



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**DANIELY SAMPAIO ARRUDA TAVARES**

**ALTERAÇÕES RESPIRATÓRIAS EM MITOCÔNDRIAS DERIVADAS DE  
CÉREBROS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE  
ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA**

**FORTALEZA**

**2022**

**DANIELY SAMPAIO ARRUDA TAVARES**

**ALTERAÇÕES RESPIRATÓRIAS EM MITOCÔNDRIAS DERIVADAS DE  
CÉREBROS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE  
ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar

**FORTALEZA**

**2022**

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

---

T229a Tavares, Daniely Sampaio Arruda.  
Alterações respiratórias em mitocôndrias derivadas de cérebros de camundongos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina / Daniely Sampaio Arruda Tavares. – 2022.  
75 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.

1. Esquizofrenia . 2. Cetamina . 3. Mitocôndria. 4. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD 615.1

---

**DANIELY SAMPAIO ARRUDA TAVARES**

**ALTERAÇÕES RESPIRATÓRIAS EM MITOCÔNDRIAS DERIVADAS DE  
CÉREBROS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE  
ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA**

Dissertação submetida a Coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia como requisito para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar (1° membro- Presidente)**  
**Universidade Federal do Ceará (UFC)**

---

**Prof. Dra. Aline Santos Monte (2° membro)**  
**Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira (UNILAB)**

---

**Prof. Dr. Antonio Lucio Teixeira Junior (3° membro)**  
**University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth Houston)**

A Deus.

À minha família, em especial ao amor da minha vida, Petrônio, pelo amor, paciência, dedicação, compreensão, por todo o apoio de sempre em tudo que eu desejo alcançar e por nunca ter mensurado esforços para que eu chegasse até esta etapa.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus, pai celestial, pela dádiva da vida, por ser minha força e coragem nos momentos mais difíceis, quando não tinha nenhuma solução clamava por sua misericórdia e ele iluminava meus caminhos novamente, aprendi que tudo com muita fé e dedicação dá sempre certo. Jesus Cristo meu guia e companheiro, e nossa senhora rogando por mim.

Ao meu marido Petrônio, meu amigo, meu amor, exemplo de respeito e coragem, sou inteiramente grata a Deus por ter te colocado em minha vida, todas as minhas conquistas esteve sempre presente em todos os momentos por mais difíceis que fossem, sempre confiou no meu potencial. Aos meus filhos, Perseu e Pérsia, meus amores que são a felicidade da casa diariamente, são meus estímulos para que possa conquistar o sucesso profissional.

Aos meus pais, Pedro Neto e Neuma, por todo ensinamento de humildade e formação humana mesmo nas dificuldades da vida. Aos meus irmãos, Denys e Maria, por me deixar sempre alegre e acreditarem em mim. Aos meus sogros, Núbia e Pio, por sempre acreditar e apoiar os meus estudos e em tudo que eu precisasse, são como pais de meu filho, pois nos ajudaram a criar e cuidar dele com muito amor e carinho, a minha eterna gratidão!

Ao meu irmão Ramon e sua esposa Mislai, por ter cuidado de pai para que eu pudesse seguir com meus planos de estudos quando fui aprovada no mestrado. À minha cunhada Petrucia e seu marido Jonathan que sempre me dão ânimo para buscar oportunidade profissional, me deram o presente de ser madrinha de seu filho Theo que trouxe alegria para todos. À Gyrlene, que me ajudou diariamente e que cuidou muito bem da minha filha para que eu pudesse me dedicar a confecção desta dissertação. À Profa. Ma. Ana Luiza, por ter sido minha inspiração como pesquisadora e educadora, desde a graduação, foi quem me incentivou e me enviou o edital da seleção do mestrado que fui aprovada.

À Ma. Manoela Rebouças, que sempre teve a atenção comigo desde a seleção para o mestrado e me indicou o apartamento das meninas para que pudesse me estabilizar em Fortaleza. Às minhas amigas piauienses, Ma. Larice Vale e Ma. Lucianny Barbosa que me acolheram em Fortaleza, me aproximaram de Deus e da igreja católica, me ensinaram tanto da vida, e que sempre se fazem presentes para ajudar no que eu precisasse. À Roberta minha parceira nesse percurso, trilhando caminhos semelhantes na pesquisa, sempre disposta a me ajudar. Às minhas amigas Manuela Nascimento e Ana Lúcia, que sempre me apoiaram e dizem

palavras de afeto. Ao Prof. Me. Júlio César, por ser meu amigo, exemplo de pesquisador, e parceiro em artigos científicos.

À Profa. Dra. Danielle Macêdo, que desde o início sempre depositou toda confiança em minha capacidade com a pesquisa, sempre solícita. A Profa. Dra. Jaqueline Carletti em me ajudar nas correções do projeto para o CEUA-NPDM, sempre disposta e paciente em me direcionar ao conhecimento. Às farmacêuticas Michele e Paloma, que na época eram de iniciação científica e contribuíram muito para meu conhecimento no manuseio dos animais e avaliações comportamentais. À Dra. Germana e Me. Raica que sempre compartilhavam seus conhecimentos para contribuição na minha pesquisa.

Ao Prof. Dr. Herbert Facundo, por acreditar na minha pesquisa, por ceder o seu laboratório para os experimentos, pelos ensinamentos, e por ter contribuído em tudo que foi necessário para conclusão deste trabalho de dissertação. À Profa. Dra. Anna Lídia, que sempre esteve disposta e presente nos meus experimentos, obrigada por toda paciência e dedicação em me ensinar tudo que eu precisava. Ao Me. Plínio Palácio, por toda ajuda nos experimentos, foi um grande auxílio em esclarecer todas as minhas dúvidas.

Aos professores das bancas de qualificação e defesa, Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço, Prof. Dr. Ricardo Lima, Profa. Dra. Aline Monte e Prof. Dr. Antonio Lúcio.

As instituições UFC e UFCA pela disponibilização e suporte dos laboratórios e materiais necessários para experimentação.

Ao CNPq e à CAPES, pelo apoio financeiro e por viabilizar esse estudo.

A todos que me ajudaram e contribuíram de forma direta ou indireta, a minha eterna gratidão.

**“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos”.**

**Provérbios 16:3**

## RESUMO

### ALTERAÇÕES RESPIRATÓRIAS EM MITOCÔNDRIAS DERIVADAS DE CÉREBROS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA

A esquizofrenia é um transtorno mental grave e incapacitante que atinge cerca de 24 milhões de pessoas no mundo. Essa doença psiquiátrica está cada vez mais sendo alvo de estudos, devido a suas características como heterogênea em termos de mecanismos e multifatoriais, bem como grande impacto social e econômico. A esquizofrenia está associada com disfunção mitocondrial e com desequilíbrio oxidativo. O desequilíbrio oxidativo altera vias celulares, pois altera moléculas como os lipídios, proteínas e DNA, sendo este um dos fatores relacionados à progressão de doenças. Com o intuito de contribuir para o avanço no entendimento da fisiopatologia e possivelmente novos alvos para o tratamento da esquizofrenia, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a função de mitocôndrias cerebrais isoladas de animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por administração repetida de cetamina, investigando respiração mitocondrial, influência na abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP), alterações ocasionadas por estresse oxidativo e sua regulação pelo sistema renina-angiotensina (SRA). Para tanto, camundongos Swiss adultos foram tratados por via intraperitoneal (i.p) por 14 dias, com cetamina (grupo KET) 20mg/kg ou salina (grupo controle). Trinta minutos após a última administração de KET os animais foram submetidos a avaliação comportamental pelo teste do campo aberto e eutanasiados para remoção dos cérebros e sequencialmente isolamento das mitocôndrias. Foi realizado dosagem de proteínas totais, avaliação da respiração/função mitocondrial, inchamento mitocondrial (abertura do mPTP) e quantificação da produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Os dados comportamentais mostraram que a exposição repetida a KET induziu hiperlocomoção, hiperatividade e ansiedade, modelando, portanto, sintomas positivos da esquizofrenia. As mitocôndrias isoladas do tecido cerebral dos animais submetidos à KET apresentaram respiração e função prejudicadas, e maior produção de peróxido de hidrogênio, indicando estresse oxidativo em comparação com o grupo controle, também ocasionando aumento da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD). A exposição das mitocôndrias isoladas à angiotensina II e losartana não causou alterações significativas na respiração mitocondrial. Em conclusão, este estudo demonstrou que após administração de KET por 14 dias, as mitocôndrias cerebrais têm a função e respiração ineficientes, mais precisamente a inatividade do complexo I e II da cadeia transportadora de elétrons (CTE) mitocondrial, e maior produção de  $H_2O_2$  determinando o estresse oxidativo, corroborando as evidências de disfunção mitocondrial desencadeada por bloqueio de receptores NMDA. Os métodos utilizados neste estudo são promissores para ampliar as pesquisas sobre a relação das mitocôndrias cerebrais e a esquizofrenia, ajudando no aprimoramento da fisiopatologia da doença, e assim poder investigar novos mecanismos para alternativas farmacológicas, como os receptores da angiotensina presentes nas mitocôndrias e os medicamentos antagonistas desse sistema, a fim de contribuir e avançar na terapêutica desta doença que ainda é incurável.

**Palavras-chave:** Esquizofrenia; Cetamina; Mitocôndria; Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

### **RESPIRATORY CHANGES IN MITOCHONDRIA DERIVED FROM BRAIN OF MICE SUBMITTED TO THE ANIMAL MODEL OF SCHIZOPHRENIA INDUCED BY KETAMIN**

Schizophrenia is a serious and disabling mental disorder that affects about 24 million people worldwide. This psychiatric disease is increasingly being the subject of studies, due to its characteristics as heterogeneous in terms of mechanisms and multifactorial, as well as great social and economic impact. Schizophrenia is associated with mitochondrial dysfunction and oxidative imbalance. Oxidative imbalance alters cellular pathways, as it alters molecules such as lipids, proteins, and DNA, which is one of the factors related to the progression of diseases. To contribute to the advancement in the understanding of the pathophysiology and possible new targets for the treatment of schizophrenia, the objective of the present work was to evaluate the function of brain mitochondria isolated from animals submitted to the model of schizophrenia induced by repeated administration of ketamine, investigating mitochondrial respiration, influence on the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), alterations caused by oxidative stress and its regulation by the renin-angiotensin system (RAS). For this purpose, adult Swiss mice were treated intraperitoneally (i.p) for 14 days with ketamine (KET group) 20mg/kg or saline (control group). Thirty minutes after the last administration of KET, the animals were submitted to behavioral evaluation by the open field test and euthanized to remove the brains and sequentially isolate the mitochondria. Total protein dosage, mitochondrial respiration/function assessment, mitochondrial swelling (mPTP opening), and quantification of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) production were performed. Behavioral data showed that repeated exposure to KET induced hyperlocomotion, hyperactivity, and anxiety, thus modeling positive symptoms of schizophrenia. Mitochondria isolated from the brain tissue of animals subjected to KET showed impaired respiration and function. They also increased hydrogen peroxide production, indicating oxidative stress compared to the control group, causing an increase in the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD). Exposure of isolated mitochondria to angiotensin II and losartan did not cause significant changes in mitochondrial respiration. In conclusion, this study demonstrated that after administration of KET for 14 days, brain mitochondria have inefficient function and respiration, more precisely the inactivity of complex I and II of the mitochondrial electron transport chain (ETC), and greater production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> determining oxidative stress, corroborating the evidence of mitochondrial dysfunction triggered by NMDA receptor blockade. The methods used in this study are promising to expand research on the relationship between brain mitochondria and schizophrenia, helping to improve the pathophysiology of the disease and thus be able to investigate new mechanisms for pharmacological alternatives, such as angiotensin receptors present in mitochondria and drugs antagonists of this system, to contribute and advance in the treatment of this disease, which remains incurable.

**Keywords:** Schizophrenia; Ketamine; Mitochondria; Oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Vias dopaminérgicas.....	20
<b>Figura 2-</b> Morfologia da mitocôndria .....	26
<b>Figura 3 -</b> Demonstração dos mecanismos dos receptores da angiotensina na mitocôndria neural .....	31
<b>Figura 4 -</b> Mecanismo de ação da cetamina nos receptores NMDA .....	34
<b>Figura 5-</b> Representações esquemáticas do protocolo experimental .....	42
<b>Figura 6 -</b> Ilustração do campo aberto circular.....	43
<b>Figura 7 -</b> Resultados das avaliações no teste de campo aberto .....	49
<b>Figura 8 -</b> Estados da respiração mitocondrial e RCR - Malato, Glutamato e Succinato .....	51
<b>Figura 9-</b> Curva do consumo de O <sub>2</sub> .....	52
<b>Figura 10 -</b> Inchamento mitocondrial induzido por cálcio .....	54
<b>Figura 11 -</b> Quantificação de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de mitocôndrias isoladas de cérebros.....	55
<b>Figura 12-</b> Quantificação da atividade das enzimas CAT e SOD .....	56
<b>Figura 13-</b> Quantificação do teor de proteínas citosólicas .....	57
<b>Figura 14-</b> Quantificação do teor de proteínas sulfidrilas citosólicas .....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrometro
5-HT	Serotonina
ADP	Adenosina difosfato
Ang I	Angiotensina tipo I
Ang II	Angiotensina tipo II
AP	Antipsicóticos
AT1R	Receptor do tipo I da angiotensina
AT2R	Receptor do tipo II da angiotensina
ATP	Adenosina Trifosfato
ATV	Área Tegmental Ventral
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BDNF	Brain-derived neurotrophic fator (Fator neurotrófico derivado do cérebro)
BHE	Barreira Hematoencefálica
BSA	Albumina do Soro Bovino
$\text{Ca}^{2+}$	Cálcio
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CID	Código Internacional de Doenças
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CONT	Controle
COX	Ciclooxigenase
CPF	Córtex Pré-Frontal
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons
DA	Dopamina
DMSO	Composto Dimetilsufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 2,2'-dinitro-5-5'-ditio-dibenzóico (Reagente de Ellman)
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

EEPs	Efeitos extrapiramidais
EPM	Erro Padrão da Média
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FADH	Dinucleótido de flavina e adenina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAD	Ácido Glutâmico Descarboxilase
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HRP	Peroxidase de Raiz Forte
iGluRs	Receptores glutamatérgicos ionotrópicos
IL	Interleucina
INSS	Instituto Nacional de Seguro Social
IP	Intraperitoneal
KCl	Cloreto de potássio
KET	Cetamina
Kg	Quilograma
KOH	Hidróxido de potássio
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LSD	Dietilamida do Ácido Lisérgico
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
mg	Miligrama
mGluRs	Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
MHC	Complexo de histocompatibilidade
mm	Milímetro
mPTP	Poros de Transição de Permeabilidade Mitocondrial
mtDNA	DNA mitocondrial
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NBT	Nitroblue tetrazolium
NMDA	N-metil D-Aspartato
NO	Óxido Nítrico
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
O <sub>2</sub>	Oxigênio

OXPHOS	Oxidative Phosphorylation System (Sistema de fosforilação oxidativa)
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCP	Fenciclidina
PG	Prostaglandina
RCF	Força Centrífuga Relativa
RCR	Razão do Controle Respiratório
RNA	Ácido ribonucleico
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
SRA	Sistema Renina Angiotensina
SUIBE	Sistema Único de Informações de Benefícios
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará
WHO	<i>World Health Organization</i>
XO	Xantina Oxidase

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1 Esquizofrenia .....	16
1.2 Fisiopatologia da esquizofrenia .....	18
1.2.1 Hipótese dopaminérgica.....	19
1.2.2 Hipótese glutamatérgica.....	21
1.2.3 Hipótese gabaérgica.....	22
1.3 Estresse oxidativo e neuroinflamação na esquizofrenia.....	23
1.4 Relação entre mitocôndria, angiotensina e esquizofrenia.....	25
1.5 Mecanismo de ação da losartana e provável ação nos transtornos psiquiátricos.....	31
1.6 Cetamina como modelo de esquizofrenia .....	33
1.7 Testes comportamentais para avaliação de sintomas tipo esquizofrenia em animais	35
<b>2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>37</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
3.1 Geral .....	39
3.2 Específicos .....	39
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
4.1 Animais .....	40
4.2 Substâncias e reagentes .....	40
4.3 Procedimento experimental .....	41
4.4 Teste de campo aberto.....	43
4.5 Teor de proteínas totais.....	44
4.6 Isolamento mitocondrial .....	44
4.7 Avaliação da respiração/função mitocondrial .....	44
4.8 Avaliação da abertura do mPTP (aumento do volume mitocondrial).....	45
4.9 Quantificação da produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	46
4.10 Atividade da catalase.....	46
4.11 Atividade enzimática de superóxido dismutase citosólica (SOD) .....	46
4.12 Teor de proteínas tiol (sulfidrilas).....	46
<b>5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>48</b>
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
6.1 A administração repetida de cetamina induziu hiperlocomoção nos animais .....	49

<b>6.2 Estados da respiração/função mitocondrial e Razão do Controle Respiratório (RCR) mitocondrial – Malato, Glutamato e Succinato .....</b>	<b>50</b>
<b>6.3 Abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) induzido por cálcio (Ca<sup>2+</sup>) <i>in vitro</i> .....</b>	<b>53</b>
<b>6.4 Alterações na produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).....</b>	<b>55</b>
<b>6.5 Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) de frações citosólicas.....</b>	<b>56</b>
<b>6.6 Teor de proteínas totais e teor de proteínas tiol (sulfidrilas) de frações citosólicas ...</b>	<b>56</b>
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>74</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia é um transtorno mental que atinge cerca de 24 milhões de pessoas no mundo. Comumente, é diagnosticada na fase final da adolescência e/ou início da idade adulta, em média aos 24 anos de idade, com sintomas mais graves e precoces em homens do que nas mulheres. Dentre os sintomas podemos destacar, perturbação e desorganização de pensamentos, emoções, percepções e comportamentos. É descrito como sintomas primordiais as alucinações e delírios, denominada de psicoses, em que impede o desenvolvimento educacional e ocupacional adequado do indivíduo (WHO, 2022).

No século XVIII, nos países europeus a esquizofrenia era associada a doença demoníaca, loucura ou insanidade mental (FRANGOU, 2022). Em 1860, Morel considerava como demência pela presença de sintomas precoces nos indivíduos, com demonstrações de comportamentos anormais, onde o termo “catatonia” foi utilizado por Kahlbaum em 1874. Por conseguinte, em 1896, Emil Kraepelin desagregou as condições impostas como demência e psicose maníaco-depressiva, e em 1911 Eugen Bleuler renomeou a demência precoce como esquizofrenia, onde ele acreditava que decorria de divisão entre a função cognitiva e afetiva. A etiologia da esquizofrenia tem diversas causas que podem contribuir para o surgimento da patologia, como biológicos, psicológicos, sociais e fatores genéticos (BARTLEY; ROSS, 2020; TSOI; HUNTER; WOODRUFF, 2008).

Atualmente, a esquizofrenia é considerada uma síndrome que se manifesta a partir de sintomas descritos em termos como: Positivos, negativos e cognitivos (HARVEY et al., 1996; TANDON; KESHAVAN; NASRALLAH, 2008). Os sintomas positivos englobam delírios e alucinações, os negativos são desmotivação e retraimento social (ELKIS, 2000), e os cognitivos com alterações de memória e dificuldade de concentração (HOWES; KAPUR, 2009).

Os portadores de esquizofrenia também apresentam alterações no volume de áreas cerebrais como o hipocampo, córtex cingulado anterior, lobo frontal e temporal (CASTRO-DE-ARAÚJO et al., 2020). Os critérios diagnósticos da esquizofrenia são ocorrências de distúrbio desenvolvimental, delírios bizarros como sons de vozes, alucinações, conversação incoerente e expressão emocional diminuída (HAYASHI; KURODA; INADOMI, 2022) Os episódios psicóticos também induzem aumento de níveis de citocinas pró-inflamatórias em diferentes regiões cerebrais, como a presença de citocinas pró-inflamatórias  $IFN\gamma$  e  $IL5$  foram associadas

com menor volume da área cortical total (LASKARIS et al., 2021).

Diversos relatos de estudos de situações favoráveis para o surgimento da esquizofrenia, como complicações na gestação como infecções, hipóxia no feto em trabalho de parto e bebês prematuros tem maior predisposição para desenvolver a patologia no início da idade adulta, bem como, foi demonstrado que pode ocasionar a sensibilização da dopamina causando danos ao hipocampo cerebral, possibilitando mal desenvolvimento comportamental e cognitivo (LAU et al., 2013).

