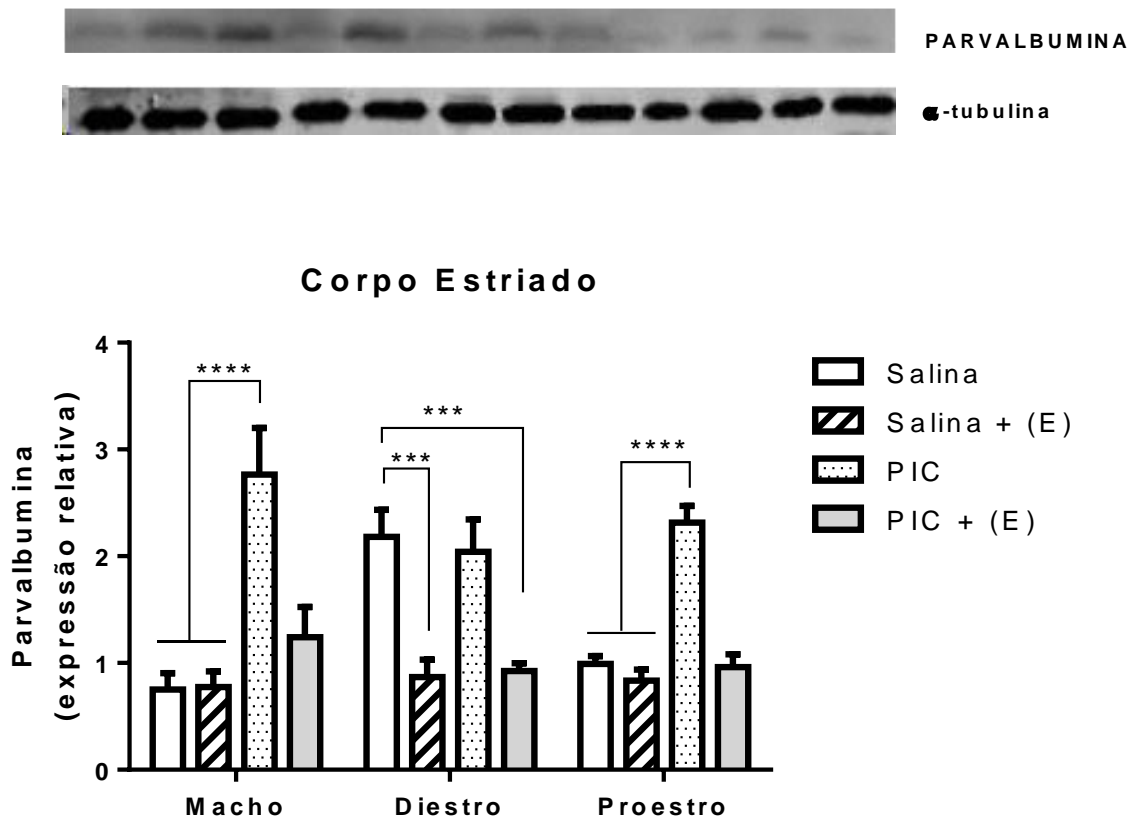


Fig 14. Avaliação da expressão relativa de parvalbumina no corpo estriado de camundongos machos e fêmeas submetidos à administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina]. Parte dos animais foi desafiado ou não com estresse (E) na adolescência. As fêmeas na idade adulta foram avaliadas em fases diferentes do ciclo, ou seja, diestro ou proestro. A expressão relativa da parvalbumina foi determinada por Western Blotting. Os dados são expressos como média \pm EPM de 5 animais por grupo. ANOVA de duas vias (fatores: sexo e desafio) foi realizada com teste post hoc de Fisher's LSD. *** $P < 0,001$ **** $P < 0,0001$). Abreviações: E: expostos ao estresse; PIC: polyI:C

Na avaliação da expressão de $\alpha 7$ -nAChR no córtex pré-frontal (Fig. 15) foi observada uma interação significativa entre os fatores sexo e desafio imune [$F(6, 32) = 7.279$, $P < 0.0001$], no entanto, não foi possível observar diferença estatística entre os grupos de camundongos machos. Já nos grupos de fêmeas em diestro, quando comparados com o grupo sem eventos estressores (Salina), foi possível observar diminuição da expressão dessa proteína em todos os outros grupos que sofreram desafios, seja o grupo exposto apenas ao PIC ($P < 0,05$), ou apenas ao estresse na adolescência (Salina + (E): $P < 0,05$) e até mesmo ao grupo com os dois desafios (PIC + (E): $P < 0,05$). Verificou-se que a expressão de $\alpha 7$ -nAChR foi

aumentada nas fêmeas em proestro expostas apenas ao desafio com PIC quando comparadas ao grupo sem eventos estressores (Salina: $P < 0,01$) e quando comparadas ao grupo exposto apenas ao estresse na adolescência (Salina + (E): $P < 0,01$).

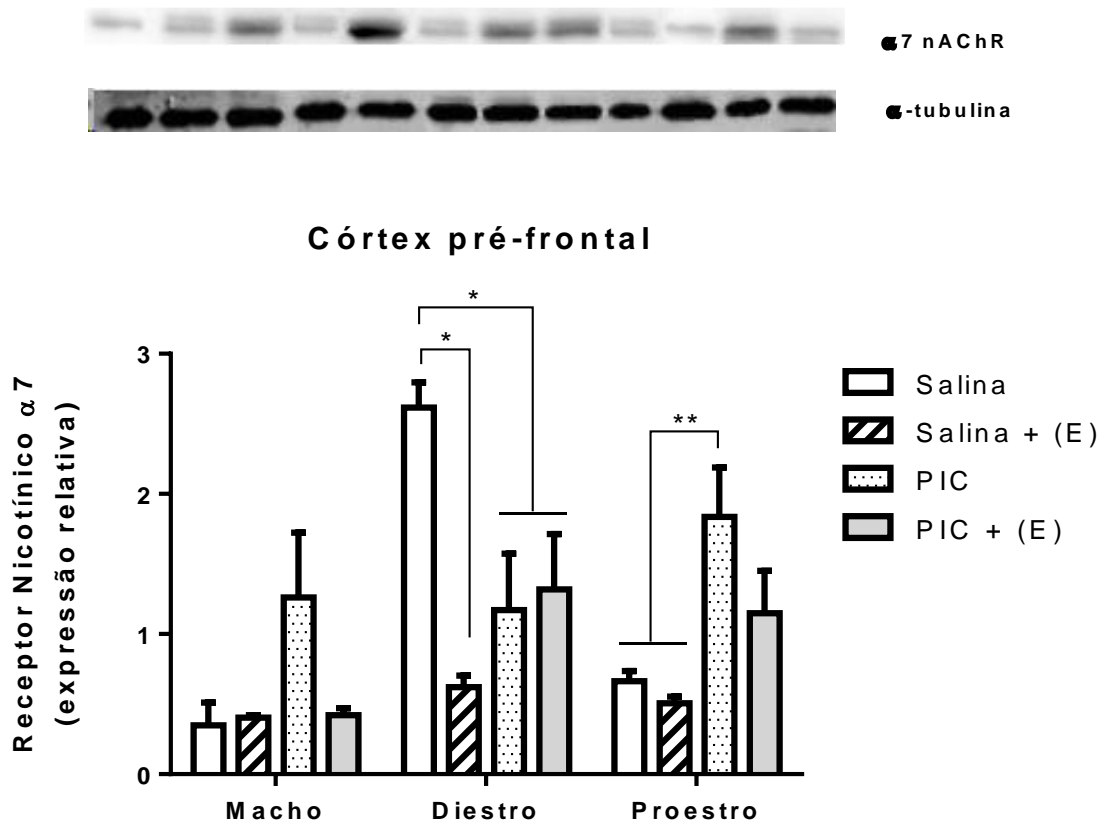


Fig 15. Avaliação da expressão relativa do receptor nicotínico α -7 no córtex pré-frontal de camundongos machos e fêmeas submetidos à administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina]. Parte dos animais foi desafiada ou não com estresse (E) na adolescência. As fêmeas na idade adulta foram avaliadas em fases diferentes do ciclo, ou seja, diestro ou proestro. A expressão relativa do receptor nicotínico foi determinada por Western Blotting. Os dados são expressos como média \pm EPM de 5 animais por grupo. ANOVA de duas vias (fatores: sexo e desafio) foi realizada com teste post hoc de Fisher's LSD. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$). Abreviações: E: expostos ao estresse; PIC: polyI:C

Na avaliação da expressão no córtex pré-frontal do receptor NR2B fosforilado (Fig. 16) não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos das fêmeas na fase de proestro, no entanto, nas fêmeas da fase diestro do grupo submetido apenas ao desafio com PIC apresentou aumento da expressão dessa proteínas quando comparadas às fêmeas do grupo salina ($P < 0,01$). Comportamento similar pôde ser observado nos camundongos machos, porém maior significância. Os camundongos machos do grupo exposto apenas ao PIC

apresentaram aumento na expressão de NR2B quando comparados aos machos do grupo salina ($P < 0,001$).

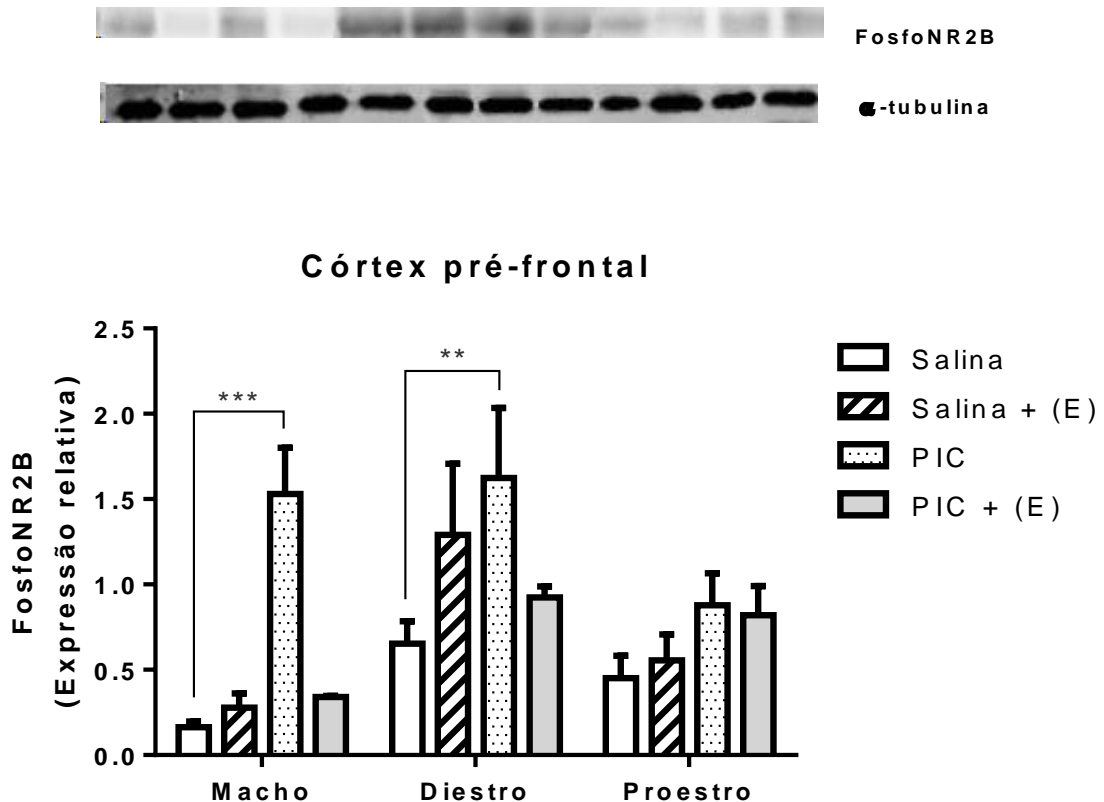


Fig 16. Avaliação da expressão relativa da subunidade NR2B fosforilada do receptor NMDA no córtex pré-frontal de camundongos machos e fêmeas submetidos à administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina]. Parte dos animais foi desafiado ou não com estresse (E) na adolescência. As fêmeas na idade adulta foram avaliadas em fases diferentes do ciclo, ou seja, diestro ou proestro. A expressão relativa do receptor NR2B foi determinada por Western Blotting. Os dados são expressos como média \pm EPM de 5 animais por grupo. ANOVA de duas vias (fatores: sexo e desafio) foi realizada com teste post hoc de Fisher's LSD. $**P < 0,01$; $***P < 0,001$. Abreviações: E: expostos ao estresse; PIC: polyI:C

Na avaliação da expressão do receptor dopaminérgico D2 no corpo estriado (Fig. 17) foi observada uma interação significativa entre os fatores sexo e desafio imune [$F(6, 35) = 3.092$, $P = 0.0155$]. Nos camundongos machos houve aumento importante da expressão do receptor D2 nos animais expostos apenas ao desafio com PIC quando comparados aos animais expostos somente a salina ($*P < 0,05$), também foi possível observar aumento de expressão do grupo PIC quando comparado ao grupo exposto apenas ao estresse na adolescência (Salina + (E): $*P < 0,05$) e até mesmo quando o grupo PIC foi comparado com o

grupo exposto aos dois desafios (PIC + (E): $*P < 0,05$). Nos grupos de fêmeas tanto em diestro como proestro não houve alterações de expressão significativas.

