

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

ALEXANDRA STEPHANIE ALMEIDA HEYLMANN

**INVESTIGAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS DO DIABETES
MELLITUS TIPO 1 COMO FATOR DE RISCO PARA
ESQUIZOFRENIA**

**CRICIÚMA
2016**

ALEXANDRA STEPHANIE ALMEIDA HEYLMANN

**INVESTIGAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS DO DIABETES
MELLITUS TIPO 1 COMO FATOR DE RISCO PARA
ESQUIZOFRENIA**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde
para obtenção do título de Mestre
em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Alexandra
Ioppi Zugno

**CRICIÚMA
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

H617i Heylmann, Alexandra Stephanie Almeida.

Investigação pré-clínica de parâmetros comportamentais e bioquímicos do diabetes mellitus tipo 1 como fator de risco para esquizofrenia / Alexandra Stephanie Almeida Heylmann ; orientadora : Alexandra Ioppi Zugno. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2016.

107 p. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2016.

1. Diabetes mellitus tipo 1. 2. Esquizofrenia. 3. Cetamina. 4. Aloxano. 5. Extresse oxidativo. 6. Avaliação comportamental. I. Título.

CDD 22. ed. 616.462



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

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 256

Com início às 09h00 (nove horas) do dia vinte e um do mês de julho de 2016 (dois mil e dezesseis), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Alexandra Stephanie Almeida Heylmann**, sob a orientação da Prof.ª Dr.ª **Alexandra Ioppi Zugno**, intitulada “Investigação pré-clínica de parâmetros comportamentais e bioquímicos do diabetes mellitus tipo 1 como fator de risco para esquizofrenia”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof.ª Dr.ª Josiane Budni (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada; Prof.ª Dr.ª Gabriela Trevisan dos Santos (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Prof.ª Dr.ª Luciane Bisognin Ceretta (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 10h00 (dez horas), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza Coordenador do Programa. Criciúma, 21 (vinte e um) de julho de 2016 (dois mil e dezesseis).

Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

Diana Ghisi Daniel
Auxiliar Administrativo PPGCS

Diana Ghisi Daniel
Secretária

A dissertação foi escrita seguindo o estilo Vancouver e será apresentada de forma tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Aos meus pais e à minha família, por ensinarem
o melhor caminho e por serem meus melhores exemplos de vida.
Com amor.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é o resultado de uma longa jornada, da qual muitas pessoas fizeram parte. Agradecer, muitas vezes, não é uma tarefa fácil. Portanto, para não correr risco de injustiça, agradeço de antemão a todos que, de alguma forma, passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

Agradeço, primeiramente, a Deus: muito obrigada pelo que me deste e pelo que me dás. Obrigada pela proteção, por me mostrar o caminho do bem e por colocar em minha vida pessoas admiráveis, que me ajudam a me tornar uma pessoa melhor. Pelo teu amor, obrigada, Senhor!

Aos meus amados pais, Ruymar Weber Heylmann e Rosilda da Conceição Almeida Heylmann, pelo amor, pelo incentivo, pela confiança e por todos os momentos em que nunca hesitaram em me dar suporte e carinho. Na distância ou não: Obrigada por agirem com sabedoria e paciência. Hoje, lhes dedico este trabalho. Vocês merecem cada elogio e cada conquista que tive e terei. Somos uma só luz; um só coração.

À minha irmã Kelly Kathleen Almeida Heylmann, pela presença constante apesar da distância, pela preocupação, dedicação, carinho e amor. Eu tenho muita sorte em ter uma irmã tão maravilhosa e especial como você para a vida toda.

Ao meu irmão Patrick Allan de Abreu Heylmann, cunhada Jucilene Souza Heylmann e sobrinha Allana Souza Heylmann pelo apoio, força e companheirismo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus tios, Ademar Rogério Weber Heylmann e Madelom Ravazzi Heylmann, obrigada por me incentivarem e acreditarem em mim. Vocês são exemplos de força, determinação e competência.

Ao meu namorado Guilherme Consul Finkler, pelo nosso amor, amizade, apoio e paciência nos momentos em que estive ausente.

À professora Alexandra Ioppi Zugno, pela oportunidade, amizade e confiança em mim depositada. Pelo incentivo e orientação neste trabalho. Muitíssimo obrigada!

À professora Josiane Budni por estar sempre disposta a ajudar, pelo carisma, pelas conversas, pelos ensinamentos, pela amizade, enfim, muito obrigada.

À amiga e companheira de laboratório, Lara Canever. Eu simplesmente não tenho palavras para expressar importância que você teve na realização desse trabalho. Sempre disposta em colaborar no que fosse preciso e quando fosse necessário. Muito obrigada pela sua ajuda,

por seus ensinamentos e por sua companhia durante a realização do meu mestrado.

Aos ‘esquizofrênicos’ que contribuíram para que este trabalho fosse realizado: Amanda Godoi, Carolina Michels, Elisa Souza, Felipe Pacheco, Geórgia Machado, Isadora Fachim, Julia Polla, Louyse Damázio, Marcos Vieira, Patricia Wessler, Sarah Tasso e a todos os amigos e colegas do Laboratório de Neurociências, pelo companheirismo, momentos de convivência e troca de conhecimentos que me proporcionaram crescimento pessoal e profissional. Vocês são muito especiais!

À Jadne Estrela, Gustavo Mastella, Katia Gress e Pedro Derosa, por toda participação e ajuda na construção deste trabalho. Muito obrigada.

À amiga Alessandra Frasseto, pela amizade construída e companheirismo em todos os momentos que precisei conversar e dividir os momentos de ansiedade, angústia e alegria. Estás no meu coração e sentirei muitas saudades!

Às minhas companheiras Francielle Mina, Michelle Garcez e Tatiani Bellettini pela amizade, risadas e valioso apoio em todos os momentos nas quais precisei de ajuda e colaboração.

Às amigas Daiana Altoff e Tamires Balbino pela amizade verdadeira, apoio, companheirismo, carinho e por algumas vezes me aturarem estressada. Podem se passar anos, vocês sempre terão um lugar especial em meu coração!

Às amigas Nutricionistas, Ana Paula Valcarenghi, Eduarda Nichele, Liliane Borges, Keron Borges, Renata Teixeira, Roberta Pieri obrigada pela amizade e força.

Aos professores das disciplinas que cursei, principalmente, a Gabriela Trevisan, Josiane Budni, Luciane Ceretta, por aceitarem participar como avaliadoras desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, em especial a Diana Ghisi pelo auxílio e colaboração.

Aos funcionários da UNESC, principalmente, Alexsandra Martins, Deivid Borges, Elige Roldão, Heron Sangaletti pela atenção e colaboração a mim dispensada durante as atividades no biotério.

Aos órgãos de fomento (FAPESC e UNESC) pelo apoio financeiro.

À minha eterna gratidão a todos que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

*“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência,
e para se chegar onde quer que seja,
aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão.
É preciso, antes de mais nada, querer.
Um dia é preciso parar de sonhar,
Tirar os planos das gavetas e,
De algum modo, partir...”*
(Almir Klink)

RESUMO

A hiperglicemia crônica do diabetes mellitus (DM) desencadeia estresse oxidativo, promovendo dano a proteínas, lipídeos e DNA, causando déficit cognitivo. Isso pode levar ao desenvolvimento da esquizofrenia. Portanto, este estudo teve por objetivo investigar os parâmetros comportamentais e bioquímicos do diabetes mellitus Tipo 1 (DM1) como fator de risco para esquizofrenia em ratos Wistar. Os animais foram divididos em quatro grupos: 1) Controle (salina+salina), 2) Aloxano (aloxano+salina), 3) Cetamina (cetamina+salina), 4) Aloxano+Cetamina. Estes permaneceram em jejum por 18 horas para posterior indução do diabetes através de uma única injeção intraperitoneal (i.p) de aloxano (150mg/kg) ou salina. Após 48 horas, os animais diabéticos foram submetidos ao teste de glicemia para comprovar a indução do modelo. Do 4º ao 10º dia, os animais receberam injeção (i.p) de cetamina (25mg/kg) ou salina, uma vez ao dia, para indução do modelo de esquizofrenia. No 10º dia, 30 minutos após a última administração de salina ou cetamina, os animais foram submetidos aos testes comportamentais. Antes da eutanásia, foi realizado o teste de glicemia para verificar se os animais permaneceram diabéticos até o final do experimento. Logo após, estes foram decapitados e as estruturas cerebrais removidas para as análises bioquímicas. Os resultados revelam que no 3º dia, o aloxano induziu hiperglicemia nos animais em relação ao grupo controle. Do mesmo modo, no 10º dia, a cetamina, o aloxano e a associação do aloxano+cetamina aumentaram a glicemia dos animais quando comparado ao controle. O peso dos animais mostrou-se menor nos grupos aloxano e aloxano+cetamina, os quais também apresentaram hiperglicemia quando comparado aos grupos controle e cetamina. Verificou-se que a cetamina isolada induziu hiperatividade, entretanto, a associação do aloxano+cetamina foi capaz de reduzir a hiperlocomoção. Na interação social, foi observado que a cetamina, o aloxano e a associação do aloxano+cetamina aumentaram significativamente o tempo para o primeiro contato (latência) e, ainda, diminuíram o número de contatos entre os animais. No teste de inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto (IPP), os animais do grupo cetamina, aloxano e aloxano+cetamina apresentaram um déficit de IPP quando comparado ao grupo controle nas três intensidades avaliadas (65dB, 70dB e 75dB). Nas análises bioquímicas, a cetamina foi capaz de aumentar a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no córtex frontal, hipocampo e

estriado, bem como a associação do aloxano+cetamina, a qual parece exercer um efeito exacerbado no sistema colinérgico. Para a peroxidação lipídica e a carbonilação proteica, os achados demonstram que o aloxano isolado não causou dano oxidativo no córtex frontal, diferentemente da cetamina. Já o aloxano+cetamina parece ter intensificado o dano lipídico e proteico nas três estruturas analisadas. Foi observado que a cetamina e a associação do aloxano+cetamina induziu dano ao DNA em ambos os parâmetros avaliados (Frequência e Índice de danos). Em conclusão, os resultados mostraram que o aloxano e a cetamina isolados e associados alteraram parâmetros comportamentais e bioquímicos neste estudo.

Palavras-chave: Diabetes mellitus tipo 1; esquizofrenia; aloxano; cetamina; análises comportamentais e bioquímicas.

ABSTRACT

The chronic hyperglycemia of diabetes mellitus (DM) triggers oxidative stress, promoting lipids, proteins and DNA damaging, causing cognitive deficits. This can lead to the development of schizophrenia. Based on that, this study aimed to investigate the behavioral and biochemical parameters of type 1 diabetes mellitus (DM1) as a risk factor to schizophrenia in Wistar rats. The animals were divided into four groups: 1) Control (saline + saline), 2) Alloxan (alloxan + saline), 3) Ketamine (saline + ketamine), 4) Alloxan + Ketamine, which were fasted 18 hours to subsequent induction of diabetes by a single intraperitoneal (i.p) injection of alloxan (150 mg/kg) or saline. After 48 hours, the diabetic animals did glucose testing to verify the induction of the model. From the 4th to 10th day, the animals were injected (i.p) ketamine (25mg/kg) or saline, once a day, to induce model of schizophrenia. On the 10th day, 30 minutes after the last administration of saline or ketamine, the animals were subjected to behavioral testing. Before euthanasia, the blood glucose test was performed to verify that the animals were diabetic until the end of the experiment. Right after, they were decapitated and the brain structures removed for biochemical analysis. The results show that on the 3rd day, alloxan induced hyperglycemia in animals compared to the control group. Similarly, on the 10th day, ketamine, alloxan and the association of alloxan + ketamine increased blood glucose of animals compared to the control. The weight of the animals was lower in alloxan and alloxan + ketamine group, which also presented hyperglycemia when compared to control groups and ketamine. It was found that the isolated ketamine induced hyperactivity, however, the combination of alloxan + ketamine was able to reduce hyperlocomotion. In social interaction was observed that ketamine, alloxan and the association of alloxan + ketamine significantly increased the time to first contact (latency) and also decreased the number of contacts between animals. In inhibition test by prepulse startle reflex (PPI), the animals of the ketamine group, alloxan and alloxan + ketamine showed a PPI deficit when compared to the control group in the three evaluated intensities (65dB, 70dB and 75dB). In the biochemical analyzes, ketamine is capable of increasing the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) activity in the frontal cortex, hippocampus and striatum as well as the combination of alloxan + ketamine, which seems to have an exacerbated effect on the cholinergic system. For lipid peroxidation and protein carbonyls, the findings demonstrate that isolated alloxan did not cause oxidative

damage in the frontal cortex, unlike ketamine. Already alloxan + ketamine appears to have intensified lipid and protein damage in the three analyzed structures. It was observed that the combination of ketamine and ketamine + alloxan induced DNA damage in both evaluated parameters (frequency and damage index). Overall, the results of this study show that alloxan and ketamine isolated and associated change the biochemical and behavioral parameters.

Keywords: Diabetes mellitus; schizophrenia; alloxan; ketamine; behavioral and biochemical analyzes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Projeção global do número de casos de Diabetes mellitus por região para 2035.....	29
Figura 2 - Critérios para diagnóstico do Diabetes mellitus pela Associação de Diabetes (ADA) e aprovados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD).....	31
Figura 3 - Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia.....	38
Figura 4 - Desenho experimental.....	48
Figura 5 - Representação do equipamento do teste da atividade locomotora.....	49
Figura 6 - Representação do equipamento do teste de interação social.....	50
Figura 7 - Representação da Inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto (PPI).....	51
Figura 8 - Medição dos níveis de glicose no 3º(A) e 10º(B) dia e do peso no 10º(C) dia em animais submetidos ao modelo do diabetes associado ao modelo de esquizofrenia.....	56
Figura 9 - Representação da hiperlocomoção do teste da atividade locomotora dos animais submetidos ao modelo de diabetes associado ao modelo de esquizofrenia.....	57
Figura 10 - Representação da interação social (A= latência, B= número de contatos e C= tempo total de contatos) dos animais submetidos ao modelo do diabetes associado ao modelo de esquizofrenia.....	59
Figura 11 - Representação do teste IPP nos animais submetidos ao modelo do diabetes associado ao modelo de esquizofrenia.....	60

Figura 12 - Representação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) dos animais submetidos ao modelo do diabetes associado ao modelo de esquizofrenia.....62

Figura 13 - Representação do parâmetro bioquímico peroxidação lipídica (TBARS) (A) e carbonilação de proteína (B) nos animais submetidos ao modelo do diabetes associado ao modelo de esquizofrenia.....63

Figura 14 - Representação do parâmetro molecular da Frequência de Danos em sangue periférico dos animais submetidos ao modelo do diabetes associado ao modelo de esquizofrenia.....64

Figura 15 - Representação do parâmetro molecular do Índice de Danos em sangue periférico dos animais submetidos ao modelo do diabetes associado ao modelo de esquizofrenia.....65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	29
1.1 DIABETES MELLITUS TIPO 1.....	29
1.2 ESQUIZOFRENIA.....	32
1.3 RELAÇÃO ENTRE DIABETES E ESQUIZOFRENIA: DANO OXIDATIVO.....	36
1.4 MODELOS ANIMAIS DO DIABETES E DA ESQUIZOFRENIA.....	41
2 OBJETIVOS.....	44
2.1 OBJETIVO GERAL.....	44
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1 ANIMAIS.....	45
3.1.1 Indução do diabetes por aloxano.....	46
3.1.2 Indução da esquizofrenia por cetamina.....	47
3.1.3 Desenho experimental.....	47
3.2 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	48
3.2.1 Atividade locomotora.....	48
3.2.2 Interação social.....	49
3.2.3 Inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto.....	50
3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	52
3.3.1 Mensuração da glicemia.....	52
3.3.2 Avaliação de parâmetros de dano oxidativo em cérebro de roedores.....	52
3.3.2.1 Medida de dano oxidativo a lipídeos.....	52
3.3.2.2 Medida de dano oxidativo a proteínas.....	52
3.3.2.3 Medida de dano ao DNA.....	52
3.3.3. Atividade da Acetilcolinesterase.....	53
3.3.4. Dosagem de proteínas.....	54
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
4 RESULTADOS.....	55
4.1 INDUÇÃO DO MODELO DO DIABETES.....	55
4.2 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	57
4.2.1 Atividade Locomotora.....	57
4.2.2 Interação Social.....	57
4.2.3 Inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto.....	59
4.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	61

4.3.1 Atividade de Acetilcolinesterase.....	61
4.3.2 Parâmetros de Dano Oxidativo.....	62
4.3.3 Parâmetros de Dano ao DNA.....	64
5 DISCUSSÃO.....	66
6 CONCLUSÃO.....	76
7 PERSPECTIVAS.....	77
REFERÊNCIAS.....	78
ANEXOS.....	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITOS TIPO 1

O diabetes mellitus (DM) é uma das principais doenças de evolução crônica que acometem o homem moderno em qualquer idade, condição social e localização geográfica (ADA, 2011). É caracterizada por uma deficiência absoluta ou relativa de insulina que irá influenciar negativamente o metabolismo dos glicídios, proteínas, lipídios, água, vitaminas e minerais. Durante a evolução da doença, na tentativa do controle metabólico poderão ocorrer complicações agudas e crônicas (Fross, 1991). Seu impacto inclui elevada prevalência, importante morbidade, alta taxa de hospitalizações e mortalidade, gerando significativos danos econômicos e sociais (Schmidt et al., 2011). Estima-se um aumento de 60% até 2035 na população diabética da América do Sul e Central (Figura 1) (IDF, 2013).

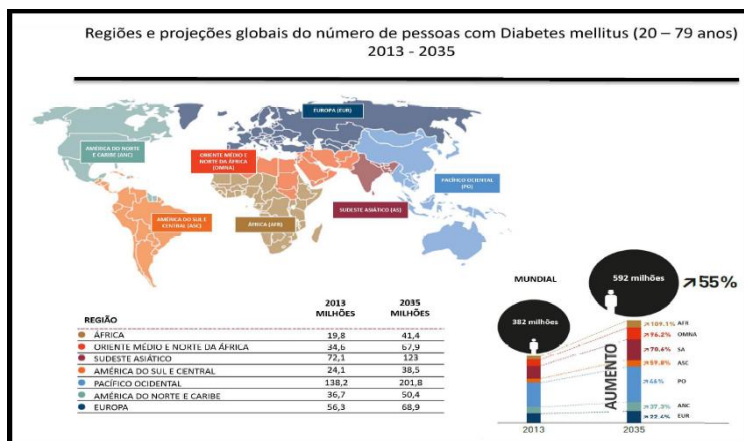


Figura 1: Projeção global do número de casos de Diabetes mellitus por região para 2035 (modificado de IDF, 2013).

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença metabólica crônica caracterizada pela deficiência de insulina, a qual é determinada pela destruição das células β -pancreáticas, podendo ser autoimune, correspondendo a cerca de 10% do total de casos de DM (ADA, 2013; Bennett; Knowler, 2009). O processo mediado pelo sistema imunológico ocasiona um quadro permanente de hiperglicemia que é característico da patologia (Balda e Pacheco-Silva, 1999). O aumento dos níveis de

glicose no sangue pode ocorrer como consequência da secreção deficiente da insulina ou da falha em compensar uma maior demanda do hormônio nos tecidos alvo, muitas vezes decorrente da perda de sensibilidade de seu receptor (White, 1997; Van Belle et al., 2011).

A insulina é um hormônio secretado pelas células β pancreáticas, sendo responsável pelo controle das reservas de energia do corpo. Assim, regula a captação de glicose pelas células, promove a formação de reservas de glicogênio no fígado e de gordura nas células adiposas (White, 1997). Se a insulina é secretada em níveis insuficientes ou impossibilitada de exercer sua ação, o corpo acaba por não utilizar a glicose disponível no sangue, também deixando de formar reservas com o nível excedente, caracterizando a hiperglicemia (Shiling e Raphael, 2008).

Em alguns pacientes, nos primeiros meses da doença, pode não haver necessidade do uso de insulina, entretanto o uso do hormônio ocorrerá inexoravelmente dentro de alguns meses devido à destruição da reserva pancreática de insulina (Atkinson e Eisenbarth, 2001). Os principais marcadores imunológicos do comprometimento pancreático são os anticorpos anti-ilhota, anti-insulina e antidescarboxilase do ácido glutâmico e podem estar presentes por meses ou anos antes do diagnóstico clínico, ou seja, na fase pré-clínica da doença, e em até 90% dos indivíduos quando se detecta hiperglicemia (DSB, 2014). Inúmeros fatores genéticos (genes do sistema HLA) e ambientais (sarampo, rubéola, caxumba, etc) contribuem para a ativação imunológica que desencadeia esse processo destrutivo (ADA, 2013).

Segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2014) é o tipo mais agressivo, geralmente ocorrendo na infância e adolescência. O DM1 apresenta uma distribuição racial pouco uniforme com uma frequência menor em indivíduos negros e asiáticos e uma frequência maior na população européia, principalmente nas populações provenientes de regiões do norte da Europa (Cavalcante et al., 1995). A incidência mundial varia muito, com as mais baixas incidências no Continente Asiático (0,1/100.000) e tendo as mais altas na Finlândia e Sardenha (36,5/100.000) (Karvonen et al., 2000).

No Brasil foram publicados dois estudos que avaliaram a incidência de DM1. Em Londrina, a taxa encontrada foi de 12,7/100.000 (Campos et al., 1998), enquanto que em quatro cidades do estado de São Paulo a incidência de DM1, em jovens abaixo de 15 anos, foi de 7,6/100.000 (Ferreira et al., 1993). As características demográficas dos pacientes com DM1 são semelhantes em todo mundo e a incidência distribui-se igualmente entre os sexos (Michalková et al., 1995).

Os critérios para o diagnóstico do DM que são recomendados pelas Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2014) incluem: glicemia em jejum igual ou superior a 126 mg/dl (em caso de pequenas elevações da glicemia, o diagnóstico deve ser confirmado pela repetição do teste em outro dia); glicemia de 2 horas pós-sobrecarga de 75 g de glicose, com o paciente apresentando os níveis de glicose acima de 200 mg/dl ou glicemia casual acima de 200 mg/dl e apresentando concomitantemente pelo menos um dos sintomas clássicos do DM (excessiva vontade de tomar água (polidipsia), aumento do volume urinário (poliúria) ou/e perda ponderal). A glicemia casual é aquela realizada em qualquer hora do dia, independente do horário das refeições. O último critério de diagnóstico do DM, se trata de valores de hemoglobina glicada (HbA1c) maior a 6,5%. O diagnóstico de DM deve sempre ser confirmado pela repetição do teste em outro dia, a menos que haja hiperglicemia inequívoca com descompensação metabólica aguda ou sintomas óbvios de DM (ADA, 2013) (Figura 2).

