



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Thainá Pereira de Souza

**Efeitos sexo-dependentes do modelo de esquizofrenia pela exposição
neonatal de camundongos à fenciclidina**

Rio de Janeiro

2022

Thainá Pereira de Souza

Efeitos sexo-dependentes do modelo de esquizofrenia pela exposição neonatal de camundongos à fenciclidina

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Yael de Abreu Villaça

Coorientadora: Dra. Ana Carolina Dutra Tavares

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S729 Souza, Thainá Pereira de.
Efeitos sexo-dependentes do modelo de esquizofrenia pela exposição neonatal de camundongos à fenciclidina / Thainá Pereira de Souza – 2022.
82f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Yael de Abreu Villaça
Coorientadora: Dra. Ana Carolina Dutra Tavares

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Esquizofrenia – Tratamento farmacológico. 2. Fenciclidina – Antagonistas & inibidores. 3. Comportamento do adolescente – Teses. 4. Caracteres Sexuais – Teses. I. Villaça, Yael de Abreu. II. Tavares, Ana Carolina Dutra. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.895-053.6-08

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo
CRB7/7341

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Thainá Pereira de Souza

Efeitos sexo-dependentes do modelo de esquizofrenia pela exposição neonatal de camundongos à fenciclidina

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 27 de setembro de 2022.

Orientadora: Prof.^a Dra. Yael de Abreu Villaça
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientadora: Dra. Ana Carolina Dutra Tavares
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Claudio Carneiro Filgueiras
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Guilherme Carneiro Montes
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Gilda Angela Neves
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação tanto como pessoa quanto como profissional. Em especial, meu amado pai por todo apoio e carinho, meu querido irmão por me mostrar o caminho acadêmico e minhas orientadoras Yael e Ana por todo conhecimento e suporte.

Sou muito grata também por fazer parte do laboratório de Neurofisiologia e poder conviver com as pessoas incríveis que trabalham nele.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-BRASIL para YA-V), da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ-BRASIL para ACD-T) e Sub-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (SR2-UERJ para FFM) e da FAPERJ-BRASIL (SEI-260003/001135/2020, E-26/200.957/2021 e E-26/010.100961/2018 para YA-V; E-26/202.266/2018 para ACD-T) e CNPq-BRASIL (304332/2016 -0 e 304368/2020-2 para YA-V).

RESUMO

SOUZA, Thainá Pereira de. **Efeitos sexo-dependentes do modelo de esquizofrenia pela exposição neonatal de camundongos à fenciclidina.** 2022. 82 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

A esquizofrenia atinge 0,9% da população mundial. É considerada um transtorno do neurodesenvolvimento, embora sua manifestação plena e seu diagnóstico ocorram frequentemente entre o final da adolescência e o início da fase adulta. Após seu estabelecimento, são observados três tipos de sintomas: positivos, negativos e cognitivos. Existem marcantes diferenças sexuais na esquizofrenia, sendo sua incidência maior e mais precoce em homens, os quais também apresentam sintomas negativos e cognitivos mais severos e pior resposta aos antipsicóticos. Apesar dessas diferenças, não há modelos animais estabelecidos que as mimetizem, o que dificulta o entendimento dos mecanismos sexo-dependentes envolvidos na fisiopatologia da esquizofrenia e o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes. Assim, nesse estudo, utilizamos o modelo de esquizofrenia pela administração neonatal de fenciclidina (nPCP), um antagonista de receptores NMDA, visando investigar se este modelo induz alterações comportamentais e neuroquímicas de forma sexo-dependente. Avaliamos também o impacto da olanzapina, um antipsicótico atípico, sobre essas alterações. Camundongos C57BL/6 de ambos os sexos receberam injeções subcutâneas de fenciclidina nas doses de 5, 10 ou 20mg/kg (nPCP5, nPCP10, nPCP20), ou salina aos 7, 9 e 11 dias de vida pós-natal (PN). Para avaliar o impacto do estresse associado às injeções, foi utilizado um grupo *Naive*. Em PN30, início da adolescência, quantificamos por *Western Blotting* a subunidade NR1 do receptor NMDA e a proteína pós-sináptica PSD-95 no córtex frontal e hipocampo. De PN48 a PN50, os animais foram submetidos aos seguintes testes comportamentais: campo aberto (CA), para medir a hiperatividade locomotora associada aos sintomas positivos; interação social (IS), para mensurar uma alteração associada a um sintoma negativo; e inibição pelo pré-pulso (IPP), para avaliar a integridade do filtro sensorio-motor. A olanzapina foi administrada 30 minutos antes de cada teste. Não houve diferenças entre animais *Naive* e Salina, os quais foram agrupados nas análises subsequentes. No CA, identificamos hipoatividade em animais nPCP de ambos os sexos, mas machos se mostraram mais sensíveis, expressando hipoatividade mesmo na menor dose de nPCP. No IS, prejuízos na interação social foram identificados somente em machos, em animais nPCP5 e nPCP20. No IPP, machos e fêmeas nPCP apresentaram déficits, com maior severidade em machos, pois estes apresentaram redução do percentual de inibição pelo pré-pulso de menor intensidade. A olanzapina não reverteu as alterações comportamentais provocadas pela nPCP e, em algumas situações, sua administração intensificou os efeitos da nPCP. A olanzapina causou hipolocomoção mais severa em machos nPCP e, particularmente no IS, machos nPCP10 somente apresentaram déficits se expostos a esse antipsicótico. Consistente com os dados obtidos nas avaliações comportamentais, identificamos diminuição da expressão da proteína NR1 no córtex frontal apenas em machos. Esses resultados sugerem que a nPCP pode ser usada para modelar as diferenças sexo-dependentes identificadas em pacientes com esquizofrenia. A ineficácia e indicação de danos comportamentais associados ao protocolo adotado para administração de olanzapina sugere ainda a necessidade de mais estudos com o objetivo de investigar a eficácia e segurança deste fármaco na adolescência.