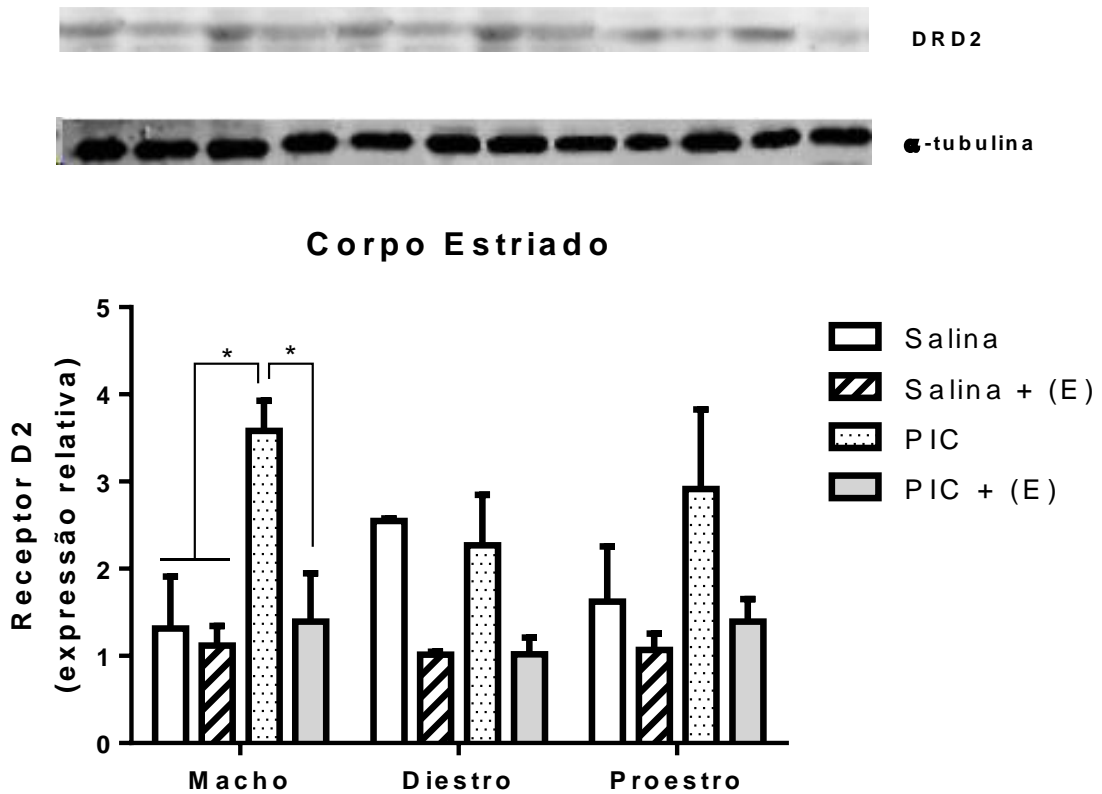


Fig 17. Avaliação da expressão relativa do receptor dopaminérgico D2 no corpo estriado de camundongos machos e fêmeas submetidos à administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina]. Parte dos animais foi desafiada ou não com estresse (E) na adolescência. As fêmeas na idade adulta foram avaliadas em fases diferentes do ciclo, ou seja, diestro ou proestro. A expressão relativa do receptor dopaminérgico D2 foi determinada por Western Blotting. Os dados são expressos como média \pm EPM de 5 animais por grupo. ANOVA de duas vias (fatores: sexo e desafio) foi realizada com teste post hoc de Fisher's LSD. $*P < 0,05$. Abreviações: E: expostos ao estresse; PIC: polyI:C

6.3 O sexo influencia a expressão de mediadores da via das quinurerinas e do estrógeno em animais expostos ao modelo dos dois desafios

Para análise da via das quinureninas, a principal via de metabolização do triptofano, foram avaliados no hipocampo dos animais em estudo os níveis de expressão de mRNA de enzimas importantes que atuam nessa via. Em relação a enzima quinureninase (KYNU) (Fig. 18) pôde observar que os animais machos submetidos aos dois desafios (PIC + (E)) tiveram a expressão aumentada quando comparados ao grupo dos animais sem eventos estressores (Salina) (*P< 0,05). Esse perfil também pôde ser observado na fêmea em diestro, onde o grupo exposto aos dois desafios (PIC + (E)) aumentou a expressão de KYNU quando comparadas ao grupo salina (*P< 0,05). No entanto, nas fêmeas em proestro o grupo exposto apenas ao PIC que apresentou expressão elevada de KYNU quando comparados ao grupo salina (*P< 0,05).

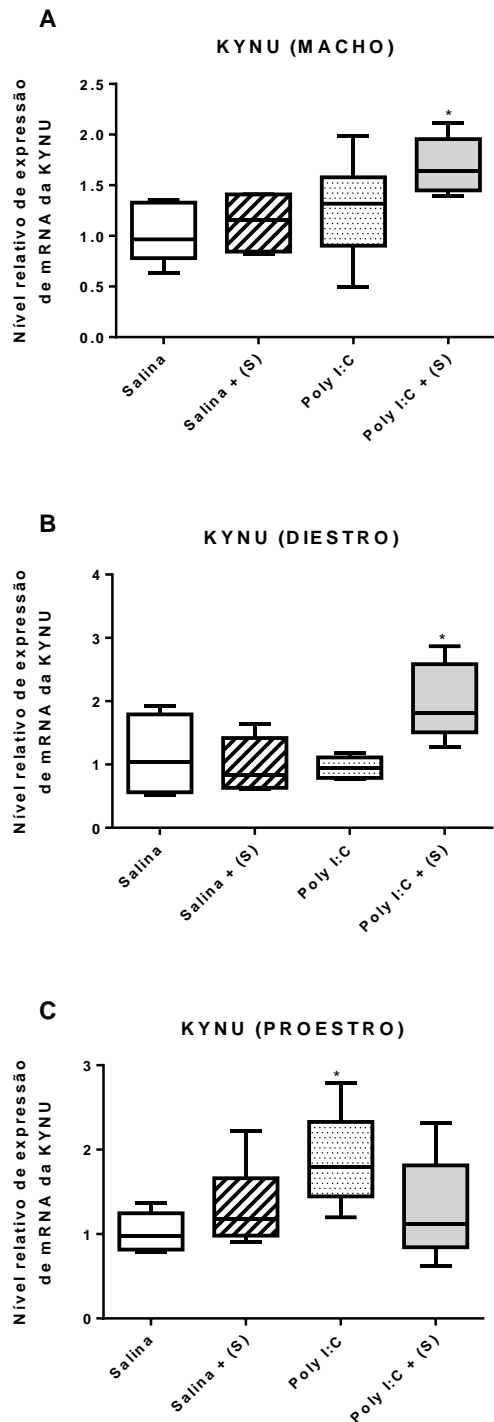


Fig. 18. Expressão relativa da enzima quinureninase (KYNU) no hipocampo de camundongos machos (A), fêmeas em diestro (B), e fêmeas em proestro (C) que receberam administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina]. Parte dos animais foi desafiada ou não com estresse (E) na adolescência. As fêmeas na idade adulta foram avaliadas em fases diferentes do ciclo, ou seja, diestro ou proestro. Os dados são expressos como média \pm EPM de 4-5 animais por grupo. ANOVA de uma via foi realizada com teste de Bonferroni *post hoc*. * $P < 0,05$; Abreviações: E: expostos ao estresse; PIC: polyI:C.

Outra enzima da via das quinureninas avaliada foi a KAT (quinurenina aminotransferase)(Fig. 19). Os animais machos expostos aos dois desafios (PIC + (E)) tiveram maior expressão dessa enzima quando comparados aos animais sem exposição a desafios na vida (Salina)($P < 0,001$). O mesmo perfil de alteração pôde ser observado no grupo das fêmeas em diestro quando comparado com o grupo sem eventos estressores ($P < 0,05$), No entanto as fêmeas em proestro apresentaram diminuição da expressão dessa enzima no grupo exposto apenas ao estresse na adolescência (Salina + (E)) quando comparado com o grupo salina ($P < 0,05$).

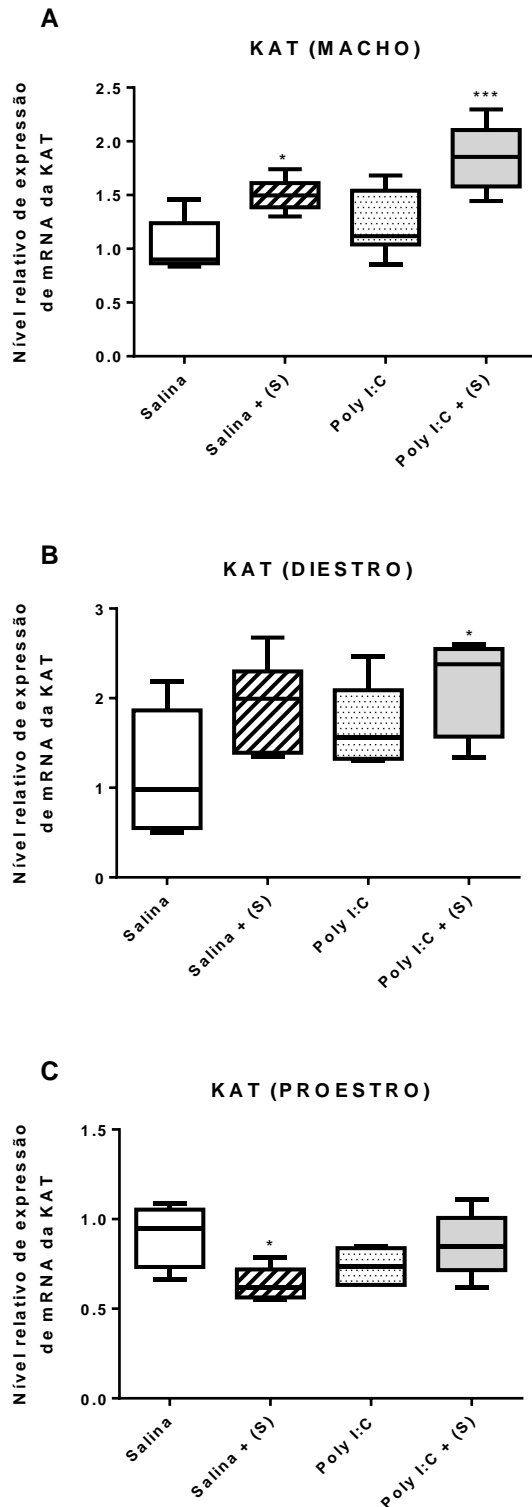


Fig. 19. Expressão relativa da enzima quinurenina aminotransferase (KAT) no hipocampo de camundongos machos (A), fêmeas em diestro (B), e fêmeas em proestro (C) que receberam administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina]. Parte dos animais foi desafiada ou não com estresse (E) na adolescência. As fêmeas na idade adulta foram avaliadas em fases diferentes do ciclo, ou seja, diestro ou proestro. Os dados são expressos como média \pm EPM de 4-5 animais por grupo. ANOVA de uma via foi realizada com teste de Bonferroni *post hoc*. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; Abreviações: E: expostos ao estresse; PIC: polyI:C.

Na terceira enzima da via das quinureninas α -amino- β -carboximuconato- ϵ -semialdeído (ACMSD) (Fig 20), podemos observar um padrão de expressão diferente nos grupos machos, diestro e proestro. Em relação aos machos o grupo exposto aos dois desafios (PIC + (E)) aumentou consideravelmente sua expressão quando comparado com o grupo Salina ($P < 0,05$), já nas fêmeas em proestro os animais expostos aos dois desafios (PIC + (E)) diminuíram a sua expressão da enzima ACMSD em relação ao grupo Salina ($P < 0,01$) e no grupos da fêmeas em diestro a mudança de expressão aconteceu no grupo dos animais expostos apenas ao estresse na adolescência (Salina + (E)), que diminuiu sua expressão quando comparado ao grupo Salina ($P < 0,05$).

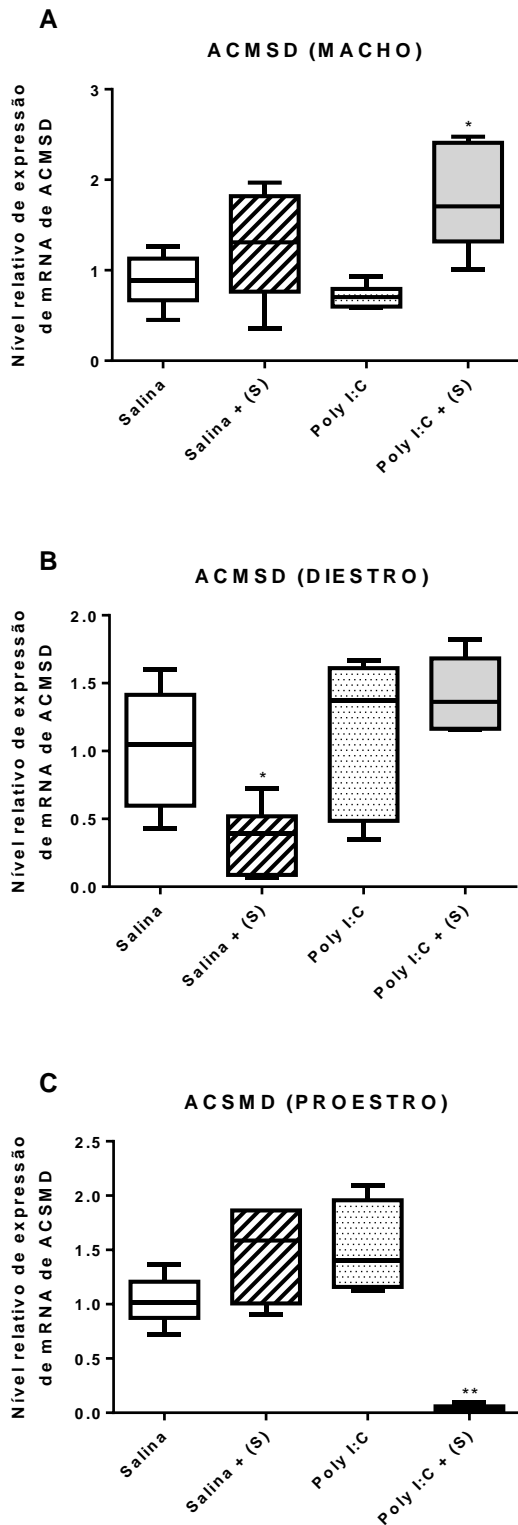


Fig. 20. Expressão relativa da enzima α -amino- β -carboximuconato- ϵ -semialdeído (ACMSD) no hipocampo de camundongos machos (A), fêmeas em diestro (B), e fêmeas em proestro (C) que receberam administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina]. Parte dos animais foi desafiada ou não com estresse (E) na adolescência. As fêmeas na idade adulta foram avaliadas em fases diferentes do ciclo, ou seja, diestro ou proestro. Os dados são expressos como média \pm EPM de 4-5 animais por grupo. ANOVA de uma via foi realizada com teste de Bonferroni *post hoc*. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; Abreviações: E: expostos ao estresse; PIC: polyI:C.