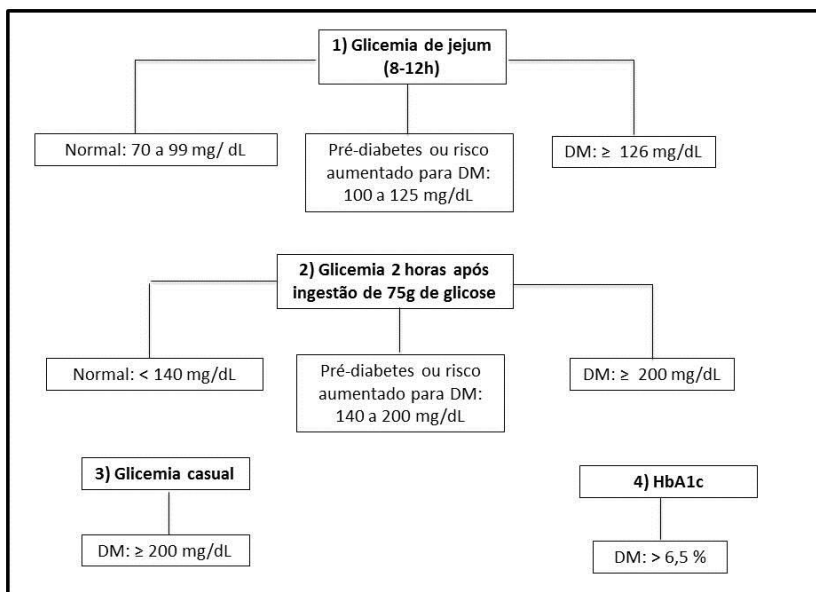


Figura 2: Critérios para diagnóstico do Diabetes mellitus pela Associação de Diabetes (ADA) e aprovados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). Legenda: HbA1c = hemoglobina glicada e DM = Diabetes Mellitus.

Estudos de Nuevo et al. (2011) demonstraram que pode haver uma relação entre o controle inadequado e tempo de evolução do DM1 com a doença microvascular, caracterizada por retinopatia, nefropatia e neuropatia diabética. Indivíduos com DM1 tem um risco 10 vezes maior de eventos cardiovasculares (Orchard et al., 2006). Já o risco de desenvolvimento de transtornos mentais é equivalente tanto no DM1 quanto no DM2 (Fráguas et al., 2007).

1.2 ESQUIZOFRENIA

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico de origem multifatorial cujo histórico familiar é o fator de risco mais significativo (Brown, 2001). Sabe-se que diversos fatores, em especial genéticos e ambientais, representam um grande impacto na etiologia do transtorno (Shorter e Miller, 2015). Todavia, a falta de resultados consistentes que apontam um fator genético específico na patogênese do transtorno, levou pesquisadores a estudarem a influência dos fatores ambientais (Rapoport et al., 2012; Matrisciano et al., 2013). Ainda assim, a literatura mostra que as alterações epigenéticas podem estar envolvidas em diversas doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, câncer e distúrbios neurocomportamentais, destacando-se o autismo e a esquizofrenia (Shorter e Miller, 2015). Logo, a regulação gênica epigenética e monoalélica é particularmente suscetível aos efeitos ambientais ocorridos durante o período pré e pós-natal (Jirtle e Skinner, 2007).

Neste contexto, a esquizofrenia é um transtorno devastador, crônico e debilitante que afeta aproximadamente 0,5 a 1% da população mundial (McGrath., 2008), sendo caracterizado como a 14ª causa de incapacidade em todo o mundo, com 16,7 milhões de pacientes, com moderada à severa incapacitação (Javitt, 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2004) o índice *Years Lost Due to Disability* (YLD - “anos perdidos por incapacidade”) classifica a esquizofrenia como a 6ª maior causa de incapacidade no mundo.

Evidências sugerem que perturbações no neurodesenvolvimento durante a vida fetal desempenham um importante papel na etiologia da esquizofrenia (Brown et al., 2007), classificando-a como uma doença neurodesenvolvimental (Rapoport et al., 2005). Diferentes fatores, conhecidos por produzir danos no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) durante período gestacional, têm sido implicados na esquizofrenia e incluem o sofrimento pré-natal e/ou perinatal (Baguelin-

Pinaud et al., 2010), como a exposição materna ao estresse (Lee et al., 2007); infecção e/ou ativação do sistema imunológico (Clarke et al., 2009); deficiências nutricionais (ácido fólico, vitamina B12, ômega 3) e/ou altos níveis maternos de homocisteína (Krebs et al., 2009); complicações obstétricas (Haukvik et al., 2009), além do estresse oxidativo (Bitanhirwe e Woo, 2011). Estes fatores podem desencadear o aparecimento de sintomas característicos da esquizofrenia, como a diminuição da interação social e/ou reconhecimento de objetos e déficit no sistema sensorio-motor demonstrado em modelos animais (Le Pen e Moreau, 2002), bem como anormalidade na estrutura cortical, baixo peso ao nascer, além de alterações dos sistemas de neurotransmissores, dopaminérgico e glutamatérgico, em humanos (Weinstock, 2001).

O diagnóstico da esquizofrenia é baseado essencialmente na descrição dos sinais e sintomas, não havendo até o momento parâmetros fisiopatológicos com sensibilidade e especificidade suficiente (Bagdy e Juhasz, 2013). De acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (DSM-V) os sinais devem estar presentes durante seis meses e incluir pelo menos um mês de sintomas ativos para se firmar o diagnóstico (APA, 2013). Os sintomas iniciam-se entre o final da adolescência e o início da vida adulta, geralmente observada por uma mudança abrupta no perfil social e afetivo do indivíduo (APA, 1994; Marsman et al., 2013). Estes sintomas são classificados em três classes: sintomas positivos, representados pelas alucinações, delírios, episódios psicóticos e desconfianças que levam o paciente à fuga da realidade; sintomas negativos referem-se ao embotamento afetivo, isolamento social, avolia, anedonia e discurso empobrecido; e déficit cognitivo, caracterizado como prejuízo na memória de trabalho, desorganização, desorientação e falta de atenção (Larson et al., 2010; Shamsi et al., 2011).

Apesar do crescente consenso de que a esquizofrenia é um transtorno mental, sua fisiopatologia ainda permanece desconhecida (Meyer e Feldon, 2010). Entretanto, não há dúvidas da existência de alterações anatômicas e bioquímicas cerebrais em sua gênese (Keshavan et al., 2011), nas quais encontram-se as disfunções nos sistemas glutamatérgico e dopaminérgico, além dos sistemas GABAérgico e colinérgico (Miyamoto et al., 2003; Harrison e Weinberger, 2005), os quais resultam em irregularidades no funcionamento de regiões córtico-basais, levando aos sintomas do transtorno (Tost e Meyer-Lindenberg, 2011). Além do mais, o aumento na liberação de dopamina está intrinsecamente relacionado à psicose, sendo a hipótese dopaminérgica, predominantemente associada à fisiopatologia da esquizofrenia (Snyder,

1976; Seeman, 1987). Assim, acredita-se que os sintomas positivos presentes no transtorno sejam gerados devido a um aumento da atividade dopaminérgica na via mesolímbica, compreendida entre a área tegmental ventral e o núcleo accumbens. Por outro lado, os sintomas negativos são supostamente causados por uma diminuição dessa atividade na via mesocortical, tendo início também na área tegmental ventral seguindo até o córtex pré-frontal (Ross et al., 2007).

Adicionalmente, alterações do sistema glutamatérgico estão envolvidas não apenas na esquizofrenia, mas em doenças neurológicas como epilepsia, isquemias, doença de Alzheimer e de Huntington, além de outros transtornos psiquiátricos como dependência de substâncias, transtorno obsessivo-compulsivo e afetivo bipolar (Javitt, 2010; Goff, 2015). Desse modo, os processos cognitivos são gravemente afetados durante a esquizofrenia, sugerindo que uma diminuição na função do receptor N-metil-d-aspartato (NMDA) pode estar relacionada aos déficits de memória e aprendizado (Benneyworth et al., 2011). Em condições normais, o glutamato tem um papel proeminente na plasticidade sináptica, aprendizado e memória (Izquierdo, 2002). O glutamato, além de estar envolvido no desenvolvimento neural e nas fases de proliferação e migração celular (McDonlad e Johnston, 1990), também influencia vários processos bioquímicos, a exemplo do metabolismo energético, da síntese de ácidos graxos, da regulação dos níveis de amônia e da composição de proteínas e peptídeos (Carobrez, 2003). A fim de explicar a participação do glutamato na fisiopatologia da esquizofrenia, duas teorias foram propostas: a teoria da hipofunção glutamatérgica (Kim et al., 1980) e da hiperfunção glutamatérgica (Deakin et al., 1989).

A primeira teoria, da hipofunção glutamatérgica, sugere que pacientes sob observação que recebiam doses subanestésicas de fenciclidina ou cetamina, apresentavam sintomas psicóticos ou exacerbavam os sintomas positivos, negativos e cognitivos deste transtorno (Luby et al., 1959; Rosenbaum et al., 1959; Bakker e Amini, 1961; Krystal et al., 1994; Anand et al., 2000). A segunda teoria, da hiperfunção glutamatérgica, descreve que uma hipofunção de receptores NMDA no córtex temporal, induzida por meio de uma maior ativação de receptores AMPA, kainato e metabotrópicos, gera uma compensação do sistema glutamatérgico no córtex frontal (Marsman et al., 2013). Além disso, estudos supõe que a excitotoxicidade neural, devido ao excesso de glutamato, tem um importante papel na esquizofrenia contribuindo para um possível processo neurodegenerativo da doença, o que, por sua vez, leva a morte celular (Pittenger et al., 2007; Moghaddam et al., 1997;

Moghaddam e Krystal, 2012). Esta teoria se concentra em distúrbios nas vias glutamatérgicas cerebrais e na deficiência da sinalização dos receptores de glutamato (Poels et al., 2014).

De acordo com a literatura, tem-se abordado uma relação do glutamato com o diabetes (Nawa et al., 2011), visto que alterações no sistema glutamatérgico podem levar a síndrome metabólica, como a obesidade e a hiperglicemia (Morrison et al., 2008). Estudo realizado por Di Cairano et al. (2011) mostrou que nas células β pancreáticas há expressão de transportadores gliais de glutamato, os quais são responsáveis por proteger as células pancreáticas da excitotoxicidade glutamatérgica.

Estudos mostram ainda que o aumento da concentração da glicose em astrócitos leva a diminuição da captação de glutamato, o que pode contribuir para o desenvolvimento da excitotoxicidade que está relacionada com o aumento da excitabilidade neuronal e a hiperatividade dos receptores glutamatérgicos pelo influxo excessivo de Ca^{2+} . Essa elevação no influxo de Ca^{2+} juntamente à ativação de diversas proteínas, como proteases, fosfatases e fosfolipases, faz com que haja um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou nitrogênio (ERN), originando um quadro de estresse oxidativo sobre as células neurais, causando dano e morte neuronal (Banks et al., 2012; Huang et al., 2012).

Além disso, um estudo verificou que marcadores neuroquímicos associados às funções cognitivas enfatizam a conexão entre o sistema glutamatérgico e o sistema colinérgico (Soreq e Seidman, 2001). A atividade colinérgica no córtex produz uma combinação complexa de efeitos inibitórios e excitatórios que interferem na sinalização glutamatérgica via receptores NMDA (Sarter et al., 2005). Colgin et al. (2003) indicaram que os sinais colinérgicos induzem uma atividade excitatória do glutamato favorecendo a aquisição da memória no hipocampo, ou seja, a acetilcolina pode modular a ação do sistema glutamatérgico.

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor excitatório sintetizado no neurônio pré-sináptico pela colina acetiltransferase (ChAT), a partir da colina e acetil-coenzima A (Acetil-CoA) (Soreq e Seidman, 2001). Atua na junção neuromuscular, ligando-se aos receptores muscarínicos ou nicotínicos localizados na membrana pré e pós-sináptica. A ACh apresenta papel essencial nas funções motora, cognitivas e de memória (Voss et al., 2008). A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima regulatória importante no controle da transmissão

do impulso nervoso através da sinapse colinérgica pela hidrólise e inativação da ACh em colina e acetato (Soreq e Seidman, 2001).

Em pacientes esquizofrênicos, as disfunções cognitivas são frequentemente encontradas e relacionam-se a alterações no sistema colinérgico (Voss et al., 2008). Além disso, os envoltimentos do sistema colinérgico na fisiopatologia de transtornos mentais têm sido frequentemente apontados. Especificamente, mudanças nos receptores muscarínicos e nicotínicos de ACh são observadas na esquizofrenia (Voss et al., 2008). No entanto, a fisiopatologia deste transtorno ainda não está esclarecida, fato que justifica a realização de mais estudos relacionados aos mecanismos subjacentes a esse transtorno tão complexo.

1.3 RELAÇÃO ENTRE DIABETES E ESQUIZOFRENIA: DANO OXIDATIVO

O SNC é susceptível a efeitos deletérios da hipoinsulinemia e da hiperglicemia, provocando estresse oxidativo, modificações na expressão de proteínas, na cadeia respiratória e fosforilação oxidativa e no fator neurotrófico derivado do cérebro. Tais modificações podem desencadear diversas comorbidades em pacientes diabéticos, como a depressão e aterosclerose (Ross et al, 1990; Mangariños et al., 2000; Jung et al., 2010; Ceretta et al., 2012b; Calles-Escandon e Cippolla, 2001).

Enquanto a maioria dos órgãos do corpo são capazes de utilizar outros substratos energéticos, o cérebro utiliza primordialmente a glicose. Dessa forma, a barreira hematoencefálica é rica em transportadores de glicose 1 (GLUT1) e mais de 99% da glicose captada é utilizada pelos neurônios e por células da glia. Assim, a eficácia e contínuas demandas metabólicas do cérebro tornam-se excepcionalmente susceptíveis a flutuações na concentração de glicose no organismo (Whitmer, 2007).

O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção de EROs e/ou ERN e a capacidade de defesa antioxidante do organismo (Yoshihiro, 2003). O cérebro é particularmente vulnerável ao dano oxidativo, devido ao seu alto consumo de oxigênio, extensivo uso de glutamato, pelo seu elevado conteúdo lipídico, em especial de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs), por seu modesto mecanismo de defesa antioxidante e pela presença de células microgliais, as quais podem produzir espécies reativas (ERO) (Halliwell e Gutteridge, 2007). Considera-se que a hiperglicemia induz um aumento na produção de

EROs no cérebro, fígado, pâncreas e células endoteliais da aorta, entre outros (Rocha et al., 2006). Portanto, a hiperglicemia constante no indivíduo diabético pode colaborar para a indução de estresse oxidativo.

Muitos estudos têm mostrado que a obesidade e a hiperglicemia estão associadas ao aumento da produção de EROs (Furukawa et al., 2004; Kudin et al., 2004). Além disso, mecanismos bioquímicos têm sido propostos para explicar as anormalidades estruturais e funcionais associadas com a exposição prolongada dos tecidos à hiperglicemia. Isso indica que a capacidade antioxidante endógena pode estar prejudicada nos indivíduos diabéticos, dificultando a remoção dos radicais livres (Santini et al., 1997).

Pesquisas indicam um aumento de carbonilação de proteínas em tecidos renais e da peroxidação lipídica em fígado, plasma e hipocampo de ratos submetidos aos modelos experimentais do diabetes (Szkudelski, 2001; Wayhs et al., 2010; Chang et al., 2011). O estresse oxidativo causa prejuízos irreversíveis às células, induzindo a morte celular tanto por necrose quanto por apoptose (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A partir de estudos em células β in vivo, observou-se que altas concentrações de glicose aumentam a apoptose celular, contudo, a glicotoxicidade nas ilhotas de Langerhans do pâncreas é potencialmente irreversível, ocorrendo uma longa exposição crônica as concentrações elevadas de glicose na condição do DM bem como pela diminuição característica da síntese e secreção da insulina (Wajchenberg, 2007).

O dano em tecidos causado pela superprodução de superóxido mitocondrial é uma das principais causas da diabetes (Giacco e Brownlee, 2010). As ERO têm um papel importante na fisiopatologia de diversas doenças, inclusive o diabetes (Brownlee, 2001). Sabe-se, por exemplo, que a hiperglicemia crônica pode aumentar o estresse oxidativo, o qual reduz a capacidade do sistema de defesa antioxidante e acelera o progresso de complicações diabéticas (Brownlee, 2004).

Um dos principais mecanismos patogênicos responsável pelos danos celulares e teciduais relacionados ao estresse oxidativo no DM envolve a formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), os quais são lipídeos ou proteínas que se tornam glicosilados após a exposição a açúcares oxidados e que atuam modificando proteínas intracelulares relacionadas a regulação gênica. Tudo isso interfere na sinalização celular e ainda estimula a produção de citocinas inflamatórias (Barbosa et al., 2008). A produção aumentada de ERO em decorrência da hiperglicemia parece ser o mecanismo comum em todas as células lesadas, sendo essa hipótese capaz de unificar todas as vias (Boarolli et al., 2014). Assim, a hiperglicemia ocasiona o aumento da

atividade da poli ADP (ribose difosfato de adenosina) polimerase (PARP), enzima envolvida no reparo de danos ao DNA, e consequentemente, a diminuição da atividade do gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), responsável pela metabolização final da glicose, ativando as vias dos polióis (isso ocorre quando a glicose é metabolizada em sorbitol e frutose, pela ação das enzimas aldose redutase e desidrogenase do sorbitol), AGEs (produtos avançados da glicosilação não enzimática), PKC (proteína cinase), NFkB (fator nuclear Kb) e via das hexosaminas (ocorre pelo aumento da glicose intracelular como consequência da metabolização final de frutose-6-fosfato a uridina difosfato-N-acetil glucosamina) (Brownlee, 2005) (Figura 3).

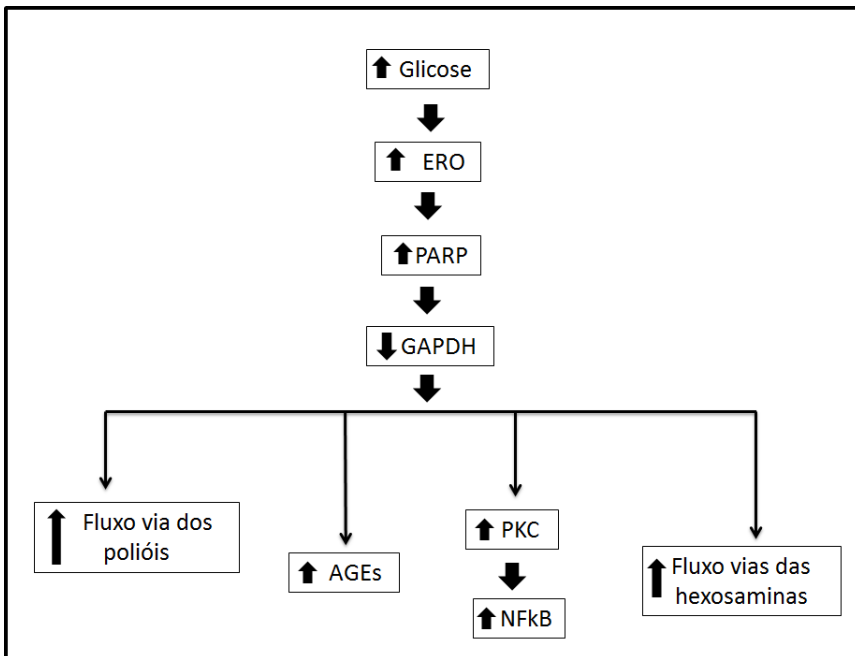


Figura 3: Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia. ERO = espécies reativas de oxigênio; PARP = poli-ADP-ribose polimerase; GAPDH = gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; AGEs = produtos avançados da glicosilação não enzimática; PKC = proteína cinase; NFkB = fator nuclear Kb. Fonte: adaptada de Reis et al. (2008).

Esse aumento ocasiona um desequilíbrio da homeostase celular que leva à diminuição das defesas antioxidantes intracelulares. Além da

hiperatividade da rota dos polióis, a hiperglicemia pode ocasionar um aumento na concentração dos produtos da glicação avançada (AGEs), alterando assim a função celular (Calles-Escandon e Cippola, 2001). A glicação de proteínas resulta na liberação de vários fatores inflamatórios (citocinas), levando ao estresse oxidativo (radicais livres) e a diminuição do metabolismo de substratos, com conseqüente redução de adenosina trifosfato (ATP), o que causa degenerações e disfunções vasculares (Sartori, 2006).

O quadro de hiperglicemia causa conseqüências neurológicas, que embora ainda não estejam totalmente esclarecidas, podem influenciar largamente no metabolismo cerebral. Um ambiente com elevada concentração de glicose provoca, por exemplo, alterações nas células gliais, contribuindo para a fisiopatologia dos transtornos do SNC observadas na hiperglicemia e pode ser devido a um efeito direto da glicose, não envolvendo necessariamente um déficit de insulina (Mello et al., 2012; Valente et al., 2012).

Todos os componentes celulares são susceptíveis à ação das EROs, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da lipoperoxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (Mello et al., 1984). De Oliveira et al. (2009) mostraram que em um modelo animal de esquizofrenia induzido por diferentes doses de cetamina aumentaram a peroxidação lipídica e carbonilação protéica.

Em modelos animais do diabetes, foram descritas alterações como o aumento da reatividade de astrócitos hipocâmpais e plasticidade sináptica; alterações vasculares; diminuição da complexidade dendrítica; neurotransmissão prejudicada e perda de memória (Magariños et al., 2000; Jung et al., 2010). Todos esses danos estão correlacionados também à esquizofrenia, o que enfatiza a relação entre a hiperglicemia e o estresse oxidativo (Boarolli et al., 2014).