Palavras-chave: Esquizofrenia. Fenciclidina. Comportamento. Dimorfismo sexual. Adolescência.

ABSTRACT

SOUZA, Thainá Pereira de. **Sex-dependent effects of a mouse model of schizophrenia induced by neonatal exposure to phencyclidine.** 2022. 82 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Schizophrenia affects 0.9% of the world population. It is considered a neurodevelopmental disorder, although its full manifestation and diagnosis occur often between late adolescence and early adulthood. After its establishment, three types of symptoms are observed: positive, negative, and cognitive. There are marked sexual differences in schizophrenia, with a higher and earlier incidence in men, who also have more severe negative and cognitive symptoms and a worse response to antipsychotics. Despite these differences, no established animal models mimic them, making it difficult to understand the sex-dependent pathophysiologic mechanisms of schizophrenia and to develop more efficient treatments. Thus, in this study, we used a developmental model of schizophrenia by the neonatal administration of phencyclidine (nPCP), an NMDA receptor antagonist, to investigate whether it induces behavioral and neurochemical changes in a sex-dependent manner. We also evaluated the impact of olanzapine, an atypical antipsychotic, on these changes. C57BL/6 mice of both sexes received subcutaneous injections of phencyclidine at doses of 5, 10, or 20mg/kg (nPCP5, nPCP10, nPCP20), or saline, at postnatal days (PN) 7, 9, and 11. A Naïve group was used to assess the impact of stress associated with injections. At PN30, early adolescence, we quantified by Western Blotting, the NR1 subunit of the NMDA receptor and the postsynaptic protein PSD-95 in the frontal cortex and hippocampus. From PN48 to PN50, the animals were submitted to the following behavioral tests: open field (OF), to check for locomotor hyperactivity associated with positive symptoms; social interaction (SI) to measure a change associated with a negative symptom; and prepulse inhibition (PPI) to assess sensorimotor gate integrity. Olanzapine was administered 30min before each test. There were no differences between Naive and Salina animals, which were pooled in subsequent analyses. In the OF, both nPCP males and females were hypoactive, but males were more sensitive, expressing hypoactivity even at the lowest dose of nPCP. In the SI, impairments in social interaction were identified only in males; in nPCP5 and nPCP20 animals. In the PPI, nPCP males and females showed deficits, with signs of greater severity in males, as they showed a reduction in the percentage of inhibition by the pre-pulse of lower intensity. Olanzapine failed to reverse the behavioral changes caused by nPCP and, in some situations, its administration intensified the effects of the neonatal model. Olanzapine caused more severe hypolocomotion in nPCP males and, particularly in the SI, nPCP10 males only showed deficits if exposed to this antipsychotic. Consistent with the data obtained in the behavioral assessments, we identified a decrease in NR1 protein expression in the frontal cortex only in males. These results suggest that nPCP can be used to model sex-dependent differences identified in patients with schizophrenia. The ineffectiveness and the behavioral damage associated with the protocol adopted for the administration of olanzapine also suggest the need for further studies with the aim of investigating the efficacy and safety of this drug during adolescence.