Na análise dos resultados da quantificação de triptofano e ácido quinolínico por HPLC (Fig. 21) pôde-se observar que apenas animais machos expostos aos dois desafios (PIC + (E)) apresentaram queda ($P < 0,05$) dos níveis de triptofano hipocampal e aumento ($P < 0,01$) dos níveis de ácido quinolínico, um metabolito neurotóxico, em relação aos animais controle. Enquanto as fêmeas em diestro e proestro não apresentaram alterações significativas, com exceção das fêmeas em proestro expostas aos dois desafios (PIC + (E)) que apresentaram aumento de ácido quinolínico quando comparadas as que foram expostas apenas ao estresse na adolescência ($P < 0,01$).

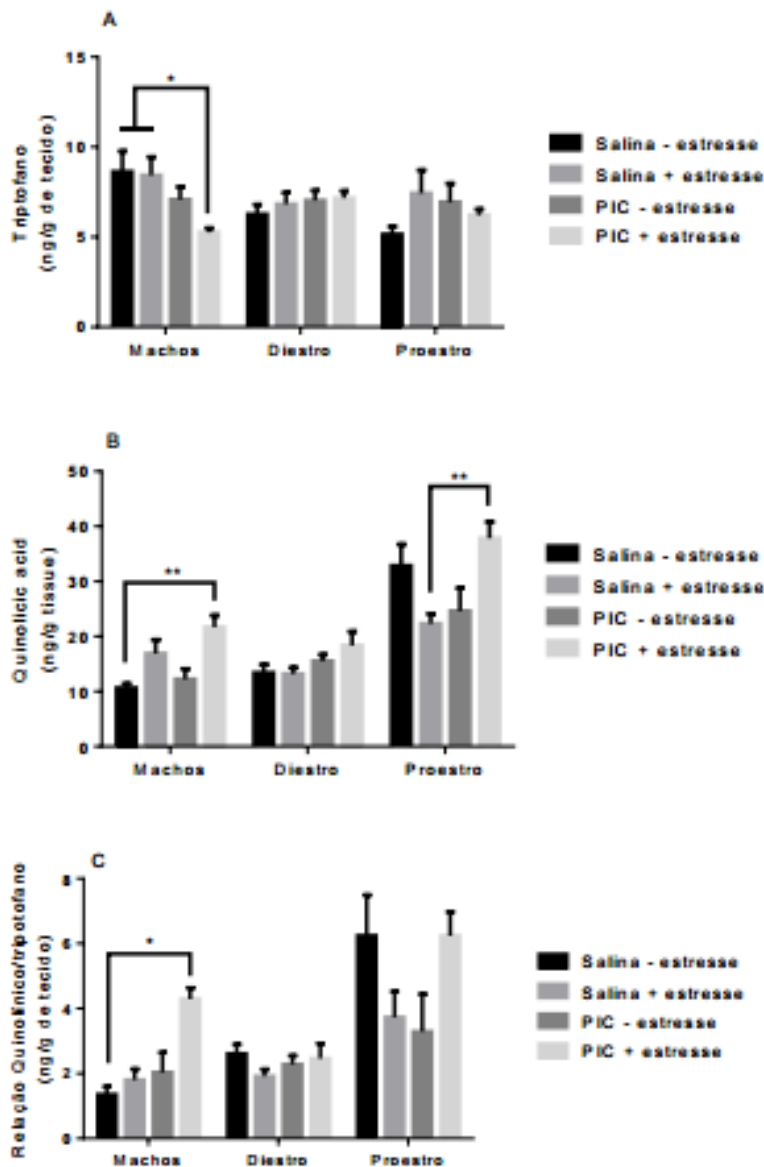


Fig. 21 Efeito da exposição a um (poly I:C- PIC) ou a dois desafios (poly I:C combinado a estresse – PIC + E), nos níveis hipocampais de triptofano e ácido quinolínico em camundongos machos e fêmeas que receberam administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril

[grupo salina]. Parte dos animais foi desafiada ou não com estresse (E) na adolescência. As fêmeas na idade adulta foram avaliadas em fases diferentes do ciclo, ou seja, diestro ou proestro. Os dados são expressos como média \pm EPM de 6 animais por grupo. ANOVA de duas vias foi realizada (fatores: sexo e desafio) com teste *post hoc* de Tukey * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$.; Abreviações: E: expostos ao estresse; PIC: polyI:C.

Em relação a expressão hipocampal de proteínas envolvidas na síntese de receptores do estrógeno (GPER, ER α , ER β , TSPO e aromatase), no receptor GPER (Fig. 22) foi observada uma interação significativa entre os fatores sexo e desafio imune [$F(6, 35) = 6.412$, $p = 0.0001$]. Em relação aos machos foi observado aumento na expressão desse receptor no grupo dos animais expostos apenas ao desafio de PIC quando comparado ao grupo dos animais sem exposição a fatores estressantes (Salina: **** $P < 0,0001$), bem como aumentou também a expressão quando comparado ao grupo dos expostos apenas ao estresse na adolescência (Salina + (E): **** $P < 0,0001$). O perfil de expressão nas fêmeas em proestro também seguiu esse padrão. Aumento de expressão de GPER no grupo desafiado apenas com PIC em comparação ao grupo sem fatores estressantes (Salina: **** $P < 0,0001$) e em comparação ao grupo exposto apenas ao estresse (Salina + (E): **** $P < 0,0001$). Já nas fêmeas na fase de diestro pôde-se observar diminuição de expressão de GPER no grupo exposto apenas ao estresse na adolescência (Salina + (E)) quando comparado com todos outros, ou seja, diminuiu a expressão quando comparado ao grupo salina (*** $P < 0,001$), quando comparado ao grupo exposto apenas ao PIC (* $P < 0,05$) e também quando comparado ao grupo exposto aos dois desafios (PIC + (E): * $P < 0,05$).

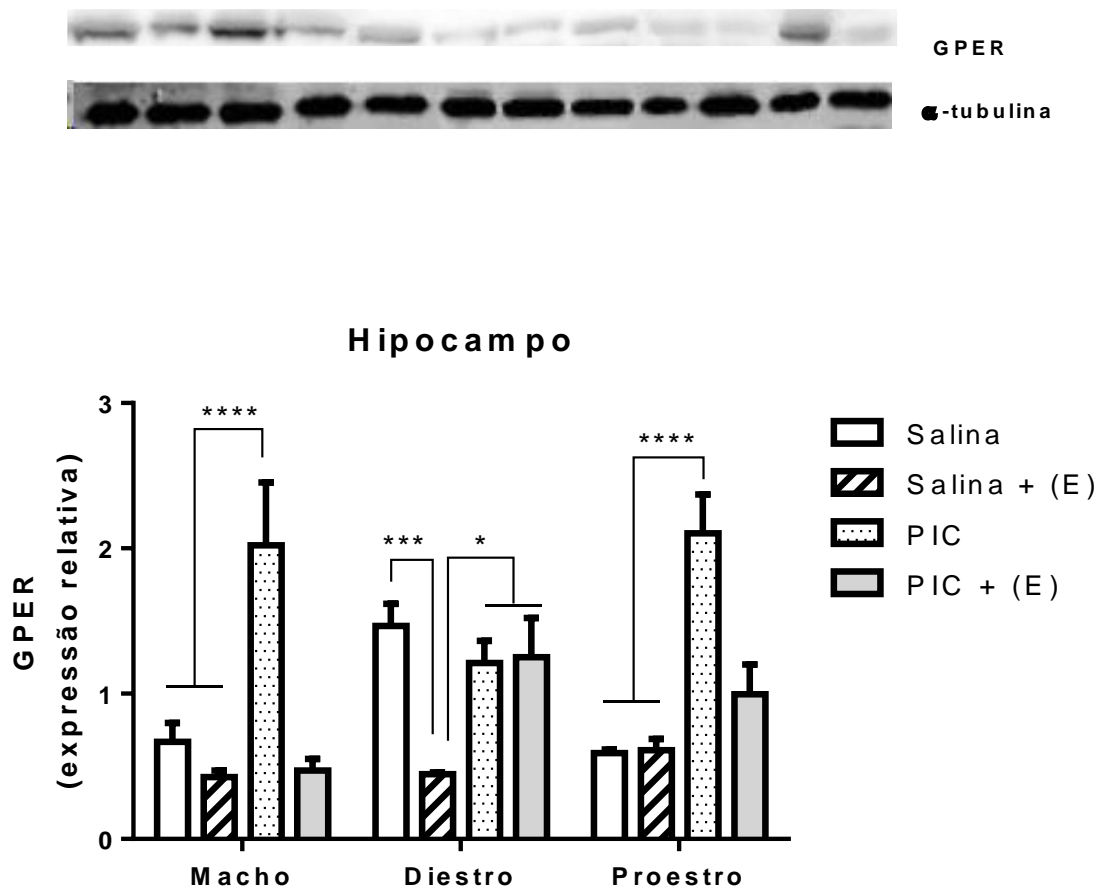


Fig. 22. Avaliação da expressão relativa do receptor GPER no hipocampo de camundongos machos e fêmeas submetidos à administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina]. Parte dos animais foi desafiada ou não com estresse (E) na adolescência. As fêmeas na idade adulta foram avaliadas em fases diferentes do ciclo, ou seja, diestro ou proestro. A expressão relativa do receptor GPER foi determinada por Western Blotting. Os dados são expressos como média \pm EPM de 5 animais por grupo. ANOVA de duas vias (fatores: sexo e desafio) foi realizada com teste post hoc de Fisher's LSD. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Abreviações: E: expostos ao estresse; PIC: polyI:C

Quando analisada a expressão do mRNA, o receptor GPER apresentou características diferentes quando comparada nos grupos de machos, fêmeas em diestro e proestro (Fig. 23). Foi observada uma interação significativa entre os fatores sexo e desafio imune [$F(6,54) = 7.981$, $p < 0.0001$]. Nos animais machos o grupo exposto apenas ao estresse na adolescência (Salina + (E)) aumentou a expressão da enzima quando comparado ao grupo Salina ($P < 0,05$), já o grupo exposto aos dois desafios (PIC + (E)) apresentou diminuição dessa enzima quando comparado ao grupo Salina ($P < 0,01$). Em relação as fêmeas em diestro o grupo que foi exposto ao desafio apenas com PIC apresentou aumento da expressão enzimática quando comparada com o grupo Salina ($P < 0,05$). Já nas fêmeas em proestro o grupo exposto apenas ao PIC aumentou sua expressão quando comparado com o grupo Salina ($P < 0,05$), e o grupo

exposto aos dois desafios (PIC + (E)) aumentou com mais intensidade a expressão dessa enzima ($P < 0,01$).

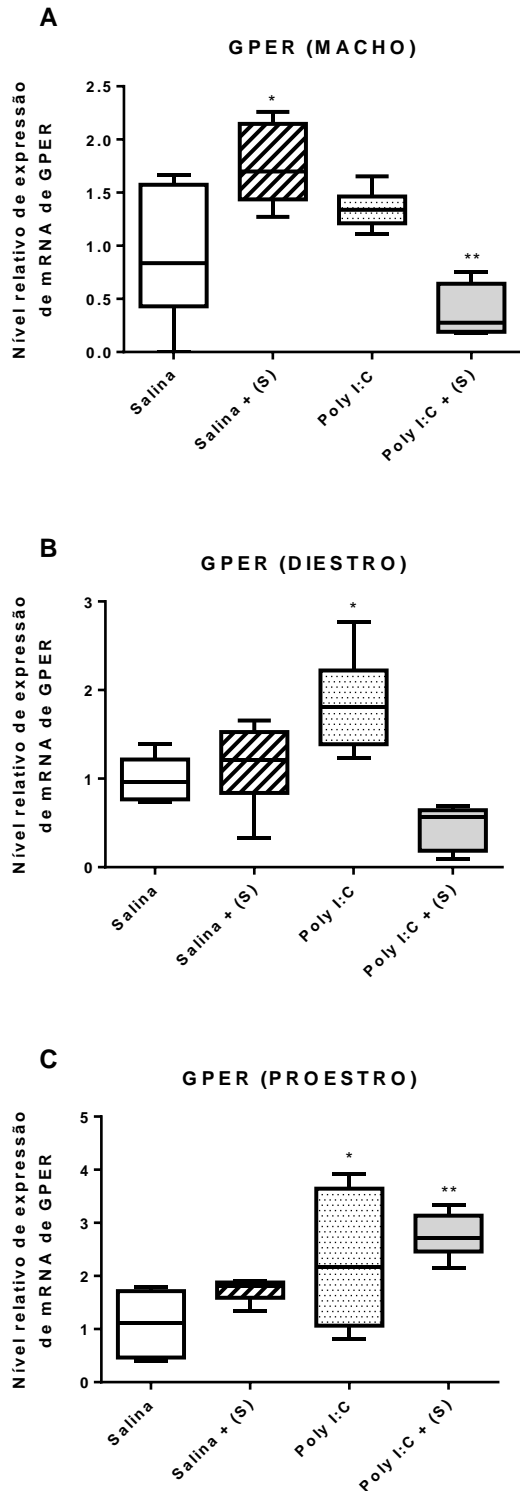


Fig. 23. Expressão relativa do mRNA para o receptor estrogênico GPER no hipocampo de camundongos machos (A), fêmeas em diestro (B), e fêmeas em proestro (C) que receberam administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina]. Parte dos animais foi desafiada ou não com estresse (E) na adolescência. As fêmeas na idade adulta foram avaliadas em fases diferentes do ciclo, ou seja, diestro ou proestro. Os dados são expressos como média \pm EPM de 4-5 animais por grupo. ANOVA de duas vias (fatores: sexo e desafio) foi realizada com teste de Tukey *post hoc* *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via foi realizada com teste de Bonferroni *post hoc*. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; Abreviações: E: expostos ao estresse; PIC: polyI:C.