O fator genético é demonstrado como grande contribuinte no desenvolvimento da esquizofrenia, visto que, em estudos com determinados portadores de esquizofrenia e seus parentes de grau aproximado, mesmo que não apresentando a doença, exibiram redução de amplitude do endofenótipo P50, um tipo de onda relacionada ao estímulo do filtro sensorial a situações auditivas causando confusão cognitiva, em que são modulados por receptores nicotínicos no hipocampo cerebral, mais precisamente a variante do gene do receptor de nicotina alfa-7 (SIEVER; DAVIS, 2004).

Há diversos tipos de genes com expressões ineficientes na esquizofrenia, como o subtipo In6, gene envolvido na expressão da proteína parvalbumina nos interneurônios gabaérgicos, coligados a alterações nas neurotransmissões (KONDO et al., 2022). Outro tipo de mutação é relatado no gene GLO1 que comanda o sistema enzimático glioxalase (GLO) tem a atividade reduzida para desintoxicação de componentes da glicólise observados em modelo de esquizofrenia, alterando comportamento animal e disfunção mitocondrial juntamente com estresse oxidativo em regiões do CPF (TORIUMI et al., 2021).

A disfunção glutamatérgica em receptores NMDA ocasiona a desregulação de dopamina em áreas cerebrais influencia o surgimento das psicoses, principal evidência da esquizofrenia (HOWES; SHATALINA, 2022). A dopamina atuando de forma excessiva, e juntamente com seus subprodutos de oxidação influencia a disfunção mitocondrial (BERMAN; HASTINGS, 1999). Consequentemente, o surgimento das disfunções mitocondriais a níveis moleculares, como polimorfismos no DNA mitocondrial e desregulação de genes envolvidos no metabolismo energético. Os genes mais afetados na esquizofrenia são os que tem atividade nos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, alterando a funcionalidade da mitocôndria (PARK; PARK, 2012).

A disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo pode gerar radicais livres devido a elétrons desemparelhados ou vazamento de elétrons no processo de respiração celular originado de espécies reativas de oxigênio (ERO). Acontece o estresse oxidativo em condições de desequilíbrio no metabolismo celular, onde há demasiada produção de ERO e falha no sistema

de defesa antioxidante ocasionada por disfunção na produção e distribuição das moléculas, ou excessivos estímulos externos. Quando há grande quantidade de ERO pode ser prejudicial, estimulando as vias de transdução desajustada das macromoléculas celulares como os lipídios, proteínas e DNA, causando a progressão de doenças (SINGH; RANA; PANDEY, 2022).

A problemática da esquizofrenia relaciona-se do fato das pessoas afetadas não terem integração social, visto que a maioria são indivíduos desempregados, que não estudam, usuários de medicações, ou seja, dependente dos recursos governamentais para se manterem juntamente com o respectivo cuidador. Devido a maioria dos esquizofrênicos se isolarem por causa dos pensamentos peculiares, esses permanecem solteiros e desprovido de amigos pela dificuldade de se relacionar com as pessoas, assim podem se sentirem solitários desenvolvendo outros distúrbios, podendo chegar até cometer o suicídio (SHER; KAHN, 2019).

## **1.2 Fisiopatologia da esquizofrenia**

Os graves sintomas da esquizofrenia impulsionaram diversos estudos com o objetivo de avançar na fisiopatologia, sendo assim, as pesquisas na área de neurobiologia e genética fornecem subsídios para o entendimento e buscas de novos tratamentos. Com isso, foram propostas hipóteses para se entender melhor a neurobiologia deste transtorno mental (PINO et al., 2014). A primeira hipótese, conhecida como hipótese dopaminérgica, postulou que a esquizofrenia era causada por concentrações elevadas deste neurotransmissor nesses pacientes, bem como em pessoas saudáveis sob efeito de drogas estimulantes do sistema dopaminérgico. Com o avançar das pesquisas foi descoberto que a disfunção do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), envolvido na neurotransmissão glutamatérgica, resulta em sintomas semelhantes aos observados na esquizofrenia, como observado na administração de antagonistas desse receptor, a cetamina (VASCONCELOS et al., 2005). A instabilidade do neurotransmissor de dopamina pode acontecer devido a problemas nos receptores glutamatérgicos de NMDA em regiões cerebrais, como estriado e CPF (JAVITT, 2007).

Em estudos anatômicos do cérebro de portadores de esquizofrenia pode-se observar o comprometimento de diferentes vias cerebrais que contribuem para funcionalidade normal do indivíduo. A região do estriado contribui para manifestações como as alucinações e paranoias, já alterações no córtex pré-frontal está relacionado a problemas de planejamento e organização de pensamentos, no sistema límbico a euforia e ausência de controle emocional, no hipocampo dificuldade de recordações e aprendizados, no lobo occipital com prejuízos e alterações na

visão, e no sistema de audição (lobo temporal) causam os delírios de vozes inexistentes (BRADFORD, 2009).

Nas pesquisas iniciais acerca do entendimento das manifestações da esquizofrenia foi observado que o tratamentos de animais com os neurolépticos clorpromazina e o haloperidol resultava no aumento de dopamina em regiões cerebrais, indicando que se houver antagonismo dos receptores dopaminérgicos há aumento dos níveis do neurotransmissor dopamina, como processo compensatório, pois o organismo entende que precisa elevar a liberação do neurotransmissor para conseguir ativar o receptor que está bloqueado e conseguir desencadear o estímulo (NETO; BRESSAN; BUSATTO FILHO, 2007).

Portanto, com os avanços dos estudos sobre a esquizofrenia é descrito atualmente diversas hipóteses para melhor compreensão desta devastadora doença.

### **1.2.1 Hipótese dopaminérgica**

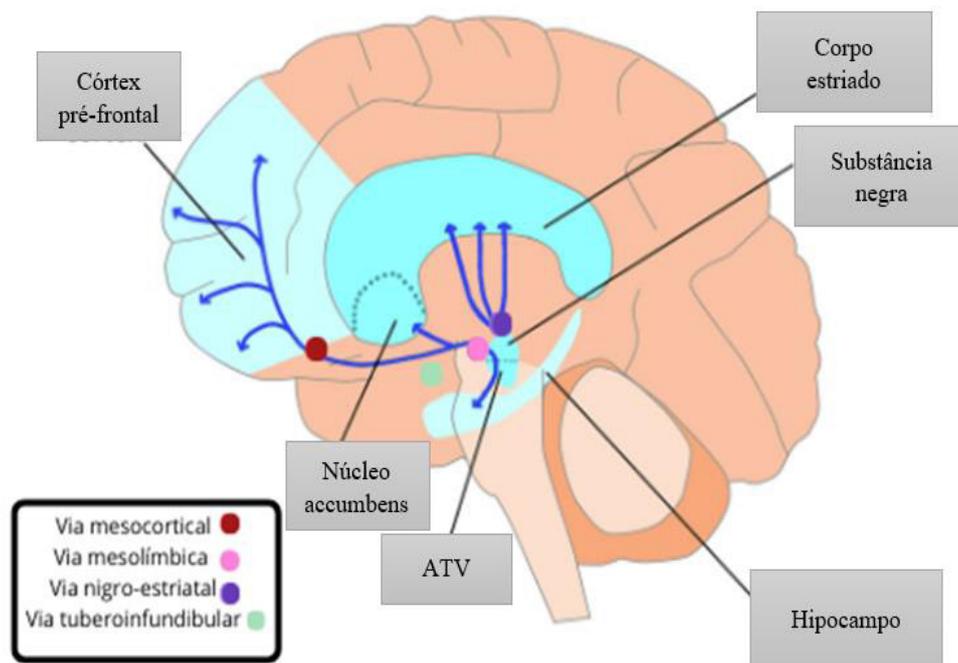
A dopamina é um neurotransmissor do SNC originado de neurônios situados no tronco cerebral atuando em diversas vias cerebrais. Há diversos receptores da dopamina espalhados pelo encéfalo, todos acoplados à proteína G. Os receptores dopaminérgicos D1 e D5 atuam por estimulação da adenilato ciclase, já o D2, D3, e D4 bloqueiam esta enzima. Vale destacar que o antagonismo do receptor D2 é utilizado como mecanismo de ação comum da maioria dos fármacos antipsicóticos (MOREIRA; GUIMARÃES, 2007).

Os receptores dopaminérgicos estão envolvidos na regulação de diversas funções importantes. Neste contexto, receptores D1 presentes no CPF e estriado têm função na memória de trabalho e tomada de decisão, receptores D2 no estriado e hipocampo envolvidos com alterações no comportamento, receptores D3 quando estimulado afeta a cognição no CPF que quando bloqueado melhora a aprendizagem, já no estriado modula o comportamento, receptores D4 no CPF e hipocampo relaciona-se a reconhecimento de objetos, atenção e comportamento exploratório. Os receptores D1 e D2 estão relacionados a atividade locomotora e na atividade de recompensa por estímulos naturais ou induzidos por drogas de abuso (LEDONNE; MERCURI, 2017; SIBLEY; MONSMA; SHEN, 1993; STAHL, 2018).

Há quatro vias centrais da dopamina (DA) que se projetam distintamente no SNC (Figura 1). A via dopaminérgica mesocortical se projeta da área tegmental ventral (ATV) para regiões do córtex pré-frontal, relacionando-se com funções cognitivas, atenção e memória; a via dopaminérgica mesolímbica vai da ATV para regiões do sistema límbico que fazem parte o núcleo accumbens, hipocampo e amígdala, envolvidos nas emoções; a via dopaminérgica nigro-

estriatal da substância negra ao estriado, locais responsáveis pela coordenação motora de movimentos voluntários, em que falhas nestas regiões podem causar distúrbios motores como acatisia e tremores; Via dopaminérgica tuberoinfundibular do núcleo arqueado do hipotálamo até a glândula pituitária, responsável por controlar hormônios como a prolactina (CAI et al., 2021).

**Figura 1-** Vias dopaminérgicas



Fonte: Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University website, adaptado. Disponível em: <https://www.oist.jp/news-center/photos/dopamine-pathways>.

As vias da dopamina mais relacionadas a esquizofrenia, são: A via mesocortical, mesolímbica e nigro-estriatal. Dentre as vias dopaminérgicas e sua relação com os sintomas da esquizofrenia podemos citar a via mesolímbica, em que nos sintomas positivos tem-se a ativação excessiva da dopamina nos receptores D2 no núcleo accumbens e estriado, e os sintomas negativos são provenientes da diminuição de ativação dos receptores D1 na região do córtex pré-frontal. Onde essas teorias são foco nas pesquisas para encontrar uma medicação que

reduza a estimulação da dopamina no núcleo accumbens melhorando os sintomas positivos da esquizofrenia e que aumente a neurotransmissão ao receptor dopaminérgico no córtex pré-frontal tratando assim os negativos e cognitivos da doença (ESTEVINHO; FORTUNATO, 2003; MOREIRA; GUIMARÃES, 2007).

Entretanto, a hipótese dopaminérgica é insuficiente para entender a complexidade da doença, os questionamentos mais colocados dos pesquisadores são: Por que o início e desenvolvimento da esquizofrenia acontecem mais entre o fim da adolescência e princípio da vida adulta? As alterações estruturais, diversidade dos sintomas e os medicamentos antipsicóticos utilizados com tratamentos insuficientes pelos casos de recidiva dos sintomas, efeitos colaterais constantes ou decorrência parcial dos sintomas, impulsionaram estudos de outras hipóteses (NETO; BRESSAN; BUSATTO FILHO, 2007).

### **1.2.2 Hipótese glutamatérgica**

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório relacionado a hipótese da esquizofrenia. Nesse sentido, a cetamina e a fenciclidina são drogas que induzem sintomas da esquizofrenia, com ação no antagonismo dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), contribuindo principalmente para a manifestação de sintomas negativos e cognitivos (UNO; COYLE, 2019). O bloqueio no receptor NMDA provoca não só alucinações, mas também sintomas como isolamento social, desmotivação, dificuldade em expressar emoções e sentimentos, falta de energia e redução do aprendizado em atividades simples (SCHWARTZ et al., 2012).

Quando os receptores NMDA estão hipofuncionais, nos interneurônios GABAérgicos (ácido gama-aminobutírico) no CPF sendo esta hipofuncionalidade na esquizofrenia normalmente relacionada a um problema neurodesenvolvimental, ocorre a redução da liberação do GABA, levando a excitação da via mesolímbica e a liberação de dopamina que ao se ligar a receptores D2 causa alucinações e psicoses (STAHL, 2018).

O glutamato estimula diversos receptores no SNC como os denominados metabotrópicos (mGluRs) que são receptores acoplados a proteína G regulando os processos celulares por essa via, e os ionotrópicos (iGluRs) são ajustados por canais iônicos que distribuem impulsos excitatórios (PINZÓN-PARRA et al., 2022). As três subfamílias de receptores agonistas iGluR, os receptores AMPA (AMPArs) tendo como subunidade GluA, cainato (KARs) subunidade GluK, e o NMDA (NMDArs). Assim, cada subunidade tem seu

comando no amino terminal extracelular (ATD) e o domínio de ligações específicas (REINER; LEVITZ, 2018; VALLI; SOBRINHO, 2014).

O NMDARs tem as subunidades GluN1, GluN2 e GluN3 que se agrega ao aminoácido D-serina, podem também seguir para sinalizar os receptores metabotrópicos. Os d-receptores que faz parte do iGluR, mas pouco compreendido, esses não são ativados por ligantes, entretanto, são importantes para plasticidade e organização de sinalização sináptica. Os diferentes subtipos de iGluR abundantes no cérebro tem diferentes sinalizações e expressões funcionais de acordo com a localização (REINER; LEVITZ, 2018).

A teoria da hipofunção do receptor NMDA contribui para o conceito de que a neurodegeneração devido à morte do neurônio é causada pela liberação excessiva de glutamato e superestimulação dos receptores NMDA, conhecidos como excitotoxicidade. O excesso de influxo de sódio e cálcio através dos canais NMDA dependentes de glutamato provoca superprodução de radicais livres, causando estresse oxidativo e morte do neurônio (PINO et al., 2014).

A hipótese do receptor NMDA e a dopamina são teorias que estão intimamente ligados, pois foi observado que os receptores NMDA podem ser responsáveis por um estado de excesso de produção de dopamina e a administração de antagonistas dopaminérgicos parecem influenciar a função de receptores NMDA (PINO et al., 2014).

### **1.2.3 Hipótese gabaérgica**

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é um neurotransmissor de caráter inibitório predominante no SNC com funcionalidade de equilibrar as neurotransmissões excitatórias, neurogênese, maturação e apoptose neuronal. Há diversos tipos de receptores e subunidades, controlados por ligantes ionotrópicos e metabotrópicos. Há diversos relatos de prejuízo da expressão de GABA na esquizofrenia, como redução da L-prolina no CPF reduzindo a liberação de GABA, danificando as expressões de RNA mensageiro da proteína GAD67 nos terminais dos neurônios acarretando em déficits cognitivos da doença (ZHANG et al., 2021).

A maturação de GABA ocorre no período pós nascimento, e empecilhos no desenvolvimento pode acarretar problemas psiquiátricos no decorrer da vida. As evidências relacionando a esquizofrenia e as alterações gabaérgicas surgiram a partir de análises da concentração de GABA no córtex através da atividade reduzida da enzima sintetizadora o ácido glutâmico Descarboxilase (GAD), bem como alterações em etapas pré- e pós-sinápticas do

neurônio. Em diversos estudos post-mortem relatam diminuição de expressão em tecido cerebral de pacientes que eram portadores de esquizofrenia, a isoforma GAD67, que é envolvido em transmissão sináptica e plasticidade neuronal (NAKAZAWA et al., 2012; REYNOLDS; BEASLEY, 2001).

A parvalbumina é uma proteína de ligação importante para plasticidade neuronal e expressões sinápticas, teoria que relata prejuízo no neurodesenvolvimento causado por trauma interno ou infecções em fases importantes para maturação cerebral, liberando-se produtos do estresse oxidativo que são tóxicos para os neurônios que expressam a parvalbumina, desta forma, também sendo diminuído os níveis na detecção dos neurônios de GABA e evidenciando a redução no córtex cerebral de esquizofrênicos (REYNOLDS; BEASLEY, 2001).

Vale destacar que as alterações observadas nos neurônios parvalbumina ocorrem devido a dano oxidativo destas células durante o neurodesenvolvimento.

### **1.3 Estresse oxidativo e neuroinflamação na esquizofrenia**

O estresse oxidativo é um processo de desequilíbrio bioquímico, desencadeado por diversos estímulos que podem ser internos ou externos ao organismo. É consequência de uma alta produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), relacionando-se também com uma baixa capacidade de expressão dos sistemas e produtos antioxidantes. O estresse oxidativo causa danos nas macromoléculas, como as proteínas, lipídios e danifica a função dos ácidos nucleicos, ou seja, altera a estrutura do DNA celular, causando evolução nas doenças humanas (ALIZADEH et al., 2022; RÉUS et al., 2018).

O desequilíbrio nas moléculas de oxigênio e o extravasamento de elétrons por falha em alguma etapa da respiração celular podem colaborar para formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical superóxido e o radical hidroxila, e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) que incluem óxido nítrico e o peroxinitrito. Desta forma, são alvos as defesas antioxidantes para balancear esse processo danoso (BITANHIRWE; WOO, 2011).

Alterações são bem evidentes em trabalhos científicos em análises nos níveis sanguíneos dos produtos oxidativos como peroxidação lipídica e óxido nítrico, e enzimas antioxidantes reduzidas como a catalase, o superóxido dismutase e a glutationala peroxidase, todos relatados em portadores de esquizofrenia comparados a grupos com mesmas características, entretanto, saudáveis (DE WITTE et al., 2014). Em portadores de esquizofrenia o estresse oxidativo é

associado aos diferentes sintomas da doença, sendo demonstrado através de pouca ação das enzimas antioxidantes (WEI et al., 2022).

Além do estresse oxidativo, a neuroinflamação está sendo cada vez mais enfatizada nas doenças que acometem o cérebro. Em estudos foi identificado nos pacientes portadores de esquizofrenia, níveis séricos elevados de um tipo de proteína que influencia o processo inflamatório, denominada de proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), e um indicador de dano oxidativo o 8-hidroxideoxiguanina (8-OHdG) (MA et al., 2020). Biomarcadores nos estudos com animais de laboratório, em que foi induzido a psicose com cetamina, demonstraram neuroinflamação nas análises neuroquímicas. O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) importante para neuroplasticidade manifestou redução significativa nas psicoses, pois em caso de neuroinflamação esta é afetada. Na neuroinflamação também são expressivas as células microgлияis, acionando citocinas inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , este por sua vez é distinguido por elevar-se na via dopaminérgica cerebral, resultando em psicose (IBRAHIM et al., 2022).

Há diversos fatores para biomarcadores na esquizofrenia, vários estudos relataram que nos fatores genéticos predominavam diversos genes alterados que elevam o risco para desenvolvimento da psicose, polimorfismos do complexo de histocompatibilidade (MHC) no cromossomo 6. As respostas inflamatórias devido a infecções também são revelados que transmitem citocinas que possibilitam o risco para a doença, principalmente em fase de desenvolvimento (MILLER; GOLDSMITH, 2019).

A esquizofrenia é descrita como uma patologia que desencadeia desequilíbrio na funcionalidade do SNC, sistema imunológico periférico e variações genéticas. O sistema imunológico tem função deficiente na doença, portanto, há alterações nas citocinas e em marcadores inflamatórios. Nos ensaios clínicos foi demonstrado que níveis de IL-1RA, IL-10 e IL-15 foram aumentados em portadores de esquizofrenia que não haviam se tratado com AP, e depois demonstraram que os níveis de IL-1RA e IL-10 diminuíram após 6 semanas de tratamento com antipsicóticos atípicos, e a alteração nos níveis de IL-10 foi correlacionada com a melhora dos sintomas de pacientes portadores de esquizofrenia principalmente sintomas negativos comparados com controle saudáveis através de coleta sanguínea e ensaios imunohistoquímicos (DE WITTE et al., 2014).