Keywords: Schizophrenia. Phencyclidine. Behavior. Sexual dimorphism. Adolescence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ilustração com as principais vias dopaminérgicas do SNC	13
Figura 2 -	Ilustração do receptor NMDA com seus principais sítios de ligação	15
Figura 3 -	Ilustração da associação entre as hipóteses dopaminérgica e glutamatérgica	18
Figura 4 -	Linha do tempo com os principais procedimentos realizados durante o estudo	26
Figura 5 -	Monitores de atividade do Laboratório de Neurofisiologia da UERJ utilizados no teste do CA	27
Figura 6 -	Equipamento do Laboratório de Neurofisiologia da UERJ utilizado no teste da IPP	29
Figura 7 -	Atividade locomotora de camundongos dos grupos <i>Naive</i> e SAL.....	34
Figura 8 -	Atividade locomotora de animais modelados para esquizofrenia e tratados com olanzapina	36
Figura 9 -	Índice de interação social dos animais dos grupos <i>Naive</i> e SAL	37
Figura 10 -	Índice de interação social de animais modelados para esquizofrenia e tratados com olanzapina	38
Figura 11 -	Percentual de inibição pelo pré-pulso de animais dos grupos <i>Naive</i> e SAL	39
Figura 12 -	Percentual de inibição pelo pré-pulso de 70dB de animais modelados para esquizofrenia e tratados com olanzapina	42
Figura 13 -	Percentual de inibição pelo pré-pulso de 75dB de animais modelados para esquizofrenia e tratados com olanzapina	43
Figura 14 -	Percentual de inibição pelo pré-pulso de 80dB de animais modelados para esquizofrenia e tratados com olanzapina	44
Figura 15 -	Resposta de sobressalto aos estímulos sonoros aplicados no teste da IPP de animais dos grupos <i>Naive</i> e SAL	45
Figura 16 -	Resposta de sobressalto aos estímulos sonoros aplicados no teste da IPP de animais modelados para esquizofrenia e tratados com olanzapina	48
Figura 17 -	Resposta de sobressalto aos pulsos aplicados nas fases de pré e pós-	

	teste do teste da IPP de camundongos dos grupos <i>Naive</i> e SAL	50
Figura 18 -	Resposta de sobressalto aos pulsos aplicados nas fases de pré e pós- teste do teste da IPP de animais modelados para esquizofrenia e tratados com olanzapina	51
Figura 19 -	Percentual de densidade da subunidade NR1 do receptor NMDA no CF de animais modelados para esquizofrenia	53
Figura 20 -	Percentual de densidade da subunidade NR1 do receptor NMDA no HP e da proteína PSD-95 no CF e no HP de animais modelados para esquizofrenia	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato
ANOVA	Análise de Variância
ATV	Área do Tegmento Ventral
CA	Campo Aberto
CEUA	Comitê de Ética para Uso Animal
CF	Córtex Frontal
CPF	Córtex Pré-Frontal
EPM	Erro Padrão da Média
FPLSD	<i>Fisher's Protected Least Significant Difference</i>
GABA	Ácido Gama Aminobutírico
HP	Hipocampo
IPP	Inibição pelo pré-pulso
IS	Interação Social
MK-801	Dizocilpina
NAc	Núcleo Acumbente
NMDA	N-metil D-Aspartato
NR1	Subunidade 1 do receptor NMDA
OLZ	Olanzapina
P	Pulso
PCP	<i>Phencyclidine</i>
PN	Pós-natal
PP	Pré-pulso
PSD-95	<i>Postsynaptic Density Protein 95</i>
s.c	subcutânea
SAL	Salina
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	percentual
D1	receptores dopaminérgicos do tipo 1
D2	receptores dopaminérgicos do tipo 2
Mg ²⁺	cátion bivalente magnésio
h	hora
°C	grau Celsius
NaCl	cloreto de sódio
mg/Kg	miligrama por quilograma
cm	centímetro
dB	decibel
ms	milissegundo
µL	microlitro
pH	potencial de hidrogênio
rpm	rotações por minuto
nm	nanômetro
mM	milimolar
µg	micrograma
mL	mililitro
g	grama

