

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC  
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**LARA CANEVER**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÔMEGA-3 EM UM  
MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR  
CETAMINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alexandra Ioppi Zugno.

**CRICIÚMA, 2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C221e Canever, Lara.

Efeito da suplementação de ômega-3 em um modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina. / Lara Canever ; orientadora: Alexandra Ioppi Zugno. – Criciúma : Ed. do Autor, 2012.

67 f. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2012.

1. Ácidos graxos ômega-3. 2. Esquizofrenia. 3. Fator neurotrófico derivado do cérebro. I. Título.

CDD. 22ª ed. 616.8982

## FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada segundo o estilo Vancouver, sendo apresentada em formato tradicional.

Este trabalho resultou da parceria entre o Laboratório de Neurociências (Neurolab) do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (Unesc) e o Laboratório de Psiquiatria Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Sendo assim, os experimentos comportamentais foram realizados no Neurolab da Unesc e as análises bioquímicas no Laboratório de Psiquiatria Molecular da UFRGS.

Os resultados das análises, comportamentais e bioquímicas, foram compartilhados entre os Laboratórios dando origem a este trabalho de Dissertação de Mestrado e ao artigo intitulado “Effects of omega-3 dietary supplement in prevention of positive, negative and cognitive symptoms: a study in adolescent rats with ketamine-induced model of schizophrenia” aceito pela revista “Schizophrenia Research” em agosto de 2012 para posterior publicação.





UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão  
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)**  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

---

## PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentado pela candidata Lara Canever, sob o título “Efeito da suplementação de ômega 3 em um modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina” para obtenção do grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido à candidata, os membros são de parecer pela “APROVAÇÃO” da Dissertação, com conceito A.

Criciúma, SC, 30 de julho de 2012

  
Prof. Dra. Josiane Budni  
Membro Relator

  
Prof. Dra. Patrícia Fernanda Schuck  
Membro Interno

  
Prof. Dra. Carolina Didonei Pederzoli  
Membro Externo

  
Prof. Dra. Alexandra Toppi Zugno  
Orientadora

  
Prof. Dr. Emilio Luiz Streck  
Coordenador do PPGCS



À minha mãe Artília e irmã Leila,  
meus amores e exemplos de  
persistência e coragem. Sem vocês  
ao meu lado, nada disso seria  
possível.

Amo-as infinitamente!





## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por permitir-me concretizar este sonho;

À professora Dr<sup>a</sup> Alexandra Ioppi Zugno, Cuca, pela confiança depositada, pelos ensinamentos compartilhados, pela orientação e amizade;

Aos integrantes do Laboratório de Neurociências, em especial Renata, Pedro, Fernando, Mariana, Daí e Leila. Sem vocês nada disso seria possível;

À professora Clarissa Gama e suas alunas, Bruna e Carolina, do Laboratório de Psiquiatria Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) por terem essencial contribuição nesta pesquisa;

Ao meu noivo, Diego, pela paciência, compreensão e palavras de incentivo; por ser meu refúgio nos momentos difíceis. Obrigada pela companhia, pelo imenso carinho e por estar sempre ao meu lado. Te amo amor!

À minha mãe Artília, por ser meu “Porto Seguro” e por estar presente em todas as horas. Obrigada por seu amor incondicional, por acreditar em mim e permitir que tudo isso se tornasse realidade. Te amo infinitamente!

Em especial, à Leilinha, pela constante presença, por ser minha inspiradora e grande incentivadora neste momento de minha vida. Lê você é “a melhor irmã do mundo”, minha fiel e confidente amiga. Amo você mana!

Ao meu pai Antonio, irmão Jader e cunhada Ângela, pelo apoio e confiança;

Às minhas gerentes Adriana e Sandra e à equipe da Empresa em que trabalho, por terem participado deste momento da minha vida!

E, finalmente, a todos que tornaram este estudo possível e contribuíram de alguma forma. Muito obrigada!



“Nossa maior fraqueza é a desistência. O caminho mais certo para o sucesso é sempre tentar apenas uma vez mais.”

(Thomas A. Edison)



## RESUMO

A esquizofrenia é considerada um transtorno psiquiátrico de desenvolvimento neurológico grave que afeta o indivíduo normalmente na fase jovem. Por este motivo, a prevenção e o diagnóstico precoce tornam-se uma das metas para melhorar os resultados a longo prazo. Os ácidos graxos ômega 3 ( $\omega$ -3) têm demonstrado eficácia para prevenir a conversão da esquizofrenia em uma população risco ultra elevado. O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito da suplementação de  $\omega$ -3 através de parâmetros comportamentais e bioquímicos em um modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina. A pesquisa utilizou 144 ratos Wistar machos com 30 dias de vida que foram separados em dois grupos para administração de  $\omega$ -3 ou veículo durante 15 dias. Posteriormente, esses grupos foram subdivididos em quatro grupos de 12 ratos para intervenção com cetamina ou salina durante 7 dias. A atividade locomotora, o teste de interação social e os testes de memória foram avaliados no 52º dia de vida dos animais. O sangue foi coletado minutos antes dos animais serem mortos e o soro obtido 24 horas depois para avaliação dos níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Os animais foram mortos após os testes comportamentais e o corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo extraídos para análise da expressão de RNAm para BDNF. Os resultados mostraram, para os tempos de 5, 10 e 15 minutos, que houve aumento da atividade locomotora no grupo cetamina comparado ao controle. Observou-se no grupo  $\omega$ -3 mais cetamina que a hiperlocomoção causada pela cetamina foi prevenida aos 10 e 15 minutos mediante administração de  $\omega$ -3. Através do teste de interação social, foi verificado que os animais tratados com cetamina não demonstraram diferença na latência para o início do teste em relação ao grupo controle. No entanto, apresentaram menos contatos entre si, assim como um menor tempo total de interação quando comparados ao controle. O grupo  $\omega$ -3 mais cetamina não apresentou interação social prejudicada. Este estudo mostrou que houve prejuízo significativo de memória imediata, de curta e longa duração no grupo tratado com cetamina em relação ao controle. No grupo  $\omega$ -3 mais cetamina, as memórias imediata, de curto e longo prazo foram preservadas. Os níveis séricos de BDNF foram significativamente maiores no grupo  $\omega$ -3 mais cetamina comparado ao controle,  $\omega$ -3 e grupo cetamina. Os resultados da expressão de RNAm para BDNF mostraram que não houve diferença significativa entre os quatro grupos analisados nas diferentes regiões cerebrais. Estes achados comprovam que a administração de  $\omega$ -3

previne os sintomas positivos, negativos e déficits cognitivos em um modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina na fase prodrômica fornecendo, desse modo, importantes evidências para ensaios clínicos futuros na confirmação do uso de  $\omega$ -3 para prevenir este transtorno. Também reforça o papel benéfico dos ácidos graxos na proteção cerebral de indivíduos em risco ultra elevado para psicose.

Palavras-chave: ácidos graxos ômega 3; esquizofrenia; risco ultra elevado para psicose; modelo animal; BDNF.

## ABSTRACT

Schizophrenia is considered a neurodevelopmental psychiatric disorder severe that usually affects the individual in the young stage. For this reason, prevention and early diagnosis become a goal to improve the long-term results. The omega 3 fatty acids ( $\omega$ -3) have demonstrated efficacy for preventing the conversion of schizophrenia in a population of ultra high risk. The present study aimed to evaluate the effect of supplementation of  $\omega$ -3 through behavioral and biochemical parameters in an animal model of schizophrenia induced by ketamine. The research used 144 male Wistar rats 30 days old that were separated into two groups for administration of  $\omega$ -3 or vehicle for 15 days. Subsequently, these groups were subdivided into four groups of 12 mice for intervention with ketamine or saline for 7 days. The locomotor activity, social interaction test and memory tests were evaluated at day 52 of life of the animals. The blood was collected minutes before the animals were killed and serum obtained after 24 hours to evaluate the levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). The animals were sacrificed after the behavioral tests and striatum, prefrontal cortex and hippocampus extracted for mRNA BDNF expression analysis. The results showed, for the times of 5, 10 and 15 minutes, there was an increase in locomotor activity in the ketamine group compared to control. It was observed in group  $\omega$ -3 plus ketamine that hyperlocomotion caused by ketamine was prevented at 10 and 15 minutes upon administration of  $\omega$ -3. Regarding the social interaction test, it was found that animals treated with ketamine did not show difference in latency to the start of the test compared to the control group. However, showed less contacts with each other, as well as a lower total time of interaction when compared to the control. The group  $\omega$ -3 plus ketamine did not show impaired social interaction. This study showed that there was significant impairment of immediate memory, short and long term in the ketamine treated group compared to control. In group  $\omega$ -3 plus ketamine, memories immediate, short and long term have been preserved. Serum levels of BDNF were significantly higher in  $\omega$ -3 plus ketamine group compared to control,  $\omega$ -3 and ketamine group. The results of the expression mRNA BDNF showed no significant difference among the four groups analyzed in different brain regions. These findings prove that the administration of  $\omega$ -3 prevents the positive symptoms, negative and cognitive impairment in an animal model of schizophrenia induced by ketamine in the prodromal phase, providing thus, important evidence for future clinical trials in confirming the use of  $\omega$ -3 to prevent this disorder. It also

reinforces the beneficial role of fatty acids in brain protection of individuals at ultra high risk for psychosis.

Key-words: omega-3 polyunsaturated fatty acids, schizophrenia, conversion to psychosis, ultra-high risk population, animal model, BDNF.



## LISTA ABREVIATURAS

- ALA - Ácido Linolênico  
ARA - Ácido Araquidônico  
BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês *Brain-derived Neurotrophic Factor*)  
CID-10 - Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde  
COX – Enzima Cicloxigenase  
DHA – Ácido Docosaexaenóico  
DSM IV - Manual de Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais, IV edição da Associação Americana de Psiquiatria  
D<sub>1</sub> - Neuroprotectina Docosanoíde  
D<sub>2</sub> - Receptor de Dopamina tipo 2  
EPA – Ácido Eicosapentaenóico  
GABA – Ácido Gama-animobutírico (do inglês *gamma-aminobutyric acid*)  
LA – Ácido Linoléico  
LOX – Enzima Lipoxigenase  
LTM – Memória de Longa Duração (do inglês *long-term memory*)  
MK-801 – Dizocilpina: antagonista não competitivo do NMDA  
NMDAR – Receptor de Glutamato tipo *N*-metil-*D*-aspartato (do inglês *ionotropic glutamatergic n-methyl-d-aspartate receptor*)  
PLA<sub>2</sub> - Enzima Fosfolipase A<sub>2</sub>  
PUFAs - Ácidos Graxos Polinsaturados de Cadeia Longa ( do inglês *Long chain polyunsaturated fatty acids*)  
RNAm - RNA mensageiro  
SANS - Escala de Sintomas Negativos (do inglês *Scale for the Assessment of Negative Symptoms*)  
SNC - Sistema Nervoso Central  
STM – Memória de Curta Duração (do inglês *short-term memory*)  
SZ - Esquizofrenia (do inglês *schizophrenia*)  
TDAH - Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade  
UHR - Risco Ultra Elevado (do inglês *ultra high risk*)  
ω-3 - Ácidos Graxos da série ômega-3  
ω-6 – Ácidos Graxos da série ômega-6  
ω-9 – Ácidos Graxos da série ômega-9  
5-HT<sub>2</sub> – Receptores Serotoninérgicos



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
1.1 DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA .....	20
1.2 DIAGNÓSTICO E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....	20
1.3 NEUROFISIOPATOLOGIA DA ESQUIZOFRENIA .....	21
<b>1.3.1 Hipótese dopaminérgica</b> .....	<b>22</b>
<b>1.3.2 Hipótese glutamatérgica</b> .....	<b>22</b>
<b>1.3.3 Hipótese fosfolipídica</b> .....	<b>24</b>
1.4 ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS .....	24
<b>1.4.1 PUFAs</b> .....	<b>25</b>
<b>1.4.2 Efeito neuroprotetor do ácido eicosapentaenóico e docosaexaenóico</b> .....	<b>26</b>
1.5 TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA E ÔMEGA-3.....	26
1.6 FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO, ESQUIZOFRENIA E NUTRIÇÃO .....	27
1.7 MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA E CETAMINA.....	29
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>31</b>
3.1 ANIMAIS.....	31
3.2 SUPLEMENTAÇÃO DOS ANIMAIS COM ÁCIDO GRAXO ÔMEGA 3 .....	32
3.3 CETAMINA.....	32
3.4 INSTRUMENTOS DE AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL ...	33
<b>3.4.1 Atividade locomotora</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4.2 Interação social</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4.3 Esquiva inibitória</b> .....	<b>34</b>
3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	34
<b>3.5.1 Preparação das amostras</b> .....	<b>34</b>
<b>3.5.2 BDNF medição</b> .....	<b>35</b>
<b>3.5.3 Expressão gênica de RNAm para BDNF</b> .....	<b>35</b>
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>51</b>
<b>ANEXO A – Protocolo de Aprovação do Comitê de Ética</b> .....	<b>67</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

A esquizofrenia (SZ) é uma doença heterogênea extremamente debilitante (Oliver & Davies, 2009), considerada como um dos mais mórbidos transtornos psiquiátricos (Moghdam & Jackson, 2003). Caracteriza-se por causar grandes mudanças na percepção, pensamento e comportamento dos pacientes por ela atingidos (Becker et al., 2003).