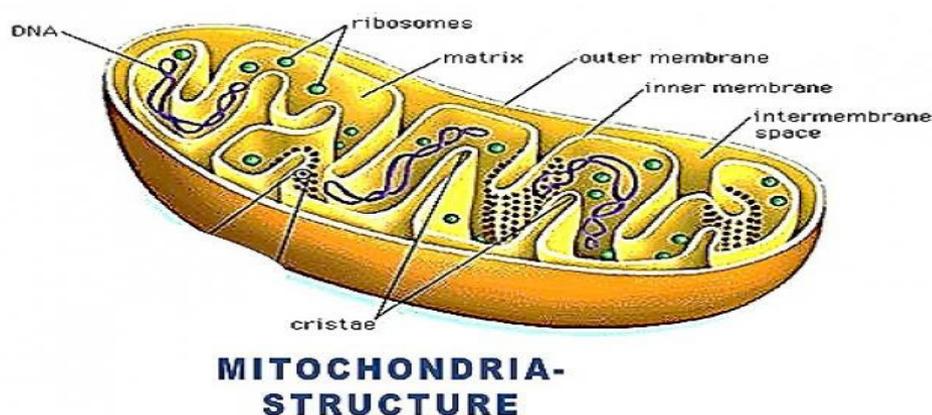
#### 1.4 Relação entre mitocôndria, angiotensina e esquizofrenia

As mitocôndrias são organelas encontradas no citoplasma de células eucarióticas, em cada célula existem milhares, porém as células que demandam mais energia exibem maior quantidade de mitocôndrias, como os neurônios que precisam realizar de forma rápida e eficaz as conduções sinápticas no SNC. Desta forma, as mitocôndrias podem ser associadas a doenças que acometem estes sistemas com prejuízos nas atividades das células neurais (HAWRYSH; MYRKA; BUCK, 2022; VANHAUWAERT; BHARAT; WANG, 2019).

A estrutura da mitocôndria apresenta-se morfologicamente em duas membranas, externa que apresenta invaginações (poros) e contém proteínas transportadoras que formam canais e deixa a membrana permeável para entrada de moléculas, e a camada interna separadas por espaço intermembranar que reveste a região denominada de matriz mitocondrial exibindo dobras ou cristas mitocondriais. A mitocôndria é formada por camada membranar externa e interna de fosfolipídios e proteínas, na matriz mitocondrial está o DNA mitocondrial, ribossomos mitocondriais, RNAs e várias enzimas (Figura 2) (PEREIRA et al., 2012).

O DNA mitocondrial (mtDNA) é uma molécula de herança genética materna (WHITEHURST; HOWES, 2022). O DNA mitocondrial humano codifica 13 componentes de proteínas para o sistema de fosforilação oxidativa (CAPT; PASSAMONTI; BRETON, 2016). Todos os processos mitocondriais são fundamentais ao organismo vivo, importante para homeostase celular. Acontecem diversas etapas para quebra de glicose proveniente da alimentação e posterior produção de energia em forma de adenosina trifosfato (ATP). A glicólise ocorre no citosol celular, o ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs) na matriz mitocondrial e a fosforilação oxidativa (OXPHOS) para transporte de elétrons atraídos pelo oxigênio (O<sub>2</sub>), ao final da cadeia respiratória na membrana interna da mitocôndria, sendo esta última etapa a que produz maior quantidade de ATP (MCCLELLAND, 2011).

**Figura 2-** Morfologia da mitocôndria



Fonte: Revista de Biociência. Disponível em: <https://www.bioscience.com.pk/topics/cell-biology/item/581-structure-and-function-of-mitochondria>

Outras funções essenciais da mitocôndria são tamponamento de cálcio intracelular e morte celular programada (apoptose), como também envolvimento no metabolismo dos carboidratos, aminoácidos, lipídios, nucleotídeos e esteroides (GANGULY; KADAM, 2022; VERGE et al., 2011). O sistema OXPHOS é dependente de  $O_2$  para concluir o mecanismo de geração de energia e qualquer alteração nesse sistema pode haver graves consequências orgânicas (FERREIRA; AGUIAR; VILARINHO, 2008).

A mitocôndria tem produção de energia no sistema OXPHOS na cadeia transportadora de elétrons (CTE) através dos elétrons provenientes do ciclo do ácido tricarboxílico da matriz mitocondrial para deslocar prótons que passam por cinco complexos enzimáticos na membrana interna (cristas mitocondriais), que são: Complexo I (NADH ubiquinona redutase); Complexo II (succinato ubiquinona redutase); Complexo III (ubiquinona citocromo c oxidoreductase); Complexo IV (citocromo c oxidase); Complexo V (ATP sintetase). Todos são responsáveis pela maior parte da síntese de ATP e são componentes da cadeia respiratória, juntamente com dois transportadores de elétrons móveis coenzima Q10 (ubiquinona) e citocromo c (SILVA et al, 2021).

Os prótons imersos no espaço intermembranar geram gradiente eletroquímico (composto de um potencial elétrico -  $\Delta\psi$  e uma razão de concentração de prótons -  $\Delta pH$ ), onde o complexo V utiliza a energia permitindo redução do gradiente de concentração e a volta para matriz mitocondrial para elaborar a união da molécula de ADP e piruvato ( $P_i$ ) para produção de ATP. No final da cadeia transportadora de elétrons tem-se a produção de  $H_2O$  (NOLFI-

DONEGAN; BRAGANZA; SHIVA, 2020). Para correta funcionalidade do sistema OXPHOS é necessário a obtenção de elétrons na cadeia respiratória por oxidação de substratos, como o malato e glutamato no complexo I e succinato no complexo II (PUCHOWICZ et al., 2004).

A entrada de elementos e a liberação de algum produto oxidado da mitocôndria passa pelo citosol. O citosol é um preenchimento aquoso na célula eucariótica que diversos componentes celulares estão imersos, onde acontecem reações redox para o processo metabólico e ação de enzimas como a SOD para eliminar EROs (LÓPEZ-MIRABAL; WINTHER, 2008), também acontece reações de sintetização de proteínas e translocação de substratos (AVENDAÑO-MONSALVE; PONCE-ROJAS; FUNES, 2020).

A mitocôndria em condições excessivas de cálcio e estresse oxidativo pode induzir a abertura de um poro inespecífico na sua membrana, o Poro de Transição de Permeabilidade mitocondrial (mPTP). A abertura deste poro leva a perda da homeostase da organela e está associada a um inchamento mitocondrial com posterior aumento da produção de EROs pela mitocôndria o que leva a um quadro de lesão celular e indução de morte (BERNARDI, 2013; BOYENLE et al., 2022).

O mPTP em estado patológico causado por aumento de  $Ca^{2+}$ , estresse oxidativo, elevação de fosfato e redução de nucleotídeos de adenina torna a matriz mitocondrial interna altamente permeável a solutos de alto peso molecular, induzindo a perda de metabólitos mitocondriais e sequenciando a perturbação da homeostase mitocondrial, resultando em morte celular (MORCIANO et al., 2021). O mPTP quando tem a abertura de forma abundante provoca a limitação da síntese de ATP intercedendo o desacoplamento da fosforilação oxidativa, desestruturando a integridade funcional da célula resultando em dano irreversível e morte celular, situação presente em doenças neurodegenerativas (KALANI; YAN; YAN, 2018).

As mitocôndrias são organelas essenciais na neurotransmissão, são localizadas em terminais sinápticas auxiliando a sustentar a produção de ATP e tamponamento de cálcio ( $Ca^{2+}$ ). A proteína Miro é um importante transportador mitocondrial, apresentando disfunção em situação de excitabilidade dos receptores glutamatérgicos (SHENG; CAI, 2012). Nas sinapses, nos axônios, mais precisamente nos disparos neurais, as mitocôndrias estão presentes, inclusive contribuem para uma atividade rápida e constante (VANHAUWAERT; BHARAT; WANG, 2019).

A relação entre esquizofrenia e as alterações de proteínas, e do metabolismo energético pertinentes a mitocôndria são bem enfatizadas na literatura científica (LEZA et al., 2015). Entretanto, na mitocôndria está sendo amplamente rebuscada a existência de receptores

AT1 e AT2. No cérebro e nas mitocôndrias de neurônios a renina se encontra de forma abundante. A renina intracelular é carregada para o interior da mitocôndria através da síntese de ATP e do potencial de membrana, uma funcionalidade de bioenergética mitocondrial (ABADIR; WALSTON; CAREY, 2012). A ativação do sistema renina angiotensina (SRA) no interior de células cerebrais foi evidenciado em estudos científicos com camundongos transgênicos, demonstrando alterações dos fluidos e do aumento da pressão arterial (LAVOIE et al., 2004).

Os polimorfismos dos nucleotídeos no mtDNA, genes defeituosos, mutações no gene que codifica o RNA transportador, redução na atividade da cadeia transportadora de elétrons (CTE), modificação na produção de glicolítica de ATP, níveis de lactato elevados no líquido cefalorraquidiano (LCR), todos foram encontrados como biomarcadores mitocondriais em pacientes portadores de esquizofrenia, sendo associados à problemas bioenergéticos (FLIPPO; STRACK, 2017). A esquizofrenia foi associada com danos na respiração mitocondrial por prejuízos no complexo I (ROSENFELD et al., 2011).

Estudos clínicos e post-mortem revelaram diversos distúrbios mitocondriais em pacientes portadores de esquizofrenia, através de análises de produtos bioquímicos. Alguns achados como mitocôndrias presentes na vascularização cerebral estavam microscopicamente anormais juntamente com uma relativa deficiência no citocromo C oxidase (complexo IV da CTE). Foi evidenciado também que pode existir a esquizofrenia secundária, ou seja, pacientes que tenham diabetes, doença cardíaca, acidente vascular cerebral (AVC), convulsões e surdez, todos são relacionados com possíveis problemas na funcionalidade das mitocôndrias (VELAKOULIS; WALTERFANG, 2019).

O complexo SRA tem importância direta na regulação da pressão arterial sistêmica, controla por meio do equilíbrio de sódio e água. A renina é uma enzima que converte angiotensinogênio em angiotensina I (ang I) no plasma, em seguida no sistema renal a enzima conversora de angiotensina (ECA) modifica ang I em angiotensina II (ang II), por sua vez, a ang II atua na suprarrenal do rim estimulando a liberação de aldosterona, este hormônio atua na reabsorção de sódio e por processo osmótico a água, resultando em aumento do volume sanguíneo. A ang II atua em dois tipos de receptores, receptor do tipo 1 (AT1) e 2 (AT2), com efeitos distintos em diferentes células do organismo (LABANDEIRA-GARCIA et al., 2017).

Basicamente, o sistema renina angiotensina (SRA) sintetiza o hormônio angiotensina (Ang) II, o receptor da Ang II é o receptor AT1 (AT1R), este quando ativado libera outros tipos de hormônios que atuam na vasoconstrição e elevação da pressão arterial (PA). A angiotensina II é um tipo de neuropeptídeo responsável por estimular os neurônios envolvidos com a

regulação cardiovascular do hipotálamo e do tronco cerebral, com vigorosa função de controlar o sistema simpático, pressão arterial e hiperatividade no SNC (CUADRA et al., 2010).

O SRA na mitocôndria está ligado a produção de óxido nítrico (NO), respiração celular, ativação de fosfolipase C e proteína tirosina quinase. Os receptores AT1 e AT2 estão ligados às ações da ang II com várias glicoproteínas transmembranares. Os receptores AT1 são localizados no interior mitocondrial, provando significamente o aumento da expressão de AT1R no envelhecimento (ABADIR; WALSTON; CAREY, 2012).

Receptores de AT1 e AT2 estão presentes em mitocôndrias de neurônios dopaminérgicos na substância negra, os receptores AT2 estão de forma abundantes e tem função de proteção celular. Os AT1R e AT2R participam do processo de respiração celular na mitocôndria, o AT2R aumenta os níveis de óxido nítrico mitocondrial e AT1R aumentou a produção de superóxido via mitocondrial (LABANDEIRA-GARCIA et al., 2021). AT1R no cérebro tem efeitos danosos, como hipertensão, inflamação, estresse oxidativo, ruptura da BHE e neurotoxicidade (FARAG et al., 2017). A intensificação do complexo NADPH-oxidase 2 (Nox2) da membrana plasmática, gera EROs provenientes de superóxido na região intracelular, que desempenha uma função importante nos efeitos pró-oxidativos e pró-inflamatórios (LABANDEIRA-GARCIA et al., 2021).

A angiotensina (1-7) é um importante peptídeo ativo do sistema renina angiotensina e tem atividade em atenuar a dopamina no cérebro (SANTOS; ANDRADE, 2014; VARSHNEY; GARABADU, 2021). A angiotensina (1-7) está relacionada a benefícios da memória de trabalho, demonstrando atividades neuroprotetoras no SNC (HO; NATION, 2018). Angiotensina IV peptídeo que também atua no sistema renina angiotensina demonstra melhora na cognição (HO; NATION, 2018). A angiotensina III é um peptídeo ativo do sistema renina angiotensina, ainda pouco explorado e é interligado com a ativação dos receptores 1 e 2 da angiotensina II, bem como, tem forte relação no controle metabólico e regulação sistêmica no cérebro (O'CONNOR et al., 2022).

Na esquizofrenia há relação com o SRA, justamente pelo poder de articulação deste sistema nas vias de neurotransmissões do SNC. O SRA está intimamente ligado a ação de plasticidade sináptica, formação neural e transmissões dopaminérgicas. Os estudos corroboram que a ativação excessiva do SRA é associado a inflamação e estresse oxidativo, ocasionando as diversas doenças neurodegenerativas (VASCONCELOS et al., 2021a).

No cérebro a ang II tem níveis superiores relacionados aos níveis no sangue periférico, estima-se que o SRA tem produção independente no SNC. O angiotensinogênio é sintetizado por células astrocitárias de neurônios. O SRA quando intensificado na via nigroestriatal

estimula AT1R causando neuroinflamação, estresse oxidativo e degeneração de dopamina (LABANDEIRA-GARCIA et al., 2021).

O AT1R é ativado na membrana plasmática por ang II extracelular e a consequente internalização de ang II via AT1R, ambos processos desencadeiam vários mecanismos de proteção a célula contra o estresse oxidativo em situações fisiológicas normais. Entretanto, o estímulo excessivo causa condições de doença ou envelhecimento, há uma sobrecarga nos mecanismos de compensatórios de proteção, ocasionando os danos celulares e logo o progresso da enfermidade (Figura 3) (LABANDEIRA-GARCIA et al., 2021).

A angiotensina quando intensificada o tipo AT1R aciona NADPH-oxidase produto relacionado e modula o ferro nos neurônios dopaminérgicos e de células microgliais, estão relacionados ao estresse oxidativo e neuroinflamação (GARRIDO-GIL et al., 2013). A dopamina é vinculada ao SRA, observado em análises que a ang II estimulou a liberação de dopamina estriatal, sendo esta posteriormente inibida com sucesso por substâncias antagonistas do AT1R (BROWN et al., 1996). A desregulação da via dopaminérgica desencadeia exacerbação do SRA, positivamente o AT1R que resulta em ação pró-oxidante e pró-inflamatória (VILLAR-CHEDA et al., 2014).

De acordo com todo o contexto acerca dos receptores de angiotensina, os mecanismos farmacológicos que atuam no SRA demonstram-se válidos para patologias neurológicas e neuropsiquiátricas. As hipóteses opostas de bloquear o receptor AT1 que age como neuroinflamatório e ativar o receptor AT2 que tem função neuroprotetora, são caminhos científicos ainda pouco explorados, mas bastante promissores (VADHAN; SPETH, 2021).



A angiotensina no cérebro está presente em diversas regiões como amígdala, putâmen caudado, cerebelo, córtex cerebral e hipocampo. Os receptores da angiotensina são abundantes no SNC, entretanto, o AT1R está distribuído em maior proporção nas estruturas cerebrais (GARD, 2002). Os receptores AT1R e AT2R são presentes em neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e micróglia. Desta forma, a relação no excesso de ativação do SRA pode afetar diversas cadeias pró-inflamatórias cerebrais (ABIODUN; OLA, 2020a).

A neuroinflamação se caracteriza por múltiplos mecanismos que envolve diversos mediadores inflamatórios como interleucinas, migração de células imunológicas e sensibilização da barreira hematoencefálica (FILLMAN et al., 2013). O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição relacionado ao controle das expressões de genes que respondem a inflamação, cérebros de portadores de esquizofrenia tem redução da proteína HIVEP2 que suprime a atividade de NF- $\kappa$ B em muitos estímulos (VOLK et al., 2019). Desta forma, o desenvolvimento da patogênese da esquizofrenia está interligada com os estímulos neuroinflamatórios e expressão dos mediadores em diferentes regiões cerebrais (SAKURAI, 2020).

A losartana induz o aumento do AT2R mitocondrial, ocasionando ações positivas, como benefícios na bioenergética celular, portanto, o excesso da expressão de AT1R e a consequente redução de expressão de AT2R está associado a desequilíbrio celular, pois o AT1R está associado a processos nocivos como estresse oxidativo e mutações no DNA mitocondrial, entretanto, a possibilidade de bloqueio do AT1R pode espontaneamente aumentar as atividades de AT2R, sendo uma proposta farmacológica para muitas doenças que envolve esses sistemas (ABADIR; WALSTON; CAREY, 2012). Além disso, com o bloqueio de AT1R houve o aumento da expressão de AT4R que é associado a melhora da memória espacial e aprendizagem, condições importantes para doenças neuropsiquiátricas (ONGALI et al., 2014).

Losartana como tratamento em modelo de inflamação no animal reduziu citocinas pró-inflamatórias sem afetar a pressão arterial (PA). As moléculas que demonstraram redução foram a citocina IL-1 $\beta$ , quimiocina (CXCL1) e TNF- $\alpha$  (SILVEIRA et al., 2013). Doses inferiores de losartana em comparação com as doses anti-hipertensiva não tem interferência na pressão arterial, no entanto, nos estudos com camundongos em diversos modelos para análise do fármaco foi constatado que a losartana aprimorou a circulação cerebral, reduziu o estresse oxidativo cerebrovascular e melhorou a função cognitiva, ou seja, a deficiência cognitiva é grande alvo de estudos, pois é um dos sintomas da esquizofrenia (ONGALI et al., 2014).

## 1.6 Cetamina como modelo de esquizofrenia

A cetamina é um anestésico dissociativo que pode ser utilizado em seres humanos e animais. Foi sintetizado pela primeira vez por Stevens na década de 60. É um análogo da fenciclidina (PCP), substância conhecida como droga de abuso. A cetamina é utilizada para minimizar dores crônicas e nos casos de doenças em estados terminais (PONCE; FUKUSHIMA, 2017).

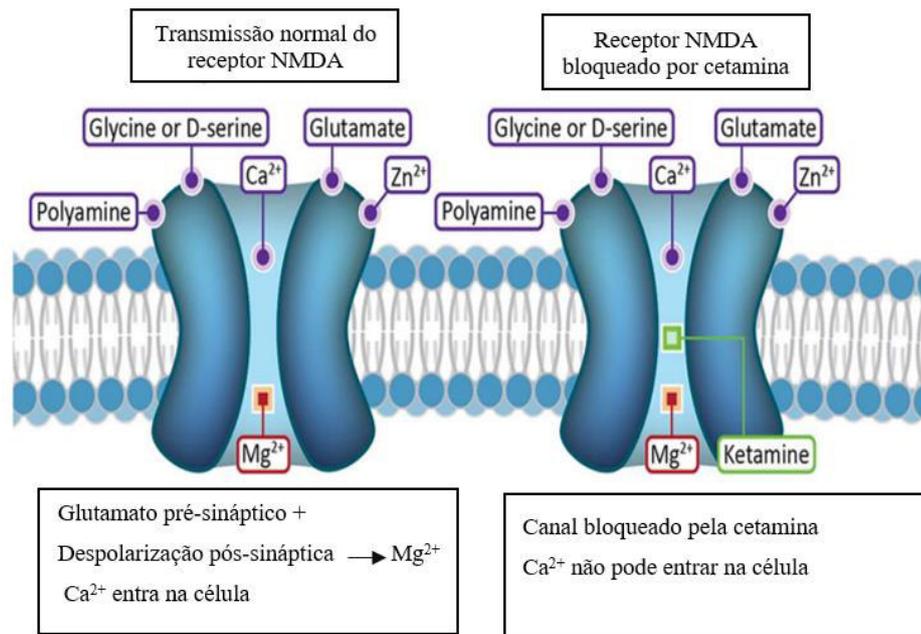
Conhecido como anestésico dissociativo, a cetamina causa paralisação muscular e amnésia sem perda da consciência. O principal problema da cetamina utilizada como anestésico em procedimentos médicos relaciona-se a consequências indesejáveis, como delírios e alucinações no processo de recuperação dos efeitos anestésicos da substância no organismo, assim devendo ser associado a outro fármaco, como benzodiazepínico para assegurar a utilização adequada (VASCONCELOS et al., 2005).