Em relação a expressão de mRNA do receptor ER α (Fig. 24) a fêmea em diestro aumentou sua expressão nos animais expostos apenas ao estresse na adolescência (Salina + (E)) quando comparado ao grupo Salina ($P < 0,001$), e as fêmeas em proestro tiveram um aumento com a mesma característica, no entanto aumentou a expressão no grupo exposto apenas ao desafio com PIC ($P < 0,001$). Nos camundongos machos o grupo dos animais expostos aos dois desafios (PIC + (E)) diminuiu a expressão de ER α quando comparado com os animais Salina ($P < 0,05$), ao comparar com os animais expostos apenas ao PIC a expressão foi diminuída ainda mais, ($P < 0,001$), e continuou diminuindo a expressão a esse receptor quando comparou-se com os animais expostos apenas ao estresse (Salina + (E)) ($P < 0,0001$).

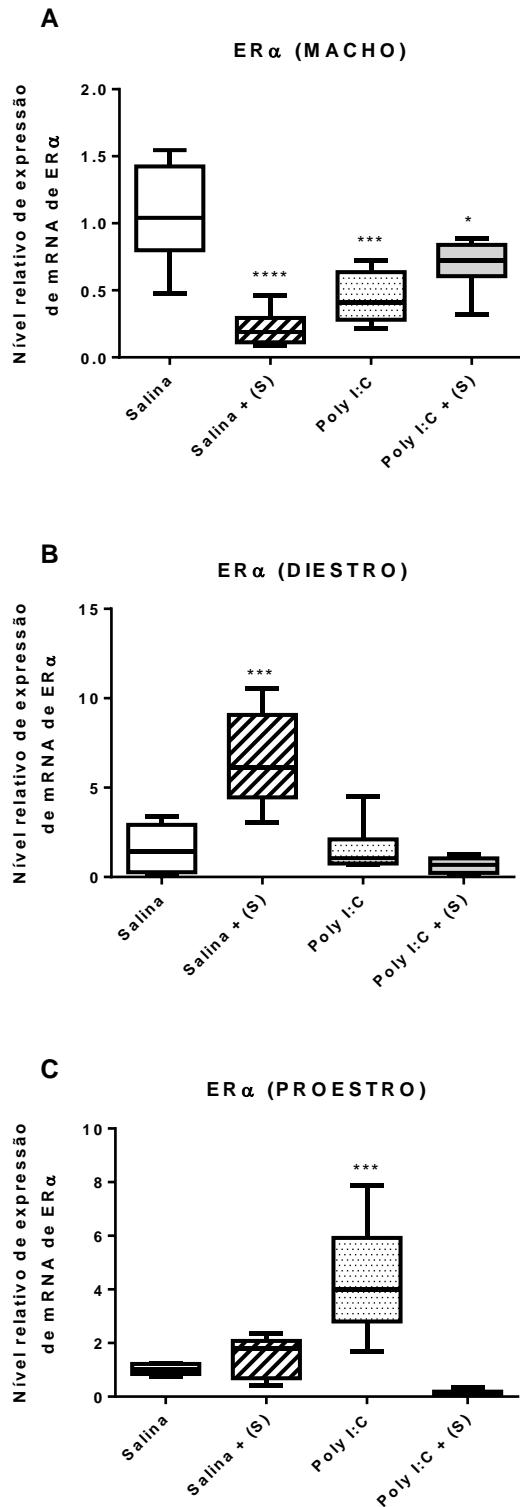


Fig. 24. Expressão relativa do mRNA para o receptor estrogênico ER α no hipocampo de camundongos machos (A), fêmeas em diestro (B), e fêmeas em proestro (C) que receberam administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina]. Parte dos animais foi desafiada ou não com estresse (E) na adolescência. As fêmeas na idade adulta foram avaliadas em fases diferentes do ciclo, ou seja, diestro ou proestro. Os dados são expressos como média \pm EPM de 4-5 animais por grupo. ANOVA de uma via foi realizada com teste de Bonferroni *post hoc*. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $p < 0,0001$; Abreviações: E: expostos ao estresse; PIC: polyI:C.

A avaliação da expressão hipocampal de mRNA de ER β apresentou o mesmo perfil de expressão do receptor ER α (Fig. 25).

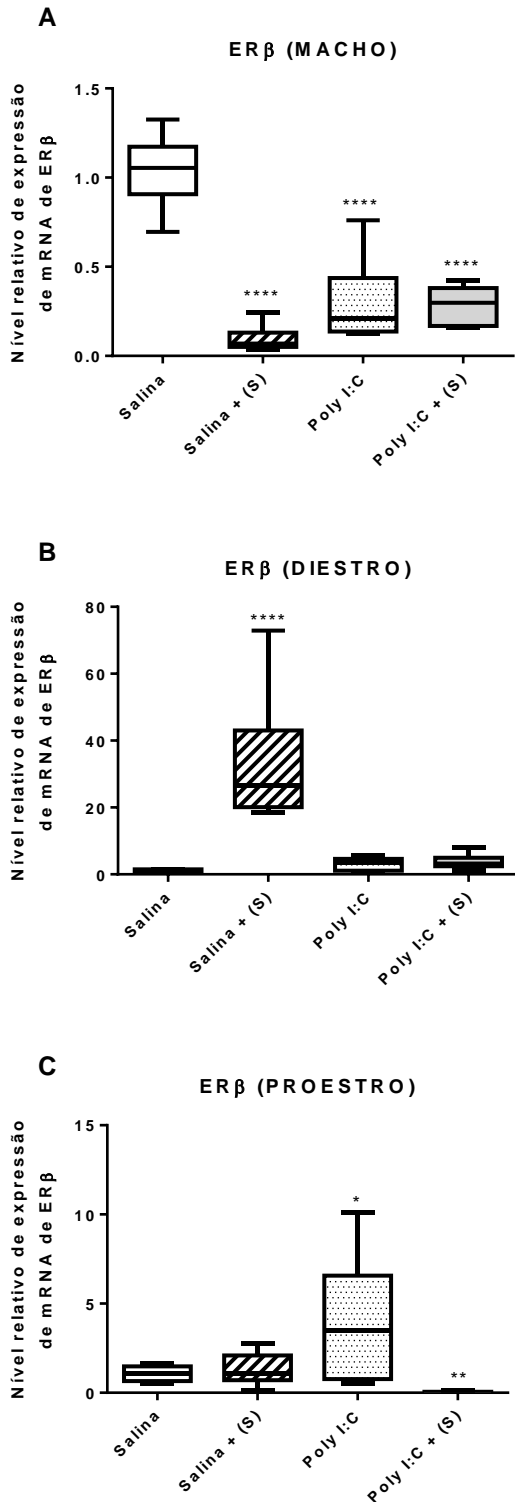


Fig. 25. Expressão relativa do mRNA para o receptor estrogênico ERβ no hipocampo de camundongos machos (A), fêmeas em diestro (B), e fêmeas em proestro (C) que receberam administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina]. Parte dos animais foi desafiado ou não com estresse (E) na adolescência. As fêmeas na idade adulta foram avaliadas em fases diferentes do ciclo, ou seja, diestro ou proestro. Os dados são expressos como média \pm EPM de 4-5 animais por grupo. ANOVA de uma via foi realizada com teste de Bonferroni *post hoc*. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $p < 0,0001$; Abreviações: E: expostos ao estresse; PIC: polyI:C.

Na análise da expressão hipocampal de mRNA da Aromatase (Fig. 26), importante enzima envolvida na síntese do estrógeno, pôde-se verificar alteração em machos, fêmeas em diestro e proestro. Os animais machos expostos apenas ao estresse na adolescência (Salina +(E)) diminuíram a expressão dessa enzima ($P < 0,01$), assim como os animais expostos aos dois desafios (PIC + (E)) ($P < 0,05$), quando comparados ao grupo Salina. As fêmeas em diestro expostas apenas ao estresse na adolescência (Salina + (E)) ($P < 0,0001$) e as fêmeas em proestro quando expostas aos dois desafios ($P < 0,0001$) aumentaram a expressão dessas enzimas quando comparados aos seus respectivos grupos Salina.

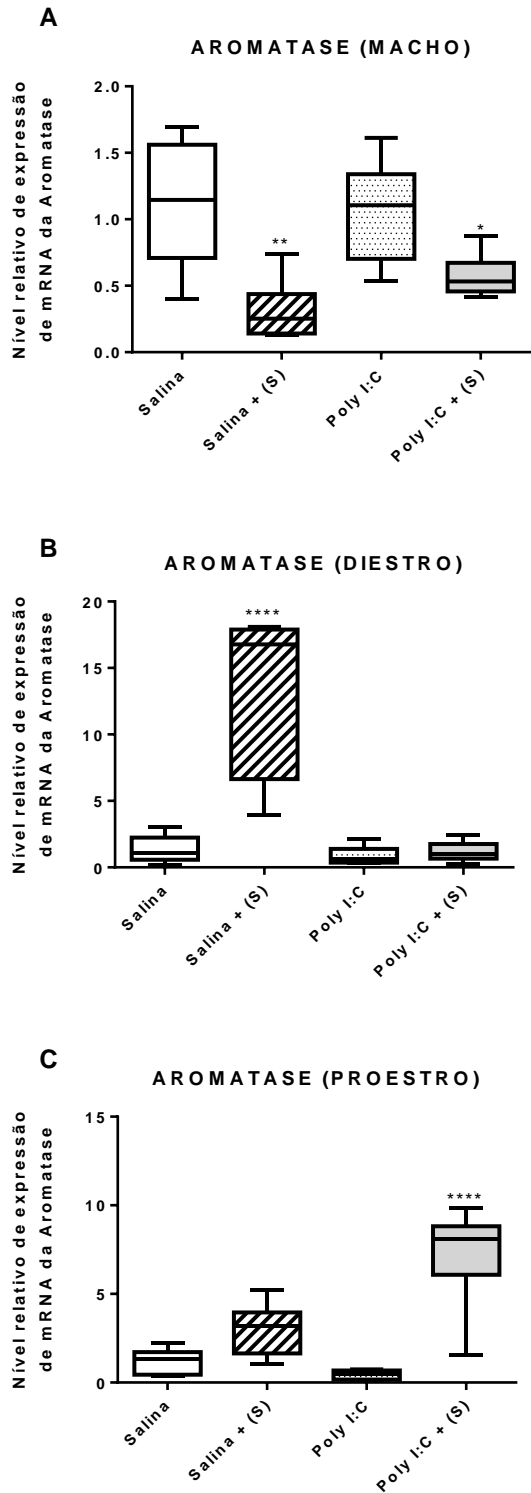


Fig. 26. Expressão relativa do mRNA para a enzima AROMATASE no hipocampo de camundongos machos (A), fêmeas em diestro (B), e fêmeas em proestro (C) que receberam administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina]. Parte dos animais foi desafiada ou não com estresse (E) na adolescência. As fêmeas na idade adulta foram avaliadas em fases diferentes do ciclo, ou seja, diestro ou proestro. Os dados são expressos como média \pm EPM de 4-5 animais por grupo. ANOVA de uma via foi realizada com teste de Bonferroni *post hoc*. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $p < 0,0001$; Abreviações: E: expostos ao estresse; PIC: polyI:C.

Em relação a expressão hipocampal de mRNA da TSPO (Fig. 27), uma enzima translocadora de 18KDa envolvida na síntese de estrógeno, podemos observar que nas fêmeas em proestro expostas aos dois desafios (PIC + (E)) tiveram sua expressão aumentada quando comparado ao grupo Salina ($P < 0,01$), e nas fêmeas em diestro exposta apenas ao estresse na adolescência (Salina + (E)) também tiveram expressão aumentada quando comparado ao grupo Salina ($P < 0,0001$). Enquanto nos animais machos todos os grupos (Salina + (E): $P < 0,0001$, PIC: $P < 0,001$; PIC + (E): $P < 0,05$) apresentaram aumento dessa enzima quando comparados ao grupo Salina.

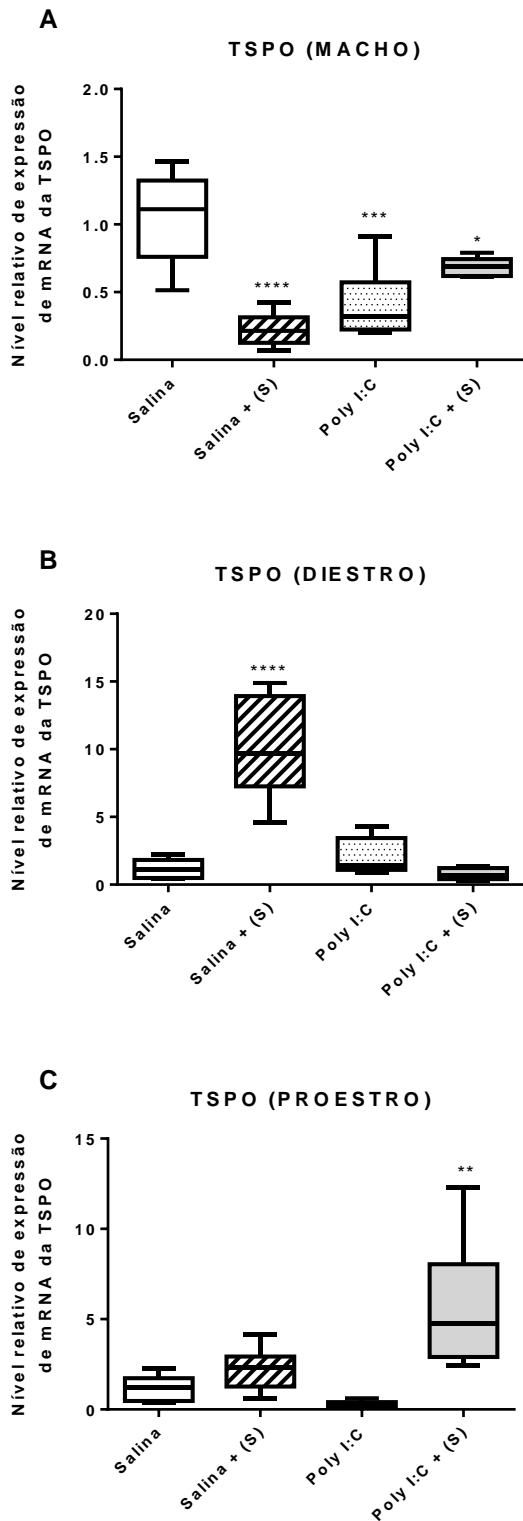


Fig. 27. Expressão relativa do mRNA para a enzima TSPO no hipocampo de camundongos machos (A), fêmeas em diestro (B), e fêmeas em proestro (C) que receberam administração neonatal de poly I:C (PN5-7) [grupo polyI:C] ou salina estéril [grupo salina]. Parte dos animais foi desafiada ou não com estresse (E) na adolescência. As fêmeas na idade adulta foram avaliadas em fases diferentes do ciclo, ou seja, diestro ou proestro. Os dados são expressos como média \pm EPM de 4-5 animais por grupo. ANOVA de uma via foi realizada com teste de Bonferroni *post hoc*. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $p < 0,0001$; Abreviações: E: expostos ao estresse; PIC: polyI:C.