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	OBJETIVOS	24
1.1	Geral	24
1.2	Específicos	24
2	MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1	Animais	25
2.2	Formação dos grupos experimentais	25
2.3	Testes comportamentais	26
2.3.1	<u>Teste do campo aberto (CA)</u>	27
2.3.2	<u>Teste de interação social (IS)</u>	28
2.3.3	<u>Teste de inibição pelo pré-pulso (IPP)</u>	28
2.4	Coleta e processamento das amostras	30
2.5	Western Blotting	30
2.6	Análise estatística	31
3	RESULTADOS	34
3.1	Campo aberto	34
3.2	Interação Social	36
3.3	Inibição pelo pré-pulso	39
3.4	Western Blotting	52
4	DISCUSSÃO	56
4.1	Efeitos sexo-dependentes do modelo de exposição neonatal à fenciclidina no comportamento associado a esquizofrenia	58
4.2	Atividade locomotora	58
4.3	Interação social	60
4.4	Inibição pelo pré-pulso	61
4.5	Tratamento com olanzapina	63
4.6	Proteínas NR1 e PSD-95 no Córtex Frontal e no Hipocampo	65
	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética para Uso Animal	82

INTRODUÇÃO

Aspectos gerais da esquizofrenia

A esquizofrenia é uma desordem mental grave e crônica que afeta cerca de 0,9% da população mundial (PERÄLÄ et al., 2007). A esquizofrenia acarreta grandes prejuízos econômicos e sociais. Nos Estados Unidos, por exemplo, são gastos mais de 150 bilhões de dólares por ano com essa doença (CLOUTIER et al., 2016). O desemprego afeta cerca de 80-90% dos pacientes (OWEN; SAWA; MORTENSEN, 2016). Além disso, esses indivíduos têm sua expectativa de vida reduzida em torno de 15 anos (HJORTHØJ et al., 2017).

O diagnóstico da esquizofrenia costuma ocorrer entre o final da adolescência e o início da fase adulta (KAHN et al., 2015), após o primeiro episódio psicótico (TENDILLA-BELTRÁN et al., 2021). Após o estabelecimento da doença, podem ser observados três tipos de sintomas: os positivos, que incluem os delírios, as alucinações, o discurso e o comportamento desorganizados; os sintomas negativos que compreendem a anedonia, a avolição, o embotamento afetivo e o retraimento social; e os cognitivos, dentre os quais se destacam déficits de memória/aprendizado e atenção (UNO; COYLE, 2019). No entanto, prejuízos cognitivos e sociais podem ser observados anos antes, numa fase denominada prodrômica (OWEN; SAWA; MORTENSEN, 2016).

Existe uma hipótese que postula que a esquizofrenia é uma doença do neurodesenvolvimento (WEINBERGER, 1987). A ocorrência de perturbações como infecções, desnutrição, estresse e/ou complicações obstétricas no período perinatal prejudica o desenvolvimento adequado do cérebro (SELEMON; ZECEVIC, 2015). Na infância as alterações estruturais provenientes desse processo seriam de alguma forma compensadas, o que atenuaria a sua expressão funcional, mas o ápice da maturação de algumas estruturas-chave do sistema nervoso central como o córtex pré-frontal, que ocorre mais tardiamente no fim da adolescência, faz com que elas se tornem evidentes (BIRNBAUM; WEINBERGER, 2017).

A adolescência é marcada pelo processo de poda sináptica, na qual as sinapses mais utilizadas se tornam mais fortes e se mantêm, enquanto as sinapses menos utilizadas se tornam mais fracas e são eliminadas (SAKURAI; GAMO, 2019). Essa eliminação é responsável pela típica diminuição da substância cinzenta observada no

cérebro adolescente (MCCUTCHEON; REIS MARQUES; HOWES, 2020) e ocorre principalmente em estruturas corticais que ainda se encontram imaturas nessa fase da vida (PATEL et al., 2021). Na fase adulta, estas estruturas são responsáveis por controlar o funcionamento de diversas estruturas subcorticais (SAKURAI; GAMO, 2019). Sendo assim, a maturação adequada de suas circuitarias é essencial para a transição do cérebro adolescente para o cérebro adulto.