A cetamina tem fácil acesso pela barreira hematoencefálica e o seu mecanismo de ação consiste em antagonizar o receptor glutamatérgico (neurotransmissão excitatória), o receptor NMDA do tipo não competitivo, bloqueando especificamente a região de ligação denominada fenciclidina (Figura 4). O receptor NMDA presente em várias regiões do cérebro responde o motivo da cetamina estar envolvida em diversos processos do SNC, inclusive para analgesia por se ligar e ter ação nos receptores opióides (GALES; MAXWELL, 2018).

Doses intermediárias de cetamina em humanos induzem sintomas de decaimento cognitivo e estados dissociativos semelhantes a esquizofrenia, como também é relatado que a cetamina agrava os sintomas de pacientes portadores de esquizofrenia. O antagonismo dos receptores NMDA com cetamina em animais de laboratório refletiu em sintomas negativos e positivos da esquizofrenia, avaliados em modelos comportamentais como avaliação da memória de trabalho e teste de inibição pré-pulso (IPP) (VASCONCELOS et al., 2015b).

O bloqueio de receptores NMDA favorece o aumento do glutamato em regiões do CPF, cuja essa localização cerebral é responsável por processos cognitivos como a tomada de decisão, memória de trabalho, atenção, aprendizado, controle sensorio motor, controle emocional e afetivo. Os sintomas de déficits cognitivos relatados na esquizofrenia tem relação com defeitos na região do CPF (LEWIS, 2012).

**Figura 4** - Mecanismo de ação da cetamina nos receptores NMDA



Fonte: FROHLICH; VAN HORN, 2014. Adaptado.

A cetamina, através do bloqueio NMDA, afeta a via gabaérgica, reduzindo o tônus de inibição do GABA sob outros neurotransmissores como a dopamina no estriado levando a efeitos psicóticos como descritos na via dopaminérgica (QIN et al., 2021). A cetamina nas doses que induzem sintomas de esquizofrenia, eleva níveis de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  em hipocampo cerebral, favorecendo as psicoses (YADAV et al., 2018).

O modelo de esquizofrenia em animais de laboratório já está bem estabelecido em protocolos de pesquisas científicas, geralmente utilizam doses padronizadas de 20mg/kg intraperitoneal (i.p.), podendo ser 14 dias ou mais de tratamento diário para obter as observações da patologia, e em seguida são realizados os experimentos comportamentais como avaliação da atividade locomotora em teste de campo aberto (avalia sintomas positivos), teste de interação social (avalia sintomas negativos) e teste cognitivo de reconhecimento de objetos (avalia déficits cognitivos) (OCCHIEPPO et al., 2022).

O grupo de pesquisa em Neurofarmacologia da UFC, com integração da Professora Dra. Danielle Macêdo tem diversos trabalhos publicados com a cetamina, inclusive o estudo “Ácido alfa-lipóico sozinho e combinado com clozapina reverte sintomas esquizofrênicos induzidos por cetamina em camundongos: Participação de mecanismos antioxidantes, nitrérgicos e neurotrófico”, onde a cetamina causou déficits em teste de memória de trabalho, interação social, inibição pré-pulso e hiperlocomoção, como também redução nos níveis de GSH, nitrito

e proteína fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), e consequente aumento de peroxidação lipídica no CPF, hipocampo e estriado (VASCONCELOS et al., 2015a). Em outro estudo publicado “Prevenção e reversão do comportamento relacionado à esquizofrenia induzida por cetamina pela minociclina em camundongos: possível envolvimento de vias antioxidantes e nitrérgicas”, a cetamina elevou substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e reduziu glutatona (GSH) em CPF, hipocampo e estriado, alterou parâmetros comportamentais avaliados (MONTE et al., 2013).

### **1.7 Testes comportamentais para avaliação de sintomas tipo esquizofrenia em animais**

Os testes comportamentais são necessários em diversos modelos patológicos nos animais de laboratório, visando a compreensão das enfermidades em humanos. A compreensão da cognição nos animais em diferentes circunstâncias como doença, tratamento e saudável (GHAFARIMOGHADAM et al., 2022). Os roedores são animais mamíferos que são mais utilizados em diversos experimentos de pesquisas científicas, principalmente em testes comportamentais, isto porque foi observado que estes animais tem respostas emocionais, sociais, dor e medo semelhantes aos humanos (KEYSERS et al., 2022).

Entre os métodos avaliativos dos transtornos psiquiátricos em experimentos nos modelos animais são teste de campo aberto, teste de interação social, teste de labirinto em cruz elevado, teste de suspensão da cauda e teste com caixa claro/escuro (SILVA et al., 2012). Esses testes com animais dependem de vários critérios fenotípicos, avanços na tecnologia e estudos da eletrofisiologia, neuroanatomia e genética ajudaram a aprimorar as técnicas comportamentais para obtenção de resultados confiáveis e maiores similaridades com as patologias ocorridas nos organismos dos seres humanos (CHADMAN; YANG; CRAWLEY, 2009).

A atividade locomotora é um dos principais parâmetros observados no teste de campo aberto, promovendo resultados preditivos de ansiedade através da quantificação dos números de cruzamentos, escalamento das paredes, quantidades de bolos fecais, índice de comportamento exploratório e levantamento do animal (SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). Também é detectado o número de groomings e autolimpeza excessiva do animal, indicativo de compulsão e ansiedade (RAMÍREZ-ARMENTA et al., 2022). Vale destacar que a ativação de receptores D2 causa aumento da atividade locomotora no campo aberto.

O modelo de esquizofrenia no animal e os comportamentos observados que o teste de campo aberto permite está relacionado a hiperatividade e respostas locomotoras para ponderação do antipsicótico utilizado e verificar se há EEP. O aumento da atividade locomotora é associado aos sintomas positivos, como delírios e alucinações e a redução na exploração relaciona-se aos sintomas negativos, como embotamento afetivo, desmotivação e retraimento social (HATTORI et al., 2008).

Para compreender diversas doenças psiquiátricas inclusive a esquizofrenia, é útil a manipulação de modelos animais para examinar as alterações provocadas por fatores ambientais e genéticos, entendimento da patogênese que ainda não está totalmente elucidada, identificações de alterações moleculares relacionadas a estimulação de regiões cerebrais e as observações dos comportamentos anormais. Os modelos animais quando realizados de forma cautelosa são excelentes ferramentas para estudos de candidatos a novos AP (POWELL; MIYAKAWA, 2006).

## 2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A esquizofrenia é uma doença mental grave e incapacitante que modifica a vida de pessoas que desenvolvem esta patologia, até mesmo de seus familiares ou cuidadores. Essa doença psiquiátrica, cada vez mais está sendo alvo de estudos, devido a fisiopatologia ser ampla e não totalmente elucidada, como também causa grande impacto social e econômico no país, comprometendo as inserções no ramo de empregabilidade por causa da diversificação de sintomas. É importante ressaltar que os mais afetados com a esquizofrenia são adultos jovens, por volta dos 20 a 24 anos de idade, fase que tem mais desenvoltura na sociedade e produtividade.

No Brasil, estimativa entre os anos de 2007 a 2017 mostrou que problemas mentais são a terceira causa de afastamento de trabalho, dados do serviço de informação do cidadão vinculado ao instituto nacional do seguro social (INSS). Em 2020 as doenças mentais foram bastante evidentes em solicitação de aposentadoria e licença temporária. Nos dados do sistema único de informações (SUIBE), no ano de 2020 a esquizofrenia representou maior quantidade de indivíduos acometidos e que tiveram que recorrer a aposentadoria por invalidez, isto comparado a outros tipos de doenças ou transtornos mentais, desta forma, ocasionando altos custos provenientes de benefícios dos recursos governamentais (DA SILVA et al., 2021).

Os índices de mortalidade também são associados, a população portadora de esquizofrenia geralmente morre prematuramente, entre 10 a 20 anos antes da população geral, principalmente relacionadas a complicações cardiovasculares. Nesse contexto, os pacientes apresentam modificações corporais evidentes, como o aumento de peso por problemas metabólicos como diabetes, alterações endócrinas e hipercolesterolemia, podendo até surgir problemas cardiovasculares (MINHAS et al., 2021), os sintomas colaterais podendo serem causados por usos dos antipsicóticos atuais, utilizados de forma crônica na prática clínica (ADELA et al., 2010; SHIELDS et al., 2022).

Por outro lado, doenças cerebrovasculares, hipertensão e doença cardíaca são observados no pródromo da esquizofrenia (CHEN et al., 2020). Todos esses distúrbios orgânicos são coadjuvantes ao estresse oxidativo (ROTARIU et al., 2022). Do mesmo modo que o estresse oxidativo está amplamente ligado aos déficits de neurocognição (CRUZ et al., 2021), neuroinflamação (MA et al., 2020), e suscetibilidade às crises psicóticas (CALDIROLI et al., 2022).

A proposta de estudos científicos com substâncias bloqueadoras dos receptores de angiotensina II do tipo 1 (AT1R), está pelo fato destes apresentarem em baixa dose a

prevenção de alterações inflamatórias avaliados por dosagens de produtos do estresse oxidativo e melhoramento de déficits motores de animais de laboratório em ambos os sexos nos modelos de esquizofrenia, sem alteração da pressão arterial (VASCONCELOS et al., 2021b).

A associação de distúrbios cerebrais, danos celulares e disfunção mitocondrial está ligada a ativação excessiva de receptores AT1, e o bloqueio destes receptores a nível cerebral melhora as desordens cerebrais, como também aumenta a expectativa de vida (SAAVEDRA, 2017). Losartana é um medicamento bloqueador do receptor AT1 da angiotensina (SALMANI et al., 2020b), mecanismo de ação associado a diversos benefícios ao SNC (ABIODUN; OLA, 2020b; OROS-GONZÁLEZ et al., 2022; OUK et al., 2021), assim determina-se que são válidas novas estratégias de pesquisa para compreender de forma eficaz a fisiopatologia e melhores terapêuticas para esquizofrenia.

Nesse contexto, o presente estudo tem por objetivo investigar alguns parâmetros mitocondriais e de estresse oxidativo no modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina, e a influência do sistema SRA através da losartana e angiotensina II em mitocôndrias isoladas de cérebros.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Investigar alterações em mecanismos respiratórios de mitocôndrias isoladas de animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por administração repetida de cetamina, avaliando alterações ocasionadas por estresse oxidativo e a influência do sistema renina-angiotensina.

#### 3.2 Específicos

Avaliar em animais submetidos ao modelo por cetamina de esquizofrenia e controles as seguintes alterações:

- ⇒ Parâmetros comportamentais relacionados à esquizofrenia através do teste de campo aberto para avaliar crossings, groomings, rearings e bolos fecais, a fim de detectar alterações de hiperlocomoção e ansiedade relativos aos sintomas positivos em camundongos submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido pela administração repetida de cetamina;
- ⇒ Efeitos na respiração/função mitocondrial através da medida da razão do controle respiratório (RCR) *in vitro*;
- ⇒ Produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) do isolado de mitocôndrias cerebrais para avaliar níveis de estresse oxidativo;
- ⇒ Efeito do tratamento *in vitro* com angiotensina II e losartana na indução de abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) dos isolados de mitocôndrias cerebrais;
- ⇒ Atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase (SOD) derivadas da extração do citosol no momento de isolamento mitocondrial.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos adultos (25-35g) provenientes do Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Os animais foram mantidos em grupos (n=8) numa sala com temperatura controlada ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), alojados em gaiolas, com alimentos e água ad libitum e com ciclos claro/escuro de 12/12 h.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) vinculado a Universidade Federal do Ceará (UFC), pesquisa protocolada sob n<sup>o</sup>: 25081119-0. Todos os princípios éticos de pesquisa animal foram seguidos em conformidade com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

### 4.2 Substâncias e reagentes

Cloridrato de Cetamina 116mg/ml foi diluído em soro fisiológico 0,9% para dose de 20mg/kg, dosagem administrada a depender do peso do animal por via intraperitoneal (i.p.) para mimetizar sintomas esquizofrênicos nos animais (VASCONCELOS et al., 2015b). Losartana potássica em pó branco (PharmaNostra) na composição pura diluída 5mg/ml em H<sub>2</sub>O utilizada 1µl *in vitro*, nas mitocôndrias, obtendo concentração final de 5µg/µl, para avaliar a influência do sistema renina-angiotensina na abertura do mPTP. Observação: As soluções injetadas via i.p. foram respeitadas o volume de 0,1ml a cada 10g de peso corporal do animal.

O tampão de isolamento pH=7,2 ajustado com KOH (hidróxido de potássio): 125mM sacarose; 250mM manitol; 10mM EGTA; 10mM HEPES; 0,1% BSA (1mg/ml). No tampão de experimento o pH= 7,2 ajustado com KOH: 25mM sacarose; 5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 20mM TRIS-HCL; 100mM KCl; 1mg/ml BSA; 75mM manitol. Os tampões foram utilizados para o processo de isolamento mitocondrial e no momento das análises utilizando as mitocôndrias. A substância de angiotensina II 0,21mg/ml foi utilizado na corrida de avaliação do mPTP para verificar a influência no inchamento mitocondrial.

O malato 1mM, glutamato 1mM e succinato 3mM são substratos que fornecem elétrons para a cadeia transportadora de elétrons, quando utilizados estimulam a respiração *in vitro* de mitocôndrias isoladas, como também são utilizados no processo de isolamento mitocondrial e no teste de inchamento mitocondrial. A oligomicina modula a função mitocondrial, droga inibidora da ATP-sintase. Azul de nitrotetrazólio (NBT) 100 mg/ml utilizado no estudo para

detecção de SOD citosólica e mitocondrial. Ácido 2,2'-dinitro-5-5'-ditio-dibenzóico (DTNB) 10mg/ml para determinar níveis de proteínas tiol.

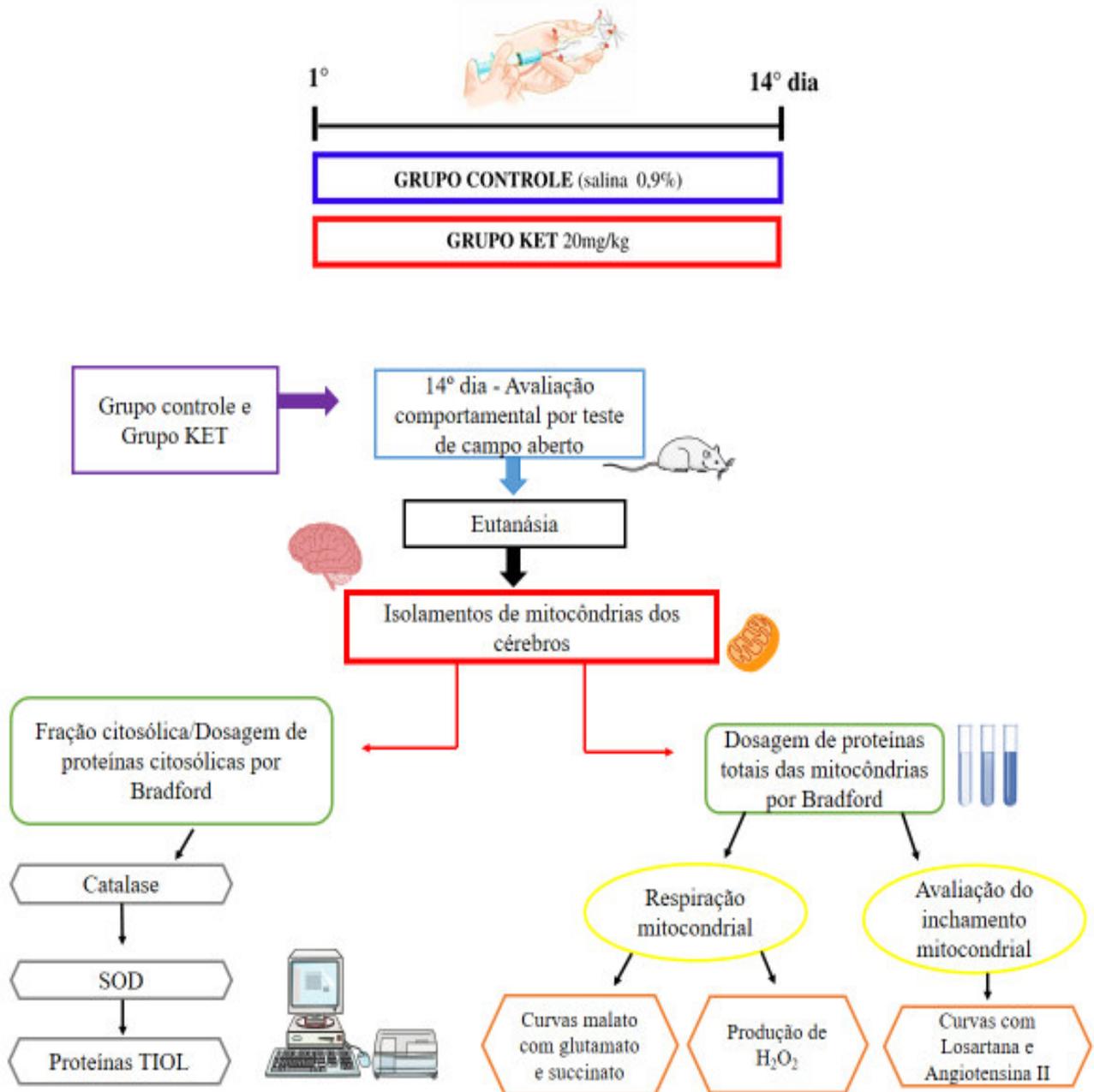
Todas as drogas são provenientes da Sigma-Aldrich® e foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO).

### **4.3 Procedimento experimental**

Os animais foram tratados *in vivo* por via intraperitoneal (i.p) por 14 dias (Figura 5) com cetamina 20 mg/kg ou salina 0,9%, denominados de grupo cetamina (KET) e grupo controle. No último dia, 30 minutos após tratamento com KET foi realizado o teste comportamental do campo aberto, este tempo é respeitado, pois os primeiros minutos após administração há efeito anestésico na dose não sedativa, após passado o intervalo de segurança é onde se tem relatado o período de recuperação da substância com surgimento de sintomas dissociativos semelhantes ao da esquizofrenia.

Logo em seguida, rapidamente os animais foram eutanasiados e dissecados para obtenção do cérebro, e assim isolados as mitocôndrias cerebrais. Durante o processo de isolamento mitocondrial, uma fração citosólica separada em eppendorfs e armazenado a -80 °C por menos de 1 mês para utilizar logo em ensaios bioquímicos como proteínas sulfidrilas (TIOL), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Ao término do isolamento mitocondrial, o eppendorf com o isolado eram mantidos em gelo durante as análises experimentais. Foi realizado sequencialmente dosagem de proteínas totais, avaliação da respiração mitocondrial, inchamento mitocondrial (abertura do mPTP) e quantificação da produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

**Figura 5-** Representações esquemáticas do protocolo experimental



Fonte: Autoria própria.

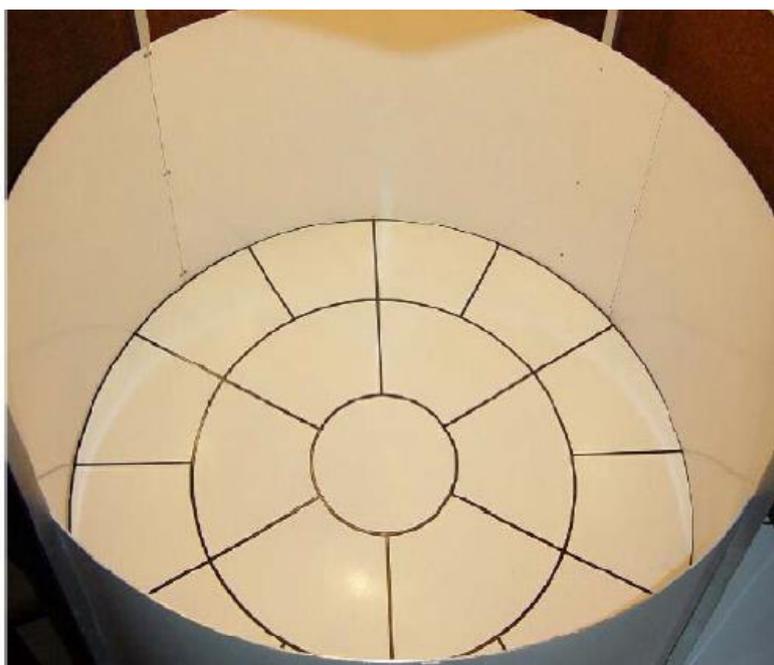
#### 4.4 Teste de campo aberto

A atividade locomotora foi avaliada através do teste de campo aberto (ARCHER, 1973).