	MACHOS			FÊMEAS DIESTRO			FÊMEAS PROESTRO			ÁREA CEREBRAL PESQUISADA
	SALINA + (E)	PIC	PIC + (E)	SALINA + (E)	PIC	PIC + (E)	SALINA + (E)	PIC	PIC + (E)	
IPP	∅	↓	↓/+	∅	∅	↓	∅	∅	∅	-
Interação social	∅	↓	↓	∅	∅	↓	∅	∅	∅	-
Labirinto em y	↓	↓	↓	∅	∅	↓	∅	∅	∅	-
Parvalbumina	∅	↑	∅	↓	∅	↓	∅	↑	∅	CORPO ESTRIADO
α7-nAChR	∅	∅	∅	↓	↓	↓	∅	↑	∅	CÓRTEX PRÉ-FRONTAL
NR2B	∅	↑	∅	∅	↑	∅	∅	∅	∅	CÓRTEX PRÉ-FRONTAL
DRD2	∅	↑	∅/+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	CORPO ESTRIADO
KYNU	∅	∅	↑	∅	∅	↑	∅	↑	∅	HIPOCAMPO
KAT	↑	∅	↑	∅	∅	↑	↓	∅	∅	HIPOCAMPO
ACMSD	∅	∅	↑	↓	∅	∅	∅	∅	↓	HIPOCAMPO
Triptofano	∅	∅	↓	∅	∅	∅	∅	∅	∅	HIPOCAMPO
Quinolínico	∅	∅	↑	∅	∅	∅	∅	∅	∅	HIPOCAMPO
Quinolínico/triptofano	∅	∅	↑	∅	∅	∅	∅	∅	∅	HIPOCAMPO
GPER - western blotting	∅	↑	∅	∅	∅	∅	∅	↑	∅	HIPOCAMPO
GPER - qpcr	↑	∅	↓	∅	↑	∅	∅	↑	↑	HIPOCAMPO
ER-α	↓	↓	↓	↑	∅	∅	∅	↑	∅	HIPOCAMPO
ER-β	↓	↓	↓	↑	∅	∅	∅	↑	↓	HIPOCAMPO
TSPO	↓	↓	↓	↑	∅	∅	∅	∅	↑	HIPOCAMPO
Aromatase	↓	∅	↓	↑	∅	∅	∅	∅	↑	HIPOCAMPO

Quadro 5: Resumo dos resultados encontrados no presente trabalho. (↓) diminuição estatística quando comparado ao grupo salina; (↑) aumento estatístico quando comparado ao grupo salina; (∅) sem alterações; (+) diminuição estatística quando comparado ao grupo PIC

7. DISCUSSÃO

7.1 O sexo influencia o comportamento de animais adultos expostos ao modelo dos dois desafios

Os resultados comportamentais obtidos no presente trabalho mostraram que os animais machos foram mais susceptíveis ao desenvolvimento de alterações, visto que a exposição ao PIC como primeiro desafio foi capaz de causar déficits de inibição pré-pulso (sintomas positivos), interação social (sintomas negativos) e labirinto em Y (sintomas cognitivos). Além disso, os machos também apresentaram déficits nestes comportamentos quando expostos aos dois desafios. As fêmeas em diestro apresentaram alterações comportamentais apenas quando expostas a dois desafios, enquanto o fato de estar em proestro protegeu os animais do desenvolvimento de alterações comportamentais. No caso da memória de trabalho os machos também se mostraram mais susceptíveis ao efeito dos desafios quando comparados às fêmeas em proestro.

A inibição pré-pulso (IPP) caracteriza-se pela redução do reflexo de sobressalto quando este é precedido de um estímulo de menor intensidade. Os déficits no processamento da atenção e da informação têm sido considerados uma característica importante na esquizofrenia, o que pode levar a déficits cognitivos e o teste de IPP tem sido proposto como uma medida neurofisiológica do bloqueio sensorio-motor. Ludewig et al 2002 reforçou que esse déficit é visto em pacientes esquizofrênicos crônicos quando mostrou que esses pacientes exibiram déficits significativo de IPP quando comparados com pacientes controle. No presente estudo observamos que animais machos expostos ao PIC, bem como machos e fêmeas em diestro expostos aos dois desafios PIC+E apresentaram déficits de IPP. Podemos sugerir, portanto, que os altos níveis de estrógeno na fase do proestro atuaram como protetores. As fêmeas em diestro podem ter apresentado menor IPP quando os dois desafios foram aplicados juntos, por que provavelmente, apesar dos baixos níveis de estrógeno, um único desafio não foi capaz de causar nenhum sintoma tipo esquizofrenia, mas os dois desafios juntos sim, ou seja, o limiar para os sintomas positivos nestes animais mostrou-se maior.

Neste estudo não houve diferença de IPP entre os animais salina machos e fêmeas. As fêmeas controle em diestro apresentaram IPP menor que as fêmeas salina em proestro. Os estudos relatados até o momento encontram-se obscuros em relação a influência do sexo no IPP, pois comparam os dados entre machos e fêmeas, mas não avaliam a fase estrogênica dos

indivíduos estudados (LEHMANN, PRYCE E FELDON, 1999; KUMARI, AASEN E SHARMA, 2004).

Em relação ao teste de interação social que avalia os sintomas tipo negativos da esquizofrenia nossos dados mostram que os machos apresentaram maior déficit nesse teste que as fêmeas, sendo que os animais machos apresentaram déficits de interação social quando expostos apenas ao PIC e aumentou esse déficit ao ser exposto aos dois desafios (PIC + (E)), enquanto apenas as fêmeas em diestro expostas aos dois desafios (PIC + (E)) que apresentaram essa diminuição de interação. Estes dados estão em linha com os achados clínicos que apontam que os homens são mais propensos aos sintomas negativos do que as mulheres (SHTASEL et al, 1992; LEUNG E CHUE, 2000; ABEL, DRAKE E GOLDSTEIN, 2010). Além disso, o fato de as fêmeas em proestro não mostrarem sintomas negativos em nenhuma grupo confirma o que dizem as pesquisas, que as fêmeas precisam de mais exposição a eventos estressantes do que os machos para desencadear os sintomas negativos da esquizofrenia (ALMEIDA; KESSLER, 1998; MYIN-GERMEYS et al, 2004).

Na avaliação dos sintomas cognitivos (memória de trabalho) as fêmeas em diestro expostas aos dois desafios (PIC + (E)) apresentaram diminuição nesta função como evidenciado através da redução no número de acertos no teste do labirinto em Y. Vale lembrar que esse sintoma faz parte da gama de sintomas apresentados por pacientes esquizofrênicos e que pode envolver disfunção neuronal circuitos cerebrais como por exemplo dos receptores de acetilcolina $\alpha 7$ -nAChR. Evidências apontam que neurônios colinérgicos têm relação direta com a presença de sintomas cognitivos (MARTIN E FREEDMAN, 2007; FREEDMAN, 2014), o que corrobora com nossos resultados já que encontramos diminuição de $\alpha 7$ -nAChR no CPF (área de grande importância no processamento da memória de trabalho e cognição) das fêmeas em diestro exposta aos dois desafios (PIC + (E)).

Nossos dados mostraram que as fêmeas em proestro não apresentaram déficits significativos nos testes comportamentais avaliados. Essa diferença no perfil comportamental pode estar relacionada aos altos níveis de estrogênio presentes nesta fase do ciclo, como confirmado pelo aumento da expressão das enzimas TSPO e aromatase que estão envolvidas na produção desse hormônio. Merece destaque o fato de que o estrógeno é capaz de aumentar o IPP em ratos (VAN DEN BUUSE E EIKELIS, 2001). O estrógeno também influencia o comportamento social. Neste contexto, camundongos nocautes para os genes α (ER α) ou ER β do receptor de estrogênio também exibem déficits comportamentais sociais (GARCIA, et al, 2017). Alterações na memória de trabalho associadas à produção reduzida de estradiol pelos

ovários podem explicar pelo menos em parte o déficit na memória relatada por muitas mulheres ao entrar na menopausa (HAMPSON, 2018).

7.2 O sexo influencia a expressão de proteínas envolvidas na neurobiologia da esquizofrenia em animais expostos ao modelo de dois desafios

O sistema GABAérgico desempenha um papel diverso nos circuitos neurais, incluindo a regulação da atividade neuronal. Os interneurônios GABAérgicos podem ser subdivididos com base no padrão de expressão de proteínas de ligação ao cálcio, incluindo calbindina, calretinina e parvalbumina (PV) (CHUNG, FISH E LEWIS, 2016).

Além do seu papel na manutenção da função normal, os neurônios GABAérgicos (neurônios parvalbumina) desempenham um papel fundamental na maturação adequada dos circuitos neurais durante o desenvolvimento pós-natal (NAKAZAWA et al, 2012).

Evidências apontam que nos primatas a maturação dos padrões de inervação GABAérgica geralmente se estende até o período pós-adolescente. Portanto, é plausível que o comprometimento da maturação dos neurônios GABAérgicos possa levar a distúrbios neuropsiquiátricos (CRUZ et al., 2009, HASHIMOTO et al., 2009). Sabe-se que a disfunção GABAérgica pode estar subjacente à fisiopatologia dos distúrbios psiquiátricos, incluindo a esquizofrenia (BELFORTE et al, 2010).

Nossos dados mostram que os animais machos tiveram aumento de PV no corpo estriado apenas no grupo de animais expostos ao desafio imune neonatal (PIC). Sabemos que a neurogênese do adulto é dinamicamente regulada por estímulos externos de insultos ambientais, incluindo excitotoxicidade e estresse oxidativo, e que o período da adolescência é um período crítico para a maturação dos neurônios GABAérgicos (JIANG, COWELL E NAKAZAWA, 2013; SONG et al, 2016).

Ao analisarmos as proteínas de neurônios glutamatérgicos (NR2B) e dopaminérgicos (DRD2) dos animais machos podemos observar que também houve aumento de expressão das proteínas, apenas, nos animais machos expostos ao desafio de PIC. Essa alteração pode sugerir ser oriunda da modulação dos neurônios GABAérgicos.

Em relação as fêmeas foi possível verificar que as alterações das proteínas se comportaram diferente em relação aos machos. Não apresentaram alterações significativas nas proteínas relacionadas a hipótese glutamatérgica (NR2B) e dopaminérgica (DRD2), no

entanto, foram observadas alterações de proteínas GABAérgicas (PV) e Colinérgicas ($\alpha 7$ -nAChR).

Nossos dados mostram diminuição de expressão de PV no corpo estriado de fêmeas em diestro que sofreram insulto no primeiro desafio (PIC) e nas fêmeas diestro que sofreram os dois desafios (PIC + (E)). Canetta et al 2016 mostra que insultos de ativação imune materna pré-natal diminuem seletivamente a transmissão de interneurônios que expressam PV no CPF. Nosso estudo mostra que essa correlação também pode acontecer nos neurônios do corpo estriado.

Ainda nas fêmeas em diestro observamos diminuição da expressão de $\alpha 7$ -nAChR cortical nos mesmos grupos que tiveram diminuição de PV. Esse perfil não foi observado nas fêmeas em proestro. A literatura aponta que pode haver interação entre neurônios colinérgicos e GABAérgicos. A correlação patológica entre esses neurônios ainda não é clara. Em modelos *in vivo* já foi identificado que a exclusão do gene $\alpha 7$ nAChR em camundongos prejudica o desenvolvimento de neurônios GABAérgicos (PV) e *in vitro* foram encontradas interrupções no desenvolvimento de interneurônios GABAérgicos positivos para PV em culturas corticais sem $\alpha 7$ nAChRs (LIN et al, 2014). Vale lembrar que redução na expressão da PV é uma observação constante em estudos humanos pós-morte, bem como em modelos animais de esquizofrênia (LODGE E GRACE, 2009; KONRADI et al, 2011; BOLEY, PEREZ E LODGE, 2014).

Assim podemos sugerir que as alterações que envolvem proteínas relacionadas a neurobiologia da esquizofrênia podem apresentar perfis diferentes de desregulação no modelo estudado, mostrando que o sexo e os eventos estressores em momentos diferentes da vida podem influenciar de forma distinta as conexões neurais afetadas.

7.3 O sexo influencia a expressão de mediadores da via das quinurerinas e da via do estrógeno em animais expostos ao modelo dos dois desafios

Na via de metabolização do triptofano avaliamos a expressão de enzimas que levam a formação do ácido quinolínico (KYNU), ácido quinurênico (KAT) e ácido picolínico (ACMSD), pois em estudos pós-mortem em cérebros de pacientes esquizofrênicos foram detectados altos níveis de ácido quinolínico.

Observamos que no grupo dos animais machos expostos aos dois desafios (PIC + (E)) a expressão de KAT aumentou mais ainda mostrando que os dois desafios combinados podem contribuir para o aumento desse metabolito no cérebro.

Há relatos que mostram aumento de ácido quinurênico cérebro de pacientes com esquizofrenia (ERHARDTA et al, 2001). Ainda nos animais machos que sofreram dois desafios (PIC + (E)) podemos observar aumento de expressão das enzimas KYNU e ACMSD. O que também corrobora com achados de outros estudos em esquizofrenia. Iaccarina et al 2013 tratou ratos com quinurenina, precursora do ácido quinurênico, nos dias pós-natais 7-10 e observou aumento no ácido quinurênico e no ácido quinolínico.