Acomete 1% da população mundial, sendo que 1 a 7 novos casos para cada 10.000 habitantes são diagnosticados a cada ano no mundo (APA, 1994). A incidência da SZ é discretamente maior entre os homens (razão homens/mulheres = 1,4) (McGrath, 2005).

Estudos realizados por Mari & Leitão (2000) mostraram que o transtorno inicia mais cedo em homens e que casos novos antes da puberdade e após os 50 anos de idade são raros. Nas mulheres os sintomas se manifestam, em média 5 anos mais tarde, porém de forma mais branda do que no sexo masculino. O pico de início da doença em homens e mulheres é de 10 a 25 e 25 a 35 anos respectivamente, havendo no sexo feminino um segundo pico de incidência na perimenopausa (Hafner, 1998).

Associado a isso, observa-se um risco aumentado de desenvolvimento da SZ quando há histórico familiar, principalmente parentesco de primeiro grau ou mais de um membro da família afetado (Kendler, 2000).

## 1.2 DIAGNÓSTICO E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O diagnóstico do transtorno é realizado por meio do Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (DSM IV, 2002) e através da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID 10) que diferenciam os sintomas da SZ em positivos, negativos e desorganizados (APA, 1994).

Os sintomas positivos são representados pelas alucinações, delírios, episódios psicóticos e desconfianças que levam o paciente a fuga da realidade (Van, 2003). Os sintomas negativos referem-se ao embotamento afetivo, isolamento social, avolia e anedonia (Simpson et al., 2010). Já o comportamento bizarro, afeto inadequado e desorganização do pensamento podem ser considerados sintomas desorganizados do transtorno (Bickel & Javitt, 2009; Bradford, 2009). O aparecimento dos sinais ocorre entre o final da adolescência ou início da

vida adulta, variando de indivíduo a indivíduo (Graeff & Brandão, 1999; Kagan & Gall, 2007).

Por ser uma doença altamente debilitante de desenvolvimento neurológico grave e afetar o indivíduo num período crítico da vida, normalmente na fase jovem, a prevenção e o diagnóstico precoce para a SZ tem sido uma das metas para melhorar os resultados a longo prazo (Amminger et al., 2011).

Neste contexto, tem-se identificado uma síndrome conferindo risco ultra elevado (UHR) para psicose (Loewy et al., 2011; 2012). Nos últimos quinze anos, foram feitas tentativas para identificar prospectivamente indivíduos na fase prodromática de SZ e outros transtornos psicóticos. A abordagem de UHR, baseada na combinação de fatores conhecidos como risco de traço e estado, tem sido a principal estratégia utilizada. A validação dos critérios de UHR levou em conta a pesquisa preditiva neste grupo, numa tentativa de identificar os fatores de risco clínicos, neurocognitivos e neurobiológicos para o início de psicose. Também considerou uma série de estudos de intervenção nessa população, os quais incluíram o uso de medicamentos antipsicóticos em baixa dose, a terapia cognitiva e o uso de ácidos graxos ômega-3 ( $\omega-3$ ). Apesar de existirem evidências razoáveis sobre a eficácia de estratégias de intervenção específicas, o tipo mais efetivo e sua duração ainda têm que ser determinados (Yung & Nelson, 2011).

Estudos sugerem que terapêuticas não empregadas em indivíduos com perturbações psicóticas possam ser eficazes quando aplicadas na fase UHR de psicose (Berger et al., 2012). Além disso, estas intervenções destinadas a tratar as pessoas jovens que são identificadas em UHR de psicose, podem estar associadas com algumas economias de custo comparadas as não-intervenções específicas (Philips et al., 2009).

### 1.3 NEUROFISIOPATOLOGIA DA ESQUIZOFRENIA

Sabe-se que a etiologia dos transtornos psiquiátricos ainda não é completamente compreendida. Um obstáculo para o entendimento da etiologia é a interação de numerosas variáveis. Neste sentido, a neuroquímica procura explicar os processos fisiopatológicos da maioria dos transtornos biológicos atuais (Ng et al., 2008).

A SZ caracteriza-se por etiologia multifatorial, englobando alterações genéticas, no neurodesenvolvimento e vulnerabilidades ambientais precoces, especialmente sofrimento perinatal (Ayhan et al., 2011). A associação entre estes fatores sugere que o transtorno seja poligênico (Lewis & Lieberman, 2000).

Evidências indicam ainda que a SZ é um transtorno sutil do desenvolvimento e da plasticidade cerebral. Alterações na migração neuronal, sinaptogênese e “poda” neuronal estão associadas ao aparecimento subsequente da doença (Miyamoto et al., 2003).

Os mecanismos fisiopatológicos do transtorno envolvem mudanças no processamento de informações, mas não perda neuronal (Pietersen, 2001). Alterações em diferentes sistemas de neurotransmissores estão envolvidas na fisiopatologia dos sintomas característicos da SZ. Dentre estes, os sistemas dopaminérgico e glutamatérgico são os mais investigados. No entanto, estudos também indicam o envolvimento em outros sistemas, como o ácido gama-aminobutírico (GABA), serotoninérgico, colinérgico e opióide (Carlsson et al., 1999; Abi-Dargham & Laurrelle, 2005), além da hipótese fosfolipídica desenvolvida por Peet, 2008 e Horrobin, 1998.

### **1.3.1 Hipótese dopaminérgica**

Estudiosos afirmam que os sintomas negativos da SZ são decorrentes de um déficit da atividade dopaminérgica mesocortical e os sintomas positivos são consequência da hiperatividade da transmissão dopaminérgica via receptores dopaminérgicos tipo 2 ( $D_2$ ) mesolímbicos (Ross et al., 2007).

Dentre as evidências que reforçam a teoria dopaminérgica destaca-se o fato de os primeiros antipsicóticos, antagonistas de receptores dopaminérgicos, serem eficazes no tratamento dos sintomas positivos da SZ. Além disso, as anfetaminas desencadeiam em animais alterações comportamentais que simulam a sintomatologia positiva da esquizofrenia (Laruelle, 1999; Abi-Dargham & Laruelle, 2005). Assim, Salum & colaboradores (2008) confirmam que a administração aguda de agonistas dopaminérgicos pode precipitar surtos psicóticos em pacientes esquizofrênicos.

Desta forma, duas observações principais sustentam a hipótese dopaminérgica: agonistas de receptores dopaminérgicos do tipo  $D_2$  em uso continuado induzem sintomas característicos da esquizofrenia e toda medicação que é efetiva como antipsicótica necessariamente bloqueia em algum grau os receptores  $D_2$  (Abi Dargham & Laruelle, 2005).

### **1.3.2 Hipótese glutamatérgica**

Além da dopamina, outros neurotransmissores foram apontados como interferentes na fisiopatologia da SZ, sendo o glutamato um dos mais estudados nesta patologia (Bradford, 2009).

O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) é importante para a migração neuronal e sinaptogênese, estando ainda envolvido em diferentes processos cognitivos relacionados à memória e percepção (Dingledine et al., 1999; Moghaddam & Jackson, 2003; Bradford, 2009). Tais processos são gravemente afetados no curso do transtorno sugerindo assim, que alterações na atividade dos receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) podem estar relacionadas aos déficits de memória presentes na esquizofrenia (Newcomer et al., 1999; Bickel & Javitt, 2009).

Pesquisas reforçam que dentre as evidências que corroboram a participação do glutamato na fisiopatologia da SZ, encontram-se os níveis diminuídos de glutamato no líquido de portadores do transtorno (Kim et al., 1980; Bradford, 2009). Além disso, sabe-se que dois fármacos antagonistas do receptor glutamatérgico NMDA, a fenciclidina e a cetamina, induzem sintomas semelhantes aos observados na SZ (Park & Holzman, 1992; Krystal et al., 1994) como sinais psicóticos, sintomas negativos e déficits cognitivos (Morgan et al., 2004).

Estes achados fundamentam a hipótese de que perturbações na neurotransmissão do glutamato, principalmente no lobo frontal, estariam subjacentes à neurofisiopatologia da SZ (Javitt & Zukin, 1991; Enomotto & Floresco, 2009). Desta forma, na maioria das teorias glutamatérgicas, o papel central do glutamato associa-se à hipofunção dos receptores glutamatérgicos NMDA (Newcomer et al., 1999, Lindsley et al., 2006, Javitt, 2007, Krivoy et al., 2008; Amann et al., 2009).

No entanto, sugere-se que a excitotoxicidade neural devido ao excesso de glutamato também tem um papel na SZ contribuindo para um possível processo neurodegenerativo da esquizofrenia. Ainda, a hiperatividade dos neurônios glutamatérgicos em diferentes regiões cerebrais, incluindo córtex pré-frontal, estaria relacionada aos sintomas positivos, cognitivos e manifestações emocionais do transtorno (Krystal et al., 2003; Moghaddam & Jackson, 2003; Paz et al., 2008).

Neste contexto, enfatiza-se o importante papel da interação entre glutamato e dopamina na fisiopatologia da SZ, sugerindo enfim que a hiperfunção dopaminérgica seria secundária à hipofunção dos receptores glutamatérgicos NMDA no transtorno (Jentsch & Roth, 1999; Bickel & Javitt, 2009; Bradford, 2009).



### 1.3.3 Hipótese fosfolipídica

Estudiosos desenvolveram a hipótese fosfolipídica na SZ sugerindo que este e outros transtornos psiquiátricos, assim como doenças neurodegenerativas, poderiam resultar de anormalidades na estrutura fosfolipídica da membrana neuronal (Peet, 2008; Horrobin, 1998).

Os ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (PUFAs) caracterizam-se como os maiores componentes estruturais da membrana celular fosfolipídica e em pacientes esquizofrênicos estariam alterados (Peet, 2008). Pesquisas mostraram que nestes indivíduos ocorre uma redução na cadeia longa destes ácidos, em especial no eicosapentaenóico (EPA), podendo esta disfunção do metabolismo lipídico estar envolvida na etiologia deste transtorno (Horrobin et al., 1994; Amminger et al., 2010).

Sabe-se que a composição dos ácidos graxos da membrana fosfolipídica neuronal está diretamente relacionada à ingestão alimentar do indivíduo (Haag, 2003). Além disso, autores sugerem que o perfil destes ácidos na membrana neuronal afeta os eventos fisiológicos normais do cérebro podendo, conseqüentemente, induzir mudanças neurofisiológicas, cognitivas, além de alterações comportamentais variadas. Resumidamente, os ácidos graxos podem modular a função dos receptores colinérgicos, nicotínicos, dopaminérgicos e glutamatérgicos (Yehuda et al., 1999)

Estudos recentes salientam ainda a possibilidade do  $\omega$ -3 interagir com o sistema dopaminérgico e serotoninérgico, uma vez que ambos estão associados à fisiopatologia da SZ através da modulação do receptor acoplado ao ácido araquidônico livre (Piomelli et al., 1991; Amminger et al., 2010).

Amminger et al. (2010) e Berger et al. (2008) reforçam que a glutatona, importante antioxidante, pode estar diminuída na SZ. Em contrapartida, o EPA parece aumentar a glutatona no lobo temporal em pacientes esquizofrênicos num primeiro episódio de psicose, protegendo assim os neurônios da excitotoxicidade e estresse oxidativo, característicos em pacientes com este transtorno. Além disso, distúrbios no metabolismo de aminoácidos também podem estar implicados na fisiopatologia da SZ, principalmente em relação à síntese prejudicada de serotonina no SNC (Van der et al., 2005; Lakhan & Vieira, 2008).

## 1.4 ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS

O interesse dos pesquisadores sobre os benefícios dos ácidos graxos, em especial os polinsaturados, iniciou quando se observou que os esquimós da Groenlândia apresentavam baixa incidência de doenças cardiovasculares, porém uma alimentação elevada em gorduras. Esta população consumia peixes de águas frias e profundas, abundantes em PUFA's (Kromhout et al., 1985). Essas observações despertaram ainda mais o interesse e o desenvolvimento de pesquisas sobre os possíveis efeitos terapêuticos e/ou preventivos dos ácidos graxos em uma série de condições clínicas como doenças cardiovasculares, artrite reumatóide, asma e outras patologias (Simopoulos, 2002).

#### 1.4.1 PUFA's

Os ácidos graxos com duplas ligações nos carbonos ômega-3 ( $\omega-3$ ), ômega-6 ( $\omega-6$ ) e ômega-9 ( $\omega-9$ ) são fundamentais ao bom funcionamento do organismo humano, no entanto, não podem ser sintetizados endogenamente. Por esse motivo, são denominados essenciais e devem ser obtidos através da alimentação para que possam ser aproveitados pelos tecidos corporais. Os principais representantes são o ácido linolênico ( $\omega-3$  - ALA 18:3) e o ácido linoléico ( $\omega-6$  - LA 18:2). Por meio da ação de enzimas específicas no fígado, estes dão origem aos PUFA's, compostos com importante papel no processo inflamatório e defesa do organismo (Haag, 2003; Marszalek & Lodish, 2005).

O  $\omega-3$  está presente em óleos vegetais como linhaça, canola e soja, sendo muito abundante também em sementes (linhaça, nozes e soja), além de vegetais verdes folhosos (Heird & Lapillonne, 2005). Deste ácido derivam os ácidos eicosapentaenóico (EPA 20:5) e docosaexaenóico (DHA 22:6), ambos encontrados em peixes e óleos de peixes como sardinha, salmão, bagre, atum e cavala (Covington, 2004).