O teste foi aplicado para avaliação da emocionalidade dos camundongos que compuseram os dois grupos experimentais, sempre no período da manhã. Os animais foram colocados, individualmente na arena, seguindo a sequência numérica pela qual os camundongos foram marcados, cada animal foi testado uma única vez.

A arena foi colocada numa sala separada, com silêncio absoluto e as variáveis contabilizados com o auxílio de uma câmera de vídeo. O aparato foi constituído de uma arena circular (Figura 6), com o fundo dividido em parcelas medindo 60 cm de diâmetro e 50cm de altura (BARBOSA; LIMA, 2016). Foi quantificado o número de cruzamentos (crossings), tempo de autolimpeza (groomings), números de levantamentos (rearings) e contagens de bolos fecais em 10 minutos. Depois de cada animal a arena foi limpa com álcool para remover o cheiro do animal anterior para evitar que influencie no comportamento do próximo.

**Figura 6** - Ilustração do campo aberto circular



Fonte: DOMBROWSKI, 2005.

#### **4.5 Teor de proteínas totais**

As proteínas foram mensuradas de cada amostra utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Baseado no deslocamento do equilíbrio do corante para sua forma aniônica, quando ocorre interação entre a proteína e o “coomassie brilhante blue” BG 250. Para calcular o teor de proteínas totais foi criada uma curva de calibração padrão e a leitura foi realizada em 595nm.

#### **4.6 Isolamento mitocondrial**

O cérebro inteiro foi lavado com PBS numa placa de petri, em seguida colocado no becker de vidro com tampão de isolamento (composição) para ser cortado com tesoura cirúrgica e depois transferido para potter de vidro para ser homogeneizado. O homogenato com as mitocôndrias foram transferidos para eppendorfs e sujeitos a processo com 3 etapas de centrifugações:

1. Centrifugação 4°C/RCF 2000G/ 5 minutos – Ao final, foram transferidos os sobrenadantes para novos eppendorfs para outra centrifugação e o sedimento com resíduos teciduais foram descartados.

2. Centrifugação 4°C/RCF 9400G/ 10 minutos – No término, os sobrenadantes foram transferidos para outros eppendorfs para serem realizadas as análises do citosol, o excesso retira com inversão do tudo e adiciona 100µl de solução tampão de isolamento e 1µl de digitonina 0,1%, ressuspendendo e juntando os precipitados de mitocôndrias, finalizando esta etapa com apenas 1 tudo para centrifugar.

3. Centrifugação 4°C/RCF 9400G/ 10 minutos – Por fim, o sobrenadante foi descartado e o sedimento mitocondrial foi ressuspendido em 100µl de solução tampão de isolamento e mantidas em gelo o tubo de eppendorf.

Quando finalizado estas etapas de centrifugações, imediatamente é realizada a avaliação da atividade respiratória e avaliação da abertura do mPTP. O sobrenadante resultante (fração citosólica) foi armazenado a -80 °C e utilizado para os outros ensaios bioquímicos, como proteínas tiol, catalase e superóxido dismutase (SOD).

#### **4.7 Avaliação da respiração/função mitocondrial**

A respiração mitocondrial foi avaliada em aparelho denominado de oxígrafo (Oxygraph Plus) com eletrodo tipo Clark, que permite a constatação do oxigênio consumido no meio reacional pelas mitocôndrias em cada situação de teste. O oxígrafo foi lavado com água destilada e álcool, e água novamente para zerar. Na sequência, adicionou-se o tampão de

experimento, os substratos malato com glutamato ou succinato, o isolado mitocondrial e iniciou-se a corrida, após 1 minuto foi adicionado ADP 1mM e quando a curva foi demonstrando decaimento significando que o consumo de oxigênio estava cessando, adicionou-se a oligomicina, ao final a curva foi parada totalmente, os dados foram salvos e os líquidos transferidos para análise de produção de  $H_2O_2$ .

Há 4 estados designados na avaliação da respiração mitocondrial, que são:

- O estado 1 é pertinente ao consumo basal da mitocôndria que não é mensurado;
- O estado 2 está relacionado ao consumo de  $O_2$  através dos substratos adicionados;
- O estado 3 com a adição de ADP na presença de substratos que estimula a fosforilação oxidativa;
- O estado 4 caracterizado pelo esgotamento do ADP e posterior bloqueio da cadeia respiratória com a oligomicina.

A oligomicina é desacopladora de prótons através da inibição da síntese de ATP (HEARNE et al., 2020).

A razão do controle respiratório mitocondrial (RCR) foi determinada pela razão do estado 3/estado 4, obtidos através do coeficiente angular das retas, em uma análise de regressão linear. Todos os valores foram normalizados pela concentração de proteínas presentes na amostra. O potencial de membrana mitocondrial resulta em declínio, já o consumo de  $O_2$  eleva-se, desta forma, a capacidade de respiração mitocondrial vai depender do grau de redução do potencial de membrana da mitocôndria expressados no software. A razão numérica do estado 3 dividido pelo estado 4 é o valor de RCR, cujo aumento do resultado significa função mitocondrial adequada, já a redução relaciona-se a desacoplamento mitocondrial e a função danificada da organela (PANOV, 2014).

#### **4.8 Avaliação da abertura do mPTP (aumento do volume mitocondrial)**

As mitocôndrias isoladas dos cérebros dos camundongos foram colocadas na cubeta juntamente com tampão de experimento, malato, glutamato, oligomicina  $1\mu\text{g/mL}$  e cálcio  $2\mu\text{M}$  para promover o inchamento mitocondrial patológico ou abertura do mPTP. Zerado com o tampão de experimento o aparelho de espectrofotômetro, as alterações na dispersão da luz devido à absorção de  $Ca^{2+}$  e, portanto, ao aumento do volume mitocondrial, foram medidas como uma diminuição ao longo do tempo na densidade óptica realizada a  $540\text{nm}$ .

Foram analisadas várias etapas no inchamento mitocondrial, como:

- Todas as soluções padronizadas como citadas acima;
- Soluções + angiotensina;

- Soluções + angiotensina + losartana;
- Soluções + losartana.

#### **4.9 Quantificação da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

A produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi mensurada utilizando Amplex Red (Molecular Probes®) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, os líquidos utilizados para corrida e análise da respiração mitocondrial no oxígrafo foram colocados em eppendorfs e incubados (protegidos da luz) com Amplex Red (50µmol/mL) e peroxidase de raiz forte (HRP) (1U/mL) durante 30 min a 37°C. Os tubos foram centrifugados a 9000G RCF durante 2 min e a absorbância medida a 560nm. A absorbância do branco foi determinada incubando tampão de experimento sem a amostra. A liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi calculada utilizando padrões de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para criar uma curva de calibração.

#### **4.10 Atividade da catalase**

Os sobrenadantes das amostras homogeneizadas foram adicionados ao meio de reação contendo 50mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 100 mM de tampão fosfato-salino (PBS) (pH 7,4). O decaimento na absorbância, a 240nm, foi registrado por 2 minutos. A atividade da catalase foi calculada como miliunidades de catalase por miligrama de proteína.

#### **4.11 Atividade enzimática de superóxido dismutase citosólica (SOD)**

O homogenato foi adicionado a um meio de reação contendo PBS, EDTA 0.1mM, L-metionina 13mM, NBT 75µM, tampão de isolamento e riboflavina 2µM, todos juntos com a amostra citosólica. A reação foi iniciada pela adição de riboflavina e exposta uniformemente a uma luz branca não filtrada por 5 min. A absorbância da cor azul desenvolvida devido à redução de NBT foi medida em 560nm. A atividade da SOD foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade é a quantidade de enzima necessária para inibir a redução de NBT em 50%.

#### **4.12 Teor de proteínas tiol (sulfidrilas)**

Os tióis nas proteínas foram medidos através da redução do DTNB, gerando um produto amarelo (TNB) medido a 412nm. O teor de proteínas tiol é importante para mensurar o estresse e dano oxidativo, uma vez que estes são inversamente proporcionais. Os sobrenadantes do homogenato foram incubados no escuro por 30 min à 37°C com DTNB 0,2mM (preparado em PBS e EDTA 1mM). O teor de proteína tiol foi calculado com base no coeficiente de extinção

molar de TNB ( $14.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e relatado como moles de TNB por miligrama de proteína. A reação com DTNB sem proteína e submetida à mesma incubação serviu como branco.

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism® versão 9.0 (Microsoft Windows®). Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade da amostra (paramétrico ou não paramétrico). A diferença entre os grupos controle e cetamina foram analisadas com a utilização da análise de variância teste “t” de student’s (para 2 grupos). Todos os resultados gráficos foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). Para todas as análises  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo (\*).

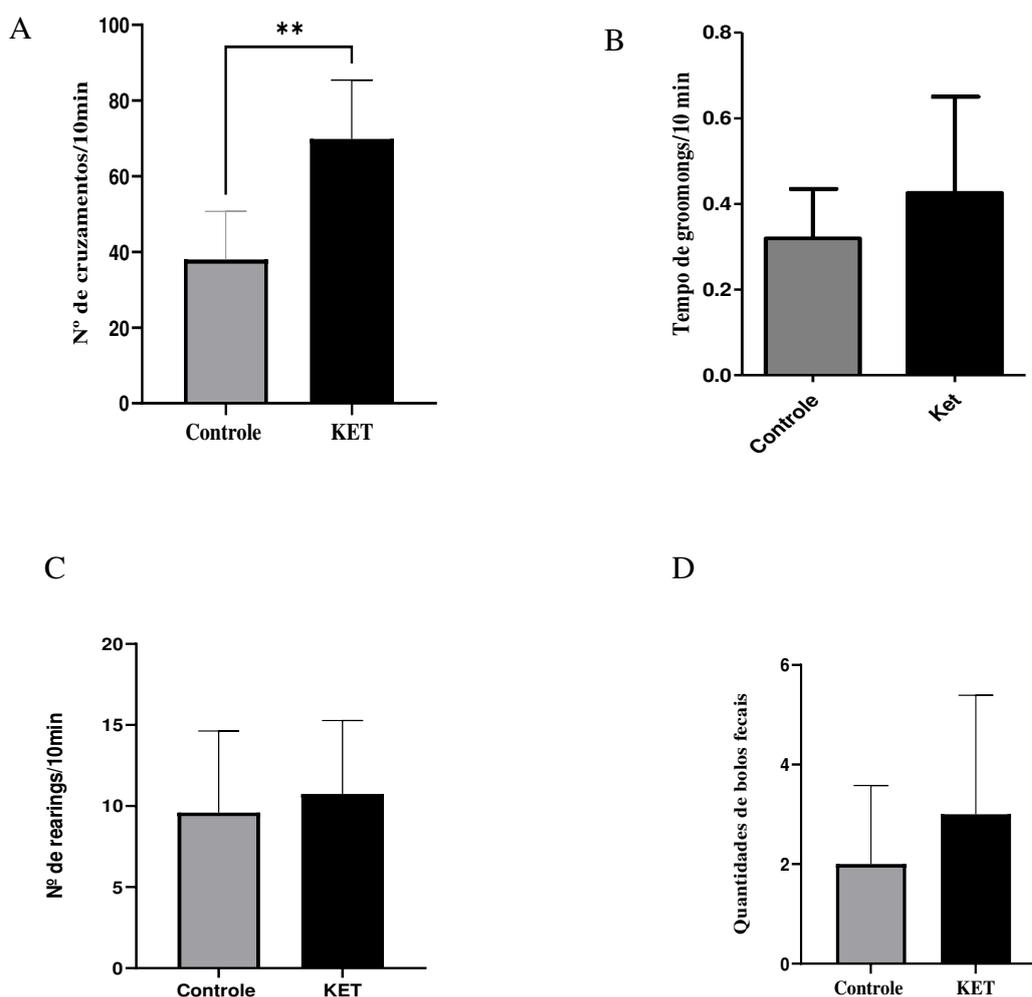
## 6. RESULTADOS

### 6.1 A administração repetida de cetamina induziu hiperlocomoção nos animais

No teste de campo aberto o número de crossings (cruzamentos) aumentou significativamente nos animais tratados com KET ( $P= 0.0027$ ) (Figura 7A). No critério avaliativo dos tempos de groomings (autolimpeza) dos animais do grupo controle e KET quando comparados não obtiveram valor considerado estatístico ( $P=0.7843$ ) (Figura 7B).

O número rearings (levantamentos) dos animais do grupo controle e KET não apresentaram diferenças significativas estatísticas ( $P= 0.6771$ ) (Figura 7C). A quantidade de bolos fecais dos grupos não teve diferença estatística ( $P= 0.4281$ ), porém, o grupo KET resultou em maior quantidade de bolos fecais no campo aberto (Figura 7D).

**Figura 7** - Resultados das avaliações no teste de campo aberto



**Teste de campo aberto dos animais do grupo controle e grupo com animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por cetamina (KET).** Números de cruzamentos (A) a relação entre os grupos foi estatisticamente significativa com valor de  $P < 0.001$  (\*\*). Tempo de groomings (B). Números de rearings (C). Quantificação de bolos fecais (D). Os valores são apresentados como  $\pm$  erro padrão da média (EPM),  $n=8$  por grupo.

## **6.2 Estados da respiração/função mitocondrial e Razão do Controle Respiratório (RCR) mitocondrial – Malato, Glutamato e Succinato**

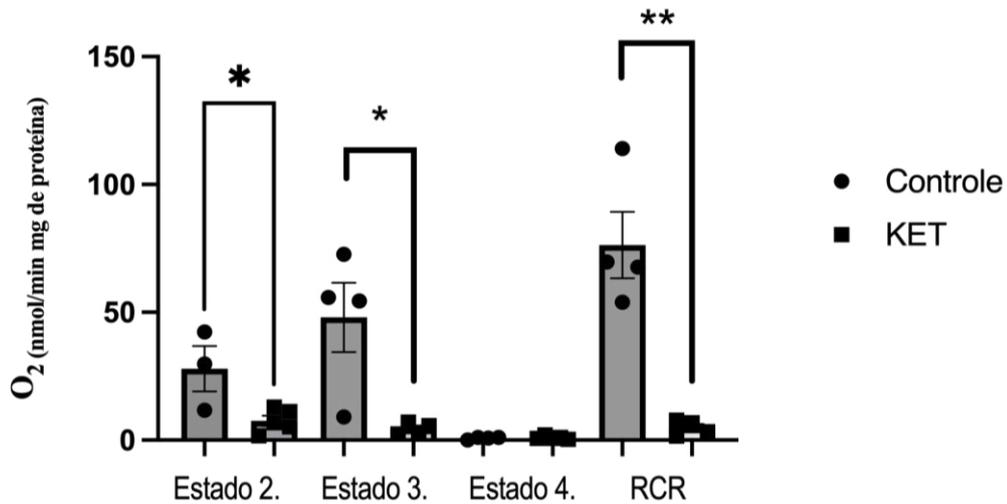
Os resultados indicaram que na presença do substrato malato e glutamato (Figura 8A), o grupo controle no estado 2 consumiu mais oxigênio do que o grupo KET, significativo ( $P=0.0032$ ). No estado 3 com a adição de ADP o grupo controle consumiu mais oxigênio do que o grupo KET, demonstrando resultado significativo ( $P=0.0045$ ). O estado 4 com a adição de oligomicina há redução de consumo de oxigênio de ambos os grupos e que não foram significativos estatisticamente. E o RCR que é resultado calculado da razão entre os estados 3 e 4 revelou que o grupo controle teve alta função mitocondrial ( $P=0.0010$ ), em comparação com o grupo KET que teve tratamento crônico com cetamina (modelo de esquizofrenia) que prejudicou a função e respiração mitocondrial.

Com substrato succinato (Figura 8B) o estado 2 e estado 3 do grupo controle teve o maior consumo de oxigênio em comparado ao grupo KET, entretanto, não tiveram valor significativo estatisticamente. No estado 4 com a adição da oligomicina os dois grupos pararam de consumir  $O_2$ , mas não foram significativos. A relação dos grupos no RCR houve diferença e foram significativos ( $P=0.0028$ ).

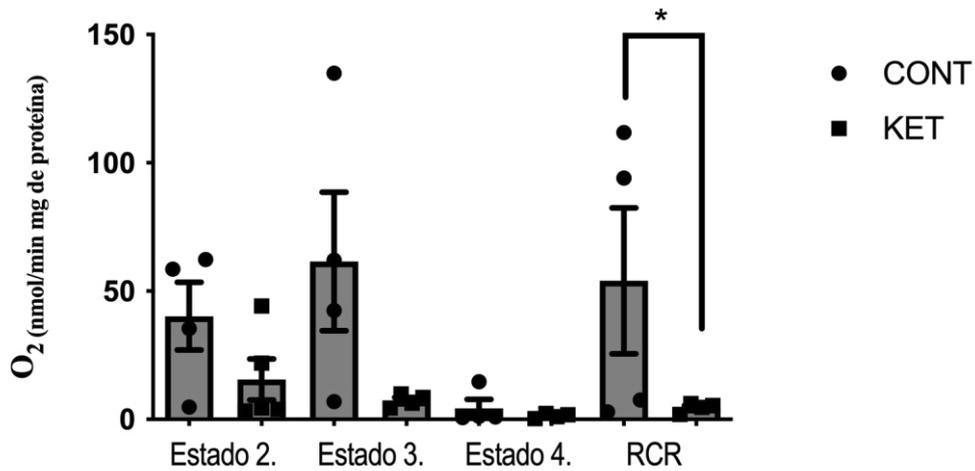
As demonstrações das curvas de consumo de oxigênio do grupo controle que foram acentuadas, com a respiração e função mitocondrial excelentes estão representadas na Figura 9A, já as curvas do grupo KET que não tiveram bom desempenho na respiração estão representadas na Figura 9B. As curvas do grupo controle têm uma grande queda quando adicionado ADP, resultado esperado, porém, as curvas do grupo KET além de serem curvas com muitos ruídos e falhas, ainda tem dificuldade na descida, ilustrando problema em consumir  $O_2$ .