Outros estudos comparando pacientes com esquizofrenia e pacientes controle mostrou aumento de imunoglobulina específica para ácido quinolínico nos pacientes esquizofrênicos (KANCHANATAWAN et al, 2018; SIRIVICHAYAKUL et al, 2019). No nosso estudo ao analisarmos a presença dos metabolitos do triptofano por HPLC foi possível observar diminuição do triptofano e aumento do ácido quinolínico, assim como aumento da relação Quinolínico/triptofano, infelizmente não foi possível analisar a quantidade de outros metabolitos da via.

Alterações induzidas por infecções, principalmente virais, em momentos críticos do desenvolvimento cerebral podem regular enzimas da via de degradação do triptofano e contribuir para a desregulação neuronal com consequente apresentação de sintomas tipo esquizofrenia na idade adulta. O estudo de Linderholm et al, 2012 mostra que níveis aumentados de ácido quinurênico no cérebro de pessoas com esquizofrenia está associado no comprometimento cognitivo o que também foi observado no nosso estudo com a diminuição de acertos no teste de labirinto em Y no grupo dos animais machos expostos aos dois desafios (PIC + (E)).

Já em relação as fêmeas podemos observar que a ativação da via das quinureninas comporta-se de forma distinta dos machos e diferente, inclusive, entre proestro e diestro. As fêmeas em diestro expostas aos dois desafios (PIC + (E)) tiveram aumento de expressão apenas das enzimas KYNU e KAT, o que não foi observado nas fêmeas em proestro. Assim, podemos suspeitar que haja regulação das enzimas da via das quinureninas mediada pela presença do estrogênio no modelo estudado.

Não é recente que estudos apontam o caráter regulatório do estrogênio nas enzimas da via de degradação do triptofano. Estudos, *in vitro*, utilizando homogenatos de rim e fígado de ratos comprovaram ação inibitória da quinureninase e KAT pelo estrogênio (BRAIDMAN E ROSE, 1971; MANNING E MASON, 1975; PATNAIK E SARANGI, 1980; JAYAWICKRAMA et al, 2017). Green et al, 1978 mostraram que mulheres em uso de contraceptivos oral aumentaram a excreção de metabolitos da via das quinureninas.

A relação entre o estrogênio, via das quinureninas e a esquizofrenia ainda permanece pouco elucidado. Uma limitação é a carência de estudos que abordem a relação de todas os aspectos juntos. Os estudos que tentam caracterizar os efeitos do estrogênio na esquizofrenia não relatam os níveis de metabólitos de quinurenina e os estudos que se concentram nesses níveis metabólitos não relatam níveis ou tratamentos hormonais. Neste contexto, o presente estudo é um dos primeiros a tentar elucidar esta questão.

Em relação a expressão de mRNA dos receptores de estrogênio no hipocampo observamos que nos animais machos que sofreram os dois desafios (PIC + (E)) apresentaram diminuição de todas as proteínas analisadas (GPER, ER α , ER β , TSPO e aromatase). Já nas fêmeas em proestro submetidas aos dois desafios (PIC + (E)) observamos que a expressão dos receptores ER α e ER β foi diminuída, enquanto a expressão do receptor GPER, da proteínas TSPO e da enzima aromatase foi aumentada. Nas fêmeas em diestro expostas aos dois desafios (PIC + (E)) não observamos alterações significativas nos receptores estudados.

A hipótese do estrogênio na esquizofrenia afirma que o este hormônio é protetor para a psicose e que uma redução no estrogênio pode piorar os sintomas. Em uma revisão realizada por Brockington em 2005 foram relatados mais de 20 casos confirmados e 200 possíveis, onde as mulheres apresentavam breves episódios psicóticos em sintonia com o ciclo menstrual, com remissão completa entre os episódios. O que foi observado também nos nossos dados comportamentais. As fêmeas em proestro não tiveram déficits estatisticamente relevantes quando expostas aos dois desafios (PIC + (E)), tendo a fêmea em diestro apresentado déficit significativo de IPP.

Na metanálise realizada por Reilly et al, 2020 foi demonstrado a exacerbação de sintomas em mulheres no período perimenstrual, encontrando evidências de excesso de internações psiquiátricas durante a fase perimenstrual em relação à fase não perimenstrual.

A correlação entre o estrogênio e a apresentação de sintomas também é vista em outras condições além do período perimenstrual. Já foi relatado que em puerperas o risco de psicose aguda após o parto aumenta consideravelmente e relatos mostram que pode estar relacionado com diminuição acentuada dos níveis de estrogênio (DEUCHAR & BROCKINGTON, 1998).

Apesar da produção do estrogênio cerebral ser independente da produção periférica há evidências que indicam que haja uma correlação entre os dois locais. Deuchar e Brockington 1998 relacionaram que uma rápida diminuição do estrogênio circulante pode resultar em uma diminuição do estrogênio no ambiente cerebral, possivelmente induzindo alterações na

neurotransmissão central. Ahokas e Aito, 2000 mostraram que a administração de estrogênio melhorou a psicose em mulheres após o parto.

Um outro estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo mostrou evidências de que o tratamento com estrogênio administrado em conjunto com antipsicóticos é benéfico para a esquizofrenia, particularmente na redução dos sintomas positivos (AKHONDZADEH et al, 2003).

As ações do estradiol são geralmente categorizadas como genômicas ou não-genômicas. As ações genômicas são lentas no início, mas de longa duração e são ativadas por via dos receptores ER α e ER β . As ações não genômicas ocorrem através da ativação de vias intracelulares do segundo mensageiro através do receptor GPER. Nosso estudo apresenta evidências que a ativação desses receptores em animais que apresentaram sintomas tipo esquizofrenia tem influência do sexo. Nos animais machos encontramos diminuição tanto das vias genômicas como não genômicas, já nas fêmeas em proestro encontramos ativação elevada da via não genômica e nas fêmeas em diestro não houve alteração de expressão de nenhuma das vias. Ao avaliarmos a expressão proteica de GPER desses animais podemos observar uma semelhança de apresentação dos dados, no entanto, por limitações do estudo não foi possível avaliar a expressão de todas as proteínas observadas na quantificação do mRNA.

A literatura mostra que diferentes agonistas do estrogênio têm a capacidade de mediar formas diferentes de aprendizado e memória, no entanto, não há relatos que abordem a regulação molecular dos receptores de estrogênio em modelos animais neurodesenvolvimentais de esquizofrenia evidenciando o papel do sexo no desenvolvimento de sintomas tipo esquizofrenia. Sinopoli et al, 2006 mostraram que uma dose baixa de estradiol injetado diretamente no hipocampo, ou uma dose alta injetada no córtex pré-frontal, poderia melhorar o desempenho da memória de trabalho em ratas ovariectomizadas. Adams et al, 2001 demonstrou a importância do estrogênio na função cognitiva ao mostrar que o tratamento com estradiol aumenta a plasticidade sináptica do hipocampo em ratas jovens ovariectomizadas.

Sendo assim o estrogênio parece ter um papel importante na fisiopatologia da esquizofrenia, potencial alvo de drogas para tratamento da doença e necessidade de estudos mais amplos que elucidem os mecanismos dessa interação.

CONCLUSÃO

- Mostramos que o modelo de dois desafios induzido por desafio imune neonatal associado a estresse na adolescência é um modelo robusto que permite avaliar a influência de dois desafios separados e combinados e que mimetizam todos os sintomas tipo esquizofrenia em animais. Este modelo é de grande importância para a elucidação dos mecanismos envolvidos na neurobiologia da esquizofrenia, principalmente abordando a influência do sexo, pois por questões éticas e científicas o estudo de alterações em humanos fica limitado;
- Contribuímos para o entendimento da influência do sexo na expressão de proteínas relacionadas a circuitos cerebrais envolvidos na esquizofrenia levando em consideração o ciclo estral da fêmea, mostrando que o pico de estrogênio pode ter uma influência benéfica no desenvolvimento dos sintomas da esquizofrenia. Neste sentido observamos que as fêmeas em proestro não apresentaram sintomas tipo-esquizofrenia, o que foi observado em animais machos e em fêmeas em diestro submetidas aos dois desafios;
- Mostramos que a exposição ao PIC + E influencia a metabolização do triptofano e a expressão de proteínas e de receptores da via do estrogênio. Neste contexto os machos mostraram regular a via do triptofano para a produção de ácido quinurênico e quinolínico, as fêmeas em proestro para o ácido picolínico e as fêmeas em diestro redução do picolínico. Enquanto na via de estrogênio cerebral os machos têm a diminuição da produção de estrogênio, tentando possivelmente compensar com ativação de receptores de membrana de efeitos rápidos (GPER).

REFERÊNCIAS

- ABEL, K. M.; DRAKE, R.; GOLDSTEIN, J. M. Sex differences in schizophrenia. **Int. Ver. Psychiatry.**, v. 22, n. 5, p. 417-428, 2010.
- ADAMS, M. M.; SHAH, R. A.; JANSSEN, W. G. M.; MORRISON, J. H. Different modes of hippocampal plasticity in response to estrogen in young and aged female rats. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 98, n. 14, p. 8071–8076, 2001.
- AGHAJANIAN, G.K.; MAREK, G.J. Serotonin model of schizophrenia: Emerging role of glutamate mechanisms. **Brain Res.** v. 31, p. 302–312, 2000.
- AHOKAS, A.; AITO, M.; RIMON, R. Positive treatment effect of estradiol in postpartum psychosis: a pilot study. **J. Clin. Psychiatry.**, v. 61, p.166-169, 2000.
- AKHONDZADEH, S.; NEJATISAFI, A. A.; AMINI, H. *et al.* Adjunctive estrogen treatment in women with chronic schizophrenia: a double-blind, randomized, and placebo-controlled trial. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 27, n. 6, p. 1007–1012, 2003.
- ALLEN, N.C.; BAGADE, S.; MCQUEEN, M.B.; *et al.* Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. **Nat Genet.** v.40, p. 827–834, 2008.
- ANGERMEYER, M. C.; KÜHN, L. Gender differences in age at onset of schizophrenia. An overview. **Eur. Arch. Psychiatry Neurol. Sci.**, v. 237, n. 6, p. 351–364, 1988.
- ARONSSON, F.; LANNÉBO, C.; PAUCAR, M.; BRASK, J.; KRISTENSSON, K.; KARLSSON, H. Persistence of viral RNA in the brain of offspring to mice infected with influenza A/WSN/33 during pregnancy. **J. Neurovirol.**, v. 8, n. 4, p. 353–357, 2002.
- ASP, L.; HOLTZE, M.; POWELL, S. B. *et al.* Neonatal infection with neurotropic influenza A virus induces the kynurenine pathway in early life and disrupts sensorimotor gating in adult Tap1 $-/-$ mice. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 13, n. 4, p. 475-485, 2010.

BELFORTE, J. E.; ZSIROS, V.; SKLAR, E. R. *et al.* Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. **Nat. Neurosci.**, v. 13, n. 1, p. 76-83, 2010.

BENDER, D. A. Effects of a dietary excess of leucine on the metabolism of tryptophan in the rat: a mechanism for the pellagrogenic action of leucine. **Br. J. Nutr.**, v. 50, n. 1, p. 25-32, 1983.

BENES, F.M. The GABA system in schizophrenia: Cells, molecules and microcircuitry. **Schizophr. Res.** v. 167, p. 1–3, 2015.

BIEDERMANN, F., & FLEISCHHACKER, W. Psychotic disorders in DSM-5 and ICD-11. **CNS Spectrums.** v.21, n. 4, p. 349-354, 2016.

BOLEY, A. M.; PEREZ, S. M.; LODGE, D. J. A fundamental role for hippocampal parvalbumin in the dopamine hyperfunction associated with schizophrenia. **Schizophr. Res.**, v. 157, n. 1, p. 238-243, 2014.

BORRELL, J.; VELA, J. M.; AREVALO-MARTIN, A.; MOLINA-HOLGADO, E.; GUAZA, C. Prenatal immune challenge disrupts sensorimotor gating in adult rats: implications for the etiopathogenesis of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 26, p. 204–215, 2002.

BOSCO, M. C.; RAPISARDA, A.; REFFO, G.; MASSAZZA, S.; PASTORINO, S.; VARESI, L. Macrophage activating properties of the tryptophan catabolite picolinic acid. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 527, p. 55-65, 2003.

BRAIDMAN, I. P.; ROSE, D. P. Effects of sex hormones on three glucocorticoid-inducible enzymes concerned with amino acid metabolism in rat liver. **Endocrinology**, v. 89, p. 1250–1255, 1971.

BREESE, C., LEE, M.J., ADAMS, C.E., SULLIVAN, B., LOGEL, J., GILLEN, K.M., MARKS, M.J., COLLINS, A.C., LEONARD, S. Abnormal regulation of high affinity nicotinic receptors in subjects with schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 23, p. 351-364, 2000.

BROCKINGTON, I. Menstrual psychosis. **World Psychiatry.**, v. 4, n. 1, p. 9-17, 2005.

BROWN, A. S. Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. **Schizophr. Bull.**, v. 32, n. 2, p. 200–202, 2006.

BROWN, A. S.; BEGG, M. D.; GRAVENSTEIN, S.; SCHAEFER, C. A.; WYATT, R. J.; BRESNAHAN, M.; BABULAS, V. P.; SUSSER, E. S. Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. **Arch. Gen. Psychiatry.**, v. 61, n. 8, p. 774-80, 2004.

BROWN, A. S.; DERKITS, E. J. Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. **Am. J. Psychiatry.**, v. 167, n. 3, p. 261–280, 2010.

BROWN, A. S.; HOOTON, J.; SCHAEFER, C. A. *et al.* Elevated maternal interleukin-8 levels and risk of schizophrenia in adult offspring. **Am. J. Psychiatry.**, v. 161, n. 5, p. 889–895, 2004.

BRUNZELL, D. H.; MCINTOSH, J. M. Alpha nicotinic acetylcholine receptors modulate motivation to self-administer nicotine: Implications for smoking and schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n.5, p. 1134–1143, 2012.

BSIBSI, M.; NOMDEN, A.; VAN NOORT, J.M.; BARON W. Toll-like receptors 2 and 3 agonists differentially affect oligodendrocyte survival, differentiation, and myelin membrane formation. **J Neurosci Res.** v. 90, n. 2, p. 388-98, 2012.