O  $\omega-6$  é amplamente encontrado em óleos vegetais e pode ser convertido ao ácido araquidônico (ARA 20:4) (Hansen et al., 1962; Burr, 1981). O ARA é abundante nos fosfolipídios de membranas celulares e desempenha papel imunológico, dando origem a mediadores inflamatórios denominados eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos). Os principais sintomas de sua deficiência são retardo de crescimento, lesões de pele, infertilidade, esteatose hepática e polidipsia, entre outros (Marszalek & Lodish, 2005).

Os ácidos graxos essenciais  $\omega-3$  e  $\omega-6$  competem pelas mesmas enzimas que os alongam (elongases) e dessaturam (dessaturases) no fígado para dar origem aos seus respectivos PUFA's. Por esta razão,

estes ácidos devem estar em equilíbrio na alimentação. Pesquisas mostraram que uma relação de  $\omega$ -6: $\omega$ -3 de 5:1 é a mais adequada para que ambos tenham seu melhor aproveitamento pelo organismo. Ressalta-se que o mesmo sistema enzimático presente no fígado também é encontrado em astrócitos no SNC auxiliando assim na garantia do suprimento de  $\omega$ -3, principalmente, ao tecido nervoso (Heird & Lapillonne, 2005; Marszalek & Lodish, 2005).

### **1.4.2 Efeito neuroprotetor do ácido eicosapentaenóico e docosaexaenóico**

O mecanismo proposto para os benefícios dos PUFAs parece estar relacionado à incorporação destes nas membranas celulares, promovendo mudanças na sua fluidez e função, bem como alterações na expressão gênica e produção de eicosanóides (Riediger et al., 2009). Os fosfolipídios do EPA e DHA são liberados da membrana celular pela ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) sendo metabolizados por duas vias. A primeira delas envolve as enzimas cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) e a segunda, a via das resolvinas e protectinas (Mickleborough et al., 2003).

Recentemente pesquisas mostraram que o DHA, liberado das membranas celulares mediante a ativação da enzima PLA<sub>2</sub> quando em situações de dano neuronal, origina um composto denominado neuroprotectina D<sub>1</sub>, um docosanóide com importante papel neuroprotetor no SNC (Bazan, 2006; Lukiw & Bazan, 2008).

Estudos também têm demonstrado que o DHA é capaz de proteger ratos jovens contra eventos de excitotoxicidade, como convulsão e isquemia (Hogyes et al., 2003; Belayev et al., 2005; Strokin et al., 2006; Bas et al., 2007). Em humanos, o DHA parece exercer um efeito neuroprotetor, à medida que baixos níveis deste ácido graxo foram associados a doenças neurodegenerativas como Alzheimer (Soderberg et al., 1991; Schaefer et al., 2006).

A deficiência dietética e baixos níveis endógenos de  $\omega$ -3 estão associados a um pior prognóstico de doenças psiquiátricas. Estudo clínico evidenciou ainda que a suplementação de  $\omega$ -3 mostrou-se benéfica em pacientes depressivos, esquizofrênicos e com transtorno de humor bipolar (Peet & Stokes, 2005).

## **1.5 TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA E ÔMEGA-3**

O tratamento da SZ, particularmente dos sintomas positivos como psicose e agitação, são mais eficientemente acompanhados por antipsicóticos. Atualmente, novos antipsicóticos atípicos têm apresentado melhor ação terapêutica contra os sinais negativos e déficits cognitivos, visto que estes sintomas são difíceis de tratar. Todavia, o tratamento com ambos típicos, bem como antipsicóticos atípicos apresentam sérios efeitos colaterais, levando a significativa perda de qualidade de vida no paciente esquizofrênico. Desse modo, considera-se fundamental o desenvolvimento de alternativas ou estratégias terapêuticas adjuvantes que possam intensificar a ação dos antipsicóticos e reduzir seus efeitos colaterais (Arvindakshan et al., 2003).

Pesquisa evidenciou que o  $\omega$ -3 pode reduzir os sintomas da SZ por suas propriedades neuroprotetoras sem, entretanto, apresentar efeitos adversos clinicamente relevantes. Este ácido graxo parece ser um candidato ideal indicado na prevenção em indivíduos jovens submetidos ao risco de psicose, no qual o uso de medicação antipsicótica é controversa (Amminger et al., 2010).

Estudo realizado recentemente concluiu que o  $\omega$ -3 reduz o risco de progressão do transtorno psicótico e pode ser uma estratégia eficiente e segura indicada na prevenção em pessoas jovens com prévios estados psicóticos. Além destas vantagens, os autores observaram excelente tolerabilidade e melhor aceitação do suplemento pelos pacientes quando comparado a medicamentos tradicionais, além do custo relativamente baixo do  $\omega$ -3 e seus efeitos gerais benéficos à saúde (Amminger et al., 2010).

## 1.6 FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO, ESQUIZOFRENIA E NUTRIÇÃO

Sabe-se que o BDNF é a neurotrofina mais amplamente distribuída no SNC, sendo expressa significativamente no córtex pré-frontal e hipocampo (Pezawas et al., 2004). O hipocampo, no entanto, contém os mais altos níveis de fatores neurotróficos, os quais são determinantes para a plasticidade neuronal (Suzuki et al., 1995).

O BDNF influencia diretamente a sobrevivência, diferenciação, sinaptogênese e manutenção neuronal (Webster et al., 2006) e parece ainda estar envolvido na ativação neuronal no hipocampo (Hohn et al., 1990). Também está relacionado com o desenvolvimento e modulação do sistema dopaminérgico (Shoval & Weizman, 2005).

Evidências sugerem que o BDNF tem importante papel na fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos, incluindo depressão e SZ

(Angelucci et al., 2005). Alterações nos níveis de BDNF têm sido reportadas em muitos estudos com pacientes em um primeiro episódio de SZ, provavelmente refletindo a associação entre BDNF e a patogênese do transtorno (Buckley et al., 2007; Rizos et al., 2008; Jindal et al., 2010; Green et al., 2011).

Dados da literatura indicam que a síndrome metabólica está frequentemente aumentada em pacientes esquizofrênicos (Peet, 2006). Neste sentido, a relação entre síndrome metabólica e SZ foi recentemente confirmada num estudo incluindo pacientes não medicados que desenvolveram o primeiro episódio do transtorno e apresentaram resistência à insulina e aumento da adiposidade visceral comparado ao grupo controle (Ryan et al., 2003).

É sabido que a alimentação de indivíduos esquizofrênicos tem qualidade nutricional inferior à dieta da população em geral. Pacientes com esquizofrenia apresentaram dieta com alto nível de gordura saturada e açúcar e baixa ingestão de alimentos saudáveis como frutas, verduras e, conseqüentemente, uma dieta pobre em fibras e antioxidantes (McCreadie et al., 1998; Brown et al., 1999).

Outro estudo alimentar realizado no Reino Unido comparando pessoas saudáveis de diferentes faixas etárias demonstrou que indivíduos jovens, entre 19 e 24 anos de idade, apresentaram alto consumo de fritura, hambúrguer, refrigerante e baixa ingestão de peixe e óleo de peixe em relação aos indivíduos de maior idade (McCreadie et al., 1998).

Nesse contexto Peet, 2004 sugere que a dieta moderna pode favorecer o desenvolvimento da SZ, uma vez que estudo recente de nutrição na população em geral, enfatiza perspectivas nada positivas quando se relaciona alimentação e SZ. O autor ainda reforça a hipótese de que níveis reduzidos de BDNF cerebrais têm importância etiológica na SZ, contribuindo para ambas, anormalidades de neurodesenvolvimento e resistência à insulina.

Pesquisa comprovou também que fatores nutricionais, particularmente o alto consumo de açúcar, gorduras e uma dieta deficiente em  $\omega-3$ , podem interagir com o BDNF e provocar sintomas esquizofrênicos em indivíduos predispostos (Peet, 2004). Em contrapartida, uma alimentação adequada em ácidos graxos poderia ativar as vias metabólicas e aumentar os níveis de BDNF (Balanza-Martinez et al., 2011).

No entanto, sabe-se que o efeito dos PUFAs, como EPA e DHA, associado ao BDNF ainda é pouco elucidado, havendo a necessidade de

mais pesquisas que encontrem respostas a questionamentos não bem esclarecidos (Peet, 2004).

## 1.7 MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA E CETAMINA

O modelo animal de SZ pode ser induzido por fármacos como anfetamina, cetamina e fenciclidina, as quais simulam manifestações comportamentais em animais semelhantes aos sintomas da SZ em humanos (Angrist et al., 1974; Hetem et al., 2000). Tais sinais incluem quatro dimensões principais: hiperlocomação, estereotipia, deficiência no processamento de informações, comprometimento das funções cognitivas (memória de trabalho e atenção) e interação social prejudicada (Bubenikova et al., 2008).

O cloridrato de cetamina referenciado como uma substância dissociativa é usada para fins de anestesia com efeito hipnótico e características analgésicas (Vasconcelos et al., 2005). Provoca perda sensorial marcante, analgesia e paralisia do movimento, assim como amnésia sem perda real da consciência (Morgan et al., 2004; Rang et al., 2004). A cetamina age como antagonista não-competitivo do receptor glutamatérgico NMDA, encontrado especialmente nas regiões do hipocampo e córtex cerebral – áreas cruciais para os processos de memória e cognição em humanos (Morgan et al., 2004).

O modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina pode ser considerado mais completo por sua capacidade em mimetizar os sintomas negativos, positivos e cognitivos do transtorno (validade de face), já tendo sido relatada sua validade de constructo (Becker et al., 2003) e validade preditiva (Becker & Grecksh, 2004). Os estudos comprovam que o modelo de cetamina fornece um novo olhar para ambas as teorias de transmissão glutamatérgica e dopaminérgica da SZ (Vollenweider et al., 2000).

Como a cetamina apresenta propriedades já descritas e ainda pode causar estresse oxidativo em modelo animal (De Oliveira et al., 2009; De Oliveira et al., 2011), essa droga foi eleita como condição neste estudo para induzir a SZ.

Através das evidências apresentadas e devido à necessidade de novas pesquisas avaliarem a relação  $\omega$ -3, SZ e BDNF, o presente estudo teve como enfoque principal analisar o possível efeito preventivo, bem como a ação terapêutica do  $\omega$ -3 por meio da suplementação deste ácido graxo em um modelo animal de SZ induzido por cetamina.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação de ômega 3 através de parâmetros comportamentais e bioquímicos em um modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da suplementação de ômega 3 em ratos Wistar através do teste campo aberto (*open field*) no modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina;

Avaliar o efeito da suplementação de ômega 3 em ratos Wistar através da interação social entre os animais no modelo de esquizofrenia induzido por cetamina;

Avaliar o efeito da suplementação de ômega 3 em ratos Wistar através da esQUIVA inibitória no modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina;

Avaliar o efeito da suplementação de ômega 3 em ratos Wistar no nível sérico de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina;

Avaliar o efeito da suplementação de ômega 3 na expressão em RNAm para BDNF em estruturas cerebrais de ratos Wistar no modelo de esquizofrenia induzido por cetamina.

### 3 METODOLOGIA

Os experimentos comportamentais foram realizados no Laboratório de Neurociências (Neurolab) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (Unesc) e as análises bioquímicas no Laboratório de Psiquiatria Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Estes procedimentos seguiram as recomendações internacionais para o cuidado e uso de animais de Laboratório, considerando também as recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC). O presente estudo foi desenvolvido após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA) da Unesc mediante protocolo número 14/2012.

Todos os equipamentos, reagentes e drogas necessárias para a execução deste projeto estavam disponíveis ao proponente, não havendo critérios aparentes para suspensão ou encerramento da pesquisa.

#### 3.1 ANIMAIS

Esta pesquisa utilizou ratos Wistar machos jovens com 30 dias de vida, pesando entre 80g e 150g procedentes do Biotério da Unesc. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado (22°C) com ciclos claro-escuro de 12 horas, água e alimentação padrão livre. O estudo empregou um total de 144 animais, divididos inicialmente em quatro grupos de 12 ratos. 1) ômega 3 e salina; 2) ômega 3 e cetamina; 3) veículo e salina; 4) veículo e cetamina. Os animais utilizados no estudo foram separados randomicamente em grupos para posterior realização de testes comportamentais e análises bioquímicas.

O sangue foi retirado minutos antes dos animais serem mortos e o soro obtido 24 horas depois, devido processo de homogeneização das amostras.

Ao término dos testes comportamentais, os animais foram mortos por decapitação e as estruturas cerebrais (corpo estriado, hipocampo e córtex pré-frontal) removidas cuidadosamente para subsequente análise bioquímica.



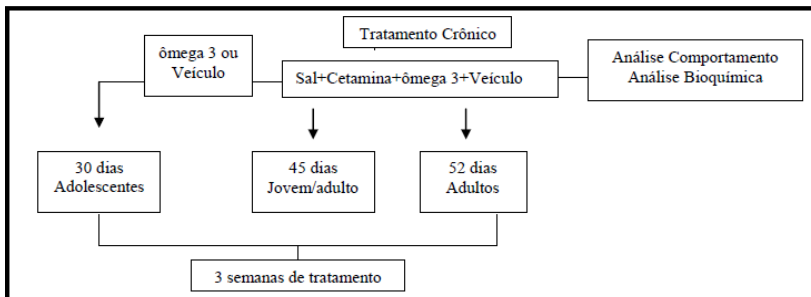


Figura 1: Desenho experimental desta pesquisa.