A correlação entre esquizofrenia e DM, normalmente está associada ao ganho de peso e a DM2 (Azevedo et al., 2002). Contudo, poucos estudos mostram a relação entre esquizofrenia e DM1. Um estudo recente indicou possível associação entre a Síndrome da Deleção do Cromossomo 22q11.2, com esquizofrenia e DM1, observado em um indivíduo de 29 anos e uma criança de 9 anos (Digilio et al., 2005). Entretanto, testes clínicos atuais mostraram como os defeitos na sinalização da insulina (causados por uma hipoinsulinemia que está presente no DM1) perturbam o nível de neurotransmissores no cérebro de camundongos, resultando em níveis elevados da proteína Net, que remove noradrenalina e dopamina do espaço sináptico (Figlewicz et

al.,1996). A diminuição da dopamina no córtex frontal pode contribuir, desse modo, para déficits cognitivos e sintomas negativos associados à esquizofrenia (Robertson et al., 2010).

Desse modo, evidências apontam que distúrbios nos mecanismos de defesa antioxidante têm um papel crucial na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos como esquizofrenia, transtorno de humor e depressão (Halliwell, 2001; Halliwell e Whiteman, 2004). Tanto fatores genéticos como ambientais podem ocasionar o aumento de ERO e influenciar a capacidade de defesa antioxidante em pacientes psiquiátricos, desencadeando dano a lipídeos, proteínas e DNA, afetando então, o crescimento e a diferenciação neuronal (Pandya et al., 2013).

O dano oxidativo no DNA é reconhecido como a maior causa de morte celular e mutações em todos os organismos aeróbicos, sendo que as ERO representam a classe de radicais mais importante gerada nos seres vivos (Bjelland e Seeberg, 2003). Devido a isso, o dano ao DNA pode ser relacionado com o desenvolvimento de doenças crônicas, degenerativas e o envelhecimento (Valko et al., 2004). Cada modificação na estrutura molecular do material genético é designada com um dano ao DNA (Friedberg et al., 2016). Inclusive, o DNA de células vivas pode ser lesado quando exposto à agentes químicos e físicos. Compostos exógenos e anestésicos têm demonstrado potenciais efeitos mutagênicos e genotóxicos (Baden e Simmon, 1980; Sardas et al., 1992).

O dano ao DNA produzido por oxidação é considerado o dano mais significativo oriundo do metabolismo celular. Uma vez que a vida animal depende de oxigênio, constantemente são gerados agentes oxidantes derivados do próprio metabolismo, como por exemplo, radicais superóxido, peróxido de hidrogênio, entre outros. Adicionalmente, os radicais livres também podem ser gerados frente a diversas patologias como o câncer e doenças cardiovasculares, radiação, calor, uso de produtos químicos e drogas. Os animais por sua vez, desenvolveram um complexo mecanismo enzimático antioxidante, porém, há situações em que este mecanismo não funciona perfeitamente ou encontra-se em desequilíbrio (Friedberg et al., 1995; Friedberg et al., 2016).

De todos os alvos celulares para o dano oxidativo, o mais vulnerável é o DNA, já que este não pode ser simplesmente repostado, como as proteínas e lipídios. O aumento de EROs pode causar dano ao DNA através do ataque químico direto e/ou através de mecanismos

indiretos, como a ação sobre enzimas que replicam ou reparam o DNA (Meehan et al., 1999; Brozmanová et al., 2001).

Já foi estimado que o genoma humano recebe cerca de 10.000 “ataques” oxidativos por dia (Friedberg et al., 1995). Os radicais livres são capazes de iniciar uma reação em cadeia que resulta em danos ao DNA a distâncias consideráveis da reação inicial (Saran e Bors, 1990). O ataque ao DNA por EROs, pode originar quebras de simples e/ou dupla fita, assim como, lesões nas bases púricas e pirimídicas, afetando a integridade do genoma (Croteu e Bohr, 1997).

Muitas evidências sugerem que danos acumulativos no DNA causados por EROs, contribuam para diversas condições clínicas como câncer (Palyvoda et al., 2003; Rajeswari et al., 2000), esquizofrenia (Psimadas et al., 2004), Alzheimer (Migliore et al., 2005), DM1 (Reis et al., 2008). O DM1 tem grandes fatores biológicos que interferem na qualidade de vida dos pacientes. O estresse oxidativo, dano ao DNA, alterações na expressão de proteínas e a apoptose, levam à progressão de doenças associadas ao DM, e ainda podem levar ao desenvolvimento da esquizofrenia (De Oliveira., 2009). Portanto, medidas que previnam o avanço de complicações psiquiátricas podem representar uma importante estratégia para prevenção e controle da esquizofrenia em pacientes com DM1.

1.4 MODELOS ANIMAIS DO DIABETES E DA ESQUIZOFRENIA

O conceito de modelo animal é qualquer preparação desenvolvida, suficientemente similar a quaisquer aspectos de determinada doença (Geyer et al., 2001). O uso de modelos animais de doenças humanas é imprescindível como ferramenta na pesquisa experimental (Lipska e Weinberger, 2000).

Dentre os diferentes modelos experimentais de DM encontra-se a aplicação de aloxano, cuja injeção intravenosa destrói seletivamente as células β -pancreáticas, que, por sua vez, são captadas rapidamente pelos transportadores de glicose (GLUT2), levando à formação de radicais livres após uma série de reações que culminam com a lesão celular (Malaisse et al., 1982; Lenzen, 2008). O aloxano proporciona discreta redução glicêmica cerca de 30 minutos após sua injeção, como resultado da estimulação de secreção de insulina e consequente aumento da insulinemia (Lenzen, 2008). Contudo, após 60 minutos da injeção ocorre hiperglicemia decorrente do decréscimo da insulinemia persistindo nas próximas 4 horas. Nessa fase ocorrem as primeiras alterações

morfológicas das células β , como dilatação do retículo endoplasmático rugoso e das mitocôndrias, além de diminuição do complexo do Golgi, dos grânulos e do conteúdo de insulina (Szkudelski, 2001). No período de 4 a 8 horas, há um grande aumento da insulinemia, como consequência de ruptura da membrana celular. Posterior e permanentemente segue a hiperglicemia, que ocorre de forma crescente entre 9 a 144 horas, estabilizando-se após esse período. Esta fase é alcançada com a completa degranulação e perda de integridade das células β , gerando um aumento de macrófagos no pâncreas (Boquist, 1977; Szkudelki, 2001; Lenzen, 2008).

Geralmente os modelos animais de diabetes exibem características fisiológicas similares às encontradas em humanos como hiperglicemia crônica, hiper ou hipoinsulinemia, além dos sintomas clínicos da diabetes: poliúria, polifagia e letargia (Srinivasan e Ramarao, 2007). Em animais, estudos apontam que o aloxano induz déficit no metabolismo da glicose e de lipídios, assim como em humanos (Velasquez et al., 1990; Shafrir, 2003; McNeil, 1999; Srinivasan e Ramarao, 2007). Além disso, vários modelos pré-clínicos de diabetes exibem complicações, tais como neuropatia, nefropatia, cardiomiopatia, aterosclerose e hipertensão (McNeil, 1999; Velazquez et al., 1990).

No presente trabalho o aloxano foi administrado via intraperitoneal, conforme descrito na literatura (Szkudelki, 2001). Esse fármaco induz nos animais DM1 devido ao desenvolvimento de alterações clínicas e laboratoriais bem definidas, incluindo, a elevação da ingestão hídrica e da diurese e valores glicêmicos acima de 300 mg/dL (Spiller et al., 2012). Diante disso, é sábio que o modelo animal de diabetes induzido por aloxano encontra-se bem estabelecido e validado, permitindo a mimetização da doença para o estudo da fisiopatologia e novos alvos terapêuticos (Schellini, 1992), fato que justifica a escolha deste modelo nesta pesquisa.

Já o modelo animal de esquizofrenia, apresenta uma complexidade e dificuldade para se obter um modelo animal que contemple todos os aspectos do transtorno. Por isso, existe uma série de modelos que demonstram aspectos diferentes da esquizofrenia para que se possam estudar diferentes mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesse transtorno (Javitt et al., 2000; Meyer e Feldon, 2010).

Em modelos animais farmacológicos de esquizofrenia, destaca-se a administração de antagonistas não competitivos de receptores glutamatérgicos (NMDA), como a cetamina (De Oliveira et al., 2009; Canever et al., 2010; Fraga et al., 2011), fenciclidina (Hashimoto et al.,

2007; Elsworth et al., 2012) e MK-801 (Su et al., 200; Boulay et al., 2010), os quais bloqueiam o canal NMDA, impedindo o influxo de cálcio, podendo assim induzir um estado psicótico transitório e reversível incluindo sintomas positivos, negativos e cognitivos da esquizofrenia em indivíduos saudáveis (Javitt et al., 2000; Mechri et al., 2010).

Em roedores, estas drogas estabelecem comportamentos anormais, como hiperatividade, estereotipia, alteração do comportamento social e déficit sensorio e cognitivo, que são constitutivos da esquizofrenia (Lipska e Weinberger, 2000). Nestes modelos, a capacidade de reversão e/ou prevenção da patologia por fármacos prevê que estes compostos poderão apresentar função antipsicótica em humanos (O’neill e Shaw, 1999; Geyer e Ellenbroek, 2003; Kapur e Mamo, 2003; Bubenikova-Vaesova et al., 2008; Neill et al., 2010; Meltzer et al., 2011).

Neste contexto, a pesquisa em animais tem representado um promissor instrumento para elucidar as bases biológicas das doenças e dos transtornos psiquiátricos. Sabe-se que o estresse oxidativo decorrente de hiperglicemia crônica exerce papel central nas complicações do DM1 e que as EROs podem lesionar macromoléculas celulares, como proteínas, lipídeos e o DNA, atuando assim como agentes pró-apoptóticos. Por fim, o propósito deste trabalho foi investigar a associação do DM1 com a esquizofrenia em modelos animais, a fim de desvendar os parâmetros comportamentais e bioquímicos envolvidos em ambas patologias.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os parâmetros comportamentais e bioquímicos do DM1 como fator de risco para o desenvolvimento da esquizofrenia em um modelo animal de roedores.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar os níveis sanguíneos pós-prandial dos ratos Wistar jovens submetidos ao modelo animal do diabetes associado ao modelo animal de esquizofrenia no início e no final do experimento;
- ✓ Monitorar o peso dos ratos Wistar jovens submetidos ao modelo animal do diabetes associado ao modelo de esquizofrenia no início e no final do experimento;
- ✓ Avaliar os parâmetros comportamentais (atividade locomotora, interação social e inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto - PPI) em ratos Wistar jovens submetidos ao modelo animal do diabetes associado ao modelo animal de esquizofrenia;
- ✓ Avaliar a atividade da enzima AChE no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos Wistar jovens submetidos ao modelo animal do diabetes associado ao modelo animal de esquizofrenia;
- ✓ Avaliar os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a carbonilação de proteínas no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos Wistar jovens submetidos ao modelo animal do diabetes associado ao modelo animal de esquizofrenia;
- ✓ Avaliar o dano ao DNA a partir do sangue periférico dos ratos Wistar jovens submetidos ao modelo animal do diabetes associado ao modelo animal de esquizofrenia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado dentro das diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimental Animal (CONCEA) para pesquisas utilizando animais. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC (Protocolo nº 006/2015-2) (anexo A). Todos os cuidados foram adotados para evitar ou mimetizar o sofrimento dos animais durante os experimentos, além de minimizar o número de animais.

Os procedimentos utilizados para este experimento foram realizados nas dependências do Laboratório de Neurociências (Neurolab), pertencente à instituição de ensino, UNESC. Todos os equipamentos, reagentes e drogas necessárias para o cumprimento deste estudo estavam disponíveis ao proponente, não havendo critérios aparentes para suspensão ou encerramento da pesquisa.

3.1 ANIMAIS

Os animais foram obtidos do biotério da universidade e acondicionados em 5 por caixa, com ciclo de claro e escuro de 12 horas (6 horas às 18 horas), a uma temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$ com alimentação e água disponíveis, exceto no dia em que os animais ficaram em jejum de 18 horas antes da administração de aloxano, para melhor absorção do medicamento conforme determina o protocolo para indução do DM1 em animais.

Os ratos Wistar são descritos na literatura há muitos anos como uma linhagem de roedores apropriada para o estudo da esquizofrenia, bem como para o estudo de novos tratamentos farmacológicos pré-clínicos (Ellenbroek e Cools, 2000; Nestler e Hyman, 2010). Para este estudo foram utilizados 180 ratos Wistar jovens, pesando em média 70g a 100g. Este número considerou o fato do modelo animal de diabetes apresentar um índice de mortalidade de 20% em experimentos pré-clínicos, já bem descritos na literatura (Dornas et al., 2006) e, além da morte dos animais pelo DM1, poderiam haver falhas técnicas e/ou imprevistos durante o experimento.

Optou-se pela utilização de ratos machos devido às fêmeas apresentarem uma grande variabilidade de resposta em ambos os testes comportamentais e bioquímicos, fato geralmente associado ao perfil hormonal específico. Os animais foram utilizados com 23 dias para

mimetizar a DM1, pois a mesma pode ser desencadeada na infância e adolescência em humanos (SBD, 2014).

Utilizou-se um número de 10-15 animais por grupo para a realização das análises comportamentais divididas em 2 momentos: 1º atividade locomotora e interação social (n=60); 2º IPP (n=60). Os mesmos animais foram expostos à atividade locomotora e ao teste de interação social, pois não há nenhum fator estressor nesses comportamentos. No entanto, os animais que realizaram o teste IPP não puderam ser expostos à outra análise comportamental, pelo fato do PPI expor os animais a estímulos auditivos, os quais poderiam gerar um estresse nos animais e, assim, comprometer os resultados da pesquisa. Para as análises bioquímicas utilizou-se um total de 60 animais (n= 5-8). Sendo que foram utilizados o sangue e as estruturas cerebrais (córtex frontal, hipocampo e estriado) de todos os animais incluídos no experimento.

Após os testes comportamentais, os animais foram decapitados e suas estruturas cerebrais dissecadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80°C para posteriores análises bioquímicas. Os animais foram descartados e acondicionados em saco branco leitoso e conduzidos para o freezer (conservação) na universidade. Posteriormente, foram coletados e transportados por empresa terceirizada. Os resíduos foram tratados fisicamente e em seguida encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Procedimentos realizados conforme RDC nº 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

3.1.1 Indução do diabetes por aloxano

O DM1 foi induzido nos animais através de uma única injeção (150 mg/kg) intraperitoneal (i.p) de aloxano diluído em solução salina (0.9% NaCl) sendo que o grupo controle recebeu solução salina nas mesmas condições. Ambos os grupos experimentais (aloxano e salina) receberam injeção de aloxano ou salina após jejum de 18 horas (Lerco et al., 2003). O conteúdo de glicose foi quantificado por kit comercial 48 horas após a indução e também no 10º dia do experimento.

Ressalta-se que neste estudo somente foram utilizados animais com alterações clínicas e laboratoriais compatíveis com o diabetes, representadas por glicemia pós-prandial acima de 300mg/dL e perda de peso. Os animais que não preencheram estes critérios foram desprezados.

3.1.2 Indução da esquizofrenia por cetamina

A cetamina é o anestésico utilizado em modelos animais de esquizofrenia para mimetizar alterações comportamentais (hiperlocomoção e embotamento afetivo) e bioquímicas (hiperfunção do glutamato, alteração em receptores nicotínicos de acetilcolina, hiperatividade na transmissão neuronal, etc.) semelhantes ao transtorno quando administrada na dose de 25mg/kg (Hunt et al, 2006; Canever et al., 2010). Na literatura está bem descrito a utilização deste modelo animal para induzir a esquizofrenia, sendo que sua validade de face (mimetizar os sintomas da doença determinada), construto (habilidade do modelo em reproduzir alguns aspectos fisiopatológicos da doença) e preditiva (a avaliação se os medicamentos clássicos utilizados para tratar a patologia tem o potencial de prevenir e/ou reverter às alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas no animal) estão comprovados (Reddy e Yao, 1996; De Oliveira et al., 2009). Sendo assim, neste estudo a cetamina foi administrada via intraperitoneal, na dose de 25 mg/kg, preparada em solução salina no volume de 1mL/100g (Tomiya et al, 2006; Imre et al , Becker, 2004; Canever et al., 2010). A utilização do modelo animal de cetamina é viável, uma vez que, estes animais são de baixo custo, fácil de trabalhar e com fisiologia semelhante ao humano em vários aspectos (Silva et al., 2010).

3.1.3 Desenho experimental

No primeiro momento (indução do diabetes), os animais foram pesados e este procedimento se repetiu no 10º dia (final) do experimento. Os ratos foram divididos em 4 grupos experimentais: 1) Controle (salina + salina), 2) Cetamina (cetamina + salina), Aloxano (aloxano + salina) e Aloxano + Cetamina, os quais permaneceram em jejum de 18 horas para posterior indução do diabetes através de uma única injeção (i.p) de aloxano (150mg/kg) ou salina. Os níveis de glicose foram avaliados 48 horas após a injeção do aloxano para comprovação da indução do modelo. Do 4º ao 10º dia, os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p) de cetamina (25mg/kg) ou salina durante 7 dias afim de mimetizar o modelo de esquizofrenia.

No 10º dia, 30 minutos após a última administração de cetamina ou salina, os animais foram submetidos aos testes comportamentais: atividade locomotora, interação social e IPP. Antes da decapitação com o uso da guilhotina, os animais foram submetidos ao teste da glicemia

para verificar se permaneceram diabéticos até o final do experimento. Logo após, os animais foram decapitados com uso de guilhotina, o sangue foi coletado para análise do Dano ao DNA e as estruturas cerebrais (córtex frontal, hipocampo e estriado) dissecadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80°C para posteriores análises bioquímicas (Figura 5).

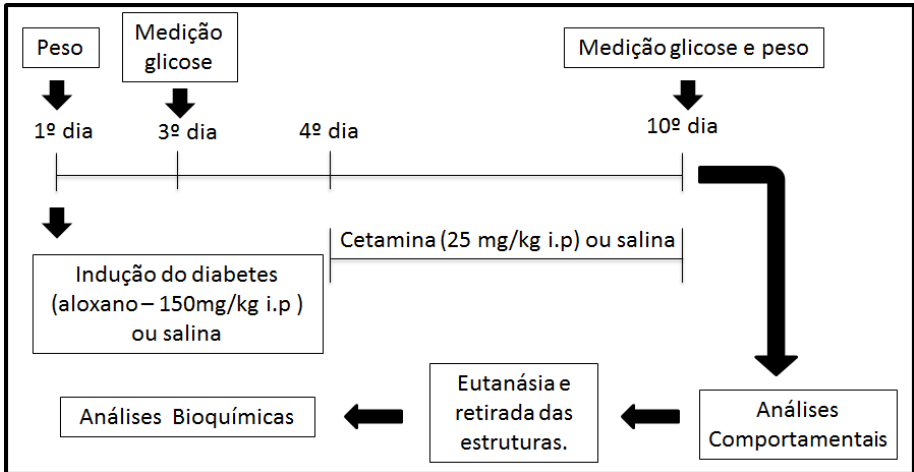


Figura 4: Desenho experimental (figura elaborada pela autora)

3.2 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

3.2.1 Atividade Locomotora

Trinta minutos após a última administração de cetamina ou salina, os animais foram submetidos individualmente à exploração durante o período de 15 minutos em uma caixa de atividade locomotora com 50 x 25 x 50 cm de dimensão, sendo a atividade avaliada automaticamente (Activity Monitor, Insight Laboratory Equipment, Ribeirão Preto, SP). Este teste avalia a distância percorrida (em centímetros) pelo animal, dividindo o tempo total de avaliação em blocos de 5 minutos (Canever et al., 2010; De Oliveira et al., 2011). A distância total foi então calculada somando-se as mudanças de posições controladas pelo sistema (Zugno et al., 2013) (Figura 6). Este teste tem

como finalidade avaliar a atividade exploratória e locomotora dos animais e está relacionado com os sintomas positivos da esquizofrenia.

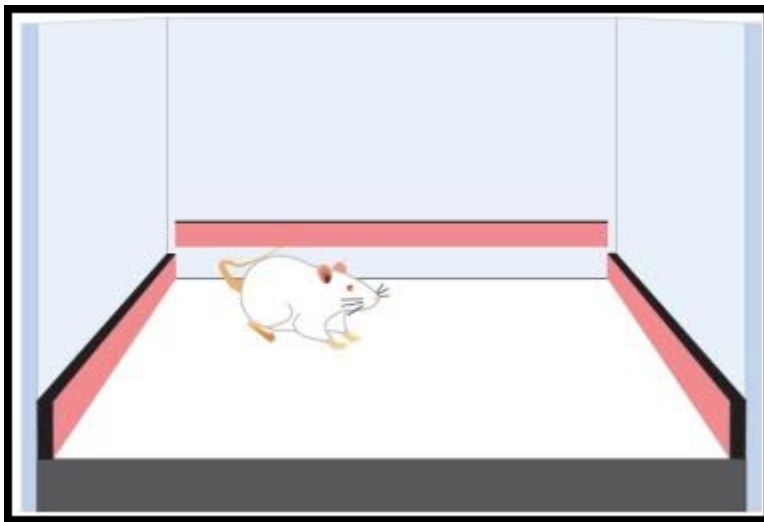


Figura 5: Representação do equipamento do teste da atividade locomotora (ilustração elaborada pela autora).

3.2.2 Interação Social

Após a última administração de cetamina ou salina, os animais foram isolados e privados de água e comida por um período de seis horas. Posteriormente foram colocados em duplas, em uma caixa de acrílico (60 x 60 x 30 cm) com piso sólido. O teste consistiu em analisar a interação social das duplas, que pertenciam ao mesmo grupo experimental, porém de caixas diferentes, por um período de 15 minutos. A avaliação comportamental em relação ao perfil social dos animais de forma individual não foi realizada, apenas em pares (Schneider e Przewlocki, 2005). Durante este intervalo, foi analisada a latência para iniciar o contato entre os animais (seguir ou se aproximar do parceiro, montagem sobre o parceiro, cheirar ou grooming de qualquer parte do corpo do parceiro), o tempo total em que os animais permaneceram em contato e o número total de contatos (Niesink e Van Ree, 1989; Schneider e Przewlocki, 2005) (Figura 7).

A diminuição da interação social vem sendo estudada como um comportamento característico (sintoma negativo) em modelos animais

de esquizofrenia e autismo (Mohn et al., 1999; Schneider e Przewlocki, 2005; Diccico-Bloom et al., 2006).