BUKA, S. L.; TSUANG, M. T.; TORREY, E. F.; KLEBANOFF, M. A.; WAGNER, R. L.; YOLKEN, R. H. Maternal cytokine levels during pregnancy and adult psychosis. **Brain Behav. Immun.**, v. 15, n. 4, p. 411–420, 2001.

CANETTA, S.; BOLKAN, S.; PADILLA-COREANO, N. *et al.* Maternal immune activation leads to selective functional deficits in offspring parvalbumin interneurons. **Mol Psychiatry.**, v. 21, n. 7, p. 956-968, 2016. doi: 10.1038/mp.2015.222. Epub 2016 Feb 2.

CANNON, T. D.; CHUNG, Y.; HE, G. *et al.* North American Prodrome Longitudinal Study Consortium. Progressive reduction in cortical thickness as psychosis develops: a multisite longitudinal neuroimaging study of youth at elevated clinical risk. **Biol. Psychiatry.**, v. 77, n. 2, p. 147–157, 2015.

CARUSO, D.; PESARESI, M.; ABBIATI, F. *et al.* Comparison of plasma and cerebrospinal fluid levels of neuroactive steroids with their brain, spinal cord and peripheral nerve levels in male and female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 10, p. 2278–2290, 2013.

CBHSQ - Center for Behavioral Health Statistics and Quality. Results from the 2016 National Survey on Drug Use and Health: Detailed Tables. Rockville, MD: Substance Abuse and Mental Health Services Administration; 2017.

<https://www.samhsa.gov/data/sites/default/files/NSDUH-DETABS-2016/NSDUH-DETABS-2016.pdf>. Acessado em: Abril, 2020.

CERSOSIMO, M. G.; BENARROCH, E. E. Estrogen actions in the nervous system: Complexity and clinical implications. **Neurology**, v. 85, n. 3, p. 263-73, 2015.

CERVENKA, I.; AGUDELO, L. Z.; RUAS, J. L. Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. **Science**, v. 357, n. 6349, eaaf9794, 2017. doi: 10.1126/science.aaf9794.

CHOI, S. H.; KANG, S. B.; JOE, S. H. Changes in premenstrual symptoms in women with schizophrenia: A prospective study. **Psychosom. Med.**, v. 6, n. 5, p. 822–829, 2001.

CHONG, H. Y.; TEOH, S. L.; WU, D. B.; KOTIRUM, S.; CHIOU, C. F.; CHAIYAKUNAPRUK, N. Global economic burden of schizophrenia: a systematic review. **Neuropsychiatr. Dis. Treat.**, v.16, n.12, p. 357-373, 2016.

- CHUNG, D. W.; FISH, K. N.; LEWIS, D. A. Pathological basis for deficient excitatory drive to cortical parvalbumin interneurons in schizophrenia. **Am. J. Psychiatry.**, v. 1, n. 173, p. 113-1139, 2016.
- COHEN, R. Z.; SEEMAN, M. V.; GOTOWIEC, A.; KOPALA, L. Earlier Puberty as a Predictor of Later Onset of Schizophrenia in Women. **Am. J. Psychiatry**, v. 1567, n. 156, p. 1059–1064, 1999.
- CRUZ, D. A.; LOVALLO, E. M.; STOCKTON, S.; RASBAND, M.; LEWIS, D. A. Postnatal development of synaptic structure proteins in pyramidal neuron axon initial segments in monkey prefrontal cortex. **J. Comp. Neurol.**, v. 514, p. 353-367, 2009.
- D' SOUZA, M. S.; MARKOU, A. Schizophrenia and tobacco smoking comorbidity: nAChR agonists in the treatment of schizophrenia-associated cognitive deficits. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 3, p.1564-1573, 2011.
- DAVIS. J.; EYRE, H.; JACKA, F. N. *et al.* A review of vulnerability and risks for schizophrenia: Beyond the two hit hypothesis. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 65, p; 185-194, 2016.
- DEUCHAR, N.; BROCKINGTON, I. Puerperal and menstrual psychoses: the proposal of a unitary etiological hypothesis. **J. Psychosom. Obstet. Gynaecol.**, v. 19, p. 104-110, 1998.
- DUNCAN,C. E.; WEBSTER, M. J.; ROTHMOND, D. A. *et al.* Prefrontal GABA(A) receptor alpha-subunit expression in normal postnatal human development and schizophrenia. **J. Psychiatr. Res.**, v. 44, p. 673-681, 2010.
- ERHARDTA, S.; BLENNOWB, K.; NORDINC, C. *et al.* Kynurenic acid levels are elevated in the cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia. **Neuroscience Letters**, v. 313, p. 96–98, 2001.

FARRELL, M.S.; WERGE, T. SKLAR, P.; et al. Evaluating historical candidate genes for schizophrenia. **Mol Psychiatry**. v. 20, n. 5, p. 555-62, 2015.

FATEMI, S. H. Prenatal viral infection, brain development and schizophrenia. *In*: FATEMI, S. H. **Neuropsychiatric Disorders and Infection**. London, UK: Taylor and Francis, 2005.

FATEMI, S. H.; FOLSOM, T. D. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. **Schizophr. Bull.**, v. 35, n. 3, p. 528–548, 2009.

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

FINEBERG, A.M.; ELLMAN, L.M.; SCHAEFER, C.A.; et al. Fetal exposure to maternal stress and risk for schizophrenia spectrum disorders among offspring: Differential influences of fetal sex. **Psychiatry Res.** v. 28; n. 236, p. 91-97, 2016.

FOLSOM, D. P.; HAWTHORNE, W.; LINDAMER, L. *et al.* Prevalence and risk factors for homelessness and utilization of mental health services among 10,340 patients with serious mental illness in a large public mental health system. **Am. J. Psychiatry.**, v. 162, p. 370–376, 2005.

FRANKLIN, T. B.; SAAB, B. J.; MANSUY, I. M. Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. **Neuron.**, v. 6, n. 75, p. 747-61, 2012.

FREEDMAN, R. $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor agonists for cognitive enhancement in schizophrenia. **Annu. Ver. Med.**, v. 65, p. 245-61, 2014.

GARAVAGLIA, S.; PEROZZI, S.; GALEAZZI, L.; RAFFAELLI, N.; RIZZI, M. The crystal structure of human alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdehyde decarboxylase in complex with 1,3-dihydroxyacetonephosphate suggests a regulatory link between NAD synthesis and glycolysis. **FEBS J.**, v. 276, n. 22, p. 6615-6623, 2009.

GARCIA, A.N.; BEZNER, K.; DEPENA, C.; YIN, W.; GORE, A.C. The effects of long-term estradiol treatment on social behavior and gene expression in adult female rats. **Horm Behav.** v. 87, p. 145-154, 2017.

GARFINKEL, P. E.; GOLDBLOOM, D. S. Mental health - getting beyond stigma and categories. **Bulletin of the World Health Organization.**, v. 78, p. 503–505, 2000.

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

GIOVANOLI, S.; HARALD, ENGLER.; ANDREA, ENGLER. *et al.* Stress in Puberty Unmasks Latent Neuropathological Consequences of Prenatal Immune Activation in mice. **Science.**, v. 339, n. 6123, p. 1095-1099, 2013.

GOFF, D. C.; COYLE, J. T. The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. **Am. J. Psychiatry.**, v. 158, n. 9, p. 1367-1377, 2001.

GOFF, D.C.; COYLE, J.T. The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. **Am. J. Psychiatry.** v. 158, p. 1367–1377, 2001.

GREEN, A. R.; BLOOMFIELD, M. R.; WOODS, H. F.; SEED, M. Metabolism of an oral tryptophan load by women and evidence against the induction of tryptophan pyrrolase by oral contraceptives. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 5, p. 233–241, 1978.

GRIGORIADIS, S.; SEEMAN, M. V. The role of estrogen in schizophrenia: implications for schizophrenia practice guidelines for women. **Can J Psychiatry.**, v. 47, n. 5, p. 437–442, 2002.

GRUNDER, G.; CUMMING, P. The dopamine hypothesis of schizophrenia: Current status. *In:* ABEL, T.; NICKL-JOCKSCHAT, T. *The Neurobiology of Schizophrenia.* MA, USA: Ed. Academic Press: Cambridge, 2016. p. 109–124.

GUILLEMIN, G. J.; CULLEN, K. M.; LIM, C. K.; SMYTHE, G. A.; GARNER, B.; KAPOOR, V.; TAKIKAWA, O.; BREW, B. J. Characterization of the kynurenine pathway in human neurons. **J. Neurosci.**, v. 27, n. 47, p. 12884-92, 2007.

GUILLEMIN, G. J.; KERR, S. J.; SMYTHE, G. A. *et al.* Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. **J. Neurochem.**, v. 78, n. 4, p. 842–853, 2001.

HAJOS, M.; HURST, R. S.; HOFFMANN, W. E.; KRAUSE, M.; WALL, T. M.; HIGDON, N. R. *et al.* The selective $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist PNU-282987 [N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-chlorobenzamide hydrochloride] enhances GABAergic synaptic activity in brain slices and restores auditory gating deficits in anesthetized rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 312, n. 3, p. 1213–1222, 2005.

HALLONQUIST, J.; SEEMAN, M. V.; LANG, M.; RECTOR, N. Variation in symptom severity over the menstrual cycle of schizophrenics. **Biol. Psychiatry**, v. 33, n. 3, p. 207–209, 1993.

HAMPSON, E. Estrogens, Aging, and Working Memory. **Curr Psychiatry Rep.** v. 20, n. 12 p. 109, 2018.

HARE, E. H.; PRICE, J. S.; SLATER, E. Schizophrenia and season of birth. **Br. J. Psychiatry**, v. 120, n. 554, p. 125–126, 1972.

HARRISON, G.; HOPPER, K.; CRAIG, T. *et al.* Recovery from psychotic illness: a 15- and 25-year international follow-up study. **Br. J. Psychiatry**, v. 178, p. 506–517, 2001.

HASHIMOTO, T.; NGUYEN, Q. L.; ROTARU, D. *et al.* Protracted developmental trajectories of GABAA receptor $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunit expression in primate prefrontal cortex. **Biol. Psychiatry**, v. 65, p. 1015-1023, 2009.

HAZLETT, E.A.; BUCHSBAUM, M.S.; HAZNEDAR, M.M. *et al.* Prefrontal glucose metabolism and startle eyeblink modification abnormalities in unmedicated schizophrenia patients. **Psychophysiology**, v. 35, n. 2, p. 186-198, 1998.

HEYES, M.P.; CHEN, C.Y.; MAJOR, E.O.; SAITO, K. Different kynurenine pathway enzymes limit quinolinic acid formation by various human cell types. **Biochem J.** v. 1, n. 326 p. 351-6, 1997.

HILMAS, C.; PEREIRA, E. F.; ALKONDON, M., RASSOULPOUR, A.; SCHWARCZ, R.; ALBUQUERQUE, E. X. The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. **J. Neurosci.**, v. 21, n. 19, p. 7463-7473, 2001.

HOWES, O. D.; KAPUR, S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: Version III-The final common pathway. **Schizophr. Bull.**, v. 35, n.3, p. 549-562, 2009.

HOWES, O.; MCCUTCHEON, R.; STONE, J. Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century. **J. Psychopharmacol.**, v. 29, n. 2, p. 97-115, 2015.

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

IACCARINO, H. F.; SUCKOW, R. F.; XIE, S.; BUCCI, D. J. The effect of transient increases in kynurenic acid and quinolinic acid levels early in life on behavior in adulthood: Implications for schizophrenia. **Schizophr. Res.**, v. 150, n. 2-3, p. 392-397, 2013.

INSEL, T. R. Rethinking schizophrenia. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 1987-1993, 2010.

JAYAWICKRAMA, G. S.; NEMATOLLAHI, A.; SUN, G. *et al.* Inhibition of human kynurenine aminotransferase isozymes by estrogen and its derivatives. **Sci. Rep.**, v. 7, n. 1, p. 17559, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-17979-7.

JIANG, Z.; COWELL, R. M.; NAKAZAWA, K. Convergence of genetic and environmental factors on parvalbumin-positive interneurons in schizophrenia. **Front Behav Neurosci.**, v. 7, n. 116, 2013. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00116.

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

JONES, P.; MURRAY, R.; JONES, P.; RODGERS, B.; MARMOT, M. Child developmental risk factors for adult schizophrenia in the British 1946 birth cohort. **Lancet.**, v. 344, n; 8934, p. 1398–1402, 1994.

KANAI, M.; FUNAKOSHI, H.; TAKAHASHI, H.; HAYAKAWA, T.; MIZUNO, S.; MATSUMOTO, K.; NAKAMURA, T. Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice. **Mol. Brain.**, v. 2, n. 8, 2009. doi: 10.1186/1756-6606-2-8.

KANCHANATAWAN, B.; SRISWASDI, S.; THIKA, S. Deficit schizophrenia is a discrete diagnostic category defined by neuro-immune and neurocognitive features: results of supervised machine learning. **Metab. Brain Dis.**, v. 33, n. 4, p. 1053-1067, 2018.

KAPUR, S. Psychosis as a state of aberrant salience: A framework linking biology, phenomenology, and pharmacology in schizophrenia. **Am. J. Psychiatry.**, v. 160, n.1, p. 13–23, 2003.

KARLSSON, H.; BACHMANN, S.; SCHRODER, J.; MCARTHUR, J.; TORREY, E. F.; YOLKEN, R. H. Retroviral RNA identified in the cerebrospinal fluids and brains of individuals with schizophrenia. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 98, n. 8, p. 4634–463, 2001.

KARSON, C. N.; CASANOVA, M. F.; KLEINMAN, J. E.; GRIFFIN, W. S. Choline acetyltransferase in schizophrenia. **Am. J. Psychiatry.**, v. 150, n.3 p. 454–459, 1993.

KENDALL, R. E.; CHALMERS, C.; PLATZ, C. Epidemiology of puerperal psychosis. **Br. J. Psychiatry**, v. 150, p. 662–673, 1987.

KOHL, S. *et al.* Prepulse inhibition in psychiatric disorders – Apart from schizophrenia. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, n. 4, p. 445–452, 2013.

KONRADI, C.; YANG, C. K.; ZIMMERMAN, E. I. Hippocampal interneurons are abnormal in schizophrenia. **Schizophr. Res.**, v. 131, n. 1–3, p. 165-173, 2011.