Na esquizofrenia, esse processo de poda sináptica ocorreria de forma excessiva (FEINBERG, 1982) e isso explicaria, em parte, a redução mais acentuada da substância cinzenta do córtex cerebral de indivíduos com esse transtorno mental (JAARO-PELED; SAWA, 2020; MCCUTCHEON; REIS MARQUES; HOWES, 2020). Isso prejudicaria o estabelecimento adequado das conexões entre o córtex e outras estruturas e o funcionamento cerebral como um todo, contribuindo para o aparecimento dos sintomas da esquizofrenia nesse período (MCCUTCHEON; REIS MARQUES; HOWES, 2020).

Assim, durante a adolescência, os eventos neurobiológicos que culminarão na expressão da esquizofrenia já estão ocorrendo. No entanto, poucos trabalhos em modelos animais se dedicaram a investigar características neurobiológicas do curso fisiopatológico dessa doença.

Sistemas de neurotransmissão

Apesar da fisiopatologia da esquizofrenia ainda não ter sido completamente elucidada, algumas hipóteses têm sido propostas para explicar os sintomas que são manifestados nesta desordem. Alterações nos sistemas de neurotransmissão dopaminérgico e glutamatérgico têm sido relacionadas de forma consistente com as disfunções comportamentais observadas neste transtorno mental.

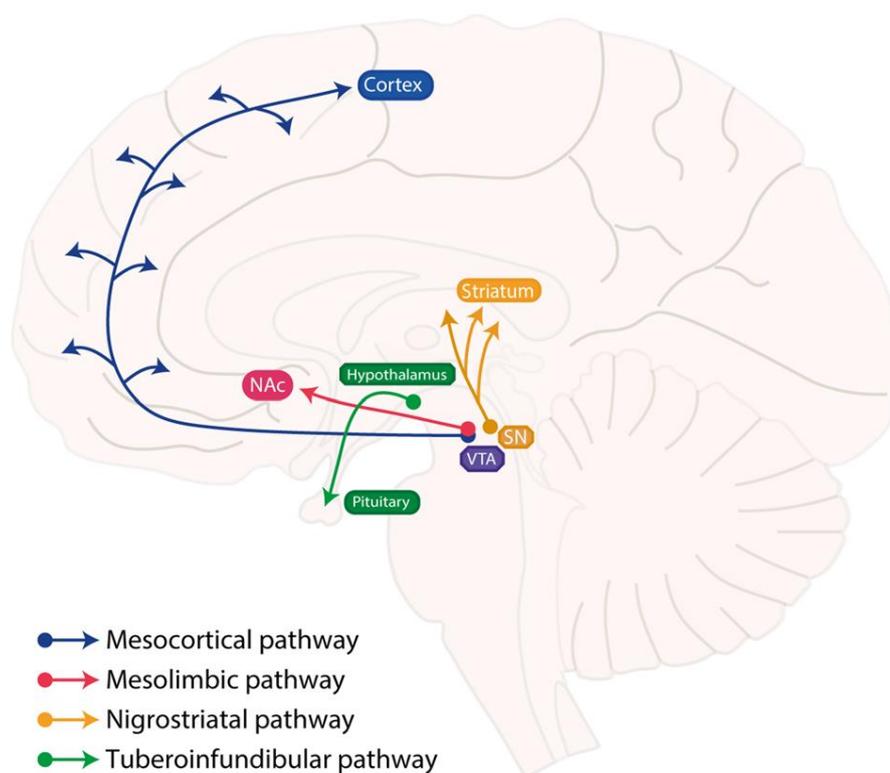
Hipótese dopaminérgica

A dopamina está envolvida em diversos processos neurobiológicos que são importantes para a cognição, a emoção, o movimento e a recompensa. Existem 5 subtipos de receptores dopaminérgicos, que estão divididos em dois grandes grupos com base em suas propriedades farmacológicas e estruturais – os do tipo D1 (D1 e D5) são excitatórios, já os do tipo D2 (D2, D3 e D4) são inibitórios (WILLIAMS et al.,

2021). No entanto, todos compartilham a característica de serem metabotrópicos, ou seja, estarem associados à proteína G e atuarem por meio da regulação da concentração intracelular de segundos mensageiros (KLEIN et al., 2019).