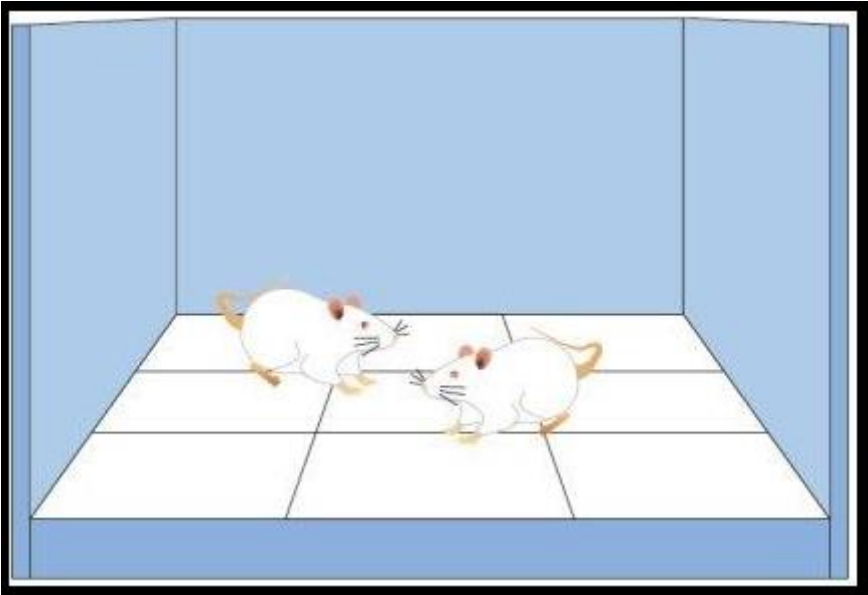


Figura 6: Representação do equipamento do teste de interação social (ilustração elaborada pela autora).

3.2.3 Inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto (IPP)

A quantificação da IPP foi realizada com base no protocolo descrito por Levin et al. (2011). Foi utilizada uma caixa de medida de sobressalto com vedação sonora (Insight). O protocolo foi composto por 74 testes pseudo-randomizados, divididos em sete categorias distintas, apresentados com um intervalo de 20 segundos: 1) 20 apresentações de pulso sozinho (P), com uma intensidade de 120 dB por 50 ms; 2) 8 apresentações de cada intensidade de pré-pulso (PP) sozinho, intensidades de 65, 70 e 75 dB, com 3000Hz de frequência por 20 ms; 3) 10 apresentações de cada intensidade de PP + P, com um intervalo de 50 ms.

A integridade do filtro sensorio-motor de humanos e de modelos animais é verificado através do teste de inibição pré-pulso do reflexo do sobressalto (IPP). O reflexo SS é uma resposta motora estereotipada frente a estímulos repentinos e intensos (Swerdlow et al., 2006). No

fenômeno de IPP, a diminuição da resposta ao pulso (P), estímulo repentino e intenso, ocorre quando esse é precedido de um pré-pulso (pP), estímulo menos intenso (Figura 8). Assim, o IPP reflete a ação protetora do filtro sensório-motor contra interferências: o estímulo mais fraco não só desencadeia o seu processamento, como também é capaz de suprimir o processamento de um estímulo mais forte subsequente (Graham, 1975). O resultado indica a porcentagem de IPP, avaliando assim as funções sensório-motoras dos animais (Hoffman e Ison, 1980; Weiss e Feldon, 2001).

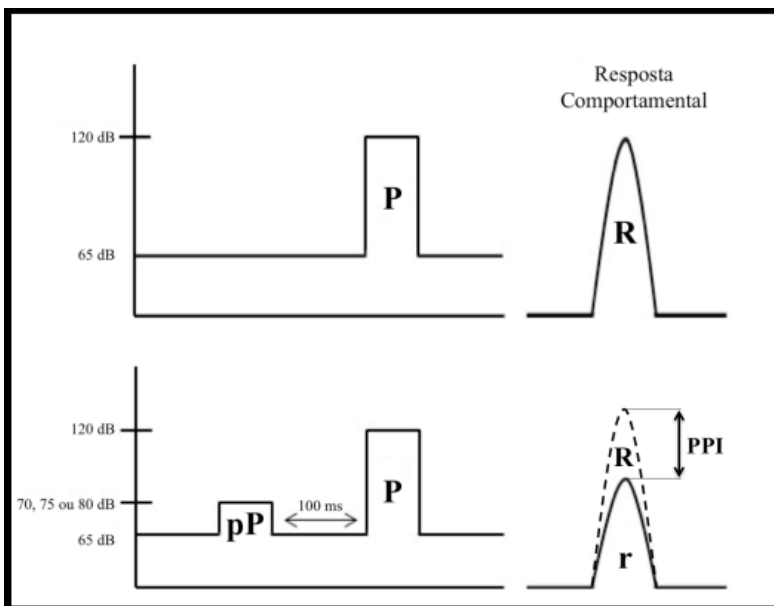


Figura 7: Representação da Inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto (PPI). A figura representa a situação em que um estímulo forte (pulso, P) gera uma resposta (R), mas na presença de um estímulo fraco prévio (pré-pulso, pP), a resposta ao pulso é diminuída (r). O fenômeno de IPP é calculado a partir da diferença entre a resposta comportamental sem e com pré-pulso. Adaptado de Koch e Schinztler (1997).

3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.3.1 Mensuração da glicemia

Os níveis sanguíneos de glicose foram mensurados por meio de kit comercial no 3º e no 10º dia de experimento. Para realizar esse procedimento, foi necessário furar a extremidade da calda do rato com uma agulha (13 x 0,45 mm) e colocar o sangue na fita medidora de glicose. Para constatação do diabetes, os níveis de glicose em jejum deveriam ser superiores ou igual a 300 mg/kg (Spiller et al., 2012).

3.3.2 Avaliação de parâmetros de Dano Oxidativo em cérebro de roedores

3.3.2.1 Medida de dano oxidativo a lipídeos

Como indício de peroxidação lipídica foi medido os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante uma reação ácida aquecida, conforme previamente descrito por Draper e Hadley (1990). As amostras obtidas foram misturadas com ácido tricloroacético 10% e ácido tiobarbitúrico 0,6%, fervidas por 30 minutos e após, os equivalentes de malondialdeído (MDA) foram determinados por espectrofotometria, à absorvância em 535 nm.

3.3.2.2 Medida de dano oxidativo a proteínas

O dano oxidativo em proteínas foi determinado pelo conteúdo de grupos carbonila, baseado na reação com dinitrofenilidrazina (DNPH), conforme descrito por Levine et al. (1990). As amostras obtidas foram precipitadas pela adição de ácido tricloroacético 20%, centrifugadas com força centrífuga de 8.000g e então dissolvidas com DNPH. Os grupos carbonila foram determinados por espectrofotometria, à absorvância em 370 nm.

3.3.2.3 Medida de dano ao DNA

O protocolo utilizado na execução do teste foi baseado na versão alcalina desenvolvido por Singh et al. (1988) com modificações sugeridas por Tice et al. (2000). Aproximadamente 5 µL de sangue heparinizado foi embebido em 95 µL de agarose Low Melting Point

(0,75%). Essa mistura foi colocada em lâmina de microscópio pré-revestida com cobertura de 300 μL de agarose normal a 1,5 % e coberta posteriormente com uma lamínula. Depois da solidificação em geladeira por aproximadamente 5 minutos, as lamínulas foram retiradas e imersas em tampão de lise [2,5 M cloreto de sódio (NaCl), 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de sulfóxido de dimetilo (DMSO)] por no mínimo 1 hora e até duas semanas, à 4°C. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300 mM hidróxido de sódio (NaOH) e 1 mM EDTA, pH>13) por 20 minutos para desenrolar o DNA. A corrida eletroforética foi realizada por mais 15 minutos, a 25v e 300mA. Todas essas etapas foram realizadas sob luz amarela indireta. Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com 0,4 M Tris (pH 7,5). Finalmente, o DNA foi corado com nitrato de prata utilizando protocolo de Villela et al. (2006).

Quanto à observação ao microscópio, foram analisadas 100 células por indivíduo (50 de cada lâmina duplicada). As células foram classificadas, visualmente, de acordo com o tamanho da cauda (0 = sem cauda e 4 = comprimento máximo de cauda). Assim, o Índice de Danos (ID) de cada grupo variou de zero ($100 \times 0 = 0$; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 ($100 \times 4 = 400$; 100 células observadas com dano máximo). A frequência de danos (em %) foi calculada em cada amostra com base no número de células com cauda versus o número de células sem cauda (Collins, 2004). Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.

3.3.3 Atividade da acetilcolinesterase

A atividade da enzima foi dosada a partir do método de (Ellman et al., 1961). A taxa de hidrólise foi analisada em 1 ml de uma solução 0,8 mM com presença de 100 mM de tampão fosfato (pH 7,5) e 1,0 mM de 5,5'-ditiobis-ácido-2-nitrobenzóico (DTNB). Foram utilizados cinquenta μL de cada amostra adicionadas à solução e pré-incubadas por 3 minutos.

Em seguida, a hidrólise foi analisada pela formação de ânions amarelos (diânion tiolato) de DTNB, mensurado em 412 nm de absorbância por 2 minutos em intervalos de 30 segundos a uma temperatura de 25°C. A atividade da enzima das amostras analisadas foi

expressa em μmol de iodeto de acetilcolina (ACSh) por hora por mg de proteína. As amostras foram avaliadas em duplicata.

3.3.4 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão. Todas as amostras analisadas foram dosadas em duplicatas.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados na análise de glicose do 3º dia foram avaliados de acordo com o teste t de Student's para amostras independentes. Já os resultados da glicose e da avaliação do peso do 10º dia foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo post hoc Tukey. Os efeitos da cetamina, aloxano e a interação aloxano + cetamina foram descritos por meio da ANOVA de duas vias. A análise bioquímica dos danos oxidativos bem como os resultados dos testes comportamentais foram obtidos pela ANOVA de duas vias, quando os valores de F foram significativos, comparações post hoc foram feitas pelo teste de Tukey. Os dados foram expressos como média (\pm) e erro padrão da média (média \pm E.P.M). A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

O teste de IPP foi analisado após o cálculo da média da amplitude de sobressalto após as sessões de P, bem como a média da amplitude da resposta de sobressalto após as sessões de PP+P para cada animal. O nível de IPP para cada animal foi determinado pela expressão da amplitude de sobressalto de PP+P, como uma redução percentual a partir da amplitude de sobressalto de P, sendo calculada de acordo com a seguinte equação: $\% \text{ IPP} = 100 - [(PP/P) \times 100]$, desta forma, 0% corresponde à ausência de diferença entre a amplitude de sobressalto após as sessões de P e PP+P e, conseqüentemente, à ausência de inibição da resposta de sobressalto. As análises estatísticas foram realizadas através do programa Statistica versão 8.0 e utilizou-se o programa GraphPad Prism 5 para a realização dos gráficos.

4 RESULTADOS

4.1 INDUÇÃO DO DIABETES POR ALOXANO

A glicose foi mensurada no 3º e 10º dia de experimento. De acordo com o teste t observou-se, no 3º dia (Figura 9-A), um aumento dos níveis de glicose nos animais do grupo aloxano em relação ao controle ($p < 0,01$). Quando avaliado os níveis de glicose no 10º dia (Figura 9-B), a análise de variância de duas vias (ANOVA) não revelou interação entre as seguintes variáveis: aloxano e cetamina [$F(1,56) = 0,27$, $p = 0,60$,] porém o ANOVA de uma via demonstrou que houve diferença entre os grupos [$F(3,32) = 1555,76$, $p < 0,01$]. No 10º dia houve um aumento da glicemia nos grupos cetamina ($p < 0,01$), aloxano ($p < 0,01$) e aloxano + cetamina ($p < 0,01$) quando comparados ao controle ($p < 0,01$). Ressalta-se que os grupos aloxano e aloxano + cetamina foram os que mostraram uma hiperglicemia mais significativa (400-600 mg/dL). O grupo aloxano + cetamina quando comparado ao grupo aloxano também mostrou uma diferença ($p < 0,01$) significativa na glicemia. Observou-se ainda que a cetamina isolada aumentou a glicemia dos animais e, conforme o esperado, o aloxano isolado e associado à cetamina induziu o modelo do diabetes, que caracteriza-se por um aumento na glicemia acima de 300mg/dL.

O peso dos ratos foi mensurado no 10º dia (Figura 9-C), e o ANOVA de duas vias não revelou interação entre o grupo aloxano + cetamina: [$F(1,56) = 0,94$, $p = 0,33$], no entanto, ANOVA de uma via demonstrou uma diferença significativa entre os grupos [$F(3,56) = 6,17$, $p < 0,01$]. Os resultados mostraram uma considerável diminuição de peso nos grupos que receberam aloxano e aloxano + cetamina, ou seja, nos que desenvolveram hiperglicemia quando comparado ao controle ($p < 0,01$) e a cetamina ($p < 0,01$).

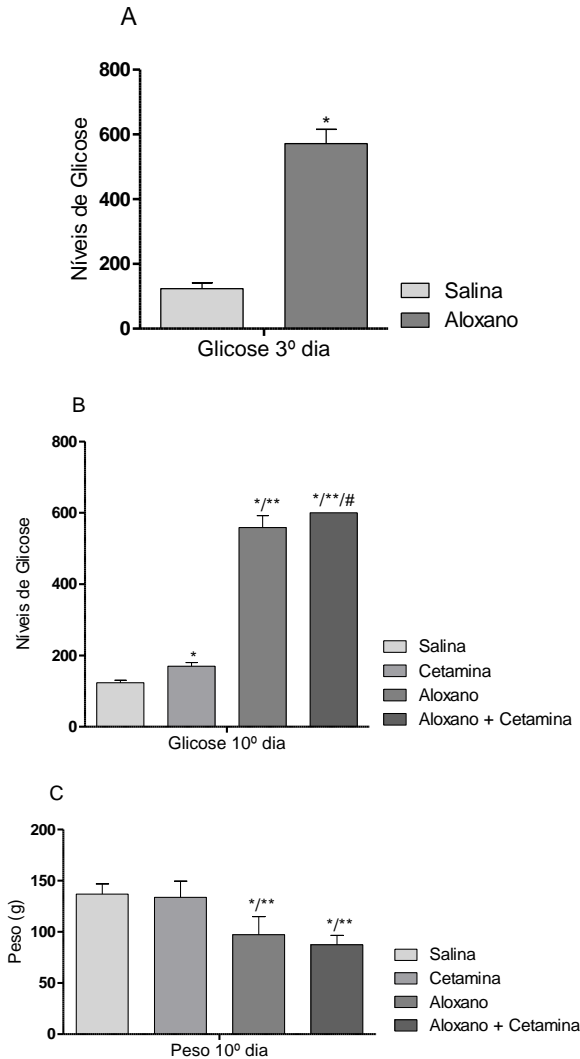


Figura 8: Medição dos níveis de glicose no 3º(A) e 10º(B) dia e do peso no 10º(C) dia em animais submetidos ao modelo do diabetes associado ao modelo de esquizofrenia nos seguintes grupos: 1) controle (salina + salina); 2) cetamina (cetamina + salina); 3) aloxano (aloxano + salina); 4) aloxano + cetamina. Valores estão expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores $p < 0,01$, $n = 15$. * diferente do grupo

controle, ** diferente do grupo cetamina, # diferente do grupo aloxano. Fonte: dados da autora.

4.2 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

4.2.1 Atividade Locomotora

A figura 10 representa a distância percorrida dos animais. A administração de cetamina induziu hiperlocomoção nos animais ($p < 0,01$). Já o grupo aloxano + cetamina apresentou uma diminuição significativa da distância percorrida em relação ao grupo cetamina ($p < 0,01$) e ao grupo aloxano ($p < 0,01$). ANOVA de duas vias revelou interação significativa entre as seguintes variáveis: aloxano + cetamina [$F(1,31) = 25,48$, $p < 0,01$]. Além disso, verificou-se que a cetamina isolada induziu hiperatividade, reproduzindo o modelo animal de esquizofrenia. A associação do aloxano + cetamina foi capaz de reduzir a hiperlocomoção em relação ao grupo cetamina ($p < 0,01$) e ao grupo aloxano ($p < 0,01$), mostrando um possível efeito depressivo causado pelo aloxano.

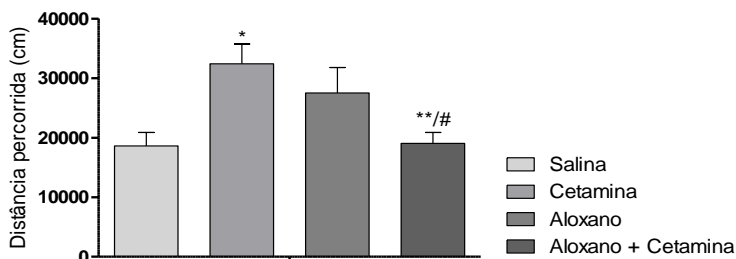


Figura 9: Representação da hiperlocomoção do teste da atividade locomotora dos animais submetidos ao modelo de diabetes associado ao modelo de esquizofrenia nos seguintes grupos: 1) controle (salina + salina); 2) cetamina (cetamina + salina); 3) aloxano (aloxano + salina); 4) aloxano + cetamina. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,01$, $n = 8-10$. * diferente do grupo controle, ** diferente do grupo cetamina, # diferente do grupo aloxano. Fonte: dados da autora.

4.2.2 Interação Social

A figura 11 representa os indicadores de interação social (latência = 4A, número de contatos = 4B e tempo total de contatos = 4C) dos

animais submetidos ao modelo do diabetes associado ao modelo de esquizofrenia.

Na latência, “tempo para o primeiro contato” (figura 4A) a ANOVA de duas vias revelou interação entre o grupo cetamina + aloxano: $[F(1,32)= 7,14, p<0,05]$. Foi observado que a cetamina aumentou significativamente o tempo para o primeiro contato ($p<0,01$) entre os animais. Observou-se também um aumento da latência no grupo aloxano quando comparado ao grupo controle ($p<0,01$) e ao grupo cetamina ($p<0,01$). Foi verificado que no grupo aloxano + cetamina, o tempo que os animais levaram para se tocar pela primeira vez foi significativamente maior em relação aos grupos controle ($p<0,01$), cetamina ($p<0,01$) e aloxano ($p<0,01$). No parâmetro avaliado, pode-se afirmar que a cetamina mimetizou os sintomas negativos no modelo animal de esquizofrenia enquanto o aloxano demonstrou, pelo menos em parte, potencializar os efeitos da cetamina.

No parâmetro, número total de contatos (figura 4B), ANOVA de duas vias revelou interação entre as seguintes variáveis: cetamina + aloxano $[F(1,32)= 6,76, p<0,05]$. Verificou-se novamente que a cetamina induziu o modelo de esquizofrenia, uma vez que diminui o número total de contatos entre os animais ($p<0,01$). O aloxano também diminui o número total de contatos em relação ao controle ($p<0,01$), enquanto o grupo aloxano + cetamina apresentou um menor número de contatos entre os animais diferindo dos grupos controle ($p<0,01$), cetamina ($p<0,01$) e aloxano ($p<0,01$). Assim como na latência, no número total de contatos, a associação do aloxano + cetamina parece ter potencializado o efeito da cetamina.

No tempo total de contatos (figura 4C), a ANOVA de duas vias revelou interação entre as seguintes variáveis: cetamina + aloxano $[F(1,32)= 7,77, p<0,01]$. Verificou-se que o grupo aloxano foi diferente significativamente do grupo controle ($p<0,01$) e do grupo cetamina ($p<0,01$) apresentando menor tempo de contato entre os animais. O grupo aloxano + cetamina também se mostrou significativo, porém somente quando comparado ao grupo cetamina ($p<0,01$). Sendo assim, destaca-se que a cetamina não foi capaz de induzir o modelo animal de esquizofrenia neste parâmetro. No entanto, o aloxano isolado e sua associação com a cetamina foi capaz de reduzir o tempo total de contato entre os animais.

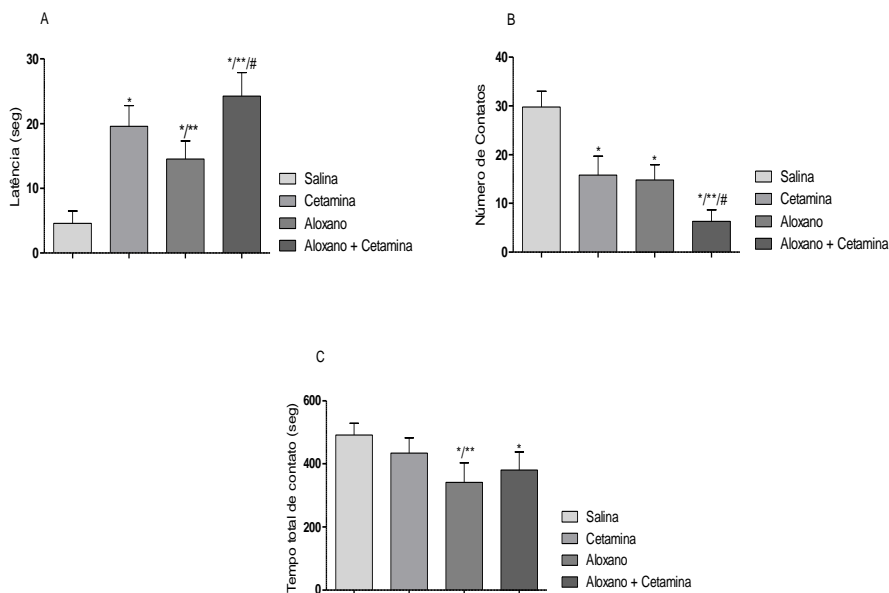


Figura 10: Representação da interação social (A= latência, B= número de contatos e C= tempo total de contatos) dos animais submetidos ao modelo do diabetes associado ao modelo de esquizofrenia nos seguintes grupos: 1) controle (salina + salina); 2) cetamina (cetamina + salina); 3) aloxano (aloxano + salina); 4) aloxano + cetamina. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,01$, $n = 8-10$. * diferente do grupo controle, ** diferente do grupo cetamina, # diferente do grupo aloxano. Fonte: dados da autora.