KULKARNI, J.; DE CASTELLA, A.; HEADEY, B. *et al.* Estrogens and men with schizophrenia: is there a case for adjunctive therapy? **Schizophr. Res.**, v. 125, n. 2–3, p. 278–283, 2011.

KUMARI, V.; AASEN, I.; SHARMA, T. Sex differences in prepulse inhibition deficits in chronic schizophrenia. **Schizophr. Res.**, v. 69, n. 2-3, p. 219-35, 2004.

LEHMANN, J.; PRYCE, C. R.; FELDON, J. Sex differences in the acoustic startle response and prepulse inhibition in Wistar rats. **Behav. Brain Res.**, v. 104, n. 1-2, p. 113-117, 1999.

LEUNG, A.; CHUE, P. Sex differences in schizophrenia, a review of the literature. **Acta Psychiatr. Scand. Suppl.**, v. 401, p. 3-38, 2000.

LEWIS, D. A. Retroviruses and the pathogenesis of schizophrenia. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, n. 8, p. 4293–4294, 2001.

LEWIS, D. A. The chandelier neuron in schizophrenia. **Dev Neurobiol.**, v. 71, n. 1, p. 118-127, 2011.

LI, R.; MA, X.; WANG, G.; YANG, J.; WANG, C. Why sex differences in schizophrenia? **J. Transl. Neurosci.**, v 1, n. 1, p. 37–42, 2016.

LIN, H.; HSU, F. C.; BAUMANN, B. H. *et al.* Cortical parvalbumin GABAergic deficits with $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor deletion: implications for schizophrenia. **Mol. Cell Neurosci.**, v. 61, p. 163-175, 2014.

LINDERHOLM, K.R.; SKOGH, E.; OLSSON, S.K. *et al.* Increased levels of kynurenine and kynurenic acid in the CSF of patients with schizophrenia. **Schizophr. Bull.**, v. 38, n. 3, p. 426-432, 2012.

LIPSKA B. K.; JASKIW, G. E.; WEINBERGER, D. R. Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: a potential animal model of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology.**, v. 9, n. 1, p. 67–75, 1993.

LISSE, T. S.; HEWISON, M.; ADAMS, J. S. Hormone response element binding proteins: novel regulators of vitamin D and estrogen signaling. **Steroids.**, v. 76, n. 4, p. 331–339, 2011.

LODGE, D. J.; GRACE, A. A. Gestational methylazoxymethanol acetate administration: a developmental disruption model of schizophrenia. **Behav. Brain Res.**, v. 7, n. 2, p. 306-312, 2009.

LUDEWIG, K.; GEYER, M.A.; ETZENSBERGER, M.; VOLLENWEIDER, F.X. Stability of the acoustic startle reflex, prepulse inhibition, and habituation in schizophrenia. **Schizophr. Res.**, v. 55, n. 1-2, p. 129-137, 2002.

MACHON, R. A.; MEDNICK, S. A.; SCHULSINGER, F. The interaction of seasonality, place of birth, genetic risk and subsequent schizophrenia in a high risk sample. **Br. J. Psychiatry.**, v. 143, p. 383–388, 1983.

MANNING, B. D.; MASON, M. Kynurenine metabolism in rats: some hormonal factors affecting enzyme activities. **Life Sci.**, v. 17, p. 225–232, 1975.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol.**, v. 62, n. 4a, p. 609-614, 2005.

MARTIN, L. F.; FREEDMAN, R. Schizophrenia and the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. **Int. Ver. Neurobiol.**, v. 78, p. 225-426, 2007.

MARWAHA, S.; JHONSON, S.; BEBBINGTON, P. *et al.* Rates and correlates of employment in people with schizophrenia in the UK, France and Germany. **Br. J. Psychiatry.**, v. 191, p. 30–37, 2007.

MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. Possible changes in striatal and limbic cholinergic systems in schizophrenia. **Arch. Gen. Psychiatry.**, v. 34, n. 11, p. 1319–1323, 1977.

MEDNICK, S. A.; MACHON, R. A.; HUTTUNEN, M. O. Adult schizophrenia following prenatal exposure to an influenza epidemic. **Arch. Gen. Psychiatry.**, v. 45, n. 2, p. 189–192, 1988.

MEXAL, S.; BERGER, R.; LOGEL, J.; ROSS, R. G.; FREEDMAN, R.; LEONARD, S. Differential regulation of alpha7 nicotinic receptor gene (CHRNA7) expression in schizophrenic smokers. **J. Mol. Neurosci.**, v. 40, n. 1-2, p. 185–195, 2010.

MILLER, T.J.; MCGLASHAN, T.H.; WOODS, S.W.; *et al.* Symptom assessment in schizophrenic prodromal states. **Psychiatr Q.** v. 70, n. 4, p. 273-87, 1999.

MOGHADDAM, B. Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia. **Neuron.**, v. 40, n. 5, p. 881–884, 2003.

MOGHADDAM, B.; JAVITT, D. From revolution to evolution: The glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 1, p.4-15, 2012.

MOMENI, S.; SEGERSTRÖM, L.; ROMAN, E. Supplier-dependent differences in intermittent voluntary alcohol intake and response to naltrexone in Wistar rats. **Front Neurosci.** v. 5, n. 9, p. 424, 2015.

MONTE, A.S.; MELLO, B.S.F.; BORELLA, V.C.M. *et al.* Two-hit model of schizophrenia induced by neonatal immune activation and peripubertal stress in rats: Study of sex differences and brain oxidative alterations. **Behav Brain Res.** v. 28, n. 331, p. 30-37, 2017.

MURRAY, R. M.; BHAVSAR, V.; TRIPOLI, G.; HOWES, O. 30 Years on: How the Neurodevelopmental Hypothesis of Schizophrenia Morphed Into the Developmental Risk Factor Model of Psychosis. **Schizophr. Bull.**, v. 21, n. 43, p. 1190-1196, 2017.

NAKAZAWA, K.; ZSIROS, V.; JIANG, Z. *et al.* GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 3, p. 1574-1583, 2012. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.01.022. Epub 2011 Jan 26.

NOVAC, N.; HEINZEL, T. Nuclear receptors: overview and classification. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.**, v. 3, n. 4, p. 335–346, 2004.

NOWROUZI, B.; KAMHI, R.; HU, J. *et al.* Age at onset mixture analysis and systematic comparison in schizophrenia spectrum disorders: Is the onset heterogeneity dependent on heterogeneous diagnosis? **Schizophr. Res.**, v. 164, n. 1–3, p. 83–91, 2015.

OGATA, S.; TAKEUCHI, M.; FUJITA, H.; SHIBATA, K.; OKUMURA, K.; TAGUCHI, H. Apoptosis induced by niacin-related compounds in K562 cells but not in normal human lymphocytes. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 64, n. 6, p. 1142-1146, 2000.

OWEN, M. J.; O'DONOVAN, M. C.; THAPAR, A.; CRADDOCK, N. Neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. **Br. J. Psychiatry.**, v. 198, n. 3, p. 173–175, 2011.

PATNAIK, S. K.; SARANGI, S. Age-related response to tryptophan pyrrolase to 17 beta-estradiol in the liver of female rats. **J. Biochem.**, v. 87, p. 1249–1252, 1980.

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

PLITMAN, E.; IWATA, Y.; CARAVAGGIO, F. *et al.* Kynurenic Acid in Schizophrenia: A Systematic Review and Meta-analysis. **Schizophr. Bull.**, v. 43, n. 4, p. 764-777, 2017.

PRANGE-KIEL, J.; SCHMUTTERER, T.; FESTER, L. *et al.* Endocrineregulation of estrogen synthesis in the hippocampus? **Prog. Histochem. Cytochem.**, v. 48, n. 2, p. 49–64, 2013.

PRESITS, P.; MOLNÁR-PERL, I. HPLC of tryptophan and its metabolites using simultaneously UV, native fluorescence and pre-column fluorescence derivatization. **Chromatographia**. v. 57; p. 87-92; 2003.

RAEDLER, T.J.; BYMASTER, F.P.; TANDON, R.; COPOLOV, D.; DEAN, B. Towards a muscarinic hypothesis of schizophrenia. **Mol. Psychiatry** v. 12, p. 232–246, 2007.

REICHENBERG, A.; CASPI, A.; HARRINGTON, H. *et al.* Static and dynamic cognitive deficits in childhood preceding adult schizophrenia: a 30-year study. **Am. J. Psychiatry.**, v. 167, n. 2, p. 160–169, 2010.

REILLY, T. J.; SAGNAY DE LA BASTIDA, V. C.; JOYCE, D. W. *et al.* Exacerbation of Psychosis During the Perimenstrual Phase of the Menstrual Cycle: Systematic Review and Meta-analysis. **Schizophrenia Bulletin**, v. 46, n. 1, p. 78–90, 2020.

RICE, D.; BARONE, S. JR . Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environ. Health. Perspect.**, v. 108, n. 3, p. 511-33, 2000.

RIETSCHER, L.; LAMBERT, M.; KAROW, A. *et al.* Clinical high risk for psychosis: gender differences in symptoms and social functioning. **Early Interv. Psychiatry.**, v. 11, n. 4, p. 306-313, 2015.

SAVITZ, J. The kynurenine pathway: a finger in every pie. **Mol. Psychiatry.**, v. 25, n. 1, p. 131-147, 2020.

SEEMAN, M. V. Interaction of sex age and neuroleptic dose. **Compr. Psychiatry**, v. 24, n. 2, p. 125–128, 1983.

SEEMAN, M.V.; LANG, M. The role of estrogens in schizophrenia gender differences. **Schizophr Bull.** v. 16, n. 2, p. 185-94, 1990.

SEKAR, A.; BIALAS, A. R.; DE RIVERA, H. *et al.* Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. **Nature**, v. 530, p. 177–183, 2016.

SHIN, M.; KIM, I.; INOUE, Y.; KIMURA, S.; GONZALEZ, F. J. Regulation of mouse hepatic alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdehyde decarboxylase, a key enzyme in the tryptophan-nicotinamide adenine dinucleotide pathway, by hepatocyte nuclear factor 4alpha and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. **Mol. Pharmacol.**, v. 70, n. 4, p. 1281-1290, 2006.

SHTASEL, D. L.; GUR, R. E.; GALLACHER, F. *et al.* Gender differences in the clinical expression of schizophrenia. **Schizophr. Res.**, v. 7, n. 3, p. 225-31, 1992.

SINOPOLI, K. J.; FLORESCO, S. B.; GALEA, L. A. M. Systemic and local administration of estradiol into the prefrontal cortex or hippocampus differentially alters working memory. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 86, n. 3, p. 293–304, 2006.

SIRIVICHAYAKUL, S.; KANCHANATAWAN, B.; THIKA, S. *et al.* A New Schizophrenia Model: Immune Activation is Associated with the Induction of Different Neurotoxic Products which Together Determine Memory Impairments and Schizophrenia Symptom Dimensions. **CNS Neurol. Disord. Drug Targets.**, v. 18, n. 2, p. 124-140, 2019.

SONG, J.; SUN, J.; MOSS, J. *et al.* Parvalbumin interneurons mediate neuronal circuitry-neurogenesis coupling in the adult hippocampus. **Nat. Neurosci.**, v. 16, n. 12, p. 1728-1730, 2013. doi: 10.1038/nn.3572. Epub 2013 Nov 10.

SRIVASTAVA, D. P.; WOOLFREY, K. M.; PENZES, P. Insights into rapid modulation of neuroplasticity by brain estrogens. **Pharmacol. Rev.**, v. 65, n. 4, p. 1318–1350, 2013.

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

STEFANIS, N.; FRANGO, S.; YAKELEY, J. *et al.* Hippocampal volume reduction in schizophrenia: effects of genetic risk and pregnancy and birth complications. **Biol. Psychiatry.**, v. 46, n. 5, p. 697–702, 1999.

STONE J. M.; PILOWSKY, L.S. Novel targets for drugs in schizophrenia. **CNS Neurol Disord Drug Targets**. v. 6, n. 4, p. 265-72, 2007.

STONE, T. W.; PERKINS, M. N. Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 72, n. 4, p. 411-412, 1981.

THOMPSON, B. L.; LEVITT, P. Now you see it, now you don't - closing in on allostasis and developmental basis of psychiatric disorders. **Neuron.**, v. 65, p. 437-439, 2010.

VAN DEN BUUSE, M.; EIKELIS, N. Estrogen increases prepulse inhibition of acoustic startle in rats. **Eur J Pharmacol**. v. 425, n. 1, p. 33-41, 2001.

VASUDEVAN, N.; PFAFF, D. W. Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain. **Front. Neuroendocrinol.**, v. 29, n. 2, p. 238–257, 2008.

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

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia>. Acessado em: 03 de abril de 2020.

WRIGHT, P.; RAKEI, N.; RIFKIN, L.; MURRAY, R. M. Maternal influenza, obstetric complications, and schizophrenia. **Am. J. Psychol.**, v. 152, n. 12, p. 1714–1720, 1995.

YANG, A. C.; TSAI, S. J. New Targets for Schizophrenia Treatment beyond the Dopamine Hypothesis. **Int J Mol Sci.**, v. 3, n.18, p. 1689-1703, 2017.

YOON, B. H.; ROMERO, R.; MOON, J. *et al.* Differences in the fetal interleukin-6 response to microbial invasion of the amniotic cavity between term and preterm gestation. **J. Matern. Fetal Neonatal. Med.**, v. 13, n. 1, p. 32–38, 2003.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO TRABALHO PELO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA ANIMAL (CEPA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ



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

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Modelo desenvolvimental de esquizofrenia em camundongos induzido pela administração neonatal de POLY I:C associada à exposição ao estresse na adolescência – avaliação de alterações comportamentais e neuroquímicas”, protocolo nº 08/15, sob responsabilidade Danielle Macêdo Gaspar, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 20 de maio de 2015.

Vigência do projeto	01/02/2015 a 30/11/2018
Espécie/Linhagem	Camundongo Swiss heterogênico
Nº de Animais	120
Peso/Idade	25g
Sexo	20 Machos / 100 Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 15 de julho de 2015

Rodrigo Siqueira
 Coordenador do CEUA - UFC

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