O descarte dos animais utilizados no experimento realizou-se através do acondicionamento em saco branco leitoso, sendo que estes foram encaminhados ao freezer para conservação na Universidade. Após conservação, os sacos foram coletados e transportados por empresa terceirizada. Os resíduos foram tratados fisicamente e depois encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos basearam-se na RDC nº 306/2004 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

### 3.2 SUPLEMENTAÇÃO DOS ANIMAIS COM ÁCIDO GRAXO ÔMEGA 3

O ácido graxo  $\omega$ -3 foi administrado ao meio dia na dose única de 0,8g/kg/peso/dia por via oral, através do método de gavagem. O tratamento iniciou em animais jovens, prosseguindo até a fase adulta. O tempo total de suplementação correspondeu a 22 dias.

As cápsulas de  $\omega$ -3 continham 1200mg de óleo de peixe, importante fonte deste ácido graxo polinsaturado. Também eram constituídas por ácido graxo polinsaturado EPA (ácido eicosapentaenóico - 18%) e DHA (ácido docosaexaenóico - 12%).

O veículo foi selecionado como placebo por ser uma substância inerte e não causar impacto no metabolismo do  $\omega$ -3. Este foi administrado na mesma concentração e método que o ácido graxo.

### 3.3 CETAMINA

A dose de cetamina correspondeu a 25 mg/kg/dia, preparada em solução salina no volume de 1  $\mu$ l/100g e administrada intraperitonealmente pela manhã (Becker et al., 2003; Imre et al., 2006;

Tomiya et al., 2006). Esta dose de cetamina é utilizada para mimetizar alguns sintomas psicóticos em animais, tais como a hiperlocomoção, estereotipia e embotamento afetivo (Hunt et al., 2006). O principal intuito do estudo ao suplementar os animais com ácido graxo  $\omega$ -3 e administrar doses de cetamina foi verificar se este ácido graxo atua na prevenção da SZ induzida pela droga.

### 3.4 INSTRUMENTOS DE AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

#### 3.4.1 Atividade locomotora

A atividade locomotora foi avaliada em um N de 12 animais por grupo (ômega 3, veículo, cetamina e salina) 30 minutos após a última injeção de cetamina. Utilizou-se o Monitor de Atividade para quantificar as alterações comportamentais nos animais induzidas pela cetamina e possivelmente prevenidas pelo  $\omega$ -3.

Esta atividade foi realizada em um monitor de 40 x 60 cm de dimensão cercado por paredes de acrílico com aproximadamente 50 cm de altura. Este monitor é circundado por 6 barras paralelas, sendo que cada barra apresenta 16 sensores infravermelhos que detectam a posição exata do rato em movimento avaliando, dessa forma, o comportamento detalhado do animal. Os animais foram avaliados durante 15 minutos (De Oliveira et al., 2009).

As informações detectadas pelos sensores foram transmitidas para um computador através do software *Open Source Versão Interbase 6.01* (Atividade Monitor – Insight Laboratório Equipamentos, Ribeirão Preto – SP) para posterior análise estatística.

#### 3.4.2 Interação social

A interação social prejudicada é uma característica comportamental de modelos animais com desordens de espectro de autismo e SZ (Mohn et al., 1999; Schneider & Przewlocki, 2005; Diccico-Bloon et al., 2006; Moldin et al., 2006).

A interação social foi avaliada em ratos submetidos a doses sub-anestésicas de cetamina (25mg/kg). Os animais foram testados em ambiente claro/escuro e pouco conhecido em campo aberto. No dia do experimento os animais ficaram isolados socialmente em caixa de material de plástico mensurando 43 x 28 x 15 cm por três horas e trinta minutos antes do experimento. A tarefa consistiu em colocar dois animais do mesmo grupo randomizados em gaiolas durante 15 minutos.

O comportamento social foi avaliado de par em par e não individualmente. O tempo de latência para a primeira interação, o número de contatos sociais e o tempo total de contato foram mensurados (Niesink & Van Ree, 1989; Schneider & Przewlocki, 2005).

### **3.4.3 Esquiva inibitória**

A avaliação da esquiva inibitória iniciou 24 horas após a última injeção de cetamina, utilizando um N de 12 ratos (ômega 3, veículo, cetamina e salina).

A esquiva inibitória consiste em uma caixa de acrílico na qual o piso é formado por barras paralelas de metal. Uma plataforma encontra-se fixada junto à parede esquerda do aparelho (Quevedo et al., 1997; Roesler et al., 2003). Na sessão de treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e mediu-se o tempo que os ratos levaram para descer com as quatro patas deste local. Imediatamente após descer da plataforma, o animal recebeu um choque de 0,4 mA durante 2 segundos. O treino, denominado latência, caracteriza-se por ser um parâmetro clássico de retenção de memória.

Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e o tempo que este levou para descer (latência) foi cronometrado, entretanto, não foi administrado o choque. Os intervalos entre o treino e o teste foram mensurados imediatamente após o treino e avaliou-se, assim, a memória imediata. Uma hora e meia após o treino mediu-se a memória de curta duração (Izquierdo et al., 1998; Bevilaqua et al., 2003) e 24 horas após a memória de longa duração (Bevilaqua et al., 2003).

## **3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS**

As análises bioquímicas, mais precisamente, os níveis séricos de BDNF e a expressão em RNAm para BDNF em estruturas cerebrais de ratos Wistar, foram avaliadas em um N de 5 animais por grupo (ômega 3, veículo, cetamina e salina)

### **3.5.1 Preparação das amostras**

Após a morte dos animais por decapitação, o córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado foram removidos. Um hemisfério foi congelado a -80°C para subsequente análise bioquímica. Estes foram homogeneizados em solução de tampão fosfato, PBS (fornecidos pela

LABORCLIN, Brasil) com cocktail de inibidor de protease (Sigma-Aldrich, EUA) e centrifugado a 5000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi separado para os ensaios. O outro hemisfério foi armazenado em RNAlater® (Sigma-Aldrich, EUA) para extração do RNA e análise da expressão genica.

### **3.5.2 BDNF medição**

O sobrenadante diluído 1:3 com tampão fosfato (PBS) foi incubado em placas de 96 poços já sensibilizadas com anticorpo anti-BDNF humano, juntamente com a curva padrão de BDNF por 24 horas. As placas foram, então, lavadas com tampão de lavagem seguida pela adição de anticorpo monoclonal anti-BDNF humano biotilado e incubado por 3 horas a temperatura ambiente. Após uma segunda lavagem, streptavidina conjugada a HRP (horseradish peroxidase) foi adicionada em cada poço e as placas incubadas a temperatura ambiente por 1h. Após a adição do substrato e solução para interromper a reação, a quantidade de BDNF foi determinada por absorbância a 450nm. A curva padrão representa uma relação direta entre a densidade óptica (OD) e a concentração de BDNF. A dosagem de proteínas totais foi realizada através do método de Lowry utilizando albumina sérica bovina como padrão.

### **3.5.3 Expressão gênica de RNAm para BDNF**

#### **3.5.3.1.Extração de RNA e síntese de cDNA**

O RNA total foi isolado a partir de estruturas cerebrais submersas em RNAlater (Sigma-Aldrich, EUA) utilizando reagente de TRI® (Sigma-Aldrich, EUA) conforme instruções do fabricante. A quantidade e pureza foram avaliados por espectrofotometria (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific, EUA) e o RNA total foi convertido para cDNA utilizando o Kit de alta capacidade de Transcrição Reversa cDNA (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Subsequentemente, o cDNA foi mantido a -20°C até ser utilizado para amplificação por PCR.

#### **3.5.3.2. Real-time PCR quantitativo (qPCR)**

A expressão de BDNF foi medida por qPCR usando um ensaio de TaqMan FAM/MGB (Applied Biosystems, Rn01484928\_m1 teste ID).

Os valores de expressão foram normalizados pela expressão da beta-actina e GAPD usando um ensaio para controle endógeno TaqMan VIC / MGB (Applied Biosystems, 4352340E e 4352335E).

As reações foram realizadas em equipamento 7500 Sistema PCR em Tempo Real (Applied Biosystems, EUA). Os ciclos de programação foram de 2 minutos a 50°C e 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Todas as reações foram realizadas em triplicado. Os níveis de expressão relativa foram determinadas pelo método  $\Delta\Delta CT$ .

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da expressão em RNAm para BDNF foram relatados como mediana e intervalo interquartil. As comparações entre os grupos foram realizadas usando o teste *Kruskal-Wallis*, tanto para a expressão em RNAm para BDNF como para os testes comportamentais. As análises bioquímicas foram avaliadas através do ANOVA seguido pelo teste de *Tukey post hoc* e expressas como média  $\pm$  DP em todas as comparações, considerando  $p < 0,05$  para significância estatística.

## 4 RESULTADOS

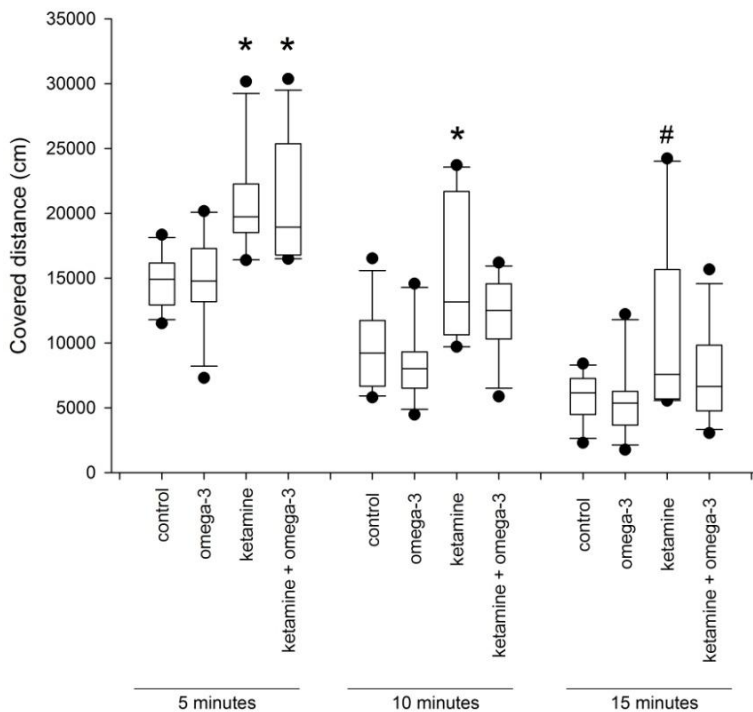
O presente estudo avaliou o efeito da suplementação de  $\omega$ -3 em um modelo animal de SZ induzido por cetamina em ratos jovens com o objetivo de verificar se essa suplementação em fase prodrômica previne as alterações causadas pela cetamina.

Nesta pesquisa, no teste campo aberto (figura 2), para os tempos de 5, 10 e 15 minutos houve aumento da atividade locomotora no grupo cetamina em relação ao grupo controle ( $p=0,025$ ). Aos 10 minutos de teste, observou-se que a hiperlocomoção induzida pela cetamina foi prevenida no grupo  $\omega$ -3 mais cetamina ( $p=0,004$ ) comparado ao grupo controle, confirmando o papel protetor deste ácido graxo nos sintomas positivos da SZ.

Para o tempo de 15 minutos, o ácido graxo  $\omega$ -3 preveniu a hiperlocomoção no grupo  $\omega$ -3 mais cetamina ( $p=0,05$ ), entretanto, não houve diferença estatística significativa neste grupo quando comparado ao controle.

Este estudo mostrou também, através do grupo  $\omega$ -3 mais cetamina ( $p=0,141$ ), que o ácido graxo não preveniu a hiperlocomoção induzida pela cetamina aos 5 minutos do teste em comparação ao grupo controle.

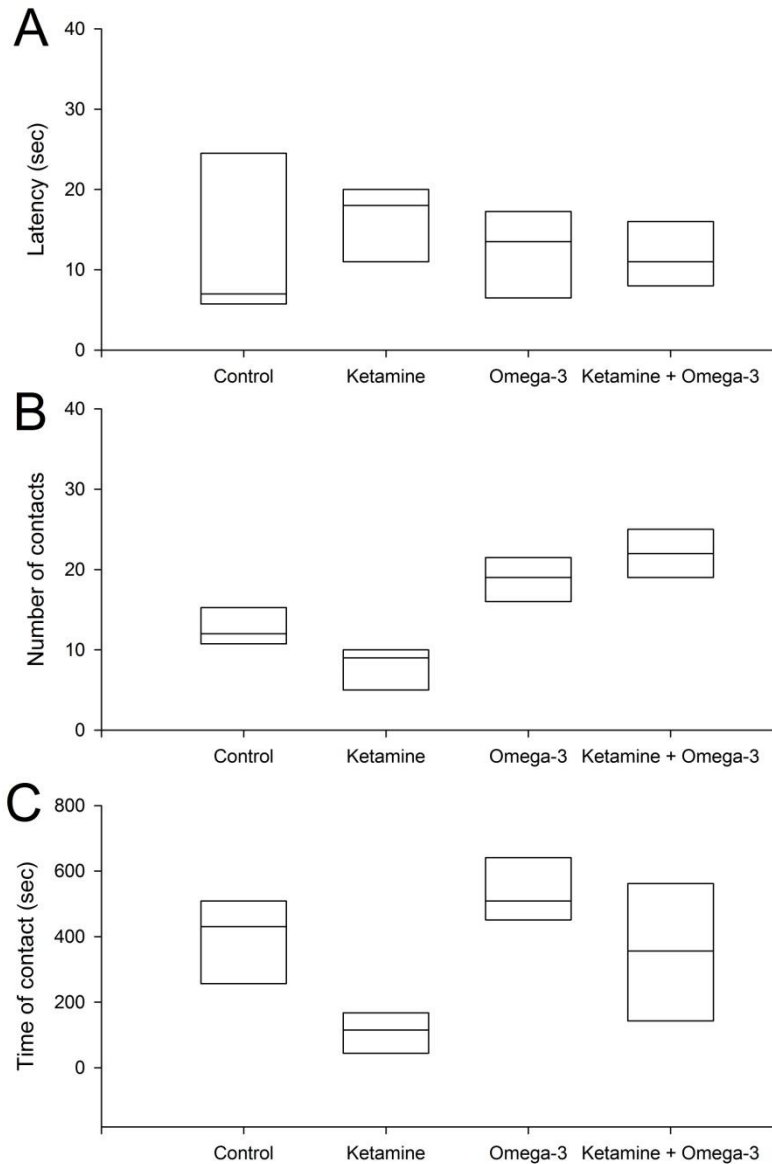
**Figura 2:** Efeito da suplementação de  $\omega$ -3 e tratamento com cetamina no teste campo aberto (*open field*).