4.2.3 Inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto

A figura 12 demonstra os efeitos da função sensório-motora dos animais submetidos ao modelo do diabetes associado ao modelo de esquizofrenia a partir do teste de IPP. ANOVA de duas vias revelou interações entre as seguintes variáveis em 65dB entre: aloxano + cetamina [$F(1,42) = 5,79$, $p < 0,05$]; em 70dB entre: aloxano + cetamina [$F(1,42) = 160,27$, $p < 0,01$]; em 75dB entre: aloxano + cetamina [$F(1,40) = 60,072$, $p < 0,01$]. Os animais do grupo controle inibiram o P (Pulso) mediante PP (Pré-Pulso) por apresentarem valores melhores de IPP, ou seja, uma maior % do IPP. Os animais pertencentes ao grupo cetamina apresentaram déficit na IPP quando comparado ao grupo

controle nas três intensidades estudadas (65dB, 70dB e 75dB) ($p < 0,01$), o que indica um possível efeito da cetamina em desencadear um déficit no perfil sensorio-motor dos animais.

Da mesma maneira, o grupo aloxano demonstrou um déficit significativo na IPP quando comparado aos animais do grupo controle nas mesmas intensidades avaliadas ($p < 0,01$, respectivamente). Esse resultado revela o efeito prejudicial do aloxano no perfil cognitivo dos animais, sendo essa ação semelhante ao efeito da cetamina. Ademais, em 65dB os resultados demonstram um significativo déficit sensorio-motor dos animais pertencentes ao grupo aloxano + cetamina quando comparados ao grupo controle ($p < 0,01$) e ao grupo aloxano ($p < 0,01$). Verificou-se também uma diminuição na IPP nos animais em 70dB e 75dB quando comparado ao grupo cetamina ($p < 0,01$). Estes resultados mostraram diante das intensidades estudadas, uma inibição IPP em ambas as patologias e na sua associação.

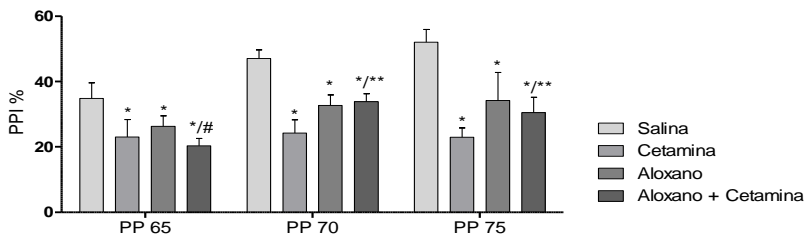


Figura 11: Representação do teste IPP nos animais submetidos ao modelo de diabetes associado ao modelo de esquizofrenia nos seguintes grupos: 1) controle (salina + salina); 2) cetamina (cetamina + salina); 3) aloxano (aloxano + salina); 4) aloxano + cetamina. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,01$, $n = 10-12$. * diferente do grupo controle (salina + salina), ** diferente do grupo cetamina (salina + cetamina), # diferente do grupo aloxano (aloxano + salina). Fonte: dados da autora.

4.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.3.1 Atividade da acetilcolinesterase

A figura 13 demonstra a atividade da enzima AChE nas três estruturas cerebrais nos animais submetidos ao modelo do diabetes associado ao modelo de esquizofrenia. ANOVA de duas vias revelou interações entre as seguintes variáveis aloxano + cetamina no córtex frontal: $[F(1,20)=49,89, p<0,01]$; hipocampo: $[F(1,20)=50,40, p<0,01]$; estriado: $[F(1,21)=10,23, p<0,01]$. A atividade da AChE mostrou-se aumentada nas três estruturas no grupo cetamina quando comparado ao grupo controle ($p<0,01$). Demonstrando a possível ação da cetamina na indução de efeitos no sistema colinérgico. Nos animais do grupo aloxano os valores da atividade da AChE apresentaram-se aumentados quando comparados ao grupo controle ($p<0,01$) no córtex frontal, hipocampo e estriado. O grupo aloxano + cetamina dentre os grupos avaliados, foi o que mostrou um mais considerável na atividade da enzima AChE em relação aos grupos controle ($p<0,01$), cetamina ($p<0,01$) e aloxano ($p<0,01$). O grupo de aloxano foi capaz de aumentar a atividade da AChE quando comparado ao grupo controle ($p<0,01$), porém não de forma tão exacerbada quanto a associação do aloxano com a cetamina.

Os dados observados na atividade da AChE demonstram o efeito da cetamina em induzir nos animais alterações bioquímicas semelhantes às observadas em pacientes esquizofrênicos, o que sugere ainda um risco aumentado destas alterações na associação do diabetes com esquizofrenia (aloxano + cetamina). A cetamina foi capaz de aumentar a atividade da AChE em todas as estruturas avaliadas, reproduzindo o modelo de esquizofrenia e apontando o efeito deste anestésico no sistema colinérgico.

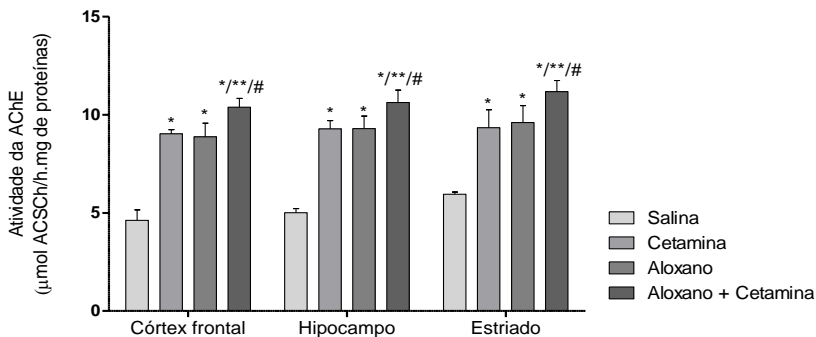


Figura 12: Representação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) dos animais submetidos ao modelo do diabetes associado ao modelo de esquizofrenia nos seguintes grupos: 1) controle (salina + salina); 2) cetamina (cetamina + salina); 3) alozano (aloxano + salina); 4) alozano + cetamina. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,01$, $n = 6$. * diferente do grupo controle, ** diferente do grupo cetamina, # diferente do grupo alozano. Fonte: dados da autora.

4.3.2 Parâmetros de Dano Oxidativo

Os resultados da figura 14A e 14B demonstraram a avaliação bioquímica de peroxidação lipídica (TBARS) e carbonilação de proteínas, respectivamente, nos animais submetidos ao modelo do diabetes associado ao modelo de esquizofrenia. ANOVA de duas vias revelou interações na peroxidação lipídica (figura 14A) entre as seguintes variáveis alozano + cetamina no córtex frontal: $[F=(1,16)=39,03, p > 0,01]$; hipocampo: $[F=(1,16)=7,71, p > 0,05]$; estriado: $[F=(1,16)=7,49, p < 0,05]$. Na figura 14B, ANOVA de duas vias revelou interações na carbonilação de proteínas entre as seguintes variáveis alozano + cetamina no córtex frontal: $[F=(1,16)=36,22, p > 0,01]$; hipocampo: $[F=(1,16)=8,54, p > 0,01]$; estriado: $[F=(1,20)=35,89, p < 0,01]$.

Nas figuras 14A e 14B demonstram que a cetamina foi capaz de aumentar os níveis de TBARS e carbonilação de proteínas em relação ao grupo controle ($p < 0,01$) apenas no córtex frontal. Por outro lado a associação do alozano + cetamina mostrou um aumento significativo da peroxidação lipídica e da carbonilação proteica quando comparado aos grupos controle ($p < 0,05$), cetamina ($p < 0,05$) e alozano ($p < 0,05$) nas três

estruturas cerebrais avaliadas. Esse resultado do TBARS e da carbonilação de proteínas parece demonstrar que o aloxano isolado não causa dano lipídico nem proteico, diferentemente da cetamina. Porém, quando associados (aloxano + cetamina), percebe-se um efeito potencializado ou predomina um efeito da cetamina, a qual aumentou significativamente a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteína.

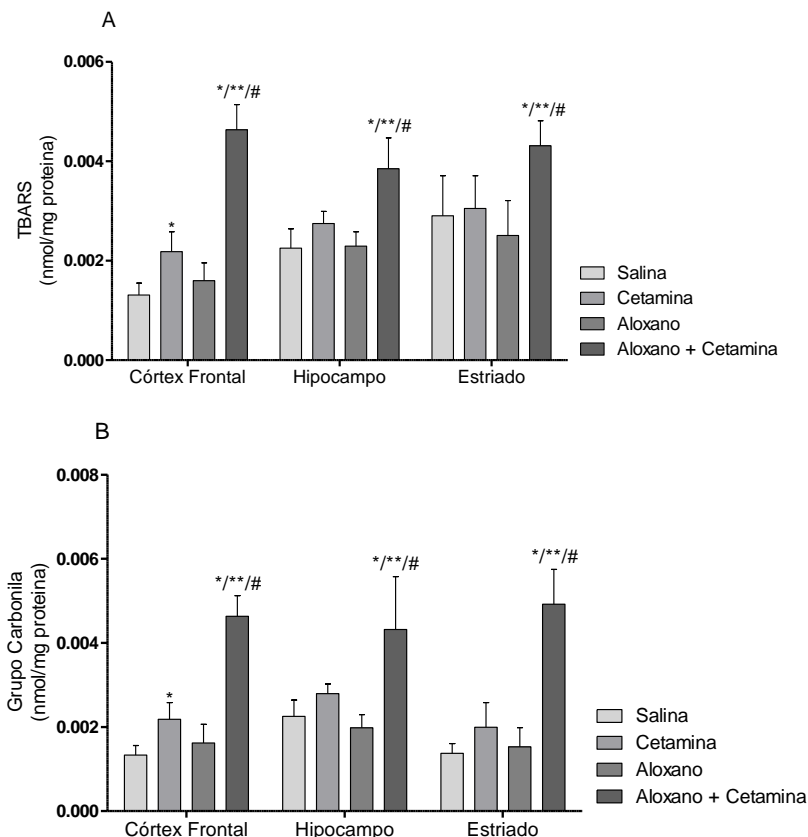


Figura 13: Representação do parâmetro bioquímico peroxidação lipídica (TBARS)(A) e carbonilação de proteína (B) nos animais submetidos ao modelo do diabetes associado ao modelo de esquizofrenia nos seguintes grupos: 1) controle (salina + salina); 2) cetamina (cetamina + salina); 3) aloxano (aloxano + salina); 4) aloxano + cetamina. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de

$p < 0,01$ e $p < 0,05$, $n = 5$. * diferente do grupo controle, ** diferente do grupo cetamina, # diferente do grupo aloxano. Fonte: dados da autora.

4.3.3 Parâmetros de Dano ao DNA

Os resultados da figura 15 e 16 demonstram a frequência de danos e o índice de danos no DNA em sangue periférico dos animais submetidos ao modelo do diabetes associado ao modelo de esquizofrenia.

A figura 15 representa o “número de células com dano”. ANOVA de duas vias revelou interação entre as seguintes variáveis aloxano + cetamina: $[F(1,18)=5,48, p < 0,05]$. Essa interação possivelmente ocorreu pelo efeito da cetamina, uma vez que, o aloxano não potencializou o dano celular. Pode-se observar que os grupos cetamina ($p < 0,05$), aloxano ($p < 0,05$) e aloxano + cetamina ($p < 0,05$) apresentaram um aumento significativo na frequência de danos, quando comparados ao grupo controle. Este resultado demonstrou que o grupo cetamina foi capaz de induzir o modelo animal de esquizofrenia. Esse resultado confirma que a cetamina foi capaz de induzir dano ao DNA, mimetizando em animais, alterações bioquímicas que ocorrem em pacientes esquizofrênicos.

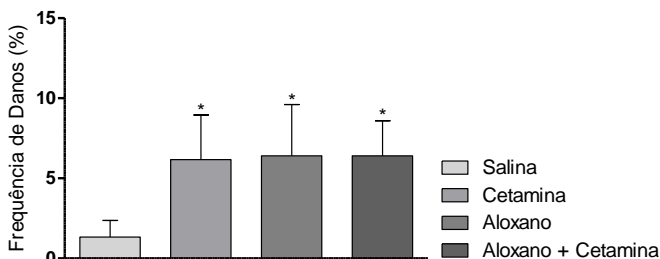


Figura 14: Representação do parâmetro molecular da Frequência de Danos em sangue periférico dos animais submetidos ao modelo do diabetes associado ao modelo de esquizofrenia nos seguintes grupos: 1) controle (salina + salina); 2) cetamina (cetamina + salina); 3) aloxano (aloxano + salina); 4) aloxano + cetamina. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n = 5$. * diferente do grupo controle. Fonte: dados da autora.

A figura 16 representa o “nível de dano nas células”, ANOVA de duas vias revelou interação entre as seguintes variáveis aloxano + cetamina: $[F(1,18)=6,33, p < 0,05]$, porém a cetamina induziu dano, enquanto o aloxano isolado não demonstrou efeito e a associação aloxano

+ cetamina não potencializou o dano ao DNA. Assim, o índice de danos mostrou-se aumentado nos grupos cetamina ($p < 0,01$) e aloxano + cetamina ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle.

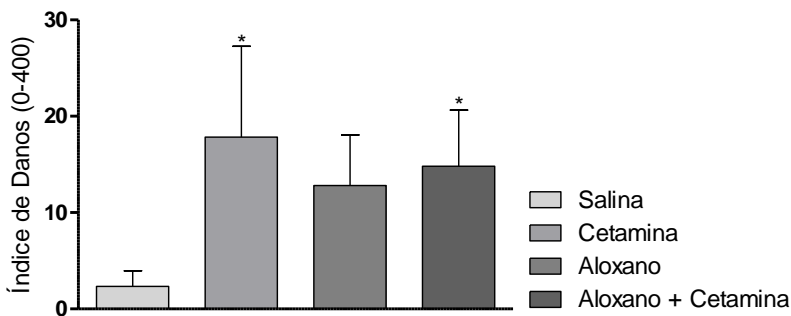


Figura 15: Representação do parâmetro molecular do Índice de Danos em sangue periférico dos animais submetidos ao modelo do diabetes associado ao modelo de esquizofrenia nos seguintes grupos: 1) controle (salina + salina); 2) cetamina (cetamina + salina); 3) aloxano (aloxano + salina); 4) aloxano + cetamina. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,01$ e $p < 0,05$, $n = 5$. * diferente do grupo controle. Fonte: dados da autora.

5 DISCUSSÃO

Como descrito anteriormente, a DM1 é uma patologia que se caracteriza pela destruição parcial ou total das células β pancreáticas resultando em perda progressiva da capacidade de produzir insulina, ao longo de meses ou anos (SBD, 2014). O processo de autodestruição se inicia meses a anos antes do diagnóstico clínico da doença e, dependendo da idade do diagnóstico, cerca de 70 a 90% das células β já foram destruídas após os primeiros sintomas de hiperglicemia (Atkinson et al., 2014).

No presente estudo, foi constatado o diabetes nos animais tanto no 3º dia como no 10º dia após a administração de aloxano, sendo que no 10º dia a cetamina isolada aumentou os níveis de glicose. As alterações do metabolismo da glicose são mais comuns em pacientes com esquizofrenia, com ou sem tratamento, quando comparados à população geral (Sena et al., 2003). Um estudo retrospectivo com 95 esquizofrênicos tratados ou não tratados mostrou uma prevalência maior de DM (15,8%) quando comparado à população geral da Itália (3,2%) (Mukherjee et al., 1996). No 10º dia, o peso dos animais dos grupos aloxano e aloxano + cetamina apresentou significativa diminuição, confirmando uma das alterações para o diagnóstico do diabetes, segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2014). Portanto, pode-se sugerir que o modelo animal do diabetes induziu hiperglicemia e perda considerável de peso sendo semelhantes àqueles apresentados pelos indivíduos diabéticos.

Nos últimos anos, pesquisas têm contribuído para a compreensão das representações do DM1 e sua associação com o autocuidado. Um estudo com delineamento longitudinal, realizado por Skinner et al. (2000), mostrou a importância das representações pessoais do diabetes na determinação do bem-estar e do autocuidado com relação à alimentação para adolescentes com DM1. Devido à isso, torna-se relevante o estudo do modelo animal de DM induzido pelo aloxano que representa o quadro diabético dependente de insulina, bem consolidado na literatura (Szkudelki, 2001; Ienzen, 2008), bem como uma possível avaliação de um posterior desenvolvimento da esquizofrenia após a indução do modelo. O presente estudo buscou investigar parâmetros comportamentais e bioquímicos do DM1 como fator de risco para a esquizofrenia.

A esquizofrenia é um transtorno altamente incapacitante (Balu e Coyle, 2011), particularmente porque afeta as pessoas em uma fase produtiva (final da adolescência e início da idade adulta) onde essas

deveriam estar consolidando ou construindo sua personalidade, incluindo os fatores sociais, econômicos, profissionais e de relacionamento (sexuais e familiares) (Koch, 2006). O transtorno tem origem poligênica, sofrendo influências de fatores ambientais e de desenvolvimento (Van Os et al., 2010). O fator poligênico pode ser um aspecto complicador no estudo devido às peculiaridades deste transtorno associado à DM1.

Estudos mostram que alterações na função glutamatérgica cortical podem estar associadas a uma disfunção tanto no sistema dopaminérgico como colinérgico nos modelos animais de esquizofrenia (Grace, 1991; Carlsson et al., 1999; Jentsch e Roth, 1999; Coyle et al., 2003). A cetamina, substância usada em modelos animais leva a uma hipofunção glutamatérgica e demonstra mimetizar, inclusive os sintomas positivos, negativos e déficit cognitivo da esquizofrenia (De Oliveira et al., 2011; Smith et al., 2011), corroborando os achados deste estudo, no qual a administração de cetamina induziu hiperlocomoção nos animais. No entanto, a associação do aloxano + cetamina foi capaz de reduzir a hiperlocomoção, fato que pode estar relacionado a um comportamento tipo depressivo nos animais. Wayhs et al. (2010) induziram o diabetes em ratos e constataram um maior tempo de imobilidade dos animais diabéticos em relação ao controle. Estudo mostrou que um dos sintomas mais comuns de depressão relacionados ao diabetes é a perda de peso, a qual foi verificada nos animais deste estudo.

Diferentes modelos animais de esquizofrenia mostram alterações no comportamento social, dentre os quais estão os tratamentos com AMPH ou antagonistas de receptor NMDA (Sams-Dood, 1995;1997;1998; Becker e Grecksch, 2004). A cetamina, substância utilizada neste estudo para mimetizar os sintomas da esquizofrenia, tem se mostrado um bom modelo animal, em particular, para os sintomas negativos (Zugno et al., 2013).

Estudos pré-clínicos utilizam o teste de interação social com o intuito de avaliar o comportamento relacionado aos sintomas negativos (Sams-Dood, 1995; Deroza et al., 2012). Neste teste comportamental são avaliados os parâmetros de latência para o primeiro contato, número de contatos e tempo total de contatos (Gama et al., 2012). Um estudo mostrou que a cetamina induziu isolamento social em humanos (Micallef et al., 2003), e do mesmo modo foi verificado um comportamento semelhante ao isolamento social, evidenciado pelo aumento da latência para o primeiro contato e a redução do número de contatos nos animais submetidos a administração de cetamina presente na pesquisa. De forma similar, Gama et al. (2012) também observaram

que administração crônica de cetamina (25 mg/kg) em ratos induziu déficit social. Corroborando com alterações sociais encontradas em pacientes esquizofrênicos (Neill et al., 2010).

Estudos clínicos e pré-clínicos tem mostrado que a depressão pode ser induzida pelo DM em animais e humanos (Gómez et al., 2003; Ceretta 2012a; Dhavale et al., 2013). Os resultados deste estudo apontam que a associação do aloxano e cetamina aumentaram significativamente a latência nestes animais e reduziu o número de contatos em relação ao grupo controle, cetamina e aloxano. Tais achados enfatizam mais uma vez um comportamento relacionado aos sintomas negativos e sugere que, pelo menos em parte, o aloxano potencializou, através do comportamento tipo depressivo, os efeitos da cetamina. Em humanos, doses subanestésicas de cetamina também induzem comportamento semelhante à esquizofrenia (Krystal et al., 2004).

Pesquisas sobre transtornos mentais associado às doenças crônicas, em particular a DM1, tem indicado presença, de depressão, ansiedade e danos cognitivos associados nos pacientes diabéticos (Wells et al., 2009). Do mesmo modo, indivíduos com esquizofrenia apresentam alterações cognitivas anterior e imediatamente após o surgimento da psicose, características que podem indicar o fator cognitivo como um marcador para o surgimento do transtorno (Zaytseva et al., 2015). Diversos estudos revelam que pacientes com DM1 apresentam déficits cognitivos associados ao desempenho reduzido em diferentes domínios da função cognitivo (Cholerton et al., 2013; Mayeda et al., 2015). Já trabalhos realizados por (Green et al., 2000; Green et al., 2004) sugerem que o grau de déficit cognitivo desencadeia um amplo impacto no desempenho social e auxilia na decisão do prognóstico de recuperação dos pacientes esquizofrênicos.

Estudos têm vinculado estas alterações cognitivas aos receptores NMDA. Pesquisa realizada por Mohn et al. (1999) mostrou a redução de NMDAR1 (NR1) em ratos geneticamente modificados e o consequente déficit social e cognitivo. Estudos, inclusive um realizado por este laboratório, avaliando o efeito crônico da cetamina em parâmetros bioquímicos e comportamentais demonstraram que a administração desta substância também leva a déficits cognitivos em ratos, mesmo após a suspensão do tratamento (Chatterjee et al., 2011; Zugno et al., 2014).

A cetamina leva a dano e morte neuronal em regiões cerebrais córtico-límbicas de ratos adultos (Farber et al., 1995). As alterações comportamentais produzidas por esta substância são, em parte, vinculadas ao bloqueio de receptores NMDA em interneurônios

GABAérgicos, desencadeando uma desinibição da atividade neural nas estruturas do sistema límbico, como o córtex pré-frontal (Moghaddam et al., 1997). Tal mecanismo leva à liberação excessiva de glutamato e dopamina nessas regiões cerebrais (Moghaddam et al., 1997; Lorrain et al., 2003; Razoux et al., 2007).

A função sensorio-motora foi avaliada neste trabalho através da inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto (IPP) que paralelamente tem sido considerado um bom instrumento para avaliação do perfil cognitivo (Isolan et al., 2007). Sabe-se que essa função é severamente destruída na esquizofrenia, ou seja, há um déficit do processamento da informação nos pacientes esquizofrênicos (Laurent et al., 1999). A inibição por pré-pulso é classificada como um endofenótipo neurofisiológico (Greenwood et al., 2007), e o déficit da IPP é relacionado com alguns sintomas da esquizofrenia, como o transtorno de pensamento e distração (Turetsky et al., 2007).