A neurotransmissão dopaminérgica no sistema nervoso central ocorre por meio de 4 principais vias: a mesolímbica, a mesocortical, a nigroestriatal e a tuberoinfundibular (Figura 1). As projeções da via mesolímbica partem da área do tegumento ventral e tem como um dos alvos principais o núcleo acumbente. Esta via está envolvida nos mecanismos de motivação e recompensa (KLEIN et al., 2019). A via mesocortical se estende da área do tegumento ventral ao córtex pré-frontal e está ligada à cognição e ao comportamento social (LOKE; HARLEY; LEE, 2015). A via nigroestriatal tem origem na substância negra e termina no estriado dorsal, atuando no controle motor (KLEIN et al., 2019). Já as projeções que partem do hipotálamo e vão até a pituitária compõem a via tuberoinfundibular, responsável por regular a secreção do hormônio prolactina (KLEIN et al., 2019).

Figura 1 - Ilustração com as principais vias dopaminérgicas do SNC.



Legenda: NAc - núcleo acumbente; ATV - área do tegumento ventral; SN - substância negra.
 Fonte: Adaptado de KLEIN et al., 2019

A primeira hipótese dopaminérgica da esquizofrenia aponta para uma hiperativação da via mesolímbica (MCCUTCHEON; ABI-DARGHAM; HOWES, 2019). Essa hipótese se baseia em observações e estudos clínicos que demonstraram, por exemplo, que: I) substâncias que estimulam a neurotransmissão dopaminérgica nessa via são capazes de causar sintomas psicóticos em indivíduos saudáveis e piorá-los em pacientes com esquizofrenia (HOWES et al., 2017); II) a eficácia dos fármacos em tratar sintomas positivos da esquizofrenia está diretamente relacionada ao bloqueio dos receptores dopaminérgicos do tipo D2 (AMATO; VERNON; PAPALEO, 2018).

Contudo, alguns fatores tornam essa hipótese incompleta: ela não explica os mecanismos envolvidos nos outros sintomas da esquizofrenia (ARYUTOVA; STOYANOV, 2021); os antipsicóticos de 1ª geração, que atuam principalmente sobre os receptores D2, não são eficazes em controlar os sintomas negativos e cognitivos desse transtorno mental (EGERTON et al., 2020). Com isso, uma hipótese complementar foi postulada: a da hipoativação da via mesocortical. Essa hipótese sugere que sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia tem como base biológica a hipoatividade dopaminérgica nesta via (STĘPNICKI; KONDEJ; KACZOR, 2018). Corroborando com essa hipótese, estudos *in vivo* com humanos mostraram menor liberação de dopamina induzida por anfetamina no córtex pré-frontal de indivíduos com esquizofrenia quando comparados à indivíduos sem essa desordem mental (SLIFSTEIN et al., 2015), além de menor liberação desse neurotransmissor durante a execução de tarefas que envolvem habilidades cognitivas (RAO et al., 2019).

Apesar da hipótese dopaminérgica ser bem fundamentada, a atividade desse sistema é regulada por outros sistemas de neurotransmissão. Assim, disfunções glutamatérgicas têm sido propostas para justificar os desequilíbrios nas vias dopaminérgicas mencionados acima (MCCUTCHEON; KRYSTAL; HOWES, 2020).