A cetamina, quando administrada em ratos, induz graves déficits sociais. Para isso, verificou-se o comportamento de interação social entre os animais. A Figura 3 demonstra que os ratos tratados com cetamina não apresentaram diferença na latência de início do teste ( $p=0,333$ ), no entanto, apresentaram menos contatos entre si ( $p=0,0001$ ), assim como um menor tempo total de interação ( $p=0,0001$ ) quando comparados aos animais do grupo controle.

Por outro lado, o  $\omega$ -3 preveniu o déficit social induzido pela cetamina grupo  $\omega$ -3 mais cetamina ( $p=0,0001$ ), resultado que sugere o efeito preventivo do  $\omega$ -3 nos sintomas negativos da SZ.

**Figura 3:** Efeito da suplementação de  $\omega$ -3 e tratamento com cetamina no teste de interação social entre os animais.

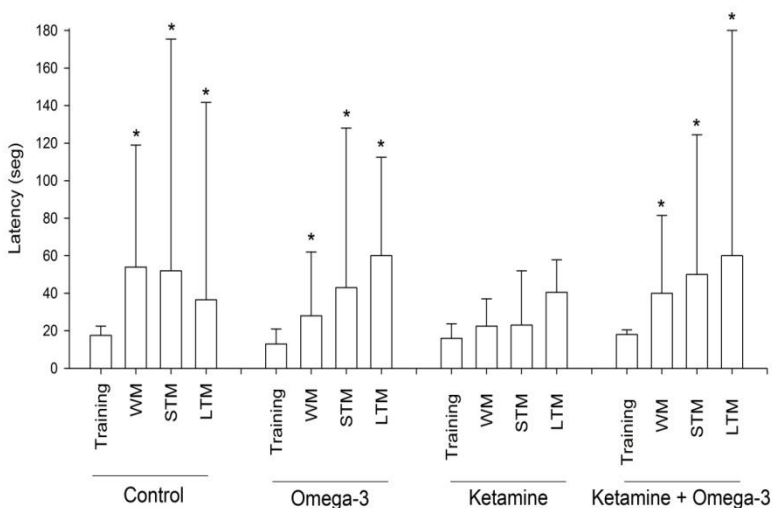




Sabe-se que pacientes esquizofrênicos manifestam sérios prejuízos cognitivos. A administração de cetamina em animais é capaz de causar estes déficits, os quais estão associados à perda de memória e percepção do animal.

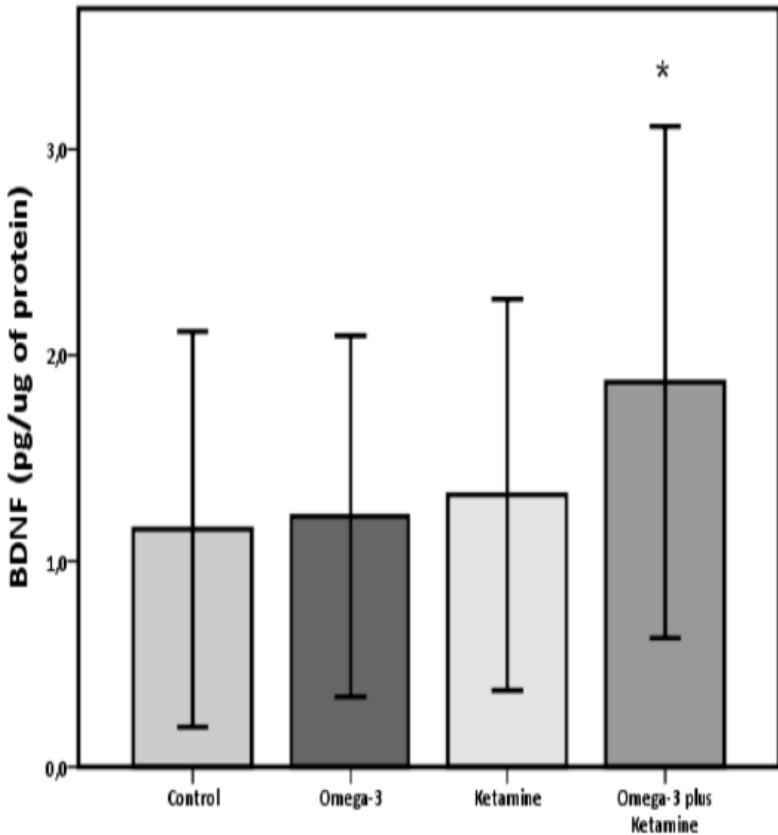
Neste trabalho observou-se, por meio da esQUIVA inibitória (figura 4), que houve prejuízo significativo de memória imediata, memória de curta e longa duração no grupo tratado com cetamina ( $p=0,0015$ ) em relação ao grupo controle. No grupo  $\omega-3$  mais cetamina, a memória imediata, assim como a de curto e longo prazo foram preservadas, comprovando a ação preventiva do  $\omega-3$  nos déficits cognitivos.

**Figura 4:** Efeito da suplementação de  $\omega-3$  e tratamento com cetamina no teste esQUIVA inibitória.



Já foi comprovado que o BDNF está envolvido na fisiopatologia de alguns transtornos psiquiátricos como depressão e esQUIVIA. Com base nisso, o estudo atual avaliou os níveis de BDNF em soro (Figura 5) e verificou que estes foram significativamente maiores no grupo  $\omega-3$  mais cetamina ( $p=0,017$ ) quando comparado ao controle, grupo  $\omega-3$  e grupo cetamina.

**Figura 5:** Efeito da suplementação de  $\omega$ -3 e tratamento com cetamina nos níveis de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF).



Também foi analisada a expressão de RNAm para BDNF (Tabela 1) em tecido cerebral e os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos nas diferentes regiões cerebrais avaliadas: córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado.

**Tabela 1:** Expressão gênica de RNAm para BDNF em tecidos cerebrais.

Group	Prefrontal cortex	Hippocampus	Striatum
	Median Interquartile amplitude	Median Interquartile amplitude	Median Interquartile amplitude
Veiculo + Saline	1.01 0.77 – 1.37	1.46 0.55 – 2.19	1.31 0.40 – 2.33
Veiculo + Ketamina	1.35 0.83 – 1.76	1.41 1.13 – 1.80	0.47 0.27 – 2.06
Omega3 + Saline	1.24 1.11 – 1.87	1.00 0.90 – 1.86	0.80 0.46 – 1.99
Omega3+Ketamine	1.15 0.84 – 1.40	1.32 0.87 – 3.01	1.33 0.37 – 2.65
P Value *	0.668	0.063	0.580

## 5 DISCUSSÃO

A SZ encontra-se entre os mais graves e incapacitantes transtornos psiquiátricos, cujos déficits cognitivos presentes desde a fase prodrômica são considerados a principal causa de incapacidade funcional dos pacientes. Estes prejuízos cognitivos tendem a ser estáveis ao longo da doença e resistentes ao tratamento, a despeito dos sintomas psicóticos, e não são conseqüências da terapêutica com psicofármacos ou hospitalizações (Keefe & Fenton, 2007). Déficits de atenção e memória estão entre os domínios cognitivos mais afetados no transtorno, para os quais os antipsicóticos conhecidos não proporcionam ação terapêutica.

Está bem documentado que crianças com alto risco de desenvolver SZ apresentam déficits de atenção e de memória verbal durante a fase prodrômica. Conseqüentemente, tais crianças caracterizam-se como fortes candidatas ao posterior desenvolvimento de psicose na fase jovem adulta (McNamara & Carlson, 2006), fato que torna relevante o desenvolvimento de estratégias preventivas para retardar ou minimizar essas manifestações neste grupo. Desse modo, considera-se fundamental a aplicação de estratégias terapêuticas adjuvantes que possam intensificar a ação dos antipsicóticos e reduzir seus efeitos colaterais (Arvindakshan et al., 2003).

Pesquisadores por meio de estudos clínicos evidenciaram que os ácidos graxos  $\omega-3$  podem reduzir os sintomas da SZ por suas propriedades neuroprotetoras sem, entretanto, apresentar efeitos adversos clinicamente relevantes (Amminger et al., 2010).

A inexistência de estudos experimentais relatando os mecanismos de tratamento com  $\omega-3$  em um modelo animal de psicose, segundo Ozyurt et al. (2007), reforçam a necessidade de realização destas pesquisas, visto que a aplicação de testes cognitivos no modelo animal induzido por cetamina, sabiamente, constitui relevante área de investigação da SZ.

No presente estudo, os resultados apontam que a administração sub-crônica de uma dose sub-anestésica de cetamina em ratos jovens submetidos à suplementação com  $\omega-3$  em fase prodrômica induz prejuízos no desempenho de testes comportamentais referentes à atividade locomotora, interação social e a diferentes tipos de memória (imediate, de curta e longa duração). Por conseguinte, a administração de  $\omega-3$  preservou esses déficits induzidos pela cetamina, confirmando o papel preventivo deste ácido graxo nos prejuízos sociais e cognitivos da SZ.

Tais achados corroboram estudos anteriores, os quais mostraram que a administração de cetamina afeta negativamente o desempenho de animais em diferentes testes de memória através do bloqueio dos receptores NMDA (Imre et al., 2006; Kos et al., 2006; Pitsikas et al., 2008, Pitsikas & Boultsadakis, 2009) e apóiam a hipótese de que o  $\omega$ -3 possa ser um candidato ideal indicado na prevenção em indivíduos jovens pré-dispostos ao risco de psicose, nos quais o uso de medicamentos antipsicóticos é controverso (Amminger et al., 2010).

Evidências indicam que comportamentos de hiperlocomoção e estereotipia são efeitos característicos da injeção sistêmica aguda de doses sub-anestésicas de cetamina em roedores (Irifune et al., 1995; Adams & Moghaddam, 1998; Wang et al., 2006; Razoux et al., 2007). Neste estudo, no teste campo aberto, para os tempos de 5, 10 e 15 minutos houve aumento da atividade locomotora no grupo cetamina comparado ao controle. Tais dados reforçam a pesquisa de Ozyurt & colaboradores (2007), a qual também verificou o aumento da atividade locomotora e das manifestações estereotípicas nos animais induzidas pela administração de MK-801, fármaco com ação semelhante à cetamina.

O presente estudo verificou no grupo  $\omega$ -3 mais cetamina que a hiperlocomoção induzida pela cetamina foi prevenida nos tempos de 10 e 15 minutos. Este dado corrobora com os achados de Moreira et al. (2010) os quais constataram que camundongos com dieta deficiente em  $\omega$ -3 apresentaram aumento da atividade locomotora e exploratória, fato que foi diretamente relacionado ao menor conteúdo de DHA no córtex frontal.

Outro estudo com achados consistentes com os nossos resultados também utilizou um modelo animal de deficiência de  $\omega$ -3 testando a atividade locomotora por 5 dias consecutivos. Os autores observaram que o grupo com dieta deficiente revelou um ligeiro aumento na locomoção em dias sucessivos, característica oposta manifestada pelos ratos com alimentação adequada em  $\omega$ -3 (Moriguchi et al., 2000).

A presente pesquisa mostrou por meio do grupo  $\omega$ -3 mais cetamina, que o  $\omega$ -3 não preveniu a hiperlocomoção induzida pela cetamina aos 5 minutos do teste. Tal resultado pode relacionar-se ao tempo de habituação dos animais nos minutos iniciais do teste ou ao efeito predominante da cetamina sob os ratos nos primeiros minutos da atividade, uma vez que a droga pode ter interferido na ação preventiva do  $\omega$ -3, predominando sobre o ácido graxo.

Alterações nos níveis de atividade locomotora e déficit no processo de habituação estão correlacionadas ao potencial papel do conteúdo alterado de ácidos graxos cerebrais durante o desenvolvimento, em particular, a diminuição de DHA, características que vem sendo observadas tanto na SZ como no Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) (Umezawa et al., 1995).

Um possível mecanismo subjacente a hiperatividade em animais com dieta deficiente em  $\omega-3$  pode ser relacionada à desregulação do sistema dopaminérgico. Já foi demonstrado que a deficiência crônica de ácidos graxos leva a diminuição da densidade dopaminérgica dos receptores  $D_2$  e ao aumento da densidade dos receptores 5-HT<sub>2</sub> serotoninérgicos no córtex frontal de ratos (Zimmer et al., 1998). Sugere-se assim que as supostas mudanças observadas no modelo animal de deficiência de  $\omega-3$  normalmente estão associadas a hipoatividade dopaminérgica das projeções mesocorticais e a hiperatividade no sistema mesolímbico, sendo consistentes a disfunção frontolímbica que acredita-se ocorrer tanto na SZ como no TDAH (Byne et al., 1999).