As estruturas corticais e límbicas, como córtex pré-frontal, hipocampo e estriado, estão diretamente relacionadas com o controle das funções sensorio-motoras (Swerdlow et al., 2001). O teste de IPP tem como objetivo avaliar o controle desempenhado por estas estruturas sobre o sistema de filtro sensorio-motor ou detectar déficits nesse processo. O mecanismo de filtro parece preservar o sistema nervoso de um elevado número de informações (Weiss e Feldon, 2001).

Levando em consideração que estas estruturas cerebrais estão alteradas na esquizofrenia (Swerdlow e Geyer, 1998), e que o transtorno em questão apresenta sintomas como dano intelectual e prejuízo em funções de memória, atenção e execução (Weickert et al., 2000), o presente estudo avaliou a função sensorio-motora através do teste de IPP em um modelo animal do diabetes associado ao modelo animal de esquizofrenia.

Desta forma, conforme os resultados obtidos neste trabalho pode-se perceber um déficit de IPP nos animais tratados com cetamina avaliados nas três intensidades de pré-pulso (65dB, 70dB e 75dB). Esses resultados confirmam estudos anteriores que mostram que os antagonistas de receptor NMDA induzem prejuízo na inibição por pré-pulso (Mansbach e Geyer, 1991; Swerdlow et al., 1998; Ducan et al., 2001; Levin et al., 2005; Imre et al., 2006; Monte et al., 2013; Zugno et al., 2014). Alguns estudos apontam que a cetamina induz déficit neste processo, porém dependente da dose utilizada (Mansbach e Geyer, 1991; Swerdlow et al., 1998). Sendo assim, o estudo em questão mostra que a dose de 25 mg/kg de cetamina também foi capaz de induzir nos animais, os efeitos comportamentais esperados.

Uma provável explicação para o surgimento desses efeitos é sugerida por Bakshi e Geyer. (1998), onde a infusão de MK-801, um antagonista de receptor NMDA, levou ao prejuízo na IPP, possivelmente devido a alterações em estruturas do sistema límbico, como a amígdala e o hipocampo dorsal, além de uma possível relação com o córtex pré-frontal medial. Acredita-se que estes receptores estejam fixados em interneurônios GABAérgicos, e o bloqueio destes receptores desencadeie uma interrupção da inibição da atividade neuronal nestas regiões.

Estas observações ressaltam a importância dos resultados encontrados no teste de IPP, com relação ao efeito da cetamina na fase jovem, principalmente, pelo fato das alterações cognitivas serem sintomas importantes, com provável valor preditivo (Green, 1996), e que estão presentes em indivíduos com esquizofrenia. A IPP da resposta a um estímulo sonoro vem sendo considerado um possível modelo animal que corrobora com as características observadas nos pacientes, como a IPP prejudicada. É regulada pelo circuito córtico-límbico-estriado-pálido, sofrendo prejuízo mediante algumas particularidades experimentais, como a utilização de antagonistas de receptor NMDA (Gogos et al., 2012).

Ainda sobre os resultados deste teste comportamental, o aloxano também induziu um déficit significativo de IPP em relação ao grupo controle nas três intensidades. Isso indica um déficit no perfil cognitivo dos animais diabéticos similar ao prejuízo induzido pela cetamina nas intensidades de PP de 65dB, 70dB e 75dB. As disfunções cognitivas no DM1 surgem no início da doença (dentro de 2 anos do diagnóstico) (McCrimmon et al., 2012; Cato et al., 2014). O encéfalo de crianças pode ser mais susceptível aos efeitos do DM do que o encéfalo de adultos, embora esse fato possa ocorrer devido à dificuldade de manter o controle glicêmico nessa idade (Ryan et al., 1985). Indivíduos que desenvolvem DM1 antes dos 7 anos de idade apresentam um risco maior de desenvolver déficits cognitivos severos quando comparados aos que desenvolvem a doença em idades mais tardias (Ryan, 2006).

O primeiro parâmetro avaliado foi a avaliação da atividade da enzima AChE devido a alguns estudos demonstrarem a relação entre o DM1 e as disfunções em sistemas de neurotransmissores, tais como: dopaminérgico, glutamatérgico, purinérgico e colinérgico (Sherin et al., 2012; Elsherbiny e Al-Gayyar, 2013; Aung et al., 2014). Sabe-se que a ACh é um neurotransmissor excitatório, essencial para funções motora, de memória, aprendizado, controle do fluxo sanguíneo cerebral,

percepção e atenção seletiva (Schetinger et al., 1999; Yu e Dayan, 2002).

Dados da literatura mostram que níveis alterados desse neurotransmissor vêm sendo associados a delírios e alucinações (Burt, 2000; Hasselmo, 2006), e demonstra que o seu metabolismo possui uma relação direta com as funções cognitivas (Hasselmo, 2006). Déficits cognitivos foram observados em pacientes diabéticos e modelos experimentais de DM sendo relacionados com alterações na atividade da AChE, o que pode indicar modificações na neurotransmissão colinérgica (Sánchez-Chávez e Salceda, 2000). A esquizofrenia também é vinculada a uma série de disfunções cognitivas, dessa maneira, o sistema colinérgico vem sendo considerado fundamental para a modulação neural de mecanismos subjacentes a esses sintomas (Davis et al., 1975; Powchik et al., Sarter et al., 2012).

Neste contexto, o déficit cognitivo observado em pacientes esquizofrênicos pode estar relacionado ao sistema colinérgico (Money et al., 2010). A atividade aumentada da enzima AChE desencadeia uma hidrólise exacerbada, e consequente diminuição de ACh em receptores colinérgicos, levando à função cerebral reduzida e alteração bioquímica observada no transtorno (Haroutunian et al., 1994; Guan et al., 1999). Paralelo a isso, fármacos inibidores da acetilcolinesterase vêm sendo estudados com o intuito de melhorar parâmetros cognitivos em indivíduos esquizofrênicos (Ribeiz et al., 2010).

Schmatz et al.(2009) demonstram que ratos submetidos a um modelo de DM apresentaram um aumento da atividade da AChE em diferentes estruturais cerebrais (córtex cerebral, hipocampo, estriado, cerebelo e hipotálamo). Por esse motivo, agentes inibidores da atividade da AChE têm sido estudados com o objetivo de diminuir os efeitos hipocolinérgicos observados quando a atividade da enzima aumenta (Das et al., 2001).

Os resultados deste estudo demonstraram que a cetamina aumentou a atividade da AChE no córtex frontal, hipocampo e estriado, o que pode levar a degradação de ACh nessas estruturas. Esses dados corroboram estudos prévios, em que antagonistas de receptores NMDA, administrados cronicamente, também foram capazes de elevar a atividade da AChE (Zugno et al., 2013; Zugno et al., 2014; Zugno et al., 2015).

Uma possível explicação para tal alteração é que a cetamina vem sendo considerada um antagonista de receptores nicotínicos (nAChR) (Scheller et al., 1996; Chatterjee et al., 2012), aumentando assim a quantidade de ACh na fenda sináptica, ativando de forma exacerbada a

enzima AChE e prejudicando a formação de memória no hipocampo (Chatterjee et al., 2012).

Estas alterações bioquímicas apoiam os resultados encontrados no teste comportamental de avaliação do perfil cognitivo (IPP) desses animais. O prejuízo no filtro sensorio motor induzido pela cetamina, com consequente redução da inibição por pré-pulso, acompanha o aumento da atividade da AChE nas estruturas cerebrais estudadas. Estudo realizado por (Ballmaier et al., 2002), mostrou que o uso de um antagonista da enzima AChE (rivastigmina) desencadeou o aumento de ACh no núcleo basal magnocelular (NBM) – região de onde se originam os neurônios colinérgicos corticopetal, finalizados em regiões corticais e camadas (Lysakowski et al., 1989; Wenk, 1997) – com decorrente redução do déficit na IPP gerado por lesão imuno no NBM, confirmando que os neurônios colinérgicos do NBM estão envolvidos na filtragem de estímulo sensorio-motor. Acredita-se que o NBM regula o mecanismo sensorio motor por meio de projeções para áreas como córtex pré-frontal e regiões límbicas (Ballmaier et al., 2001).

Essas estruturas cerebrais estão diretamente relacionadas com o controle da função sensorio motoras também mostraram alteração bioquímica no presente estudo. Como referido acima, a acetilcolina é um neurotransmissor envolvido em parâmetros de memória e aprendizado, o que condiz também com os resultados encontrados no teste de IPP, sendo possível que estas alterações comportamentais sejam devido a alterações no sistema colinérgico, com o aumento da degradação de ACh pela enzima AChE.

Os resultados do presente estudo, também mostraram que o aloxano aumentou a atividade AChE nas três estruturas em relação ao grupo controle. A associação do aloxano + cetamina potencializou o aumento na atividade da enzima AChE quando comparado aos grupos controle, cetamina e aloxano. Dados da literatura demonstraram que a hiperglicemia foi capaz de causar uma diminuição na neurotransmissão colinérgica hipocampal em função de um aumento nos níveis de RNAm da AChE e uma redução nos níveis de RNAm dos receptores colinérgicos M1 e M3 em modelo animal de ratos diabéticos (Sherin et al., 2012).

Atualmente é postulado que o estresse oxidativo decorrente do quadro de hiperglicemia crônica exerce papel central nas complicações do DM (Giacco, Browlee, 2010). As EROs podem danificar proteínas, lipídeos e o DNA, e atuar como agentes pró-apoptóticos. Marcadores de dano oxidativo em proteínas e lipídeos na vigência do DM têm sido amplamente abordados na literatura. No entanto, a relação do DM com

os transtornos mentais requer atenção e principalmente novos estudos (Kowluru et al., 2004). Um estudo mostrou que a peroxidação lipídica e a carbonilação protéica são as maiores consequências mediadas por radicais livres (Meagher e Fitzgerald, 2000).

Os danos em proteínas e lipídeos alteram a permeabilidade da membrana celular e, conseqüentemente, prejudicam a atividade de enzimas e receptores. Várias doenças neurodegenerativas estão diretamente ligadas com a peroxidação lipídica. Adicionalmente, o acúmulo de proteínas carboniladas em neurônios tem sido implicado em muitos transtornos neurológicos (Dalle-Donne, 2006).

No presente estudo a cetamina aumentou os níveis de TBARS e carbonilação de proteínas no córtex frontal quando comparado ao grupo controle. Estes resultados corroboram estudos anteriores do grupo do laboratório (De oliveira et al., 2009; Zugno et al., 2003). A diminuição dos sintomas positivos da esquizofrenia está supostamente envolvida com a diminuição da peroxidação lipídica, levando em consideração que a hiperatividade dopaminérgica desencadeia danos lipídicos devido a formação de radicais livres durante o metabolismo da dopamina (Zhang et al., 2006). Adicionalmente, resultados encontrados na literatura indicam níveis aumentados de TBARS no plasma, eritrócitos e líquido de pacientes com esquizofrenia (Mahadik et al., 1998; Herken et al., 2001; Akyol et al., 2002). Dalle-Donne et al. (2006) encontraram ainda evidências de acúmulo de proteínas carboniladas em pacientes esquizofrênicos.

O estresse oxidativo no diabetes tem sido associado à hiperglicemia e, em especial, a complicações cardiovasculares e prejuízos ao SNC (Mangariños et al., 2000; Jung et al., 2010; Pitocco et al., 2010). Além disso, a resistência à insulina e a disfunção das células β pancreáticas parecem desempenhar um papel importante no estado de desequilíbrio redox (Pitocco et al., 2010). A esquizofrenia também está associada à indução do estresse oxidativo em pacientes (Padurariu et al., 2010).

Durante a hiperglicemia, há um aumento da produção de radicais livres de oxigênio através da auto-oxidação da glicose. Tais radicais exercem seus efeitos citotóxicos nos fosfolípidios de membrana, resultando na formação de malondialdeído (MDA) (Silva et al., 2011). O MDA é um produto final da peroxidação lipídica, o qual reage com o ácido tiobarbitúrico (Ayoub e Yousuf, 2000). Sendo assim, nesta pesquisa foi observado que a associação do aloxano + cetamina aumentou significativamente os níveis de TBARS e a carbonilação de

proteínas no córtex frontal, hipocampo e estriado quando comparado aos grupos controle, cetamina e aloxano.

O aumento de proteínas glicadas no plasma de pacientes diabéticos está relacionado ao estresse oxidativo, uma vez que essas proteínas interagem com receptores, estimulando a produção de ERO e diminuindo a glutatona intracelular (Baynes, 1991). Esse aumento de produção de ERO contribui para uma série de complicações secundárias ao diabetes, tais como aterosclerose e a peroxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) nas células endoteliais (Nishikawa et al., 2000). Estudos revelam que o estresse oxidativo secundário à hiperglicemia ocorre antes das complicações mais tardias do DM se manifestarem clinicamente, incluindo os transtornos mentais. Por isso, acredita-se que esta condição desempenhe um papel particularmente relevante na patogênese da DM (Rocha et al., 2006; Hamilton et al., 2007).

Outro parâmetro bioquímico avaliado neste estudo foi o dano ao DNA. Vários estudos, inclusive esse, têm demonstrado que a cetamina está relacionada ao aumento do estresse oxidativo. Neste contexto todos os alvos celulares para o dano oxidativo, o mais vulnerável é o DNA (Hallwell e Gutteridge, 2006). Os resultados deste estudo demonstram que a cetamina, o aloxano e a associação aloxano + cetamina induziram aumento na frequência de danos em comparação ao grupo controle, enquanto no índice de danos, apenas a cetamina e aloxano + cetamina induziu um aumento neste parâmetro. De Oliveira et al. (2009) apontam que doses subanestésicas de cetamina causam aumento do estresse oxidativo em cérebro de ratos.

Hou et al. (2013) mostraram que a administração crônica deste anestésico causou lesão neuronal em camundongos. Adicionalmente, Zou et al. (2009) relataram aumento notável na neurodegeneração apoptótica em cérebro de ratos administrados com múltiplas injeções de cetamina (20 mg/kg).

A hiperglicemia pode acarretar a glicação das enzimas antioxidantes, o que causa a inativação destas, diminuindo assim a defesa do organismo (Wiernsperger, 2003). Merkel et al. (2003) demonstraram que pacientes diabéticos que não produzem ou são sensíveis à insulina, podem apresentar uma instabilidade genômica maior em decorrência de um sistema de reparo menos eficiente.

Provavelmente em decorrência desse reparo menos eficiente, a doença pode estar relacionada ao acúmulo de danos em diferentes tecidos ao longo do tempo bem como disfunção e falha de diversos órgãos, principalmente olhos, nervos, coração, rins e vasos sanguíneos (Taylor, 1999). Desse modo, o dano oxidativo tem sido considerado

como um dos principais responsáveis pelas complicações apresentadas pelos diabéticos (Wiernsperger, 2003).

Diante de tudo, este estudo sugere que o DM1 pode desencadear a esquizofrenia, pois a hiperglicemia presente constantemente no DM1 pode desencadear alterações nos parâmetros comportamentais e bioquímicos, conforme evidenciado nesta pesquisa. No entanto, mais estudos são necessários para desvendar os mecanismos envolvidos e concretizar os achados deste estudo.

6 CONCLUSÃO

Os resultados descritos permitiram as seguintes conclusões:

✓ A administração do aloxano aumentou a glicemia e diminuiu o peso nos animais confirmando alterações para o diagnóstico do diabetes.

✓ Nos parâmetros comportamentais avaliados foram observados que o aloxano + cetamina apresentaram um comportamento tipo depressivo na atividade locomotora, assim como na interação social; tanto a cetamina quanto o aloxano isoladamente mostraram um prejuízo no déficit cognitivo (IPP); e a cetamina isolada mimetizou os sintomas positivos, negativos e cognitivos no modelo animal de esquizofrenia, uma vez que induziu hiperlocomoção, aumentou a latência para o primeiro contato social, redução do número de contatos entre os animais, além de diminuir o IPP.

✓ Nos parâmetros bioquímicos foi observado que o aloxano e a cetamina isolados e associados aumentaram a atividade da AChE; a cetamina e a associação com o aloxano induziram dano lipídico, protéico e dano ao DNA.

A importância do DM1 do ponto de vista social e econômico é indiscutível, devido às taxas de comorbidade e mortalidade. Assim, fica evidente que tal doença mereça uma atenção e cuidados especiais no sentido de uma detecção precoce dos indivíduos susceptíveis, para que haja possibilidade de intervenção e prevenção inclusive contra o desenvolvimento de outras patologias associadas ao DM1, como a esquizofrenia.

7 PERPECTIVAS

Apesar dos avanços nas pesquisas com diabetes e esquizofrenia, tanto em modelos animais quanto em humanos, permanecem muitas dúvidas sobre seus mecanismos envolvidos. Sendo assim, pretende-se dar continuidade a esse estudo dosando outros marcadores bioquímicos como: insulina, hemoglobina glicada e perfil lipídico; avaliar outros parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo, neuroinflamação e metabolismo energético; acompanhar a diurese e ingestão de água dos animais. Por fim, objetiva-se realizar um estudo com ratas Wistar jovens para comparar as diferenças entre os gêneros nos mesmos parâmetros comportamentais e bioquímicos.

REFERÊNCIAS

- American Diabetes A. Standards of medical care in diabetes--1998. *Diabetes care*. 2011;39(1):12-45.
- American Diabetes A. Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes care*. 2013;36(1):S11-66.
- American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (5th Edition)*. Arlington, VA: American Psychitric Publishing; 2013.
- Anand A, Charney DS, Oren DA, Berman RM, Hu XS, Cappiello A, Krystal JH. Attenuation of the neuropsychiatric effects of ketamine with lamotrigine: support for hyperglutamatergic effects of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Arch Gen Psychiatry*. 2000;57(3):270-6.
- Anderson RM. Delegacion de responsabilidades en el diabético y su relacion con el modelo médico tradicional: existen diferencias irreconciliables? Em *Educación sobre diabetes*. Disminuyamos el costo de la ignorância. Organización Panamericana de la Salud. 1996
- Antunes MV, Lazzaretti CA, Gamargo GD, Linden RL. Estudo pré-analíticos e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4 dinitrofenilhidrazina. *Rev Bras Cienc Farm*. 2008;44(2):279-87.
- Apa. "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Diseases". Fourth edition (DSM-IV). Washington, DC: APA;1994.
- Arent CO, Réus GZ, Abelaira HM, Ribeiro KF, Steckert AV, Mina F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Synergist effects of n-acetylcysteine and deferoxamine treatment on behavioral and oxidative parameters induced by chronic mild stress in rats. *Neurochem Int*. 2012;61(7):1072-1080.
- Atkinson M a, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet*. Elsevier Ltd; 2014;383:69–82.
- Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. 2001;358:221-9.
- Aung MH, Park HN, Han MK, Obertone TS, Abey J, Aseem F, Thule PM, Iuvone PM, Pardue MT. Dopamine deficiency contributes to early visual dysfunction in a rodent model of type 1 diabetes. *J Neurosci*. 2014;34:726– 36.
- Ayoub RS, Yousif WH. Serum glucose, cholesterol and total lipids level and tissue peroxidation in aloxan-diabetic rats treated with aqueous extract of nigella sativa seed. *Iraqi J Vet Sci*. 2000;13(1):43-9.

- Azevedo AP, Papelbaum M, D'Elia F. Diabetes and eating disorders: a high risk association. *Rev. Bras. Psiquiatric.* 2002;24(3):77-80.
- Baden JM, Simmon VF. Mutagenic effects of inhalation anaesthetics. *Mutat. Res.* 1980;75:169-189.
- Bagdy G, Juhasz G. Biomarkers for personalised treatment in psychiatric diseases. *Expert Opin Med Diagn* 2013;7(5):417-22.
- Baguelin-Pinaud A, Robert S, Menard JF, Thibaut F. Prenatal exposure to tobacco and risk for schizophrenia: a retrospective epidemiological study. *Compr Psychiatry.* 2010;51(2):106-9.
- Bakker CB, Amini FB. Observations on the psychotomimetic effects of Sernyl. *Compr Psychiatry.* 1961; 2:269-80.
- Bakshi VP, Geyer MA. Multiple limbic regions mediate the disruption of prepulse inhibition produced in rats by the noncompetitive NMDA antagonist dizocilpine. *J Neurosci.* 1998; 18(20):8394-401.
- Balda CA, Pacheco-Silva A. Aspectos imunológicos do diabetes mellitus tipo 1. *Rev Ass Med Brasil.* 1999;45(2):175-80.
- Ballmaier M, Casamenti F, Scali C, Mazzoncini R, Zoli M, Pepeu G, Spano PF. Rivastigmine antagonizes deficits in prepulse inhibition induced by selective immunolesioning of cholinergic neurons in nucleus basalis magnocellularis. *Neuroscience.* 2002;114(1):91-8.
- Ballmaier M, Casamenti F, Zoli M, Pepeu G, Spano P. Selective immunolesioning of cholinergic neurons in nucleus basalis magnocellularis impairs prepulse inhibition of acoustic startle. *Neuroscience.* 2001;108(2):299-305.
- Balu DT, Coyle JT. Neuroplasticity signaling pathways linked to the pathophysiology of schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011;35(3):848-70.
- Banks, WA, Owen, JB, Erickson MA. Insulin in the brain: There and back again. *Pharmacology & Therapeutics.* 2012;136:82-93.
- Barbosa JHP, Oliveira SL, Seara LT. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008;52(6):940-6.
- Barreiros ALBS, Davi JM. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Bahia, Quím Nova.* 2006;29(1):113-23.
- Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* 1991;40:405-12.
- 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.