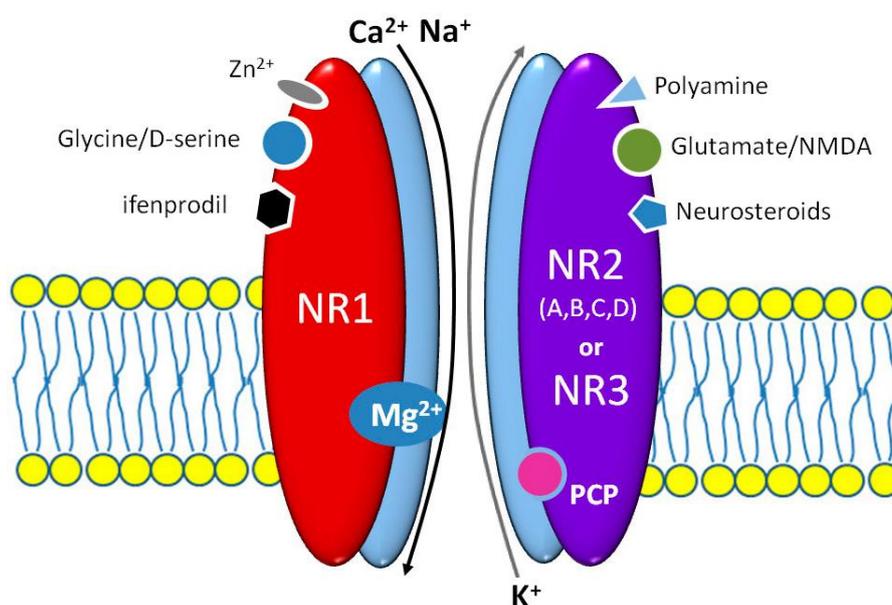
Hipótese glutamatérgica

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e pode ativar tanto receptores ionotrópicos, quanto receptores metabotrópicos presentes nas membranas das células (UNO; COYLE, 2019). Os primeiros são compostos por canais iônicos e podem ser classificados de acordo com os agonistas pelos quais eles têm maior afinidade, sendo estes o N-metil-D-aspartato (NMDA), o

ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA) ou o cainato. Já os metabotrópicos são acoplados a proteínas G e atuam por meio de segundos mensageiros intracelulares (UNO; COYLE, 2019).

Como detalhado mais a frente, os receptores NMDA (Figura 2) têm sido particularmente associados a fisiopatologia da esquizofrenia (DAUVERMANN; LEE; DAWSON, 2017). Estes receptores são compostos por quatro subunidades, divididas em três tipos: NR1, NR2 (A-D) e NR3 (A-B) (BERTRON; SETO; LINDSLEY, 2018). A presença de duas subunidades NR1 é obrigatória, sendo indispensável para o funcionamento adequado desses receptores (TENDILLA-BELTRÁN et al., 2021). Além disso, os receptores NMDA necessitam que alguns processos ocorram simultaneamente para que sejam ativados. Deve ocorrer a despolarização da membrana pós-sináptica para que o íon Mg^{2+} que bloqueia o canal seja deslocado; deve ocorrer também a ligação dos co-agonistas glicina ou D-serina e glutamato a seus respectivos sítios (ADELL, 2020).

Figura 2 - Ilustração do receptor NMDA com seus principais sítios de ligação.



Fonte: KRZYSTANEK; PAŁASZ, 2019

O envolvimento do sistema de neurotransmissão glutamatérgico na esquizofrenia foi sugerido após a observação de que indivíduos com essa doença apresentavam menores níveis de glutamato no fluído cérebro-espinhal (KIM et al.,

1980). Como esse resultado não foi replicado em outros estudos (PERRY, 1982; KORPI et al., 1987), a hipótese glutamatérgica só ganhou força com a descoberta de que substâncias como a fenciclidina e a cetamina, que são antagonistas dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, provocam sintomas semelhantes aos da esquizofrenia em indivíduos saudáveis e pioram os sintomas em indivíduos que apresentam essa doença (EGERTON et al., 2020). A hipótese glutamatérgica passou então a ser definida mais especificamente como a hipótese da hipofunção dos receptores NMDA (DAUVERMANN; LEE; DAWSON, 2017). A ativação desses receptores é de suma importância para os mecanismos envolvidos na plasticidade sináptica e para os processos cognitivos de aprendizado e memória (SNYDER; GAO, 2020).

Observações mais recentes também apontam para o envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica na fisiopatologia da esquizofrenia. Indivíduos com encefalite autoimune, doença em que anticorpos se ligam à subunidade 1 (NR1) dos receptores NMDA e fazem com que eles sejam internalizados, apresentam sintomas psicóticos (alucinações e delírios) e comprometimentos cognitivos que podem ser confundidos com os da esquizofrenia (NAKAZAWA; SAPKOTA, 2020). Além disso, estudos *post-mortem* mostraram que indivíduos com esquizofrenia apresentam maiores concentrações de ácido quinurênico no fluido cérebro-espinhal e no tecido cerebral. Este ácido é proveniente do metabolismo do aminoácido triptofano e em altas concentrações atua como um antagonista endógeno dos receptores NMDA (HYUN; INOUE; HAYASHI-TAKAGI, 2020).

Estudos genéticos apontam que grande parte dos genes de risco para a esquizofrenia codificam proteínas que estão envolvidas na neurotransmissão glutamatérgica (COYLE; BRAD RUZICKA; BALU, 2020). Além disso, animais manipulados geneticamente para reduzir o funcionamento dos receptores NMDA apresentam alterações comportamentais e neuroquímicas relacionadas à esquizofrenia (COYLE; BRAD RUZICKA; BALU, 2020).