**Figura 8** - Estados da respiração mitocondrial e RCR - Malato, Glutamato e Succinato

A



B

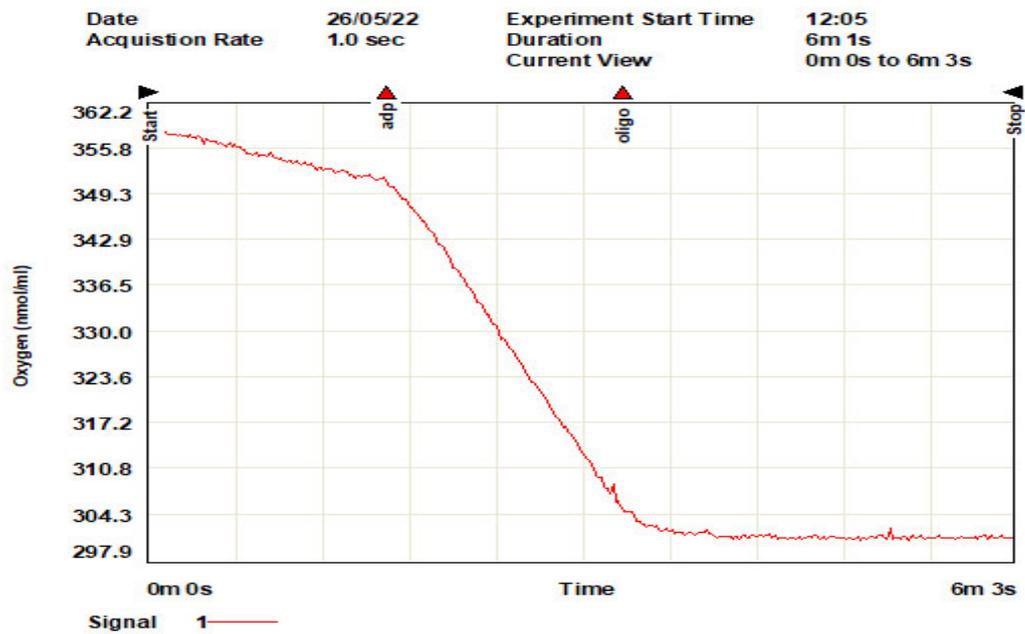


**Estados da respiração mitocondrial e razão do controle respiratório mitocondrial (RCR) em mitocôndrias isoladas de cérebros dos animais do grupo controle e grupo submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por**

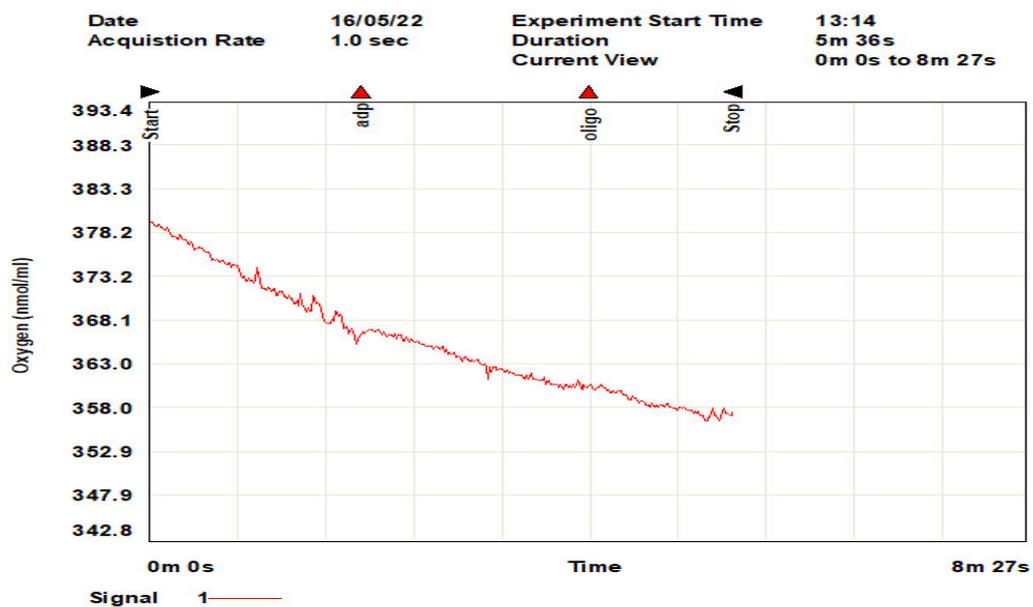
**cetamina (KET).** Substratos malato e glutamato (7A), a relação entre os grupos do estado 2, estado 3 e o RCR foram estatisticamente significativas com valor de  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.001$  (\*\*). Substrato succinato (7B), a relação entre os grupos do RCR foi estatisticamente significativa com valor de  $P < 0.05$  (\*). Os resultados foram deduzidos a partir do coeficiente angular das retas. Os valores são apresentados como  $\pm$  erro padrão da média (EPM),  $n = 8$  por grupo.

Figura 9- Curva do consumo de O<sub>2</sub>

A



B



Fonte: Dados da pesquisa. Curva do consumo positivo de O<sub>2</sub> do grupo controle (8A). Curva com pouco declínio representando dificuldade das mitocôndrias no consumo de O<sub>2</sub> do grupo KET (8B).

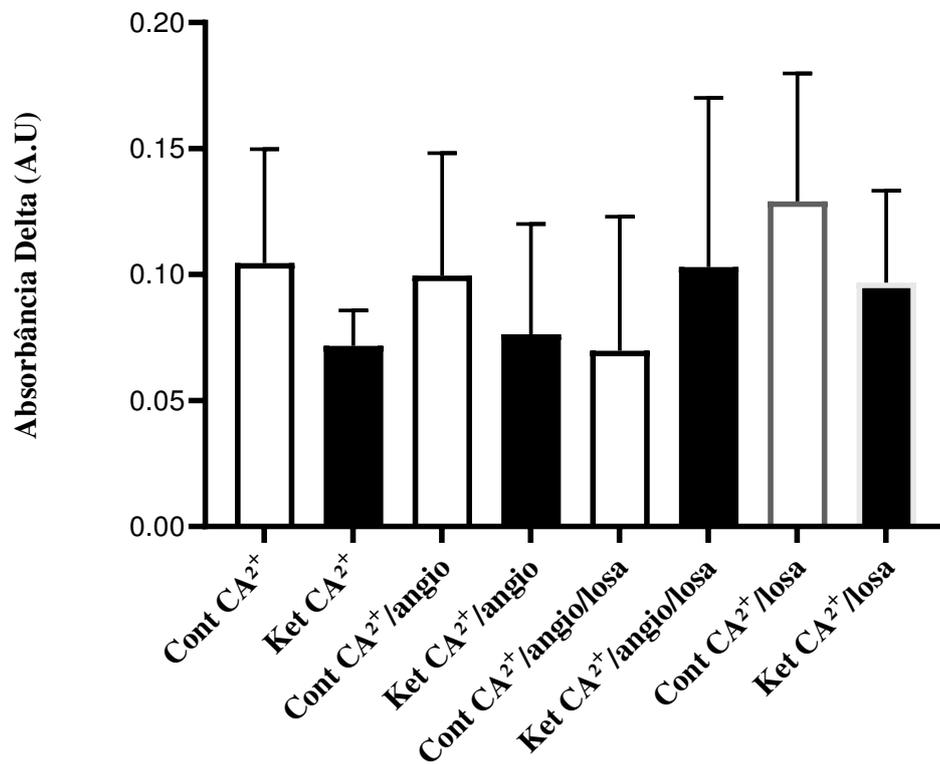
### **6.3 Abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) induzido por cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) *in vitro***

Nas análises *in vitro* esta indução é realizada com  $\text{Ca}^{2+}$  diretamente no isolado de mitocôndrias cerebrais dos camundongos do grupo controle e KET, proporcionando o inchamento da matriz mitocondrial através da ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  a sítios internos da membrana provocando a abertura de um canal hidrofílico transmembranar. A detecção do aumento de volume mitocondrial foi avaliada pelo equipamento de espectrofotômetro, neste método quanto menor for a absorbância é indicativo de maior inchamento das mitocôndrias, revelando que a luz ultrapassou de forma insuficiente devido ao inchamento mitocondrial, e assim podendo ocasionar a ruptura e morte da organela.

Neste teste, foi adicionado aos isolados mitocondriais em corridas distintas, como:

1.  $\text{Ca}^{2+}$ ;
2.  $\text{Ca}^{2+}$  com angiotensina II;
3.  $\text{Ca}^{2+}$  com angiotensina II e losartana;
4.  $\text{Ca}^{2+}$  e losartana.

As comparações entre os grupos não tiveram valores significativos estatisticamente, como também os resultados demonstraram graficamente que o grupo controle e KET não se diferenciaram em relação ao quesito inchamento promovido por  $\text{Ca}^{2+}$ , até mesmo independente da presença de angiotensina II e losartana (Figura 10).

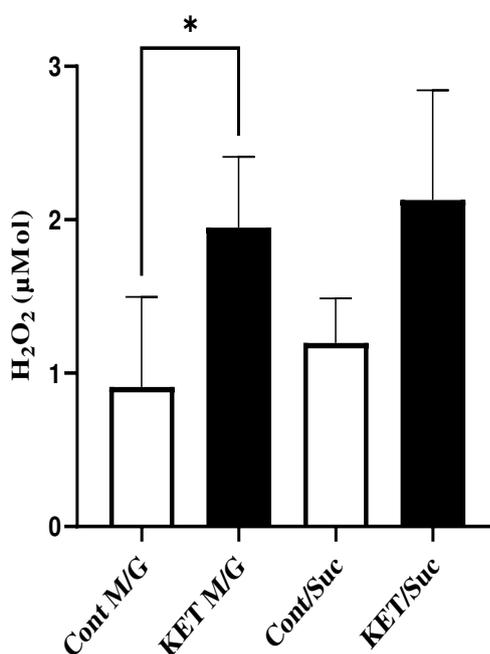
**Figura 10** - Inchamento mitocondrial induzido por cálcio

Avaliações da abertura do mPTP (aumento do volume mitocondrial), acompanhamento da dispersão de luz após a adição de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) em mitocôndrias isoladas de cérebros dos animais do grupo controle e grupo submetido ao modelo de esquizofrenia induzido por cetamina (KET). Delta das absorbâncias. Os valores são apresentados como  $\pm$  erro padrão da média (EPM), n= 8 por grupo.

#### 6.4 Alterações na produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

A dosagem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no isolado de mitocôndrias cerebrais dos grupos controle e KET foi uma etapa realizada após a respiração mitocondrial, justamente porque quanto mais disfunção a mitocôndria apresentar mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode formar, expressando mais estresse oxidativo. Os resultados evidenciaram que o grupo controle e KET na presença do substrato malato e glutamato tiveram uma diferença significativa (P= 0.0162), demonstrando que o grupo KET tem maior produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comparado ao grupo controle (Figura 11). Nos resultados pertinentes aos grupos controle e KET na presença do substrato succinato corroboraram também com o aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do grupo KET.

**Figura 11** - Quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de mitocôndrias isoladas de cérebros

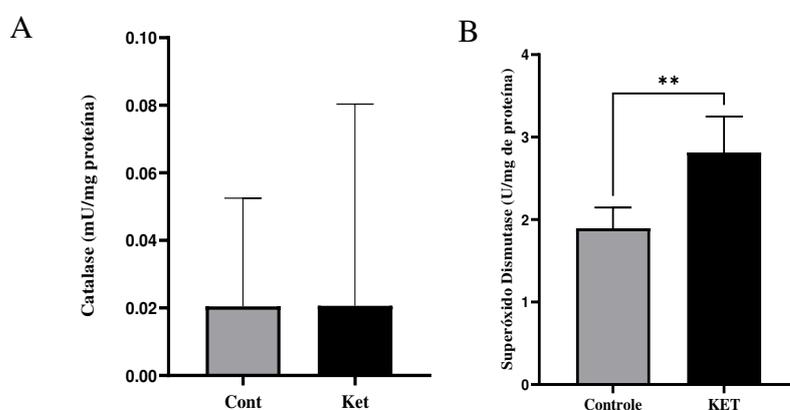


**Quantificação da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em grupo de animais controle e grupo submetido ao modelo de esquizofrenia induzido por cetamina (KET) 20mg/kg.** A relação entre os grupos controle e KET com substratos M/G foi estatisticamente significativa com valor de P<0.05 (\*). Os valores são apresentados como ± erro padrão da média (EPM), n= 8 por grupo.

### 6.5 Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) de frações citosólicas

As atividades das enzimas antioxidantes CAT e SOD são importantes para mensurar se essas enzimas estão exercendo suas funções em diferentes situações experimentais de estresse oxidativo. A quantificação de CAT não mostrou diferenças gráficas e nem estatísticas significativas nos grupos controle e KET (Figura 12A). A atividade da enzima SOD resultou em valor significativo estatisticamente ( $P=0.0025$ ), explanando que o grupo KET quantificou em maior proporção comparado ao grupo controle (Figura 12B).

**Figura 12-** Quantificação da atividade das enzimas CAT e SOD



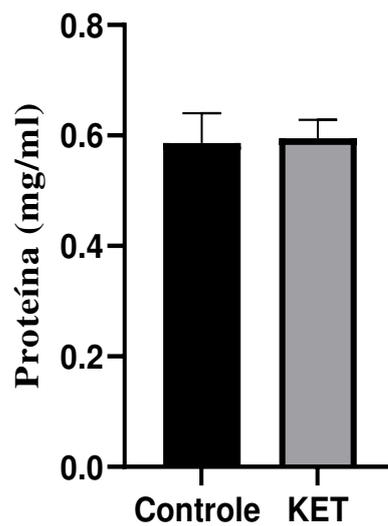
**Atividade de enzimas antioxidantes CAT e SOD em fração citosólica de mitocôndrias isoladas de cérebros dos animais do grupo controle e grupo submetido ao modelo de esquizofrenia induzido por cetamina (KET) 20mg/kg.** Quantificação e atividade da enzima CAT (11A). Quantificação e atividade da enzima SOD (11B), a relação entre os grupos foi estatisticamente significativa com valor de  $P<0.001$  (\*\*). Os valores são apresentados como  $\pm$  erro padrão da média (EPM),  $n= 8$  por grupo.

### 6.6 Teor de proteínas totais e teor de proteínas tiol (sulfidrilas) de frações citosólicas

A importância de quantificar o teor de proteínas totais e sulfidrilas está relacionado a danos oxidativos a proteínas, nesta situação as proteínas totais aumentam e as

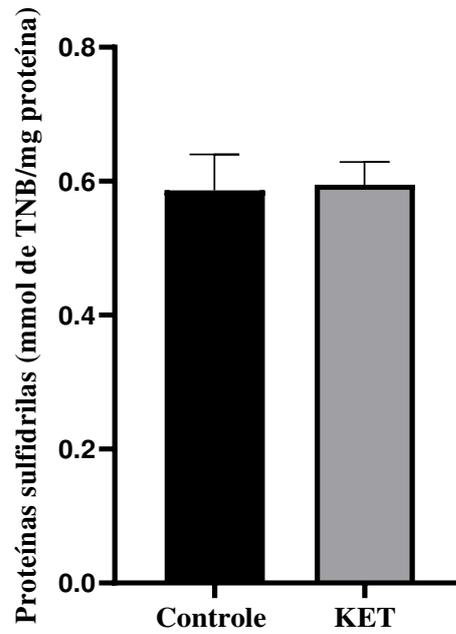
sulfidrila são reduzidas. No teor de proteínas totais e proteínas sulfidrila da fração do citosol não houve alterações estatisticamente significativas dos grupos controle e KET (Figura 13 e 14).

**Figura 13-** Quantificação do teor de proteínas citosólicas



Quantificação do teor de proteína tiol em grupo de animais controle e grupo submetido ao modelo de esquizofrenia induzido por cetamina (KET) 20mg/kg. A relação entre os grupos não foi estatisticamente significativa. Os valores são apresentados como  $\pm$  erro padrão da média (EPM), n= 8 por grupo.

**Figura 14-** Quantificação do teor de proteínas sulfidrilas citosólicas



Quantificação do teor de proteína tiol em grupo de animais controle e grupo submetido ao modelo de esquizofrenia induzido por cetamina (KET) 20mg/kg. Os valores são apresentados como  $\pm$  erro padrão da média (EPM), n= 8 por grupo.

## 7. DISCUSSÃO

No presente estudo conseguimos replicar dados prévios mostrando que a administração repetida de KET induz sintomas tipo positivos da esquizofrenia manifestados como hiperlocomoção e ansiedade através do aumento de cruzamentos dos animais e quantidades de fezes no ambiente avaliativo. A respiração e função mitocondrial prejudicadas, e maior produção de peróxido de hidrogênio, indicaram a presença de estresse oxidativo nos animais após exposição repetida a KET. Contudo, não foram detectadas alterações significativas nos testes de inchamento mitocondrial, enzima catalase, proteínas citosólicas totais e sulfidrilas. Também não observamos interferência significativa do SRA nesta resposta.

A cetamina ao antagonizar os receptores glutamatérgicos NMDA em doses subanestésicas induz sintomas semelhantes a esquizofrenia (MOGHADDAM et al., 2021). Injeções de cetamina em camundongos alteram parâmetros comportamentais como frequência de cruzamentos, levantamentos e autolimpeza (SORCE et al., 2010). A hiperlocomoção do animal no teste de campo aberto relaciona-se ao sintoma positivo ou psicoses da esquizofrenia e está amplamente correlacionada às vias dopaminérgicas e glutamatérgicas no SNC, explicitando fenótipos da esquizofrenia (OMEIZA et al., 2022; 2OCCHIEPPO et al., 2022).

A cetamina provoca efeitos estimulantes e estereotipias pelo envolvimento do núcleo accumbens e estriado, mediado por neurônios dopaminérgicos (IRIFUNE; SHIMIZU; NOMOTO, 1991). É antagonista do receptor NMDA em baixas doses e bloqueia receptores D2 da dopamina. Esta droga, portanto, induz alterações comportamentais, cognitivas, neuroquímicas, do metabolismo cerebral e desequilíbrio da neurotransmissão de glutamato e dopamina que suprime a ação gabaérgica, influenciando em sintomas psicóticos (LI et al., 2022).

Os *groomings* ou autolimpeza avaliados em testes comportamentais dos animais quando elevados estão associados a oscilações na emocionalidade dos animais (SOUSA, 2015). O aumento da defecação na psicose pode estar coligado a disfunção gabaérgica que é retratado em estudos da esquizofrenia, isto afeta o estado de ansiedade e reflete em ação negativa ao sistema entérico, pois ambos estão relacionados (GÓMEZ EGUÍLAZ et al., 2019). Os *rearings* ou levantamentos são representações de exploração do novo ambiente exposto e o aumento nesse parâmetro de avaliação comportamental pode também indicar estresse do animal (JÚNIOR, 2018). Nesse contexto, apesar de não significativo, observamos alterações no número de *rearings* e defecação no grupo tratado com cetamina.

Os resultados apresentados neste trabalho com relação a função e respiração mitocondrial foram importantes para a compreensão de que o modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina causa prejuízos a nível mitocondrial. Na presença de substratos mitocondriais como malato, glutamato e succinato das mitocôndrias do grupo controle tiveram maior desempenho com a adição de ADP no estado 3, etapa onde a mitocôndria deveria ter maior consumo, enquanto as mitocôndrias do grupo cetamina não conseguiram empenho no processo respiratório, revelando disfunção. Este fator pode estar associado a alterações nos complexos funcionais da cadeia respiratória das mitocôndrias, falhas no metabolismo energético, neuroinflamação e estresse oxidativo (RAJASEKARAN et al., 2015). Vale destacar que trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram que a administração repetida de cetamina por 14 dias causa alterações neuroinflamatórias, aumentando a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), um marcador de ativação neutrofílica, bem como aumento dos níveis de interleucina (IL) 4 e IL-6 e da peroxidação lipídica em áreas como o córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo (DA SILVA ARAÚJO et al., 2017).

A cadeia respiratória da mitocôndria é composta por cinco complexos enzimáticos (MAURER; ZIERZ; MÖLLER, 2001). A superexpressão da neurotransmissão dopaminérgica na esquizofrenia reduz a atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, etapa importante para transferência de elétrons, e assim dar seguimento a cadeia de complexos e ao final ter a produção de energia na forma de ATP (BRENNER-LAVIE et al., 2008). Cetamina administrada de forma crônica provoca modificações na cadeia transportadora de elétrons das regiões cerebrais como CPF, estriado e hipocampo. Há também alterações nos complexos enzimáticos da mitocôndria que estão ligadas a hipóxia dessa organela (DE OLIVEIRA et al., 2011).

A fosforilação oxidativa mitocondrial é um sistema de suma importância para produção de ATP e função energética da célula. Estudos demonstram que na esquizofrenia há alterações negativas na fosforilação oxidativa em diversas regiões cerebrais, bem como modificações no tamanho, densidade e morfologia da mitocôndria (REZIN et al., 2009). A disfunção mitocondrial também pode estar associada a genes que codifica o ativador da oxidase D-aminoácido (DAOA), também conhecido como G72, que é um gene envolvido com a patologia da esquizofrenia (MANJI et al., 2012).

ADP é um composto químico que contribui para o aumento do consumo de O<sub>2</sub> e síntese de ATP (WILLIS et al., 2018). Os resultados deste estudo em relação a respiração e função mitocondrial na presença de substratos que favorecem a atividade mitocondrial, demonstram que as mitocôndrias do grupo controle salina consumiram mais O<sub>2</sub> quando

adicionado ADP no percurso da corrida, favorecendo o sucesso respiratório da organela. Na análise *in vitro*, entretanto, as mitocôndrias com cetamina não tiveram tanta diferença na adição de ADP, revelando dificuldade na respiração e falha na função mitocondrial.

Estudos *in vivo* em pacientes psiquiátricos demonstraram através de técnicas de imagens que metabólitos indicativos do pH e energia cerebral revelaram o sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS) disfuncional e declínio dos fosfatos de alta energia, provocando conseqüente acúmulo de ácido láctico e acidificação tecidual (CLAY; SILLIVAN; KONRADI, 2011).