Além dos sintomas positivos, sabe-se que pacientes esquizofrênicos comumente manifestam sintomas negativos como alogia, embotamento afetivo, avolia, anedonia e prejuízos intelectuais, os quais comprometem a qualidade de vida e as funções gerais destes indivíduos. A cetamina, quando administrada em ratos, induz estes déficits, alterando o comportamento de interação social dos animais e, conseqüentemente, mimetizando os sintomas negativos do transtorno.

Esta pesquisa, através do teste de interação social, observou que os animais tratados com cetamina não demonstraram diferença na latência para o início do teste. No entanto, apresentaram menos contatos entre si, assim como um menor tempo total de interação quando comparados aos animais tratados com salina. Esses resultados estão, portanto, em acordo com dados de literatura, confirmando que a cetamina mimetiza os sintomas negativos da SZ.

Por outro lado, o  $\omega-3$  preveniu o déficit social induzido pela cetamina (grupo  $\omega-3$  mais cetamina), resultado que sugere o efeito preventivo do  $\omega-3$  na SZ. Tais achados corroboram estudos anteriores sobre a importância dos ácidos graxos no envolvimento da regulação do estado emocional, bem como nas funções cognitivas em animais e humanos (Fedorova & Salem, 2006).

Pesquisadores observaram uma relação direta entre PUFAs, especialmente DHA, e a escala de sintomas negativos (SANS) na SZ, evidenciando que o déficit de ácidos graxos está associado a estas

manifestações (Sethom et al., 2010). Os resultados do estudo mostraram uma alteração no metabolismo de PUFA's em pacientes esquizofrênicos livres de medicação antipsicótica, indicando claramente que a deficiência de  $\omega$ -3 associa-se ao estado psicótico, em particular, aos sintomas negativos. Sendo assim, nossos dados reforçam achados de estudos clínicos, nos quais já foi demonstrado que a suplementação com  $\omega$ -3 resulta em significativa melhora das manifestações negativas da SZ, embora seja menos eficaz nos sintomas positivos (Laugharne et al., 1996).

Na SZ, presume-se que a hipofunção do sistema dopaminérgico cortical e pré-frontal contribui para os sintomas negativos e declínios cognitivos no transtorno, enquanto a hiperatividade dopaminérgica subcortical e límbica ocasiona os sintomas positivos (Abi-Dargham, 2004). Desta forma, uma pesquisa comprovou que a deficiência de  $\omega$ -3 está intimamente relacionada ao prejuízo da neurotransmissão de dopamina (Zimmer et al., 2002). Além disso, pesquisadores mostraram que os níveis de PUFA's estão reduzidos na região orbitofrontal no cérebro de pacientes esquizofrênicos, fato capaz de explicar a associação entre déficit de  $\omega$ -3 e sintomas negativos (McNamara et al., 2007).

Ozyurt & colaboradores (2007) destacam a possibilidade em se estudar o efeito protetor do  $\omega$ -3 nas conseqüências clínicas e patológicas da SZ. Ressaltam também, que até o momento, a suplementação com  $\omega$ -3 foi investigada somente em alguns ensaios clínicos, os quais analisaram o efeito desta administração sobre os sintomas do transtorno. Diante disso, os autores reforçam a necessidade de mais evidências nesta área.

Além dos sintomas positivos e negativos, a SZ também é caracterizada pelo declínio e comprometimento cognitivo nos indivíduos por ela acometidos. A administração de cetamina em animais é capaz de causar déficits cognitivos, os quais estão associados à perda de memória e percepção do animal. Estudo realizado anteriormente correlacionou os prejuízos cognitivos com a redução dos níveis teciduais de ácidos graxos, em especial DHA e EPA, confirmando que a suplementação destes ácidos graxos promove melhorias nas funções cognitivas (Kidd, 2007).

Com essa perspectiva, os resultados do presente estudo, por meio da esQUIVA inibitória, mostraram que a cetamina induziu prejuízo significativo de memória imediata, de curta e longa duração. Estes dados estão em conformidade com o estudo de Enomoto & Floresco (2009) que também demonstrou significativo déficit de memória imediata, persistente mesmo após longo período de retirada da droga.

O  $\omega$ -3, em contrapartida, preservou o déficit de memória imediata, assim como a de curta e longa duração induzido pela cetamina. Tais achados podem ser comparados ao estudo de Moreira et al. (2010) no qual a deficiência dietética de  $\omega$ -3 levou a amnésia de curto e longo prazo. Neste contexto, evidencia-se o papel preventivo da suplementação de  $\omega$ -3 nos déficits cognitivos em animais, uma vez que a deficiência comprovadamente gerou perda de memória.

Os resultados desta pesquisa fortalecem estudos que associam a deficiência dietética de  $\omega$ -3 e alterações comportamentais em roedores. Estes dados têm sido amplamente analisados, como por exemplo, o déficit de memória espacial, que foi revertido através da suplementação de  $\omega$ -3, confirmando a eficácia deste ácido graxo na prevenção dos prejuízos cognitivos (Francês et al., 1996; Moriguchi et al., 2000; Xiao et al., 2006; Fedorova et al., 2007; Chung et al., 2008).

É importante ressaltar que a fisiopatologia da SZ ainda é pouco compreendida. Este fato, conseqüentemente, reforça a necessidade de estratégias terapêuticas alternativas que possam prevenir e/ou retardar os sintomas psicóticos, bem como os déficits cognitivos em indivíduos de alto risco. Deste modo, o presente estudo mostrou que a suplementação com  $\omega$ -3 foi comprovadamente eficaz na prevenção das manifestações comportamentais e prejuízos cognitivos, confirmando assim o efeito protetor dos ácidos graxos  $\omega$ -3 no modelo animal de SZ induzido por cetamina.

Em relação ao BDNF, uma recente metanálise concluiu que os níveis desta neurotrofina estão alterados em pacientes esquizofrênicos (Favalli et al., 2012). Estudo descrito anteriormente evidenciou que os ácidos graxos  $\omega$ -3 podem aumentar os níveis de BDNF por estarem envolvidos na ativação de vias metabólicas (Wu et al., 2004; Balanza-Martinez et al., 2011). Outra pesquisa revelou também que a cetamina é capaz de aumentar significativamente os níveis de BDNF no hipocampo de animais, 30 minutos após ser administrada, mas não 24 horas após sua aplicação (Autry et al., 2011).

Com base nisso, este estudo verificou que os níveis de BDNF em soro foram significativamente maiores no grupo  $\omega$ -3 mais cetamina comparado ao controle, grupo  $\omega$ -3 e grupo cetamina, comprovando que o ácido graxo aumentou ainda mais estes níveis. No entanto, tais achados contrastam dados de literatura (Wu et al., 2004), uma vez que o  $\omega$ -3 isoladamente não aumentou os níveis de BDNF na presente pesquisa.

Este trabalho também analisou a expressão de RNAm para BDNF no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado. Os resultados



mostraram que não houve diferença significativa entre os quatro grupos analisados nas diferentes regiões cerebrais. Este achado é consistente ao estudo de Autry et al. (2011) em que nenhuma alteração foi observada na expressão de RNAm para BDNF no hipocampo, tanto 30 minutos como 24 horas após a administração de cetamina e MK-801.

Ressalta-se ainda, que o resultado acima pode ser atribuído ao tempo de suplementação com  $\omega-3$ , período que pode não ter sido suficiente para promover alteração na expressão de RNAm para BDNF em regiões cerebrais.

Além disso, pesquisas demonstraram que uma dieta rica em gordura, açúcar e deficiente em PUFAs reduz a expressão hipocampal de BDNF em ratos (Molteni et al., 2002). A expressão reduzida de BDNF foi observada também no córtex pré-frontal de pacientes esquizofrênicos, sugerindo o envolvimento do BDNF na etiologia do transtorno (Weickert et al., 2003). As evidências acima, entretanto, contrariam os resultados deste estudo, a medida que a suplementação com  $\omega-3$  não aumentou a expressão de BDNF em nenhuma região cerebral analisada. A pesquisa atual reforça ainda mais a necessidade de estudos relacionando  $\omega-3$  e BDNF, visto que os achados até o momento permanecem não muito claros.

A ausência de diferença estatística entre os grupos na expressão de RNAm para BDNF pode ser explicada pela incompatibilidade entre a distribuição da proteína BDNF no soro e no cérebro (Tropea et al., 2001). Em adição a isso, é importante considerar que neste estudo, os tecidos cerebrais foram obtidos logo após o término dos testes comportamentais e o soro 24 horas depois dos testes, fatores que podem ter interferido para estes achados.

Apesar da análise de estresse oxidativo não ter sido aplicada nesta pesquisa, o seu envolvimento na fisiopatologia da SZ tem sido amplamente descrito e está presente desde o início até as fases mais tardias do transtorno (Gama et al., 2006; 2008b; Kunz et al., 2008; Pedrini et al., 2012). Ressalta-se ainda que os níveis séricos de BDNF parecem ser inversamente relacionados a alguns marcadores de estresse oxidativo (Kapczinski et al., 2008).

O dano celular oxidativo como rompimento de DNA, inativação protéica, alteração da expressão gênica, diminuição de PUFAs na membrana lipídica e geralmente apoptose, contribui para o crescimento e diferenciação anormal dos neurônios (Mahadik et al., 2006). O papel cerebral destes ácidos graxos ainda não está completamente elucidado, mas evidências suportam que os PUFAs são essenciais ao funcionamento normal do cérebro, como parte da

membrana celular, facilitando a plasticidade sináptica e melhorando a função mitocondrial, além de reduzir o estresse oxidativo intracelular (Gomez-Pinilla, 2008). Estas propriedades cerebrais protetoras estariam, portanto, envolvidas na prevenção da SZ em pacientes prodrômicos (Amminger et al., 2010).

Diante de tudo, o estudo atual comprovou que a administração de  $\omega$ -3 previne os sintomas positivos, negativos e déficits cognitivos em um modelo animal de SZ induzido por cetamina na fase prodrômica. Estes resultados estão em conformidade com o ensaio clínico realizado por Amminger et al. (2010) em uma população UHR para desenvolvimento da SZ.

Em adição, este trabalho de dissertação de mestrado sugere a combinação de  $\omega$ -3 aos antioxidantes, principalmente em indivíduos UHR para psicose ou nos estágios iniciais do transtorno quando o cérebro apresenta alto grau de neuroplasticidade, o que pode ser potencialmente mais eficaz a longo prazo, melhorando o resultado clínico da SZ (Mahadik et al., 2006).

Se os achados deste recente estudo são conseqüência do aumento dos níveis séricos de BDNF, isso não está claro e merece uma investigação mais aprofundada. No entanto, esta pesquisa fornece importantes evidências para ensaios clínicos maiores na confirmação do uso de  $\omega$ -3 para prevenir a SZ e reforça ainda mais o papel benéfico dos PUFAs na proteção cerebral de indivíduos em UHR para psicose.

## 6 CONCLUSÃO

O foco deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação de ômega 3 através de parâmetros comportamentais e bioquímicos em um modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina.

Desse modo, a presente pesquisa permitiu concluir que a suplementação com  $\omega$ -3 foi comprovadamente eficaz na prevenção das manifestações comportamentais (sintomas positivos e negativos) e prejuízos cognitivos, confirmando assim o efeito protetor dos ácidos graxos  $\omega$ -3 no modelo animal de SZ induzido por cetamina na fase prodrômica.

Concluiu-se, ainda, que a administração de  $\omega$ -3 elevou os níveis séricos de BDNF. Em contrapartida, os resultados da expressão de RNAm para BDNF no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado mostraram que não houve diferença estatística significativa entre os quatro grupos analisados nas diferentes regiões cerebrais.

Diante de tudo, este estudo forneceu evidências relevantes para ensaios clínicos maiores, incentivando o desenvolvimento de novas pesquisas na confirmação do uso de  $\omega$ -3 para prevenir a SZ. Também, reforçou ainda mais o papel benéfico dos PUFA's na proteção cerebral de indivíduos em UHR para psicose.

## REFERÊNCIAS

Abi-Dargham A. Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2004; 7 (1): 1-5.

Abi-Dargham A, Laruelle M. Mechanisms of action of second generation antipsychotic drugs in schizophrenia: insights from brain imaging studies. *Eur Psychiatry*. 2005; 20 (1): 15-27.

Adams B, Moghaddam B. Corticolimbic dopamine neurotransmission is temporally dissociated from the cognitive and locomotor effects of phencyclidine. *J Neurosci*. 1998; 18 (14): 5545 - 54.

Amann LC, Halene TB, Ehrlichman RS, Luminais SN, Ma N, Abel T, Siegel SJ. Chronic ketamine impairs fear conditioning and produces long-lasting reductions in auditory evoked potentials. *Neurobiol Dis*. 2009; 35 (2): 311–17.

Amminger GP, Schafer MR, Papageorgiou K, Klier CM, Cotton SM, Harrigan SM, Mackinnon A, McGorry PD, Berger GE. Long-chain w-3 fatty acids for indicated prevention of psychotic disorders.: a randomized placebo-controlled trial. *Arch Gen Psychiatry*. 2010; 67 (2): 146-54.

Amminger GP, Henry LP, Harrigan SM, Harris MG, Alvarez-Jimenez M, Herrman H, Jackson HJ, McGorry PD. Outcome in early-onset schizophrenia revisited: findings from the Early Psychosis Prevention and Intervention Centre long-term follow-up study. *Schizophr Res*. 2011; 131 (1-3): 112-9.