- Bennett PH, Knowler WC. Definição, diagnóstico e classificação do diabetes mellitus e da homeostase da glicose. *Diabetes Mellitus*. 2009;19:345-353.
- Benneyworth MA, Roseman AS, Basu AC, Coyle JT. Failure of NMDA receptor hypofunction to induce a pathological reduction in PV-positive GABAergic cell markers. *Neurosci Lett*. 2011;488(3):267-71.
- Bitanhirwe BKY, Woo TUW. Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35(3):878-93.
- Bjelland S, Seeberg E, Mutagenicity. Toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res*. 2003; 29;531(1-2):37-80.
- Boarolli M, Ferreira NC, Bavaresco DV, Felipe DF, Amboni G. Manifestações psiquiátricas e possíveis danos cognitivos em pacientes diabéticos tipo II. *Revista de Iniciação Científica*. ISSN 1678-7706 2014;1(2):134-43.
- Boquist L. Differences In The Blood Glucose Response Of Mice To Alloxan And Alloxan-Inhibiting Compounds. *Acta Endocrinol*. 1979;92:687-93.
- Boulay D, Bergis O, Avenet P, Griebel G. The glycine transporter-1 inhibitor SSR103800 displays a selective and specific antipsychotic-like profile in normal and transgenic mice. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(2):416-27.
- Browlee M. Banting Lecture The Pathobiology of Diabetic Complications A Unifying Mechanism. *Diabetes*. 2004;54:1615-25.
- Brown AS, Blottiglieri T, Schaefer C, Quesenberry CPJr, Liu L, Bresnahan M, Susser ES. Elevated Prenatal Homocysteine Levels as a Risk Factor for Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2007; 64:31-9.
- Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications – a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005;56:1615-25.
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.
- Brozmanova J, Dudas A, Henriques JA. Repair of oxidative DNA damage-an important factor reducing cancer risk. *Neoplasma*. 2001;48(2):85-93.
- Bubenikova-Valesova V, Horacek J, Vrajova M, Hoschl C. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008;32(5):1014-23.
- Calles-Escandon J, Cippolla M. Diabete and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr Rev*. 2001;22(1):36-52.
- Campos JJB, Almeida HG, Iochida LC, Franco LJ. Incidência de Diabetes Mellitus Insulino-Dependente (Tipo 1) na cidade de Londrina, PR, Brasil. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 1998;42(1):36-44.

- Canever L, Oliveira L, D'altoe De Luca R, Correa PT, De BFD, Matos MP, Scaini G, Quevedo J, Streck EL, Zugno AI. A rodent model of schizophrenia reveals increase in creatine kinase activity with associated behavior changes. *Oxid Med Cell Longev*. 2010;3(6):421-7.
- Carlsson A, Waters N, Carlsson ML. Neurotransmitter interactions in schizophrenia-therapeutic implications. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1999; 4:37-43.
- Carobrez, AP. Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2003;25(2):52-58.
- Cato MA, Mauras N, Ambrosino J, Bondurant A, Conrad AL, Kollman C, Cheng P, Beck RW, Ruedy KJ, Aye T, Reiss AL, White NH, Hershey T. Cognitive Functioning in Young Children with Type 1 Diabetes. *J Int Neuropsychol Soc*. 2014;20:238–247
- Cavalcante LF, Gonçalves MM, Santos AM, Aguiar LGK, Cunha EF, Gomes MB. Aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1 do ambulatório de Diabetes do HUPE-UERJ. 1995. 9º Congresso da Associação Latino-Americana de Diabetes/10º Congresso Brasileiro de Diabetes.
- Ceretta LB, Reus GZ, Abelaira HM, Jornada LK, Schwalm MT, Hoepers NJ, Tomazzi CD, Gulbis KG, Ceretta RA, Quevedo J. Increased prevalence of mood disorders and suicidal ideation in type 2 diabetic patients. *Acta Diabetol*. 2012a;49(1):227-234.
- Ceretta LB, Réus GZ, Abelaira HM, Ribeiro KF, Zappellini G, Felisbino FF, Steckert AV, Dal- Pizzol F, Quevedo J. Increased oxidative stress and imbalance in antioxidant enzymes in the brains of alloxan-induced diabetic rats. *Exp Diabetes Res*. 2012b; 2012:1-20.
- Chang CC, Chang CY, Wu YT, Huang JP, Yen TH, Hung LM. Resveratrol retards progression of diabetic nephropathy through modulations of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and AMP-activated protein kinase. *J Biomed Sci*. 2011;18(1):47.
- Chatterjee M, Ganguly S, Srivastava M, Palit G. Effect of 'chronic' versus 'acute' ketamine administration and its 'withdrawal' effect on behavioural alterations in mice: implications for experimental psychosis. *Behav Brain Res*. 2011; 216(1):247-54.
- Chatterjee M, Verma R, Ganguly S, Palit G. Neurochemical and molecular characterization of ketamine-induced experimental psychosis model in mice. *Neuropharmacology*. 2012; 63(6):1161-71.
- Cholerton, B; Baker, LD; Craft, S. Insulin, cognition, and dementia. *Eur. J. Pharmacol*. 2013;170-79.

- Clarke MC, Tanskanen A, Huttunen M, Whittaker JC, Cannon M. Evidence for an interaction between familial liability and prenatal exposure to infection in the causation of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2009;166(9):1025-30.
- Clinical manifestations of Deletion 22q11.2 syndrome (DiGeorge/Velo-Cardio-Facial syndrome). *Paediatr Cardiol.* 2005;7(2):23-34.
- Collins, AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology.* 2004; 26(3):249-261.
- Coyle JT, Tsai G, Goff D. Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci.* 2003:318-27.
- Croteau DL, Bohr VA. Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J Biol Chem.* 1997;272(41)25409-12.
- da Silva Haeser A, Sitta A, Barschak AG, Deon M, Barden AT, Schmitt GO, Landgraff S, Gomez R, Barros HM, Vargas CR. Oxidative stress parameters in diabetic rats submitted to forced swimming test: the clonazepam effect. *Brain Res.* 2007;18(1154):137-143.
- Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2006;10(2):389-406.
- Das A, Dikshit M, Nath C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. *Life Sci.* 2001;68:1545-55.
- Davis AJ, Holzbauer M, Sharman DF. Postnatal development of dopamine deamination in the striatum of the rat. *Br J Pharmacol.* 1975; 55(4):558-60.
- De Oliveira L, Fraga DB, De Luca RD, Canever L, Ghedim FV, Matos MP, Streck EL, 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.
- 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):1003-8.
- Deakin JF, Slater P, Simpson MD, Gilchrist AC, Skan WJ, Royston MC, Reynolds GP, Cross AJ. Frontal cortical and left temporal glutamatergic dysfunction in schizophrenia. *J Neurochem.* 1989; 52(6):1781-6.
- Deroza PF, Ghedim FV, Heylmann AS, De Luca RD, Budni J, Souza RP, Quevedo J, Zugno AI. Effect of cigarette smoke exposure in the

- behavioral changes induced by ketamine: *Schizophr Res.* 2012;141(1):104-5.
- Dhavale HS, Panikkar V, Jadhav BS, Ghulghule M, Agari AD. Depression and diabetes: impact of antidepressant medications on glycaemic control. *J Assoc Physicians India.* 2013;61(12):896-899.
- Di Cairano ES, Davalli AM, Perego L, Sala S, Sacchi VF, La Rosa S, Finzi G, Placidi C, Capella C, Conti P, Centonze VE, Casiraghi F, Bertuzzi F, Folli F, Perego C. The glial glutamate transporter 1 (GLT1) is expressed by pancreatic beta-cells and prevents glutamate-induced beta-cell death. 2011;286(16):14007-18.
- 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):6897-906.
- Dornas WC, Nagem JT, Oliveira TT, Contelli R. Aloxano e Diabetes. *Rev. Bras. Toxicologia.* 2006;2:81-7.
- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421-31.
- Duncan EJ, Madonick SH, Parwani A, Angrist B, Rajan R, Chakravorty S, Efferen TR, Szilagyi S, Stephanides M, Chappell PB, Gonzenbach S, Ko GN, Rotrosen JP. Clinical and sensorimotor gating effects of ketamine in normals. *Neuropsychopharmacology.* 2001;25(1):72-83.
- Ellenbroek BA, Cools AR. Animal models for the negative symptoms of schizophrenia. *Behav Pharmacol.* 2000;11(3-4):223-33.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7:88-95.
- Elsherbiny N, Al-Gayyar M. Adenosine Receptors: New Therapeutic Targets for Inflammation in Diabetic Nephropathy. *Inflamm Allergy-Drug Targets.* 2013;12:153-161.
- Elsworth JD, Groman SM, Jentsch JD, Valles R, Shahid M, Wong E, Marston H, Roth RH. Aripiprazole effects on cognitive and monoamine dysfunction elicited by subchronic phencyclidine administration. *Neuropharmacology.* 2012;62(3):1442-52.
- Esterbauer H, Cheesman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: MDA and hydroxymononol. *Methods of Enzymology.* 1991;186:407-21.
- Farber NB, Wozniak DF, Price MT, Labruyere J, Huss J, St Peter H, Olney JW. Age-specific neurotoxicity in the rat associated with NMDA receptor blockade: potential relevance to schizophrenia?. *Biol Psychiatry.* 1995;38(12):788-96.

- Ferreira SRG, Franco LJ, Vivolo MA, Negrato CA, Simões ACP, Venturelli CR. Population based incidence of IDDM in the state of São Paulo, Brazil. *Diabetes Care*.1993;16:701-4.
- Figlewicz DP, Brot MD, McCall AL, Szot P. Diabetes causes differential changes in CNS noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat: a molecular study. *Brain Research*. 1996;736(1):54-60.
- Fraga DB, Deroza PF, Ghedim FV, Steckert AV, De Luca RD, Silverio A, Cipriano AL, Leffa DD, Borges GD, Quevedo J, Pinho RA, Andrade VM, Dal-Pizzol F, Zugno AI. Prenatal exposure to cigarette smoke causes persistent changes in the oxidative balance and in DNA structural integrity in rats submitted to the animal model of schizophrenia. *Journal of psychiatric research*. 2011;45(11):1497-503.
- Fraguas R, Iosifescu DV, Bankier B, Perlis R, Clementi-Craven N, Alpert J, Fava M. Major depressive disorder with anger attacks and cardiovascular risk factors. *Int J Psychiatry Med*. 2007;37(1):99-111.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W. *DNA Repair and Mutagenesis*. 1995.
- Frohlich J, Van Hom JD. Reviewing ketamine model for schizophrenia. *J Psychopharmacol*. 2014 ;28(4):287-302.
- Fross MC. Diabetes Mellitus e suas complicações crônicas. *Revista Brasileira de Neurologia*. 1991;27(1):3-6.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. 2004; 114(12):1752-61.
- Gama CS, Salvador M, Anndreazza AC, Kapczinski F, Silva Belmonte-de Abreu P. 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):512-515.
- Geyer MA, Ellenbroek B. Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic atypicality. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003; 27(7):1071-9.
- Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacol*. 2001;156:117-54.
- Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Cir. Res*. 2010; 107:1058-1070.

- Gogos A, Kwek P, Van Den Buuse M. The role of estrogen and testosterone in female rats in behavioral models of relevance to schizophrenia. *Psychopharmacology*. 2012; 219(1):213-24.
- Gómez-Pinilla F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9:568-578.
- Grace AA. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience*. 1991; 41(1):1-24.
- Graham F. The more or less startling effects of weak prestimulation. *Psychophysiology*. 1975;12(3):238-48.
- Green MF, Kern RS, Braff DL, Mintz J. Neurocognitive deficits and functional outcome in schizophrenia: are we measuring the "right stuff"? *Schizophr Bull*. 2000;26(1):119-36.
- Green MF, Kern RS, Heaton RK. Longitudinal studies of cognition and functional outcome in schizophrenia: implications for MATRICS. *Schizophr Res*. 2004;72(1):41-51.
- Green MF. What are the functional consequences of neurocognitive deficits in schizophrenia? *Am J Psychiatry*. 1996;153(3):321-30.
- Greenwood TA, Braff DL, Light GA, Cadenhead KS, Calkins ME, Dobie DJ, Freedman R, Green MF, Gur RE, Gur RC, Mintz J, Nuechterlein KH, Olincy A, Radant AD, Seidman LJ, Siever LJ, Silverman JM, Stone WS, Swerdlow NR, Tsuang DW, Tsuang MT, Turetsky BI, Schork NJ. Initial heritability analyses of endophenotypic measures for schizophrenia: the consortium on the genetics of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2007;64(11):1242-50.
- Griendling KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation*. 1997;96(10):3264-5.
- Guan ZZ, Zhang X, Blennow K, Nordberg A. Decreased protein level of nicotinic receptor alpha7 subunit in the frontal cortex from schizophrenic brain. *Neuroreport*. 1999;10(8):1779-82.
- Haeser, AS. Oxidative stress parameters in diabetic rats submitted to forced swimming test: the clonazepam effect. *Brain reserarch*. 2007;1154:137-43.
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004;142:231–55.
- Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*. 2001;18:685–716.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3. ed. Oxford University Press, 1999.

Hallwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4. ed. Oxford University Press, 2007.

Hamilton SJ, Chew GT, Watts GF. Therapeutic regulation of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res*. 2007;4:89-102.

Haroutunian V, Davidson M, Kanof PD, Perl DP, Powchik P, Losonczy M, Mccrystal J, Purohit DP, Bierer LM, Davis KL. Cortical cholinergic markers in schizophrenia. *Schizophr Res*. 1994;12(2):137-44.

Harrison PJ, Weinberger DR. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry*. 2005; 10(1):40-68.

Hashimoto K, Fujita Y, Iyo M. Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of fluvoxamine: role of sigma-1 receptors. *Neuropsychopharmacol*. 2007;32(3):514-21.

Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol*. 2006;16(6):710-5.

Haukvik UK, Lawyer G, Bjerkan PS, Hartberg CB, Jonsson EG, Mcneil T, Agartz I. Cerebral cortical thickness and a history of obstetric complications in schizophrenia. *J Psychiatric Res*. 2009;43(16):1287-93.

Herken H, Uz E, Fadillioque E, Unal S, Sogut S, Ozyurt H, Savas HA. The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2002;26:995-1005.

Herken H, Uz E, Ozyurt H, Sogut S, Virit O, Akyol O. Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2001;6:66-73.

Hoffman HS, Ison JR. Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. *Psychol Rev*. 1980;87(2):175-89.

Hou Y, Zhang H, Xie G, Cao X, Zhao Y, Liu Y, Mao Z, Yang J, Wu C. Neuronal injury, but not microglia activation, is associated with ketamine-induced experimental schizophrenic model in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013;45:107-16.

Huan X, Wang F, Chen W, Chen Y, Wang N, Maltzan K. Possible link between the cognitive dysfunction associated with diabetes and the neurotoxicity of methylglyoxal. *Brain Research*. 2012;1469:82-91.

- Hunt MJ, Raynaud B, Garcia R. Ketamine dose-dependently induces 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.
- Isolan L, Pheula G, Salum GA Jr, Oswald S, Rohde LA, Manfro GG. An open-label trial of escitalopram in children and adolescents with social anxiety disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2007 Dec;17(6):751-60.
- 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, Shelley AM, Silipo G, Lieberman JA. Deficits in auditory and visual context-dependent processing in schizophrenia: defining the pattern. *Arch Gen Psychiatry*. 2000;57(12):1131-7.
- Javitt DC. Glutamatergic theories of schizophrenia. *Isr J Psychiatry Relat Sci*. 2010; 47(1):4-16.
- Jentsch JD, Roth RH. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 1999; 20(3):201-25.
- Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet*. 2007; 8(4):253-62.
- Jung SW, Han OK, Kim SJ. Increased expression of β amyloid precursor gene in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic mice with memory deficit and anxiety induction. *J Neural Transm*. 2010;117(12):1411-1418.
- Kakkar R, Karl J, Mantha SV, Prasad K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetics rats. *Molec cell biochem*. 1999;151(10):1300-304.
- Kapur S, Mamo D. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003; 27(7):1081-90.
- Karvonen M, Viek-Kayander M, Moltchanova E, Libman I, Laporte R, Tuomilehto J, et al. For the Diamond Project. Incidence of childhood Type 1 Diabetes worldwide. *Diabetes Care*. 2000;23(10):1516-26.
- Keshavan MS, Nasrallah HA, Tandon R. Schizophrenia, "Just the Facts" 6. Moving ahead with the schizophrenia concept: from the elephant to the mouse. *Schizophr Res*. 2011;127(1-3):3-13.

- 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.
- Koch M, Schnitzler HU. The acoustic startle response in rats - circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. *Behav Brain Res.* 1997;89(1):35-49.
- Koch M. *Animal Models of Schizophrenia. Animal Models of Neuropsychiatric Diseases.* London: Imperial College Press. 2006;337-403.
- Kohl S, Heekeren K, Klosterkötter J, Kuhn J. Prepulse inhibition in psychiatric disorders - Apart from schizophrenia. *J Psychiat Res.* 2012;47(4):445-52.
- Kowluru RA, Odenbach S. Effect of long-term administration of alpha-lipoic acid on retinal capillary cell death and the development of retinopathy in diabetic rats. *Diabetes.* 2004;53:3233-8.
- Krebs MO, Bellon A, Mainguy G, Jay TM, Frieling H. One-carbon metabolism and schizophrenia: current challenges and future directions. *Trends Molecul Med.* 2009; 15(12):1471-4914.
- 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, Abi-Saab W, Perry E, D'Souza DC, Liu N, Gueorguieva R, McDougall L, Hunsberger T, Belger A, Levine L, Breier A. Preliminary evidence of attenuation of the disruptive effects of the NMDA glutamate receptor antagonist, ketamine, on working memory by pretreatment with the group II metabotropic glutamate receptor agonist, LY354740, in healthy human subjects. *Psychopharmacology (Berl).* 2005;179(1):303-9.
- Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS. Characterization of superoxide producing sites in isolated brain mitochondria. *Journal of Biological Chemical.* 2004; 279(6):4179-4135.
- Larson MK, Walker EF, Compton MT. Early signs, diagnosis and therapeutics of the prodromal phase of schizophrenia and related psychotic disorders. *Expert Rev Neurother.* 2010;10(8):1347-59.
- Laurent A, Saoud M, Bougerol T, d'Amato T, Anchisi AM, et al. Attentional deficits in patients with schizophrenia and in their non-psychotic first-degree relatives. *Psychiatry Res.* 1999;89:147-159.
- Le Pen G, Moreau JL. Disruption of prepulse inhibition of startle reflex in a neurodevelopmental model of schizophrenia: reversal by clozapine,

- olanzapine and risperidone but not by haloperidol. *Neuropsychopharmacology*. 2002; 27(1):1-11.
- Lee PR, Brady DL, Shapiro RA, Dorsa DM, Koenig JJ. Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: Reversal by oxytocin. *Brain Res*. 2007; 2:152-67.
- Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):216-26.
- Lerco MM, Spadella CT, Machado JLM, Schellini AS, Padovani CR. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido por aloxano em ratos. Estudo clínico e laboratorial. *Acta Cir. Bras*. 2003;18:132-42.
- Levin ED, Petro A, Caldwell DP. Nicotine and clozapine actions on prepulse inhibition deficits caused by N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamatergic receptor blockade. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005; 29(4):581-6.
- Levin R, Calzavara MB, Santos CM, Medrano WA, Niigaki ST, Abílio VC. Spontaneously hypertensive rats (SHR) present deficits in prepulse inhibition of startle specifically reverted by clozapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011; 35:1748-52.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990;186:464-78.
- Lipska BK, Weinberger DR. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacol*. 2000; 23(3):223-39.
- Lorrain DS, Bacceti CS, Bristow LJ, Anderson JJ, Varney MA. Effects of ketamine and N-methyl-D-aspartate on glutamate and dopamine release in the rat prefrontal cortex: modulation by a group II selective metabotropic glutamate receptor agonist LY379268. *Neuroscience*. 2003;117(3):697-706.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-7.
- Luby ED, Cohen BD, Rosenbaum G, Gottlieb JS, Kelley R. Study of a new schizophrenomimetic drug; sernyl. *AMA Arch Neurol Psychiatry*. 1959; 81(3):363-9.
- Lysakowski A, Wainer BH, Bruce G, Hersh LB. An atlas of the regional and laminar distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in rat cerebral cortex. *Neuroscience*. 1989; 28(2):291-336.
- Mafra D, Abdalla DSP, Cozzolino SMF. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. *Rev Nutr*. 1999;12(3):205-12.
- Magariños AM, McEwen BS. Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased

- glucocorticoid reactivity to stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(20):11056–61.
- Mahadik SP, Mukherjee S, Scheffer R, Correnti EE, Mahadik JS. Elevated plasma lipid peroxides at the onset of nonaffective psychosis. *Biol Psychiatry*. 1998;43(9):674-679.
- Malaisse Wj, Malaisse-Lagae F, Sener A, Pipeleers Dg. Determinants Of The Selective Toxicity Of Alloxan To The Pancreatic B Cell. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79:927-30.
- Mansbach RS, Geyer MA. Parametric determinants in pre-stimulus modification of acoustic startle: interaction with ketamine. *Psychopharmacology*. 1991; 105(2):162-8.
- Marsman A, Van Den Heuvel MP, Klomp DW, Kahn RS, Luijten PR, Hulshoff Pol HE. Glutamate in schizophrenia: a focused review and meta-analysis of (1)H-MRS studies. *Schizophr Bull*. 2013;39(1):120-9.
- Matriciano F, Tueting P, Dalal I, Kadriu B, Grayson DR, Davis JM, Nicoletti F, Guidotti A. Epigenetic modifications of GABAergic interneurons are associated with the schizophrenia-like phenotype induced by prenatal stress in mice. *Neuropharmacol*. 2013;68:184-94.
- Mayeda ER, Whitmer RA, Yaffe K. Diabetes and cognition. *Clin Geriatr Med*. 2015; 31:101-15.
- McCrimmon RJ, Ryan CM, Frier BM. Diabetes and cognitive dysfunction. *Lancet*. 2012;379:2291–99.
- Mcdonald JW, Jonhston MV. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain research*. 1990;15(1):41-70.
- McGrath J, Saha S, Chant T, Welham J. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev*. 2008; 30:67-76.
- Meagher EA, Fitzgerald GA. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and imitations. *Free Radical Biology & Medicine*. 2000;28(12):1745-50.
- Mechri A, Saoud M, Khiari G, D'amato T, Dalery J, Gaha L. [Glutamatergic hypothesis of schizophrenia: clinical research studies with ketamine]. *Encephale*. 2001;27(1):53-9.
- Meehan WJ, Spencer JP, Rannels DE, Welch DR, Knobbe ET, Ostrander GK. Hydrogen peroxide induces oxidative DNA damage in rat type II pulmonary epithelial cells. *Environ Mol Mutagen*. 1999;33(4):273-278.
- Mello AS, Quincozes-Santos A, Funchal C. Correlação entre hiperglicemia e células do SNC, com enfoque na atividade glial. *Rev. Neurocienc*. 2012; 20(2):294-301.