Cada vez mais estudos mostram a disfunção mitocondrial devido a ação dopaminérgica, o que é provado porque a enzima monoamina oxidase (MAO), responsável pelo metabolismo de dopamina, é presente na membrana externa da mitocôndria. Altas concentrações de dopamina no cérebro têm como conseqüência a redução da atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial e de ATP na região estriatal, contribuindo para morte de células neurais (BEN-SHACHAR, 2002). Em estudos *post mortem* e imagens *in vivo*, através da vesícula transportadora de glutamato e das sinapses glutamatérgicas em diferentes regiões cerebrais, as mitocôndrias estão reduzidas em terminais dos axônios e nos neurônios em geral, identificando redução energética cerebral (ROBERTS et al., 2020).

A baixa regulação do gene LYRM4 que codifica proteínas mitocondriais está associado a disfunção cognitiva, contribuindo para o estresse oxidativo e fosforilação oxidativa instável em culturas de células (JABLENSKY et al., 2012). O aumento do estresse oxidativo com conseqüente excesso de EROs, redução de ATP, fosfocreatina e de dinâmica energética são constantemente relatados em pacientes portadores da esquizofrenia (VAN RENSBURG et al., 2022).

A cetamina influencia na produção de EROs e dano oxidativo cerebral, causa prejuízos à neurogênese do hipocampo por causa de alterações oxidativas desenvolvendo os prejuízos cognitivos como relatados na esquizofrenia (SORCE et al., 2010; SAMPAIO et al., 2018). Alguns produtos indicativos de estresse oxidativos são alterados com a administração de cetamina, como aumento dos níveis de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e peroxidação lipídica em regiões cerebrais importantes na esquizofrenia como córtex pré-frontal, hipocampo e estriado (DA SILVA ARAÚJO et al., 2017; MONTE et al., 2013; ZUGNO et al., 2016).

Em modelo de psicose com o bloqueio do receptor NMDA como ocorre com a cetamina foi desvendado que há redução do consumo de oxigênio pela perda da capacidade de produção de ATP através das mitocôndrias e elevação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mesmo com a presença de vários

substratos. Excesso de  $H_2O_2$  está altamente associada ao envelhecimento e neurodegeneração (HASAN; REDZIC; ALSHUAIB, 2013).

As causas estão relacionadas a alterações no DNA mitocondrial, perdas de complexos enzimáticos, alterações estruturais e no sistema transportador de elétrons (MONTEIRO et al., 2020). Se os sistemas de elétrons da mitocôndria não tiver eficiência pode acumular  $H_2O_2$  e este ser convertido em radical hidroxila (OH) que pode aumentar a oxidação das proteínas do grupo tiol pelos radicais livres e comprometer a atividade antioxidante (ALEXANDRE, 2020). Nos achados desse estudo teve o aumento da produção de  $H_2O_2$  no grupo KET, provenientes dos analitos da respiração mitocondrial, onde está correlacionado ao estresse oxidativo.

O poro de transição mitocondrial faz parte da integridade da mitocôndria, a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) causa inchaço mitocondrial, colapso de membrana e liberação do citocromo c. O citocromo c é um sinalizador de apoptose, pois adia a transferência de elétrons do complexo III para o complexo IV, logo eleva a produção de EROs, resultando em dano oxidativo, prejuízo progressivo da substância cinzenta notada na psicose e perda neural como relatada na fisiopatologia da esquizofrenia (FAIZI et al., 2014). A introdução de  $Ca^{2+}$  nas mitocôndrias pode ocasionar estado patológico com desregulação da função neural (MONTEIRO et al., 2020). A atividade do complexo I da CTE pode ser reduzida com a indução excessiva do  $Ca^{2+}$  e conseqüente elevação de EROs, oxidação de grupos sulfidrílicos e da glutatona mitocondrial (KLIMACZEWSKI et al., 2013).

Algumas etapas foram adicionadas no momento de avaliação do inchamento mitocondrial como adição de angiotensina II e losartana, esses componentes foram incluídos para observar se a angiotensina II aumentava a abertura do poro mitocondrial e contribuía mais ainda para entrada de cálcio na organela e possível elevação do inchamento da mitocôndria quando comparada, já a losartana como bloqueadora dos receptores AT1 se esta promoveria a redução do inchamento mitocondrial.

A superexpressão de angiotensina II e ativação do receptor AT1 cerebral está correlacionada a declínio cognitivo, ansiedade e perturbação na plasticidade sináptica em análises eletrofisiológicas de oscilações neurais (GAO et al., 2021). A losartana nesse estudo foi utilizada na forma pura *in vitro*, pois é uma substância bloqueadora de receptores AT1. A losartana exerce efeitos neuroprotetores através da atenuação de IL-1 $\beta$  e GM-CSF, aumentou IL-10 que suprime a inflamação, expressão da tirosina hidroxilase no estriado e locus coeruleus (DANIELYAN et al., 2010). Com a administração de cetamina tem-se o desenvolvimento de sintomas e características da esquizofrenia e com ênfase no antagonismo dos receptores AT<sub>1</sub>, os fármacos estão sendo eficazes em estudos com modelos animais (OCCHIEPPO et al., 2022).

Nesse estudo o parâmetro avaliativo da abertura do mPTP (aumento do volume mitocondrial) após a adição de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) nas mitocôndrias isoladas de cérebros dos animais do grupo controle saudáveis tratados com salina 0,9% e grupo com animais submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por cetamina (KET) 20mg/kg não expressou alterações significativas, mesmo com a adição de angiotensina II e losartana, possivelmente pela grande dispersão dos dados.

O estresse oxidativo é determinado por produção excessiva de EROs e ERNs, que podem causar variação no equilíbrio redox (reações de oxirredução eletroquímica), e consequente disfunção das vias moleculares compensatórias, desta forma, resultando em dano oxidativo (PERKINS; JEFFRIES; DO, 2020). A importância de biomoléculas que atuam sobre os radicais livres, e radical ânion superóxido que é gerado do metabolismo energético normal da mitocôndria, no caso de excesso são prejudiciais ao organismo, para isto existem as defesas de primeira linha, os antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

Pacientes portadores de esquizofrenia e mesmo em tratamento com antipsicóticos tiveram a atividades das enzimas antioxidantes SOD e GSH-Px reduzidas, manifestando o estresse oxidativo com a fisiopatologia da doença (ZHANG et al., 2006). SOD tem importância para proteção e bom funcionamento de células neurais contra os danos oxidativos (MARCHENKO; LEKOMTSEVA; GORBACH, 2021), pois os neurônios são responsáveis pelas atividades do sistema nervoso central e comando de todo o organismo.

As enzimas antioxidantes das mitocôndrias são importantes para desintoxicar a organela dos EROs, como o excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , entretanto, CAT está em menor proporção nas atividades mitocondriais cerebrais (MORRIS et al., 2020). Quando se tem altas produções de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como resultado de produtos da cadeia respiratória mitocondrial as enzimas antioxidantes se expressam em maior proporção, como no caso da SOD que pode elevar-se para suprir as outras enzimas que não estejam desempenhando suas atividades adequadamente.

Os resultados neste estudo sobre as enzimas antioxidantes do fracionamento citosólico revelaram que a enzima CAT em ambos os grupos teve empenho de atividade, e mesmo com a elevada produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , já a SOD mostrou-se significativamente mais elevada no grupo cetamina. Este aumento da SOD consolida a reação orgânica frente a estímulos estressores, pois o tratamento com cetamina por 14 dias estimulou altos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  um produto relacionado ao estresse oxidativo, e estimulou as defesas antioxidantes, abrindo uma hipótese: Se prolongar por mais dias o tratamento de cetamina, será que a SOD e CAT ainda estariam exercendo de forma positiva suas atividades? Abrindo caminhos para novos desenhos experimentais como:

O tratamento prolongado de cetamina e as atividades de outras enzimas antioxidantes envolvidas, também a identificação da expressão dos receptores do sistema renina-angiotensina e o nível da atividade de mitofagia em modelo de esquizofrenia.

O sistema de defesa antioxidante ineficiente e níveis de peroxidação lipídica alterados são evidentes na esquizofrenia (WU; KOSTEN; ZHANG, 2013). O estado redox é determinado através da redução ou oxidação (PERKINS; JEFFRIES; DO, 2020), do grupamento sulfidril (SH) ou tiol (D'ALMEIDA et al., 2019), podendo causar disfunção da atividade de proteínas reguladoras (PERKINS; JEFFRIES; DO, 2020). Existem os tióis não proteicos que são na forma reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e cisteína (CSH), e os tióis proteicos reduzidos (PSH) e oxidados (PSSP), responsáveis por regular a homeostase do estado redox e defesas antioxidantes intracelulares (GRINTZALIS et al., 2022). Em portadores de esquizofrenia as concentrações de proteínas tiol revelaram reduzidas (TOPCUOGLU et al., 2017). Entretanto, nas últimas análises que foram as proteínas sulfidrilas, neste estudo não tiveram níveis reduzidos e nem diferenças entre os grupos.

Este estudo revelou que a cetamina proporcionou disfunção mitocondrial, com redução da atividade do complexo I e II das mitocôndrias cerebrais dos animais tratados com a cetamina, e consequentes maiores níveis de produção de  $H_2O_2$ , revelando o estresse oxidativo. Ampliando novas possibilidades de estudos mitocondriais para área psiquiátrica, incluindo tratamentos de forma oral em animais para análises mitocondriais, bem como testes diretos nas mitocôndrias com substâncias, experimentos mitocondriais com materiais biológicos de portadores da esquizofrenia, análises de proteínas do SRA, dosagem de citocinas pró-inflamatórias, e investigações das vesículas do processo de mitofagia.

As limitações deste estudo foram a redução de animais e testes experimentais devido a atraso ocasionado pela pandemia e uso somente de animais machos.

## 8. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que em modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina, as mitocôndrias dos cérebros têm a função e respiração ineficientes, e maior produção de  $H_2O_2$  determinando o estresse oxidativo, enunciando que a hipótese glutamatérgica causa a disfunção mitocondrial. Os métodos utilizados neste estudo são promissores para ampliar as pesquisas sobre a relação das mitocôndrias cerebrais e a esquizofrenia, ajudando no aprimoramento da fisiopatologia da doença, e assim poder investigar novos mecanismos para alternativas farmacológicas, como os receptores da angiotensina presentes nas mitocôndrias cerebrais e os medicamentos antagonistas desse sistema, a fim de contribuir e avançar na terapêutica desta doença devastadora e incurável.

## REFERÊNCIAS

- ABADIR, P. M.; WALSTON, J. D.; CAREY, R. M. **Subcellular characteristics of functional intracellular renin-angiotensin systems***Peptides*Elsevier, , 1 dez. 2012.
- ABIODUN, O. A.; OLA, M. S. **Role of brain renin angiotensin system in neurodegeneration: An update***Saudi Journal of Biological Sciences*Elsevier, , 1 mar. 2020a.
- ABIODUN, O. A.; OLA, M. S. Role of brain renin angiotensin system in neurodegeneration: An update. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 3, p. 905–912, 1 mar. 2020b.
- ADELA, P. E. et al. Psicofarmacología de la Psicosis: Elección del Fármaco, Adherencia al Tratamiento y Nuevos Horizontes. **Clínica y Salud**, v. 21, n. 3, p. 271–283, 2010.
- ALIZADEH, S. et al. Paraquat induced oxidative stress, DNA damage, and cytotoxicity in lymphocytes. **Heliyon**, v. 8, n. 7, p. e09895, 1 jul. 2022.
- ARCHER, J. **Tests for emotionality in rats and mice: A review***Animal Behaviour*Academic Press, , 1 maio 1973.
- BARBOSA, D. F.; LIMA, C. F. DE. Efeitos do exercício físico em comportamentos relacionados com a ansiedade em ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 22, n. 2, p. 122–125, 2016.
- BARTLEY, C. M.; ROSS, D. A. **Schizophrenia: A Homecoming***Biological Psychiatry*, 2020.
- BEN-SHACHAR, D. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: A possible linkage to dopamine. **Journal of Neurochemistry**, v. 83, n. 6, p. 1241–1251, 2002.
- BERMAN, S. B.; HASTINGS, T. G. Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: Implications for Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 73, n. 3, p. 1127–1137, 1999.
- BITANIHIRWE, B. K. Y.; WOO, T. U. W. **Oxidative stress in schizophrenia: An integrated approach***Neuroscience and Biobehavioral Reviews*Pergamon, , 1 jan. 2011.
- BRADFORD, A. The dopamine and glutamate theories of schizophrenia: A short review. **Current Anaesthesia and Critical Care**, v. 20, n. 5–6, p. 240–241, 2009.
- BRENNER-LAVIE, H. et al. Dopamine modulates mitochondrial function in viable SH-SY5Y cells possibly via its interaction with complex I: Relevance to dopamine pathology in schizophrenia. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1777, n. 2, p. 173–185, 2008.
- CAI, Y. et al. **The neurodevelopmental role of dopaminergic signaling in neurological disorders***Neuroscience Letters*Elsevier, , 10 jan. 2021.
- CALDIROLI, A. et al. Is there an association between inflammatory/anti-oxidant markers and the presence of psychotic symptoms or severity of illness in mood and psychotic disorders? A multi-centric study on a drug-free sample. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, v. 22, p. 100453, 1 jul. 2022.
- CAPT, C.; PASSAMONTI, M.; BRETON, S. The human mitochondrial genome may code for more than 13 proteins. **Mitochondrial DNA**, v. 27, n. 5, p. 3098–3101, 2016.
- CHADMAN, K. K.; YANG, M.; CRAWLEY, J. N. Criteria for validating mouse models of psychiatric diseases. **American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 150, n. 1, p. 1–11, 2009.
- CHEN, Y. L. et al. Physical illnesses before diagnosed as schizophrenia: A nationwide case-control study. **Schizophrenia Bulletin**, v. 46, n. 4, p. 785–794, 2020.
- CLAY, H. B.; SILLIVAN, S.; KONRADI, C. **Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia***International Journal of Developmental Neuroscience*No longer published by Elsevier, , 1 maio 2011.
- CRUZ, B. F. et al. Investigating potential associations between neurocognition/social cognition and oxidative stress in schizophrenia. **Psychiatry Research**, v. 298, p. 113832, 1 abr. 2021.

- CUADRA, A. E. et al. **A current view of brain renin-angiotensin system: Is the (pro)renin receptor the missing link?** *Pharmacology and Therapeutics* Pergamon, , 1 jan. 2010.
- DA SILVA ARAÚJO, T. et al. Reversal of schizophrenia-like symptoms and immune alterations in mice by immunomodulatory drugs. **Journal of Psychiatric Research**, v. 84, p. 49–58, 1 jan. 2017.
- DANIELYAN, L. et al. Protective effects of intranasal losartan in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer disease. **Rejuvenation Research**, v. 13, n. 2–3, p. 195–201, 2010.
- DE LACERDA ALEXANDRE, J. V. et al. Quercetin treatment increases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> removal by restoration of endogenous antioxidant activity and blocks isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 394, n. 2, p. 217–226, 2021.
- DE OLIVEIRA, L. et al. Behavioral changes and mitochondrial dysfunction in a rat model of schizophrenia induced by ketamine. **Metabolic Brain Disease**, v. 26, n. 1, p. 69–77, 2011.
- DE WITTE, L. et al. Cytokine alterations in first-episode schizophrenia patients before and after antipsychotic treatment. **Schizophrenia Research**, v. 154, n. 1–3, p. 23–29, 1 abr. 2014.
- ELKIS, H. A evolução do conceito de esquizofrenia neste século. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, n. suppl 1, p. 23–26, 2000.
- ESTEVINHO, F.; FORTUNATO, J. S. Dopamina e Recetores. **Revista Portuguesa de Psicossomática**, v. 5, p. 21–31, 2003.
- FAIZI, M. et al. **Schizophrenia Induces Oxidative Stress and Cytochrome C Release in Isolated Rat Brain Mitochondria: a Possible Pathway for Induction of Apoptosis and Neurodegeneration** Shaheed Beheshti University of Medical Sciences and Health Services **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**. [s.l: s.n.].
- FARAG, E. et al. The renin angiotensin system and the brain: New developments. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 46, p. 1–8, 1 dez. 2017.
- FILLMAN, S. G. et al. Increased inflammatory markers identified in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 18, n. 2, p. 206–214, 2013.
- FLIPPO, K. H.; STRACK, S. **An emerging role for mitochondrial dynamics in schizophrenia** *Schizophrenia Research* Elsevier, , 1 set. 2017.
- FRANGOU, S. Schizophrenia: More data, less debate. **Schizophrenia Research**, v. 242, p. 25–26, 1 abr. 2022.
- FROHLICH, J.; VAN HORN, J. D. Reviewing the ketamine model for schizophrenia. **Journal of Psychopharmacology**, v. 28, n. 4, p. 287–302, 2014.
- GALES, A.; MAXWELL, S. Cetamina: Evidências Recentes e Usos Atuais. **Anaesthesia - Tutorial of The Week**, v. 381, 2018.
- GANGULY, B. B.; KADAM, N. N. Triplication of HSA21 on alterations in structure and function of mitochondria. **Mitochondrion**, v. 65, p. 88–101, 1 jul. 2022.
- GAO, N. et al. Angiotensin II induces cognitive decline and anxiety-like behavior via disturbing pattern of theta-gamma oscillations. **Brain Research Bulletin**, v. 174, p. 84–91, 1 set. 2021.
- GHAFFARIMOGHADAM, M. et al. A review of behavioral methods for the evaluation of cognitive performance in animal models: Current techniques and links to human cognition. **Physiology & Behavior**, v. 244, p. 113652, 1 fev. 2022.
- GÓMEZ EGUÍLAZ, M. et al. El eje microbiota-intestino-cerebro y sus grandes proyecciones. **Revista de Neurología**, v. 68, n. 03, p. 111, 2019.
- GRINTZALIS, K. et al. Alterations in thiol redox state and lipid peroxidation in the brain areas of male mice during aging. **Advances in Redox Research**, v. 6, p. 100043, 1 dez. 2022.
- HARVEY, P. D. et al. Cognitive impairment and negative symptoms in geriatric chronic schizophrenic patients: A follow-up study. **Schizophrenia Research**, v. 22, n. 3, p. 223–231, 1996.
- HATTORI, S. et al. Behavioral abnormalities and dopamine reductions in sdy mutant mice with

- a deletion in *Dtnbp1*, a susceptibility gene for schizophrenia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 373, n. 2, p. 298–302, 22 ago. 2008.
- HAWRYSH, P. J.; MYRKA, A. M.; BUCK, L. T. Review: A history and perspective of mitochondria in the context of anoxia tolerance. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 260, p. 110733, 1 jun. 2022.
- HAYASHI, R.; KURODA, K.; INADOMI, H. Jumping to conclusions correlates with negative symptoms, poor response inhibition, and impaired functioning in individuals diagnosed with schizophrenia. **Asian Journal of Psychiatry**, v. 71, p. 103068, 1 maio 2022.
- HEARNE, A. et al. Oligomycin-induced proton uncoupling. **Toxicology in Vitro**, v. 67, p. 104907, 1 set. 2020.
- HO, J. K.; NATION, D. A. Cognitive benefits of angiotensin IV and angiotensin-(1–7): A systematic review of experimental studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 92, p. 209–225, 1 set. 2018.
- HOWES, O. D.; KAPUR, S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: Version III - The final common pathway. **Schizophrenia Bulletin**, v. 35, n. 3, p. 549–562, 2009.
- HOWES, O. D.; SHATALINA, E. Integrating the Neurodevelopmental and Dopamine Hypotheses of Schizophrenia and the Role of Cortical Excitation-Inhibition Balance. **Biological Psychiatry**, v. 92, n. 6, p. 501–513, 15 set. 2022.
- IBRAHIM, W. W. et al. Niacin mitigates blood–brain barrier tight junctional proteins dysregulation and cerebral inflammation in ketamine rat model of psychosis: Role of GPR109A receptor. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 119, p. 110583, 20 dez. 2022.
- IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287–293, 1 dez. 2018.
- JABLENSKY, A. et al. Promoter polymorphisms in two overlapping 6p25 genes implicate mitochondrial proteins in cognitive deficit in schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 17, n. 12, p. 1328–1339, 2012.
- JAVITT, D. C. **Glutamate and Schizophrenia: Phencyclidine, N-Methyl-d-Aspartate Receptors, and Dopamine-Glutamate Interactions** International Review of Neurobiology Academic Press, , 1 jan. 2007.
- KEYSERS, C. et al. Emotional contagion and prosocial behavior in rodents. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 26, n. 8, p. 688–706, 1 ago. 2022.
- KONDO, M. A. et al. Dysfunction of mitochondria and GABAergic interneurons in the anterior cingulate cortex of individuals with schizophrenia. **Neuroscience Research**, 23 set. 2022.
- LABANDEIRA-GARCIA, J. L. et al. **Brain renin-angiotensin system and microglial polarization: Implications for aging and neurodegeneration** Frontiers in Aging Neuroscience, 2017.
- LABANDEIRA-GARCIA, J. L. et al. **The intracellular renin-angiotensin system: Friend or foe. Some light from the dopaminergic neurons** Progress in Neurobiology Pergamon, , 1 abr. 2021.
- LASKARIS, L. et al. Brain morphology is differentially impacted by peripheral cytokines in schizophrenia-spectrum disorder. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 95, p. 299–309, 1 jul. 2021.
- LAVOIE, J. L. et al. Localization of renin expressing cells in the brain, by use of a REN-eGFP transgenic model. **Physiological Genomics**, v. 16, p. 240–246, 2004.
- LEDONNE, A.; MERCURI, N. B. Current concepts on the physiopathological relevance of dopaminergic receptors. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, n. February, p. 1–9, 2017.
- LEWIS, D. A. Cortical circuit dysfunction and cognitive deficits in schizophrenia - implications