Angelucci F, Brenè S, Mathé AA. BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Mol Psychiatry*. 2005; 10 (4): 345-52.

Angrist B, Sathananthan G, Wilk S, Gershon S. Amphetamine psychosis: behavioral and biochemical aspects. *J Psychiatr Res*. 1974; 11: 13-23.

APA - American Psychiatric Association, “Diagnostic and Statistical Manual of Mental Diseases”, fourth edition (DSM-IV). Washington, DC: APA, 1994.

Arvindakshan M, Ghate M, Ranjekar PK, Evans D, Mahadik SP. Supplementation with a combination of  $\omega$ -3 fatty acids and antioxidants (vitamins E and C) improves the outcome of schizophrenia. *Schizophr Res*. 2003; 62 (3): 195-204.

Autry AE, Adachi M, Nosyreva E, Na ES, Los MF, Cheng P, Kavalali ET, Monteggia LM. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature*. 2011; 475 (7354): 91-5.

Ayhan Y, Abazyan B, Nomura J, Kim R, Ladenheim B, Krasnova IN, Sawa A, Margolis RL, Cadet JL, Mori S, Vogel MW, Ross CA, Pletnikov MV. Differential effects of prenatal and postnatal expressions of mutant human DISC1 on neurobehavioral phenotypes in transgenic mice: evidence for neurodevelopmental origin of major psychiatric disorders. *Mol Psychiatry*. 2011; 16 (3): 292-306.

Balanzá-Martínez V, Fries GR, Colpo GD, Silveira PP, Portella AK, Tabarés-Seisdedos R, Kapczinski F. Therapeutic use of omega-3 fatty acids in bipolar disorder. *Expert Rev Neurother*. 2011; 11 (7): 1029-47.

Bas O, Songur A, Sahin O, Mollaoglu H, Ozen AO, Yaman M, Eser O, Fidan H, Yagmurca M. The protective effect of fish n-3 fatty acids on cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurochem Int*. 2007; 50 (3): 548-54.

Bazan NG. Cell survival matters: docosahexaenoic acid signaling, neuroprotection and photoreceptors. *Trends Neurosci*. 2006; 29 (5): 263-71.

Becker A, Peters B, Shroeder H, Mann T, Huether G, Grecksch G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003; 27 (4): 687-700.

Becker A, Grecksch G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004; 28 (8): 1267-77.

Belayev L, Marcheselli VI, Khoutorova L, Rodriguez de Turco EB, Busto R, Ginsberg MD, Bazan NG. Docosahexaenoic acid complexed to

albumin elicits high-grade ischemic neuroprotection. *Stroke*. 2005; 36 (1): 118-23.

Berger GE, Wood SJ, Wellard RM, Proffitt TM, McConchie M, Amminger GP, Jackson GD, Velakoulis D, Pantelis C, McGorry PD. Ethyl-eicosapentaenoic acid in first-episode psychosis: a 1H-MRS study. *Neuropsychopharmacology*. 2008; 33 (10): 2467-73.

Berger GE, Wood SJ, Ross M, Hamer CA, Wellard RM, Pell G, Phillips L, Nelson B, Amminger GP, Yung AR, Jackson G, Velakoulis D, Pantelis C, Manji H, McGorry PD. Neuroprotective effects of low-dose lithium in individuals at ultra-high risk for psychosis. A longitudinal MRI/MRS study. *Curr Pharm Des*. 2012; 18 (4): 570-5.

Bevilaqua LR, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci*. 2003; 17 (4): 897-902.

Bickel S, Javitt DC. Neurophysiological and neurochemical animal models of schizophrenia: focus on glutamate. *Behav Brain Res*. 2009; 204 (2): 352-62.

Bradford A. The dopamine and glutamate theories of schizophrenia: a short review. *Curr Anest Crit Care*. 2009; 20: 240-1.

Brown S, Birtwistle C, Roe L, Thompson C. The unhealthy lifestyle of people with schizophrenia. *Psychol Med*. 1999; 29 (3): 697-701.

Bubeníková-Valesová V, Horáček J, Vrajová M, Höschl C. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008; 32 (5): 1014 - 23.

Buckley PF, Mahadick S, Pillai A, Terry A Jr. Neurotrophins and schizophrenia. *Schizophr Res*. 2007; 94 (1-3): 1-11.

Burr GO. The essential fatty acids fifty years ago. *Prog Lipid Res*. 1981; 20.

Byne W, Kemether E, Jones L, Haroutunian V, Davis KL. The neurochemistry of schizophrenia. In: Charney DS, Nestler EJ, Bunney

BJ, editores. *Neurobiology of mental illness*. Oxford: Oxford University Press; 1999. p. 236–45.

Carlsson A, Waters N, Carlsson ML. Neurotransmitter interactions in schizophrenia-therapeutic implications. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1999; 249 (4): 37–43.

Chung WL, Chen JJ, Su HM. Fish oil supplementation of control and (n-3) fatty acid-deficient male rats enhances reference and working memory performance and increases brain regional docosahexaenoic acid levels. *J Nutr*. 2008; 138 (6): 1165–71.

Covington MB. Omega 3 fatty acids. *Am Fam Physician*. 2004; 70 (1): 133–40.

De Oliveira L, Spiazzi CM, Bortolin T, Canever L, Petronilho F, Mina FG, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Zugno AI. Different sub-anesthetic doses of ketamine increase oxidative stress in the brain of rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009; 33 (6): 1003-08.

De Oliveira L, Fraga DB, De Luca RD, Canever L, Ghedim FV, Matos MP, Streck EI, Quevedo J, Zugno AI. Behavioral changes and mitochondrial dysfunction in a rat model of schizophrenia induced by ketamine. *Metab Brain Dis*. 2011; 26 (1): 69-77.

Dicicco-Bloom E, Lord C, Zwaigenbaum L, Courchesne E, Dager SR, Schmitz C, Schultz RT, Crawley J, Young LJ. The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. *J Neurosci*. 2006; 26 (26): 6807-906.

Dingledine R, Boges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacoll Ver*. 1999; 51 (1): 7-61.

DSM-IV-TR – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

Enomotto T, Floresco SB. Disruptions in spatial working memory, but not short-term memory, induced by repeated ketamine exposure. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009; 33 (4): 668–75.

Favalli G, Li J, Belmonte-de-Abreu P, Wong AH, Daskalakis ZJ. The role of BDNF in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2012; 46 (1): 1-11.

Fedorova I, Salem N Jr. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2006; 75 (4-5): 271-89.

Fedorova I, Hussein N, Di Martino C, Moriguchi T, Hoshiba J, Majchrzak S, Salem N Jr. An n-3 fatty acid deficient diet affects mouse spatial learning in the Barnes Circular Maze. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2007; 77 (5-6): 269-77.

Frances H, Monier C, Clement M, Lecorsier A, Debray M, Bourre JM. Effect of dietary alpha-linolenic acid deficiency on habituation. *Life Sci.* 1996; 58 (21): 1805-16.

Gama CS, Salvador M, Andreazza AC, Kapczinski F, Belmonte-de-Abreu PS. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: a study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2006; 30 (3): 512-5.

Gama CS, Salvador M, Andreazza AC, Lobato MI, Berk M, Kapczinski F, Belmonte-de-Abreu PS. Elevated serum thiobarbituric acid reactive substances in clinically symptomatic schizophrenic males. *Neurosci Lett.* 2008b; 433 (3): 70-3.

Gómez-Pinilla F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nat Rev Neurosci.* 2008; 9 (7): 568-78.

Graeff FG, Brandão ML. *Neurobiologia das doenças mentais.* 5ª ed. São Paulo: Lemos; 1999.

Green MJ, Matheson SL, Shepherd A, Weickert CS, Carr VJ. Brain-derived neurotrophic factor levels in schizophrenia: a systematic review with meta-analysis. *Mol Psychiatry.* 2011; 16 (9): 960-72.

Haag M. Essential fatty acids and the brain. *Can J Psychiatry.* 2003; 48 (3): 95-203.

Häfner H, An Der Heiden W, Behrens S, Gattaz WF, Hambrecht M, Löffler W, Maurer K, Munk-Jørgensen P, Nowotny B, Riecher-Rössler



- A, Stein A. Causes and consequences of the gender difference in age at onset of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 1998; 24 (1): 99-113.
- Hansen AE, Stewart RA, Hughes G, Soderhjelm L. The relation of linoleic acid to infant feeding. *Acta Paediatr Suppl.* 1962; 137: 1-41.
- Heird WC, Lapillonne A. The role of essential fatty acids in development. *Annu Rev Nutr.* 2005; 25: 549-71.
- Hetem LA, Danion JM, Diemunsch P, Brandt C. Effect of a subanesthetic dose of ketamine on memory and conscious awareness in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl).* 2000; 152 (3): 283-8.
- Högyes E, Nyakas C, Kiliaan A, Farkas T, Penke B, Luiten PG. Neuroprotective effect of developmental docosahexaenoic acid supplement against excitotoxic brain damage in infant rats. *Neuroscience.* 2003; 119 (4): 999-1012.
- Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature.* 1990; 344 (6264): 339-41.
- Horrobin DF, Glen AI, Vaddadi K. The membrane hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Res.* 1994; 13(3): 195-207.
- Horrobin DF. The membrane phospholipid hypothesis as a biochemical basis for the neurodevelopmental concept of schizophrenia. *Schizophr Res.* 1998; 30 (3): 193-208.
- Hunt MJ, Raynaud B, Garcia R. Ketamine dose-dependently unduces high-frequency oscillations in the nucleus accumbens in freely moving rats. *Biol Psychiatry.* 2006; 60 (11): 1206-14.
- Imre G, Fokkema DS, Den Boer JA, Ter Horst GJ. Dose-response characteristics of ketamine effect on locomotion, cognitive function and central neuronal activity. *Brain Res Bull.* 2006; 69 (3): 338-45.
- Irifune M, Shimizu T, Nomoto M, Fukuta T. Involvement of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in noncompetitive NMDA receptor antagonist induced hyperlocomotion in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 1995; 51 (2-3): 291-6.

Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, De Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature*. 1998; 393 (6686): 635-6.

Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1991; 148 (10): 1301-8.

Javitt DC. Glutamate and schizophrenia: phencyclidine, N-methyl-D-aspartate receptors and dopamine–glutamate interactions. *Int Rev Neurobiol*. 2007; 78: 69–108.

Jentsch JD, Roth RH. The Neuropsychopharmacology of Phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 1999; 20 (3): 201-25.

Jindal RD, Pillai AK, Mahadik SP, Eklund K, Montrose DM, Keshavan MS. Decreased BDNF in patients with antipsychotic naïve first episode schizophrenia. *Schizophr Res*. 2010; 119 (1-3): 47-51.

Kagan J, Gall SB. "Schizophrenia" *The Gale Encyclopedia of Childhood and Adolescence*. 2<sup>a</sup> ed. Detroit: Gale 2007.

Kapczinski F, Frey BN, Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Cunha AB, Post RM. Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes. *Rev Bras Psiquiatr*. 2008; 30 (3): 243-5.

Keefe RS, Fenton WS. How should DSM-V criteria for schizophrenia include cognitive impairment? *Schizophr Bull*. 2007; 33 (4): 912-20.

Kendler KS. Schizophrenia: Genetics. In: Sadock BJ, Sadock VA, editores. *Kaplan & Sadock*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

Kidd PM. Omega-3 DHA and EPA for cognition, behavior and mood: clinical findings and structural-functional synergies with cell membrane phospholipids. *Altern Med Rev*. 2007; 12 (3): 207-27.

Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmüller B. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett*. 1980; 20 (3): 379-82.

Kos T, Popik P, Pietraszek M, Schäfer D, Danysz W, Dravolina O, Blokhina E, Galankin T, Bernalov AY. Effect of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist MDL 72222 on behaviors induced by ketamine in rats and mice. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2006; 16 (4): 297-310.

Krivoy A, Fischel T, Weizman A. The possible involvement of metabotropic glutamate. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2008; 18 (6): 395-405.

Kromhout D, Bosschieter EB, De Lezenne CC. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med*. 1985; 312 (19): 1205-9.

Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB Jr, Charney DS. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry*. 1994; 51 (3): 199-214.

Krystal JH, D'Souza DC, Mathalon D, Perry E, Belger A, Hoffman R. NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003; 169 (3-4): 215-33.

Kunz M, Gama CS, Andreazza AC, Salvador M, Ceresér KM, Gomes FA, Belmonte-de-Abreu PS, Berk M, Kapczinski F. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008; 32 (7): 1677-81.

Lakhan SE, Vieira KF. Nutritional therapies for mental disorders. *Nutr J*. 2008; 7:2.

Laruelle M, Abi-Dargham A, Gil R, Kegeles L, INNIS R. Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. *Biol Psychiatry*. 1999; 46 (1): 56-72.

Laugharne JE, Mellor M, Peet M. Fatty acids and schizophrenia. *Lipids*. 1996; 31 (Suppl): 163-5.

Lewis DA, Lieberman JA. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron*. 2000; 28 (2): 325-34.

Lindsley CW, Shipe WD, Wolkenberg SE, Theberge CR, Williams DI Jr, Sur C, Kinney GG. Progress towards validating the NMDA receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Curr Top Med Chem*. 2006; 6 (8): 771–85.

Loewy RI, Pearson R, Vinogradov S, Bearden CE, Cannon TD. Psychosis risk screening with the Prodromal Questionnaire--brief version (PQ-B). *Schizophr Res*. 2011; 129 (1): 42-6.