- Mello Filho AC, Hoffmann EM, Meneghini R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem.* 1984;218(1):273-75.
- Meltzer HY, Horiguchi M, Massey BW. The role of serotonin in the NMDA receptor antagonist models of psychosis and cognitive impairment. *Psychopharmacology.* 2011;213(2-3):289-305.
- Merkel P, Khoury N, Bertolotto C, Perfetti R. Insulin and glucose regulate the expression of the DNA repair enzyme XPD. *Mol Cell Endocrinol.* 2003; 2:75-85.
- Meyer U, Feldon J. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Prog Neurobiol.* 2010; 90(3):285-326.
- Micallef J, Tardieu S, Gentile S, Fakra E, Jouve E, Sambuc R, Blin O. Effects of a subanaesthetic dose of ketamine on emotional and behavioral state in healthy subjects. *Neurophysiol Clin.* 2003;33(3):138-47.
- Michalková DM, Cernay JC, Danková A, Rusnák M, Fandáková K, Slovak. Childhood Diabetes Epidemiology Study Group. Incidence and prevalence of childhood diabetes in Slovakia (1985-1992). *Diabetes Care.* 1995;18:315-20.
- Migliore L, Fontana I, Trippi F, Colognato R, Coppedè F, Tognoni , Nucciarone B, Siciliano G. Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients. *Neurobiol Aging.* 2005;26(5):567-73.
- 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, Adams B, Verma A, Daly D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci.* 1997; 17(8):2921-7.
- Moghaddam B, Krystal JH. Capturing the angel in "angel dust": twenty years of translational neuroscience studies of NMDAR antagonists in animals and humans. *Schizophr Bull.* 2012; 38(5):942-9.
- 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.
- Money TT, Scarr E, Udawela M, Gibbons AS, Jeon WJ, Seo MS, Dean B. Treating schizophrenia: novel targets for the cholinergic system. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2010;9(2):241-56.

- Monte AS, De Souza GC, McIntyre RS, Soczynska JK, Dos Santos JV, Cordeiro RC, Ribeiro BM, De Lucena DF, Vasconcelos SM, De Sousa FC, Carvalho AF, Macedo DS. Prevention and reversal of ketamine-induced schizophrenia related behavior by minocycline in mice: Possible involvement of antioxidant and nitregeric pathways. *J Psychopharmacol.* 2013;27(11):1032-43.
- Moreira RO, Papelbaum M, Appolinario JC, Matos AG, Coutinho WF, Meirelles RMR, Ellinger VCM, Zagury L. Diabetes mellitus e Depressão: Uma Revisão Sistemática Diabetes mellitus e depressão: uma revisão sistemática . *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003;47(1):19-29.
- Morrison JF, Shehab S, Sheen R, Dhanasekaran S, Shaffullah M, Mensah-Brown E. Sensory and autonomic nerve changes in the monosodium glutamate-treated rat: a model of type II diabetes. *Exp Physiol.* 2008;93(2):213-22.
- Mukherjee S, Decina P, Bocola V, Saraceni F, Scapicchio PL. Diabetes mellitus in schizophrenia patients. *Compr Psychiatry.* 1996;37:68-73.
- Nawa A, Fujita-Hamabe W, Tokyyama S. Altered instestinal Pgycoprotein expressionmlevels a monosodium glutamateinduced obese mouse model. *Life Sci.* 2011;89(23):834-38.
- Neill JC, Barnes S, Cook S, Grayson B, Idris NF, Mclean SL, Snigdha S, Rajagopal L, Harte MK. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. *Pharmacol Ther.* 2010;128(3):419-32.
- Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci.* 2010;13(10):1161-9.
- 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.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000;404(6779):787-90.
- Nuevo R, Chatterji S, Fraguas D, Verde E, Naidoo N, Arango C, Ayuso-Mateus JL. Increased risk of diabetes mellitus among persons with psychotic symptoms: Results from the Who World Health Survey. *J Clin Psychiatry.* 2011; 72(12):1592-9.
- O'neill MF, Shaw G. Comparison of dopamine receptor antagonists on hyperlocomotion induced by cocaine, amphetamine, MK-801 and the

- dopamine D1 agonist C-APB in mice. *Psychopharmacology*. 1999;145(3):237-50.
- Orchard TJ, Costacou T, Kretowski A, Nesto RW. Type 1 diabetes and coronary artery disease. *Diabetes Care*. 2006;29(11):2528-38.
- Palyvoda O, Polanska J, Wygoda A, Rzeszowska-Wolny J. DNA damage and repair in lymphocytes of normal individuals and cancer patients: studies by the comet assay and micronucleus tests. *Acta Biochim Pol*. 2003; 50(1):181-90
- Pandya CD, Howell KR, Pillai A. Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013; 46:214–23.
- Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, Romitelli F, Santini SA, Zuppi C, Ghirlanda G. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev Diabet Stud*. 2010;7:15-25.
- Pittenger C, Sanacora G, Krystal JH. The NMDA receptor as a therapeutic target major depressive disorder. *CNS Neurological Disorders Drug Targets*. 2007; 6(2):101-115.
- Poels EM, Kegeles LS, Kantrowitz JT, Javitt DC, Lieberman JA, Abi-Dargham A, Girgis RR. Glutamatergic abnormalities in schizophrenia: a review of proton MRS findings. *Schizophr Res*. 2014; 152(2-3):325-32.
- Popke EJ, Tizabi Y, Rahman MA, Nespor SM, Grunberg NE. Prenatal exposure to nicotine: effects on prepulse inhibition and central nicotinic receptors. *Pharmacol Biochem Behav*. 1997; 58(4):843-9.
- Psimadas D, Messini-Nikolaki N, Zafiropoulou M, Fortos A, Tsilimigaki S, Piperakis SM. DNA damage and repair efficiency in lymphocytes from schizophrenic patients. *Cancer Lett*. 2004;204(1):33-40.
- Rajeswari N, Ahuja YR, Malini U, Chandrashekar S, Balakrishna N, Rao KV, Khar A. Risk assessment in first degree female relatives of breast cancer patients using the alkaline Comet assay. *Carcinogenesis*. 2000; 21(4):557-61.
- Rapoport JL, Addington AM, Frangou S, Psych MR. The neurodevelopmental model of schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2005; 10(5):434-49.
- Rapoport JL, Giedd JN, Gogtay N. Neurodevelopmental model of schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2012; 17(12):1228-38.
- Razoux F, Garcia R, Lena 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.

- Reddy RD, Yao JK. Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1996; 55(1-2):33-43.
- Reis JS, Veloso CA, Mattos RT, Purish S, Nogueira-Machado JA. Estresse oxidativo: Revisão da sinalização metabólica no Diabetes tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008;52(7):1096-1105.
- Ribeiz SR, Bassitt DP, Arrais JA, Avila R, Steffens DC, Bottino CM. Cholinesterase inhibitors as adjunctive therapy in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder: a review and meta-analysis of the literature. *CNS Drugs*. 2010; 24(4):303-17.
- Robertson SD, Matthies HJG, Owens Aw, et al. Insulin reveals Akt signaling as a novel regulator of norepinephrine transporter trafficking and norephrine homeostasis. *J Neurosci*. 2010, 25:30(34)11305-11316.
- Rocha FD, Teixeira VL, Pereira RC, Kaplan MA. Diabetes mellitus e estresse oxidativo: produtos naturais como alvo de novos modelos terapêuticos. *Rev Bras Farm*. 2006;87(2):49-54.
- Rosenbaum G, Cohen BD, Luby ED, Gottlieb JS, Yelen D. Comparison of sernyl with other drugs: simulation of schizophrenic performance with sernyl, LSD-25, and amobarbital (amytal) sodium; I. Attention, motor function, and proprioception. *AMA Arch Gen Psychiatry*. 1959;1:651-6.
- 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.
- Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-126.
- Ryan C, Vega A, Drash A. Cognitive deficits in adolescents who developed diabetes early in life. *Pediatrics*. 1985;75:921-27.
- Ryan CM. Diabetes and brain damage: More (or less) than meets the eye? *Diabetologia*. 2006. p. 2229-2233.
- Sams-Dodd F. A test of the predictive validity of animal models of schizophrenia based on phencyclidine and D-amphetamine. *Neuropsychopharmacology*. 1998; 18(4):293-304.
- Sams-Dodd F. Distinct effects of d-amphetamine and phencyclidine on the social behaviour of rats. *Behav Pharmacol*. 1995; 6(1):55-65.
- Sams-Dodd F. Effect of novel antipsychotic drugs on phencyclidine-induced stereotyped behaviour and social isolation in the rat social interaction test. *Behav Pharmacol*. 1997; 8(2-3):196-215.
- Sánchez-Chávez G, Salceda R. Effect of streptozotocin-induced diabetes on activities of cholinesterases in the rat retina. *IUBMB Life*. 2000;49:283- 287.

- Santini SA, Marra G, Giardina B, Cotroneo P, Mordente A, Martorana GE, Manto A, Ghirlanda G. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes*. 1997;46(11):1853-1858.
- Santos Junior ER. O efeito do diabetes induzido pela estreptozotocina em ratos Wistar na fase pré-gestacional e suas consequências no concepto. Dissertação. Campinas: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de Campinas;2006.
- Saran M, Bors W. Radical reactions in vivo – an overview. *Radiat. Environ. Biophys*. 1990;29(4):249-262
- Sardas S, Cuhruk H, Karakaya AE, Atakurt Y. Sister chromatid exchanges in operating room personnel. *Mutat. Res*. 1992;279(2):117-120.
- Sarter M, Lustig C, Taylor SF. Cholinergic contributions to the cognitive symptoms of schizophrenia and the viability of cholinergic treatments. *Neuropharmacology*. 2012; 62(3):1544-53.
- Sarter M, Nelson CL, Bruno JP. Cortical cholinergic transmission and cortical information processing in schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2005; 31(1):117-38.
- Sartori MS. Contribuição da glicemia pós-dejejum para o controle glicêmico do paciente com diabete mellito tipo 2. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006;5(2):53-9.
- Scheller M, Bufler J, Hertle I, Schneck HJ, Franke C, Kochs E. Ketamine blocks currents through mammalian nicotinic acetylcholine receptor channels by interaction with both the open and the closed state. *Anesth Analg*. 1996; 83(4):830-6.
- Schellini AS. Retinopatia diabética experimental: estudo estrutural, ultraestrutural e morfométrico da retina de ratos normais, diabéticos e diabéticos tratados. [Tese de Doutorado]. Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Medicina de Botucatu; 1992.
- Schetinger MR, Bonan CD, Frassetto SS, Wyse AT, Schierholt RC, Webber A, Dias RD, Sarkis JJ, Netto CA. Pre-conditioning to global cerebral ischemia changes hippocampal acetylcholinesterase in the rat. *Biochem Mol Biol Int*. 1999; 47(3):473-8.
- Schmatz R, Mazzanti CM, Spanevello R, Stefanello N, Gutierrez J, Maldonado PA, Corrêa M, da Rosa CS, Becker L, Bagatini M, Gonçalves JF, Jaques JDS, Schetinger MR, Morsch VM. Ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and treated with resveratrol. *Brain Res Bull*. 2009; 80:371–376.

- Schmidt MI, Duncan BB, Silva GA, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM, Chor D, Menezes PR. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. 2011;377(9781):1949-61.
- Schneider T, Przewlocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*. 2005; 30(1):80-9.
- Seeman P. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse*. 1987;1(2):133-52.
- Sena EP, Sampaio AS, Quarantini LC, Oliveira IR. Diabetes mellitus and atypical antipsychotics. *Rev Bras Psiquiatric*. 2003;25(4):253-7.
- Shafir E. Contribution of animal models to the research of the causes of diabetes. *World J Diabetes*. 2010;1(5):137-140.
- Shamsi S, Lau A, Lencz T, Burdick KE, DeRosse P, Brenner R, Lindenmayer JP, Malhotra AK. Cognitive and symptomatic predictors of functional disability in schizophrenia. *Schizophr. Res* 2011;126:257-64.
- Sheneider CD. Avaliação do estresse oxidativo em indivíduos submetidos a diferentes intensidades de exercício em esteira rolante. [Dissertação]. Porto Alegre: Escola de Educação Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2002.
- Sherin A, Anu J, Peeyush KT, Smijin S, Anitha M, Roshni BT, Paulose CS. Cholinergic and GABAergic receptor functional deficit in the hippocampus of insulin-induced hypoglycemic and streptozotocin-induced diabetic rats. *Neuroscience*. Elsevier Inc. 2012;202:69-76.
- Shiling AM, Raphael J. Diabetes, Hyperglycemia and Infections. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 2008;22(3):519-535.
- Shorter KR, Miller BH. Epigenetic mechanisms in schizophrenia: *Prog Biophys Mol Biol*. 2015;118(1-2):1-7.
- Silva FC, Dantas RT, Citó CO, Silva IG, Vasconcelos MM, Fonteles MF, Viana SB, Sousa CF. Ketamina, da anestesia ao uso abusivo: artigo de revisão. *Rev. Neurocienc*. 2010;18(2):227-37.
- Silva M, De Lima WG, Silva ME, Pedrosa ML. Efeitos da estreptozotocina sobre os perfis glicêmicos e lipídico e o estresse oxidativo em hamster. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2011;55(1):46-51.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175(1):184-91.
- Skinner TC, John M, Hampson SE. Social support and personal models of diabetes as predictors of self-care and well-being. A longitudinal study of adolescents and young adults with type 1 diabetes. *Health Psychol*, 21(1), 61-70.

- Smith JW, Gastambide F, Gilmour G, Dix S, Foss J, Lloyd K, Malik N, Tricklebank M. A comparison of the effects of ketamine and phencyclidine with other antagonists of the NMDA receptor in rodent assays of attention and working memory. *Psychopharmacology*. 2011;217(2):255-69.
- Snyder SH. The dopamine hypothesis of schizophrenia: focus on the dopamine receptor. *Am J Psychiatry*. 1976; 133(2):197-202.
- Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. 2014
- Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor: *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(4):294-302.
- Spiller F, Carlos D, Souto FO, de Freitas A, Soares FS, Viera SM, Paula FJ, Alves-Filho JC, Cunha FQ. A1-Acid Glycoprotein decreases neutrophil migration and decreases susceptibility to sepsis in diabetic mice. *Diabetes*. 2012; 61: 1584-91.
- Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian Journal Medicine Research*. 2007;125(3):451-72.
- Su YA, Si TM, Zhou DF, Guo CM, Wang XD, Yang Y, Shu L, Liang JH. Risperidone attenuates MK-801-induced hyperlocomotion in mice via the blockade of serotonin 5-HT 2A/2C receptors. *Eur J Pharmacol*. 2007;564(1-3):123-30.
- Swerdlow N, Braff D, Geyer M. Cross-species Studies of Sensorimotor Gating of the Startle Reflex. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;877(1):202-16.
- Swerdlow NR, Geyer MA, Braff DL. Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology*. 2001;156(2-3):194-215.
- Swerdlow NR, Geyer MA. Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schizophr Bull*. 1998;24(2):285-301.
- Szkudelski T. The Mechanism Of Alloxan And Streptozotocin Action In B Cells Of The Rat Pancreas. *Physiol Res*. 2001;50(6):537-46.
- Taylor C, Fricker AD, Devi LA, Gomes I. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. *Cell Signal*. 2005;17:549-557.
- Taylor SI. Deconstructing type 2 diabetes. 1999; 971:9-12.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyama Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):206-21.

- Tomiya M, Fukushima T, Kawai J, Aoyama C, Mitsushashi S, Santa T, Imai K, Toyooka 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.
- Tost H, Meyer-Lindenberg A. Dopamine-glutamate interactions: a neural convergence mechanism of common schizophrenia risk variants. *Biol Psychiatry.* 2011;69(10):912-3.
- Turetsky BI, Calkins ME, Light GA, Olincy A, Radant AD, Swerdlow NR. Neurophysiological endophenotypes of schizophrenia: the viability of selected candidate measures. *Schizophr Bull.* 2007; 33(1):69-94.
- Valente T, Gella A, Solé M, Durany N, Unzeta M. Immunohistochemical study of semicarbazide-sensitive amine oxidase/vascular adhesion protein-1 in the hippocampal vasculature: pathological synergy of Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *J Neurosci Res.* 2012;90:1989-1996.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Cell Biochem.* 2004;266:37-56.
- Van Belle TL, Coppieters KT, Von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiology Review.* 2011;91(1):79-118.
- Van Os J, Kenis G, Rutten BP. The environment and schizophrenia. *Nature.* 2010; 468(7321):203-12.
- Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Benfato MS, Manfredini V, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. *Quím nova.* 2007;33(5):1323-38
- Velasquez MT, Kimmel PL, Michaelis OE. Animal models of spontaneous diabetic kidney disease. *The FASEB Journal.* 1990;4(11):2850-59.
- Villela IV, de Oliveira IM, da Silva J, Henriques JA. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutation Research.* 2006;605(1-2):78-6.
- Voss B, Thienel R, Leucht S, Kircher T. [Therapy of cognitive deficits in schizophrenia with acetylcholinesterase inhibitors. A systematic overview. *Nervenarzt.* 2008;79(1):47-8.
- Wajchenberg BL. B-Cell Failure in Diabetes and Preservation by Clinical treatment. *Endocrine Reviews.* 2007;28:187-218.
- Wayhs CA, Manfredini V, Sitta A, Deon M, Ribas G, Vanzin C, Biancini G, Ferri M, Nin M, Barros HM, Vargas CR. Protein and lipid

- oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test: the insulin and clonazepam effect. *Metab Brain Dis.* 2010;25(3):297-304.
- Weickert TW, Goldberg TE, Gold JM, Bigelow LB, Egan MF, Weinberger DR. Cognitive impairments in patients with schizophrenia displaying preserved and compromised intellect. *Arch Gen Psychiatry.* 2000; 57(9):907-13.
- Weinstock M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog Neurobiol.* 2001; 65(5):427-51.
- Weiss IC, Feldon J. Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. *Psychopharmacol.* 2001;156(2-3):305-26.
- Wenk GL. The nucleus basalis magnocellularis cholinergic system: one hundred years of progress. *Neurobiol Learn Mem.* 1997; 67(2):85-95.
- White MF. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia.* 1997; 40: 2-17.
- Whitmer RA. Type 2 diabetes and risk of cognitive impairment and dementia. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2007; 373-380.
- Wiernsperger NF. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab.* 2003; 296:579-85.
- World Health Organization (WHO). [Acesso em 2015, Abril 20]. Disponível em <http://www.who.int/es/>
- Yoshihiro T, Kathy K. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. *Hypertension.* 2003; 42:1075-1108.
- Yu AJ, Dayan P. Acetylcholine in cortical inference. *Neural Netw.* 2002; 15(4-6):719-30.
- Zaytseva Y, Chan RC, Poppel E, Heinz A. Luria revisited: cognitive research in schizophrenia, past implications and future challenges. *Philos Ethics Humanit Med.* 2015; 10(1):015-0026.
- Zhang Xy, Tan Yl, Cao LY, Wu Gy, Xu Q, Shen Y, Zhou DF. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different forms of schizophrenia treated with typical and atypical antipsychotics. *Schizophr Res.* 2006;81: 291-300.
- Zou X, Patterson TA, Divine RL, Sadovova N, Zhang X, Hanig JP, Paule MG, Slikker W, Wang C. Prolonged exposure to ketamine increases neurodegeneration in the developing monkey brain. *Int J Dev Neurosci.* 2009;27(7):727-731.
- Zugno AI, Chipindo H, Canever L, Budni J, Alves De Castro A, Bittencourt De Oliveira M, Heylmann AS, Gomes Wessler P, Da Rosa

Silveira F, Damazio LS, Mastella GA, Kist LW, Bogo MR, Quevedo J, Gama CS. Omega-3 fatty acids prevent the ketamine-induced increase in acetylcholinesterase activity in an animal model of schizophrenia. *Life Sci.* 2015; 121:65-9.

Zugno AI, Chipindo HL, Volpato AM, Budni J, Steckert AV, De Oliveira MB, Heylmann AS, Da Rosa Silveira F, Mastella GA, Maravai SG, Wessler PG, Binatti AR, Panizzutti B, Schuck PF, Quevedo J, Gama CS. Omega-3 prevents behavior response and brain oxidative damage in the ketamine model of schizophrenia. *Neuroscience.* 2014; 259:223-31.

Zugno AI, Fraga DB, De Luca RD, Ghedim FV, Deroza PF, Cipriano AL, Oliveira MB, Heylmann AS, Budni J, Souza RP, Quevedo J. Chronic exposure to cigarette smoke during gestation results in altered cholinesterase enzyme activity and behavioral deficits in adult rat offspring: potential relevance to schizophrenia. *J Psychiat Res.* 2013; 47(6):740-6.

Zugno AI, Juliao RF, Budni J, Volpato AM, Fraga DB, Pacheco FD, Deroza PF, Luca RD, De Oliveira MB, Heylmann AS, Quevedo J. Rivastigmine reverses cognitive deficit and acetylcholinesterase activity induced by ketamine in an animal model of schizophrenia. *Metab Brain Dis.* 2013; 28(3):501-8.

Zugno AI, Matos MP, Canever L, Fraga DB, De Luca RD, Ghedim FV, Deroza PF, De Oliveira MB, Pacheco FD, Valvassori SS, Volpato AM, Budni J, Quevedo J. Evaluation of acetylcholinesterase activity and behavioural alterations induced by ketamine in an animal model of schizophrenia. *Acta Neuropsychiatr.* 2014; 26(1):43-50.

ANEXO



**Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "O PAPEL DA DIABETES COMO FATOR DE RISCO PARA ESQUIZOFRENIA" Protocolo nº 006/2015-2 sob a responsabilidade de Alexandra Ioppi Zugno e equipe: Josiane Budni, Patrícia Fernanda Schuck, Samira Valvassori, Vanessa Moraes de Andrade, Lara Canever, Alexandra Stephanie Almeida Heylmann, Gustavo Mastella, Louyse Sultzbach Damázio e Sarah Gomes Tasso, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense, em reunião de: 28/07/2015.

Vigência do Projeto	29/07/2015 à 15/07/2016
Espécie/linhagem	Rattus norvegicus (Wistar)
Nº. De animais	180
Peso/idade	60 a 120 g
Sexo	M
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Protocol number: 006/2015-2


Principal Investigator: Alexandra Ioppi Zugno

Researchers: Josiane Budni, Patrícia Fernanda Schuck, Samira Valvassori, Vanessa Moraes de Andrade, Lara Canever, Alexandra Stephanie Almeida Heylmann, Gustavo Mastella, Louyse Sultzbach Damázio, Sarah Gomes Tasso

Project title: **DIABETES' ROLE AS A RISK FACTOR FOR SCHIZOPHRENIA**

*The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net*

Criciúma, 28 de julho de 2015.


JAIRO JOSÉ ZOCHE
 Coordenador da CEUA