- for preemptive interventions. **European Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 12, p. 1871–1878, 2012.
- LEZA, J. C. et al. Inflammation in schizophrenia: A question of balance. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 55, p. 612–626, 1 ago. 2015.
- LÓPEZ-MIRABAL, H. R.; WINTHER, J. R. **Redox characteristics of the eukaryotic cytosol***Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*Elsevier, , 1 abr. 2008.
- MA, J. et al. A pilot study of biomarkers of oxidative stress in serum and schizophrenia. **Psychiatry Research**, v. 284, p. 112757, 1 fev. 2020.
- MARCHENKO, M.; LEKOMTSEVA, Y.; GORBACH, T. P.0135 Estimation of antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase in the post-injury period following mild traumatic brain injury. **European Neuropsychopharmacology**, v. 53, p. S97–S98, 1 dez. 2021.
- MAURER, I.; ZIERZ, S.; MÖLLER, H. J. Evidence for a mitochondrial oxidative phosphorylation defect in brains from patients with schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 48, n. 1, p. 125–136, 2001.
- MCCLELLAND, G. B. TISSUE RESPIRATION | Cellular Respiration. **Encyclopedia of Fish Physiology**, v. 2, p. 951–958, 1 jan. 2011.
- MILLER, B. J.; GOLDSMITH, D. R. Inflammatory biomarkers in schizophrenia: Implications for heterogeneity and neurobiology. **Biomarkers in Neuropsychiatry**, v. 1, p. 100006, 1 dez. 2019.
- MINHAS, S. et al. **Mind-Body Connection: Cardiovascular Sequelae of Psychiatric Illness***Current Problems in Cardiology*Mosby, , 4 ago. 2021.
- MOGHADDAM, A. H. et al. Neuroprotective effects of curcumin-loaded nanophytosome on ketamine-induced schizophrenia-like behaviors and oxidative damage in male mice. **Neuroscience Letters**, v. 765, p. 136249, 20 nov. 2021.
- MONTE, A. S. et al. Prevention and reversal of ketamine-induced schizophrenia related behavior by minocycline in mice: Possible involvement of antioxidant and nitrenergic pathways. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 11, p. 1032–1043, 2013.
- MONTEIRO, J. et al. Energization by multiple substrates and calcium challenge reveal dysfunctions in brain mitochondria in a model related to acute psychosis. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 52, n. 1, p. 1–15, 2020.
- MOREIRA, F. A.; GUIMARÃES, F. S. Mecanismos De Ação Dos Antipsicóticos: Hipóteses Dopaminérgicas. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 40, n. 1, p. 63, 2007.
- MORRIS, G. et al. **The interplay between oxidative stress and bioenergetic failure in neuropsychiatric illnesses: can we explain it and can we treat it?***Molecular Biology Reports*, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11033-020-05590-5>>. Acesso em: 13 set. 2022
- NAKAZAWA, K. et al. GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 3, p. 1574–1583, 1 mar. 2012.
- NETO, A. G. D. A. A.; BRESSAN, R. A.; BUSATTO FILHO, G. Physiopathology of schizophrenia: Current aspects. **Revista de Psiquiatria Clinica**, v. 34, n. SUPPL. 2, p. 198–203, 2007.
- NOLFI-DONEGAN, D.; BRAGANZA, A.; SHIVA, S. **Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement***Redox Biology*Elsevier, , 1 out. 2020.
- O'CONNOR, A. T. et al. Roles of Angiotensin III in the brain and periphery. **Peptides**, v. 153, p. 170802, 1 jul. 2022.
- OCCHIEPPO, V. B. et al. Schizophrenia-like enduring behavioral and neuroadaptive changes induced by ketamine administration involve Angiotensin II AT1 receptor. **Behavioural Brain Research**, v. 425, p. 113809, 3 maio 2022.
- ONGALI, B. et al. Angiotensin II type 1 receptor blocker losartan prevents and rescues

- cerebrovascular, neuropathological and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. **Neurobiology of Disease**, v. 68, p. 126–136, 1 ago. 2014.
- OROS-GONZÁLEZ, A. et al. Captopril and losartan attenuate behavioural sensitization in mice chronically exposed to toluene. **Behavioural Brain Research**, v. 418, p. 113640, 10 fev. 2022.
- OUK, M. et al. Associations between brain amyloid accumulation and the use of angiotensin-converting enzyme inhibitors versus angiotensin receptor blockers. **Neurobiology of Aging**, v. 100, p. 22–31, 1 abr. 2021.
- PANOV, A. V. PRACTICAL MITOCHONDRIOLOGY Pitfalls and Problems in Studies of mitochondria with a Description of Mitochondrial Functions. n. March, p. 244, 2014.
- PARK, C.; PARK, S. K. **Molecular links between mitochondrial dysfunctions and schizophrenia** *Molecules and Cells*, 2012.
- PEREIRA, L. C. et al. Mitocôndria como alvo para avaliação de toxicidade de xenobiótico. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 25, n. 1–2, p. 1–14, 2012.
- PINO, O. et al. Neurodevelopment or neurodegeneration: Review of theories of schizophrenia. **Actas Espanolas de Psiquiatria**, v. 42, n. 4, p. 185–195, 2014.
- PINZÓN-PARRA, C. A. et al. Long-term effect of neonatal antagonism of ionotropic glutamate receptors on dendritic spines and cognitive function in rats. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 119, p. 102054, 1 jan. 2022.
- PONCE, F.; FUKUSHIMA, A. R. Aspectos Farmacologicos e Toxicologicos da Cetamina: Uma Revisão de Literatura. **Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics**, v. 6, n. 2, p. 210–227, 2017.
- POWELL, C. M.; MIYAKAWA, T. **Schizophrenia-Relevant Behavioral Testing in Rodent Models: A Uniquely Human Disorder?** *Biological Psychiatry* Elsevier, , 15 jun. 2006.
- PUCHOWICZ, M. A. et al. Oxidative phosphorylation analysis: assessing the integrated functional activity of human skeletal muscle mitochondria—case studies. **Mitochondrion**, v. 4, n. 5–6, p. 377–385, 1 set. 2004.
- QIN, Z. et al. Ketamine's schizophrenia-like effects are prevented by targeting PTP1B. **Neurobiology of Disease**, v. 155, p. 105397, 1 jul. 2021.
- RAJASEKARAN, A. et al. **Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: Pathways, mechanisms and implications** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* Pergamon, , 1 jan. 2015.
- RAMÍREZ-ARMENTA, K. I. et al. Optogenetic inhibition of indirect pathway neurons in the dorsomedial striatum reduces excessive grooming in Sapap3-knockout mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 47, n. 2, p. 477–487, 2022.
- REINER, A.; LEVITZ, J. Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. **Neuron**, v. 98, n. 6, p. 1080–1098, 2018.
- RÉUS, G. Z. et al. The inhibition of the kynurenine pathway prevents behavioral disturbances and oxidative stress in the brain of adult rats subjected to an animal model of schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, p. 55–63, 2 fev. 2018.
- REYNOLDS, G. P.; BEASLEY, C. L. GABAergic neuronal subtypes in the human frontal cortex — development and deficits in schizophrenia. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 22, n. 1–2, p. 95–100, 1 jul. 2001.
- REZIN, G. T. et al. Mitochondrial Dysfunction and Psychiatric Disorders Hypothalamic-pituitary-adrenal mtDNA Mitochondrial deoxyribonucleic acid mRNA Messenger ribonucleic acid MRS Magnetic resonance spectroscopy PCR Polymerase chain reaction PET Positron emission tomography. **Neurochem Res**, v. 34, p. 1021–1029, 2009.
- ROBERTS, R. C. et al. Ultrastructural evidence for glutamatergic dysregulation in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, 1 fev. 2020.
- ROSENFELD, M. et al. Perturbation in mitochondrial network dynamics and in complex I

- dependent cellular respiration in schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 69, n. 10, p. 980–988, 2011.
- ROTARIU, D. et al. **Oxidative stress – Complex pathological issues concerning the hallmark of cardiovascular and metabolic disorders** *Biomedicine and Pharmacotherapy* Elsevier Masson, , 1 ago. 2022.
- SAAVEDRA, J. M. Beneficial effects of Angiotensin II receptor blockers in brain disorders. **Pharmacological Research**, v. 125, p. 91–103, 1 nov. 2017.
- SAKURAI, T. **LOCATION, LOCATION, LOCATION: Location of neuroinflammation is important in pathogenesis of schizophrenia** *Brain, Behavior, and Immunity* Academic Press, , 1 ago. 2020.
- SALMANI, H. et al. Losartan modulates brain inflammation and improves mood disorders and memory impairment induced by innate immune activation: The role of PPAR- $\gamma$  activation. **Cytokine**, v. 125, p. 154860, 1 jan. 2020a.
- SALMANI, H. et al. Losartan modulates brain inflammation and improves mood disorders and memory impairment induced by innate immune activation: The role of PPAR- $\gamma$  activation. **Cytokine**, v. 125, p. 154860, 1 jan. 2020b.
- SAMPAIO, L. R. L. et al. Advantages of the Alpha-lipoic Acid Association with Chlorpromazine in a Model of Schizophrenia Induced by Ketamine in Rats: Behavioral and Oxidative Stress evidences. **Neuroscience**, v. 373, p. 72–81, 1 mar. 2018.
- SANTOS, S. H. S.; ANDRADE, J. M. O. Angiotensin 1–7: A peptide for preventing and treating metabolic syndrome. **Peptides**, v. 59, p. 34–41, 1 set. 2014.
- SCHWARTZ, T. L. et al. Glutamate neurocircuitry: theoretical underpinnings in schizophrenia. 2012.
- SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 96, p. 1–6, 2015.
- SHENG, Z. H.; CAI, Q. **Mitochondrial transport in neurons: Impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration** *Nature Reviews Neuroscience*, 2012.
- SHER, L.; KAHN, R. S. **Suicide in schizophrenia: An educational overview** *Medicina (Lithuania)*, 2019.
- SHIELDS, G. E. et al. Acknowledging Patient Heterogeneity in Economic Evaluations in Schizophrenia: A Systematic Review. **Value in Health**, v. 25, n. 1, p. 147–156, 2022.
- SIBLEY, D. R.; MONSMA, F. J.; SHEN, Y. Molecular Neurobiology of Dopaminergic Receptors. **International Review of Neurobiology**, v. 35, n. C, p. 391–415, 1 jan. 1993.
- SILVA, L. C. C. P. DA et al. O uso de animais de laboratório como modelos experimentais para o estudo de transtornos psiquiátricos. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 1, n. 3, p. 270–278, 2012.
- SILVA, R. S. Caracterização Bioquímica das Doenças Mitocondriais : uma revisão integrativa em teses e dissertações no período de ( 2000 a 2020 ) *Biochemical Characterization of Mitochondrial Diseases : an integrative review of theses and*. v. 2021, n. 1984, p. 1–15, 2021.
- SINGH, A. K.; RANA, H. K.; PANDEY, A. K. The oxidative stress: Causes, free radicals, targets, mechanisms, affected organs, effects, indicators. **Antioxidants Effects in Health: The Bright and the Dark Side**, p. 33–42, 1 jan. 2022.
- STAHL, S. M. Beyond the dopamine hypothesis of schizophrenia to three neural networks of psychosis: Dopamine, serotonin, and glutamate. **CNS Spectrums**, v. 23, n. 3, p. 187–191, 2018.
- TANDON, R.; KESHAVAN, M. S.; NASRALLAH, H. A. Schizophrenia, “Just the Facts” What we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. **Schizophrenia Research**, v. 102, n. 1–3, p. 1–18, 2008.
- TOPCUOGLU, C. et al. Thiol/disulfide homeostasis in untreated schizophrenia patients. **Psychiatry Research**, v. 251, p. 212–216, 1 maio 2017.
- TORIUMI, K. et al. Combined glyoxalase 1 dysfunction and vitamin B6 deficiency in a

schizophrenia model system causes mitochondrial dysfunction in the prefrontal cortex. **Redox Biology**, v. 45, p. 102057, 1 set. 2021.

TRIGGLE, D. J. **Angiotensin II receptor antagonism: Losartan-sites and mechanisms of action***Clinical Therapeutics*Elsevier, , 1 nov. 1995.

TSOI, D. T. Y.; HUNTER, M. D.; WOODRUFF, P. W. R. History, aetiology, and symptomatology of schizophrenia. **Psychiatry**, v. 7, n. 10, p. 404–409, 2008.

UNO, Y.; COYLE, J. T. Glutamate hypothesis in schizophrenia. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 73, n. 5, p. 204–215, 2019.

VADHAN, J. D.; SPETH, R. C. **The role of the brain renin-angiotensin system (RAS) in mild traumatic brain injury (TBI)***Pharmacology and Therapeutics*Pergamon, , 1 fev. 2021.

VALLI, L. G.; SOBRINHO, J. DE A. Mecanismo De Ação Do Glutamato No Sistema Nervoso Central E a Relação Com Doenças Neurodegenerativas the Mechanism of Action of Glutamate in the Central Nervous System and Its Relation With Neurodegenerative Diseases. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**, v. 18, n. 1, p. 58–67, 2014.

VAN RENSBURG, D. J. et al. Reviewing the mitochondrial dysfunction paradigm in rodent models as platforms for neuropsychiatric disease research. **Mitochondrion**, v. 64, p. 82–102, 1 maio 2022.

VANHAUWAERT, R.; BHARAT, V.; WANG, X. Surveillance and transportation of mitochondria in neurons. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 57, p. 87–93, 1 ago. 2019.

VARSHNEY, V.; GARABADU, D. Ang (1–7)/Mas receptor-axis activation promotes amyloid beta-induced altered mitochondrial bioenergetics in discrete brain regions of Alzheimer's disease-like rats. **Neuropeptides**, v. 86, p. 102122, 1 abr. 2021.

VASCONCELOS, G. S. et al. **Alpha-lipoic acid alone and combined with clozapine reverses schizophrenia-like symptoms induced by ketamine in mice: Participation of antioxidant, nitrenergic and neurotrophic mechanisms***Schizophrenia Research*, 2015a.

VASCONCELOS, G. S. et al. Alpha-lipoic acid alone and combined with clozapine reverses schizophrenia-like symptoms induced by ketamine in mice: Participation of antioxidant, nitrenergic and neurotrophic mechanisms. **Schizophrenia Research**, v. 165, n. 2–3, p. 163–170, 1 jul. 2015b.

VASCONCELOS, G. S. et al. Low-dose candesartan prevents schizophrenia-like behavioral alterations in a neurodevelopmental two-hit model of schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 111, p. 110348, 20 dez. 2021a.

VASCONCELOS, G. S. et al. Low-dose candesartan prevents schizophrenia-like behavioral alterations in a neurodevelopmental two-hit model of schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 111, p. 110348, 20 dez. 2021b.

VASCONCELOS, S. M. M. et al. Cetamina: aspectos gerais e relação com a esquizofrenia. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 32, n. 1, p. 10–16, 2005.

VELAKOULIS, D.; WALTERFANG, M. Facts box Mitochondrial disorders and psychosis. p. 229–240, 2019.

VERGE, B. et al. **Mitochondrial DNA (mtDNA) and schizophrenia***European Psychiatry*No longer published by Elsevier, , 1 jan. 2011.

VOLK, D. W. et al. The Role of the Nuclear Factor- $\kappa$ B Transcriptional Complex in Cortical Immune Activation in Schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 85, n. 1, p. 25–34, 2019.

WEI, Q. et al. Oxidative stress-mediated particulate matter affects the risk of relapse in schizophrenia patients: Air purification intervention-based panel study. **Environmental Pollution**, v. 292, p. 118348, 1 jan. 2022.

WHITEHURST, T.; HOWES, O. The role of mitochondria in the pathophysiology of schizophrenia: A critical review of the evidence focusing on mitochondrial complex one. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 132, p. 449–464, 1 jan. 2022.

WILLIS, W. T. et al. Dominant and sensitive control of oxidative flux by the ATP-ADP carrier

in human skeletal muscle mitochondria: Effect of lysine acetylation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 647, p. 93–103, 1 jun. 2018.

WU, J. Q.; KOSTEN, T. R.; ZHANG, X. Y. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 46, p. 200–206, 1 out. 2013.

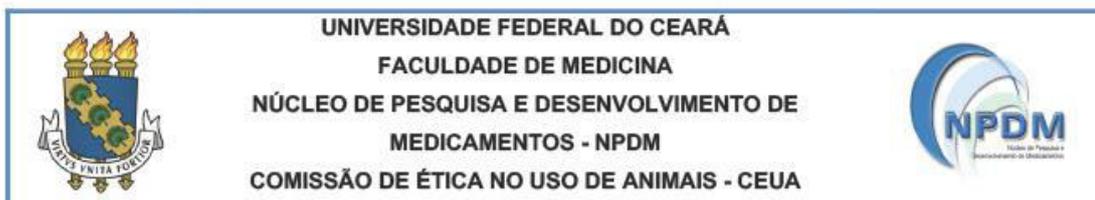
ZHANG, W. et al. **The Role of the GABAergic System in Diseases of the Central Nervous System** *Neuroscience* Pergamon, , 21 ago. 2021.

ZHANG, X. Y. et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different forms of schizophrenia treated with typical and atypical antipsychotics. **Schizophrenia Research**, v. 81, n. 2–3, p. 291–300, 31 jan. 2006.

ZUGNO, A. I. et al. Effect of folic acid on oxidative stress and behavioral changes in the animal model of schizophrenia induced by ketamine. **Journal of Psychiatric Research**, v. 81, p. 23–35, 1 out. 2016.

WHO (World Health Organization). Schizophrenia, 10 de janeiro de 2022 [Acesso em 12 julho de 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia>

## ANEXO



**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ADENDO DO PROJETO DE PESQUISA APROVADO PELA CEUA-NPDM SOB Nº: 25081119-0**

**I. IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO:**

1. **Título:** Estudo do efeito antipsicótico de baixa dose de candesartana em modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina
2. **Pesquisador Responsável:** Danielle Silveira Macêdo Gaspar
3. **Colaborador Principal:** Daniely Sampaio Arruda Tavares

**II. OBJETO DO ADENDO:** Novo título e prorrogação de prazo

**III. BREVE DESCRIÇÃO DO ADENDO:** a pesquisadora justifica que foi necessário a mudança do fármaco Candesartana por Losartana, mas a mudança se dará dentro do mesmo grupo farmacológico. Assim, o novo título do projeto passa a ser: **ESTUDO DO EFEITO ANTIPSICÓTICO DE LOSARTANA: UMA AVALIAÇÃO EM ISOLADOS DE MITOCÔNDRIAS CEREBRAIS DE CAMUNDONGOS SWISS**. Ainda, o novo prazo do projeto passa a ser: **NOVEMBRO DE 2022**.

**IV. PARECER DA CEUA:** A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do NPDM da Universidade Federal do Ceará **APROVOU** o adendo referente ao projeto de pesquisa supracitado em reunião ordinária realizada em 19 de maio de 2022.

Reiteramos que esse Parecer Consubstanciado só terá validade se apresentado juntamente com o Certificado de Aprovação do Projeto de Pesquisa objeto do adendo.

Coordenação da Comissão de Ética e Uso de Animais  
Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos  
Universidade Federal do Ceará