Loewy RI, Therman S, Manninen M, Huttunen MO, Cannon TD. Prodromal psychosis screening in adolescent psychiatry clinics. *Early Interv Psychiatry*. 2012; 6 (1): 69-75.

Lukiw WJ, Bazan NG. Docosahexaenoic acid and the aging brain. *J Nutr*. 2008; 138 (12): 2510–4.

Mahadik SP, Pillai A, Joshi S, Foster A. Prevention of oxidative stress-mediated neuropathology and improved clinical outcome by adjunctive use of a combination of antioxidants and omega-3 fatty acids in schizophrenia. *Int Rev Psychiatry*. 2006; 18 (2): 119-31.

Mari JJ, Leitão RJ. A epidemiologia da esquizofrenia. *Rev Bras Psiquiatr*. 2000; 22: 15-7.

Marszalek Jr, Lodish HF. Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005; 21: 633–57.

McCreadie R, MacDonald E, Blacklock C, Tilak-Singh D, Wiles D, Halliday J, Paterson J. Dietary intake of schizophrenia patients in Nithsdale, Scotland: case-control study. *BMJ*. 1998; 317 (7161): 784-5.  
McGrath JJ. Myths and plain truths about schizophrenia epidemiology — the NAPE lecture 2004. *Acta Psychiatr Scand*. 2005; 111 (1): 4-11.

McNamara RK, Carlson SE. Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2006; 75 (4-5): 329–49.

McNamara RK, Jandacek R, Rider T, Tso P, Hahn CG, Richtand NM, Stanford KE. Abnormalities in the fatty acid composition of the postmortem orbitofrontal cortex of schizophrenic patients: gender differences and partial normalization with antipsychotic medications. *Schizophr Res*. 2007; 91 (1-3): 37–50.

Mickleborough TD, Murray RI, Ionescu AA, Lindley MR. Fish oil supplementation reduces severity of exercise-induced bronchoconstriction in elite athletes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 168 (10): 1181 – 9.

Miyamoto S, Lamantia AS, Duncan GE, Sullivan P, Gilmore JH, Lieberman JA. Recent advances in the neurobiology of schizophrenia. *Mol Interv*. 2003; 3 (1): 27-39.

Moghaddam B, Jackson ME. Glutamatergic animal models of schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 1003: 131-7.

Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell*. 1999; 98 (4): 427-36.

Moldin SO, Rubenstein JL, Hyman SE. Can autism speak to neuroscience? *J Neurosci*. 2006; 26 (26): 6893-6.

Molteni R, Barnard RJ, Ying Z, Roberts FA, Gómez-Pinilla F. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity and learning. *Neuroscience*. 2002; 112 (4): 803-14.

Moreira JD, Knorr L, Ganzella M, Thomazi AP, De Souza CG, De Souza DG, Pitta CF, Mello e Souza T, Wofchuk S, Elisabetsky E, Vinadé L, Perry MLS, Souza DO. Omega-3 fatty acids deprivation affects ontogeny of glutamatergic synapses in rats: Relevance for behavior alterations. *Neurochem Int*. 2010; 56 (6-7): 753-9.

Morgan CJ, Mofeez A, Brandner B, Bromley L, Curran HV. Acute effects of ketamine on memory systems and psychotic symptoms in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology*. 2004; 29 (1): 208-18.

Moriguchi T, Greiner RS, Salem N Jr. Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. *J Neurochem*. 2000; 75 (6): 2563–73.

Niesink RJ, Van Ree JM. Involvement of opioid and dopaminergic systems in isolation-induced pinning and social grooming of young rats. *Neuropharmacology*. 1989; 28 (4): 411-8.

Ng F, Berk M, Dean N O, Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008; 11 (6): 851-76.

Ozyurt B, Sarsilmaz M, Akpolat N, Ozyurt H, Akyol O, Herken H, Kus I. The protective effects of omega-3 fatty acids against MK-801 induced neurotoxicity in prefrontal cortex of rat. *Neurochem Int*. 2007; 50 (1): 196-202.

Pedrini M, Massuda R, Fries GR, De Bittencourt Pasquali MA, Schnorr CE, Moreira JC, Teixeira AL, Lobato MI, Walz JC, Belmonte-de-Abreu PS, Kauer-Sant'anna M, Kapczinski F, Gama CS. Similarities in serum oxidative stress markers and inflammatory cytokines in patients with overt schizophrenia at early and late stages of chronicity. *J Psychiatr Res*. 2012; 46 (6): 819-24.

Peet M. Nutrition and schizophrenia: beyond omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2004; 70 (4): 417-22.

Peet M. The metabolic syndrome, omega-3 fatty acids and inflammatory processes in relation to schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2006; 75 (4-5): 323-7.

Pezawas L, Verchinski BA, Mattay VS, Callicott JH, Kolachana BS, Straub RE, Egan MF, Meyer-Lindenberg A, Weinberger DR. The brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and variation in human cortical morphology. *J Neurosci*. 2004; 24 (45): 10099 - 102.

Phillips LJ, Cotton S, Mihalopoulos C, Shih S, Yung AR, Carter R, McGorry PD. Cost implications of specific and nonspecific treatment

for young persons at ultra high risk of developing a first episode of psychosis. *Early Interv Psychiatry*. 2009; 3 (1): 28-34.

Piertsen CY. An Animal Model of Emotional Blunting in Schizophrenia. *Epidem Psichiatri Soc*. 2001; 2-12.

Piomelli D, Pilon C, Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Schwartz JC. Dopamine activation of the arachidonic acid cascade as a basis for D1/D2 receptor synergism. *Nature*. 1991; 353 (6340): 164-7.

Pitsikas N, Boultsadakis A, Sakellaris N. Effects of sub-anesthetic doses of ketamine on rats' spatial and non-spatial recognition memory. *Neuroscience*. 2008; 154 (2): 454-60.

Pitsikas N, Boultsadakis A. Pre-training administration of anesthetic ketamine differentially affects rats' spatial and non-spatial recognition memory. *Neuropharmacology* 2009; 57 (1): 1-7.

Quevedo J, Vianna M, Zanatta MS, Roesler R, Izquierdo I, Jerusalinsky D, Quillfeldt JA. Involvement of mechanisms dependent on NMDA receptors, nitric Oxide and protein kinase A in the hippocampus but not in the caudate nucleus in memory. *Behav Pharmacol*. 1997; 8 (8): 713-7.

Rang HP, Dale MM, Ritter MJ. *Farmacologia*. 2<sup>a</sup>ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

Razoux F, Garcia R, Léna I. Ketamine, at a dose that disrupts motor behavior and latent inhibition, enhances prefrontal cortex synaptic efficacy and glutamate release in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology*. 2007; 32 (3): 719-27.

Riediger ND, Othman RA, Suh M, Moghadasian MH. A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *J Am Diet Assoc*. 2009, 109 (4): 668-79.

Rizos EN, Rontos I, Laskos E, Arsenis G; Michalopoulou PG, Vasilopoulos D, Gournellis R, Lykouras L. Investigation of serum BDNF levels in drug-naïve patients with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008; 32 (5): 1308-11.

Roesler R, Schröder N, Vianna MR, Quevedo J, Bromberg E, Kapczinski F, Ferreira MB. Differential involvement of hippocampal

and amygdalar NMDA Receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Res.* 2003; 975 (1-2): 207-13.

Ross BM, Seguin J, Sieswerda LE. Omega-3 fatty acids as treatments for mental illness: which disorder and which fatty acid? *Lipids Health Dis.* 2007; 6: 21.

Ryan MC, Collins P, Thakore JH. Impaired fasting glucose tolerance in first-episode, drug-naïve patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 2003; 160 (2): 284-9.

Salum C, Pereira ACCI, Guimarães EADBB. Dopamina, óxido nítrico e suas interações em modelos para o estudo da esquizofrenia. *Psicologia: Reflexão e Crítica.* 2008; 21 (2): 186- 94. 2008.

Schaefer EJ, Bongard V, Beiser AS, Lamon-Fava S, Robins SJ, Au R, Tucker KL, Kyle DJ, Wilson PW, Wolf PA. Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: the Framingham Heart Study. *Arch Neurol.* 2006; 63 (11): 1545–50.

Schneider T, Przewlocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology.* 2005; 30 (1): 80-9.

Sethom MM, Fares S, Bouaziz N, Melki W, Jemaa R, Feki M, Hechmi Z, Kaabachi N. Polyunsaturated fatty acids deficits are associated with psychotic state and negative symptoms in patients with schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2010; 83 (3): 131–6.

Shoval G, Weizman A. The possible role of neurotrophins in the pathogenesis and therapy of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2005; 15 (3): 319–29.

Simopoulos AP. Omega 3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr.* 2002; 21 (6): 495–505.

Simpson EH, Kellendonk C, Kandel E. A possible role for the striatum in the pathogenesis of the cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuron.* 2010; 65 (5): 585-96.



Söderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G. Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimers disease. *Lipids*. 1991; 26 (6): 421–5.

Strokin M, Chechneva O, Reymann KG, Reiser G. Neuroprotection of rat hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation by enrichment with docosahexaenoic acid and by inhibition of hydrolysis of docosahexaenoic acid-containing phospholipids by calcium independent phospholipase A2. *Neuroscience*. 2006; 140 (2): 547–53.

Suzuki F, Junier MP, Guilhem D, Sorensen JC, Onteniente B. Morphogenetic effect of kainite on adult hippocampal neurons associated with a prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience*. 1995; 64 (3): 665-74.

Tomiya M, Fukishima T, Kawai J, Aoyama C, Mitsuhashi S, Santa T, Imai K, Toyo'oka T. Alterations of plasma and cerebrospinal fluid glutamate levels in rats treated with the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, ketamine. *Biomed Chromatogr*. 2006; 20 (6-7): 628-33.

Tropea D, Capsoni S, Tongiorgi E, Giannotta S, Cattaneo A, Domenici L. Mismatch between BDNF mRNA and protein expression in the developing visual cortex: the role of visual experience. *Eur J Neurosci*. 2001; 13 (4): 709-21.

Umezawa M, Ohta A, Tojo H, Yahii H, Hosokawa M, Takeda T. Dietary alpha-linolenate/linoleate balance influences learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Brain Res*. 1995; 669 (2): 225–33.

Van Der Heijden FM, Fekkes D, Tuinier S, Sijben AE, Kahn RS, Verhoeven WM. Amino acids in schizophrenia: evidence for lower tryptophan availability during treatment with atypical antipsychotics. *J Neural Transm*. 2005; 112 (4): 577-85.

Van OS J. Is there a continuum of psychotic experiences in the general population? *Epidemiol Psichiatr Soc*. 2003; 12 (4): 242-52.

Vasconcelos SMM, Andrade MM, Soares PM, Chaves BG, Patrocínio MCA, Sousa FCF, Macedo DS. Cetamina: aspectos gerais e relação com a esquizofrenia. *Rev Psiq Clín*. 2005, 32 (1): 10-16.

Vollenweider FX, Vontobel P, Oye I, Hell D, Leenders KL. Effects of (S)-ketamine on striatal dopamine: a raclopride PET study of a model psychosis in humans. *J Psychiatr Res.* 2000; 34 (1): 35-43.

Xiao Y, Wang L, Xu RJ, Chen ZY. DHA depletion in rat brain is associated with impairment on spatial learning and memory. *Biomed Environ Sci.* 2006; 19 (6): 474-80.

Wang GD, Zhuo M. Forebrain NMDA receptors contribute to neuronal spike responses in adult mice. *Sheng Li Xue Bao.* 2006; 58 (6): 511-20.  
Webster MJ, Herman MM, Kleinman JE, Shannon WC. BDNF and trkB mRNA expression in the hippocampus and temporal cortex during the human lifespan. *Gene Expr Patterns.* 2006; 6 (8): 941-51.

Weickert CS, Hyde TM, Lipska BK, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE. Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2003; 8 (6): 592-610.

Wu A, Ying Z, Gómez-Pinilla F. Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 2004; 21 (10):1457-67.

Yehuda S, Rabinovitz S, Mostofsky DI. Essential fatty acids are mediators of brain biochemistry and cognitive functions. *J Neurosci Res.* 1999; 56 (6): 565-70.

Yung AR, Nelson B. Young people at ultra high risk for psychosis: research from the PACE clinic. *Rev Bras Psiquiatr.* 2011; 33 (Suppl 2): 143-60.

Zimmer L, Hembert S, Durand G, Breton P, Guilloteau D, Besnard JC, Chalon S. Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid diet-deficiency acts on dopamine metabolism in the rat frontal cortex: a microdialysis study. *Neurosci Lett.* 1998; 240 (3): 177-81.

Zimmer L, Vancassel S, Cantagrel S, Breton P, Delamanche S, Guilloteau D, Durand G, Chalon S. The dopamine mesocorticolimbic

pathway is affected by deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr.* 2002; 75 (4): 662-7.

**ANEXO A – Protocolo de Aprovação do Comitê de Ética**

Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

**Resolução**

A Comissão de Ética no Uso de Animais, reconhecido pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 14/2012

Professor:

ALEXANDRA IOPPI ZUGNO

Título: "EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE OMEGA 3 EM UM MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA".

"EFFECT OF OMEGA 3 IN AN ANIMAL MODEL OF SCHIZOPHRENIA INDUCED BY KETAMINE".

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Para demais dúvidas contatar a CEUA. [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua).

Criciúma, 28 de fevereiro de 2012.

Coordenador da CEUA