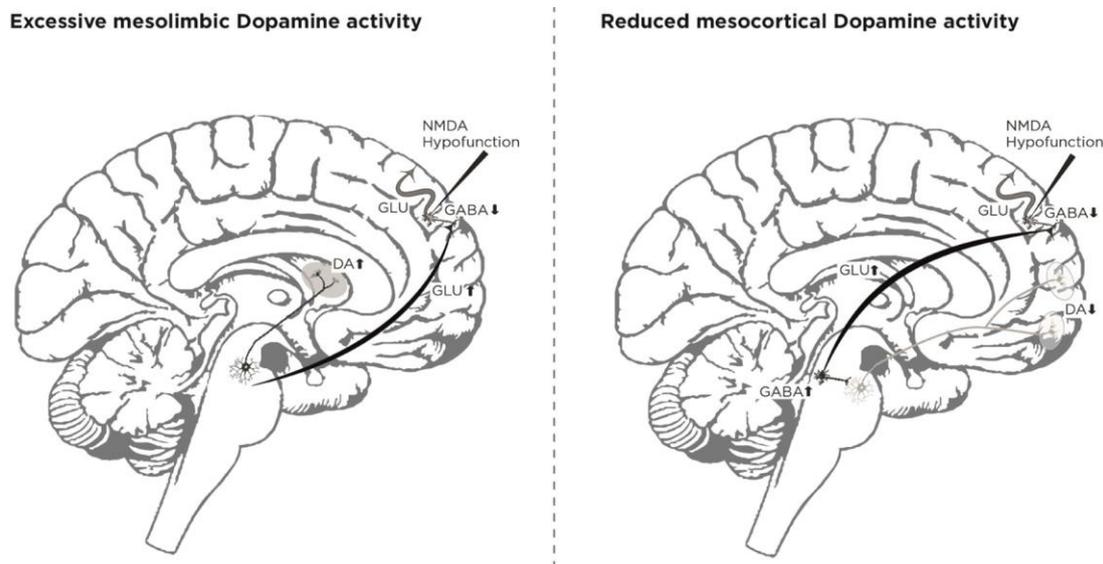
Alterações em proteínas importantes para o funcionamento adequado da neurotransmissão glutamatérgica também tem sido observadas em estudos *post-mortem* com tecido cerebral de indivíduos com esquizofrenia. Uma delas é a proteína pós-sináptica PSD-95. Esta atua na estabilização, no recrutamento e no transporte dos receptores NMDA e AMPA para a membrana pós-sináptica. Sendo assim, é essencial para a plasticidade sináptica durante o neurodesenvolvimento (COLEY; GAO, 2018). A expressão dessa proteína se encontra diminuída em algumas porções do córtex pré-

frontal de indivíduos com esquizofrenia (COLEY; GAO, 2018). Outra proteína cujos níveis de expressão se encontram diminuídos no córtex pré-frontal (UNO; COYLE, 2019) e no giro denteado do hipocampo (BALU, 2016) de indivíduos com esquizofrenia é a subunidade NR1 do receptor NMDA. Como mencionado anteriormente, esta é indispensável para o funcionamento adequado dos receptores NMDA (TENDILLA-BELTRÁN et al., 2021), por isso, a diminuição de sua expressão pode indicar uma diminuição no número desses receptores como um todo (KRZYSTANEK; PAŁASZ, 2019).

Relação entre as duas hipóteses

Tem sido aceita a existência de uma associação entre as duas hipóteses mencionadas acima, que propõe que as alterações nas vias dopaminérgicas seriam provocadas pela hipofunção dos receptores NMDA expressos em interneurônios GABAérgicos (inibitórios) do córtex pré-frontal (TREEN et al., 2016). Esses interneurônios regulam a atividade do *output* glutamatérgico com origem no córtex pré-frontal e que tem como alvo regiões subcorticais, nas quais desempenha importante papel sobre a regulação da atividade. Assim, a hipofunção glutamatérgica resultaria em um aumento da liberação de dopamina na via mesolímbica e em uma diminuição da liberação desse neurotransmissor na via mesocortical (BALU, 2016) (Figura 3).

Figura 3 - Ilustração da associação entre as hipóteses dopaminérgica e glutamatérgica.



Fonte: Adaptado de TREEN et al., 2016

Tratamento – antipsicóticos típicos e atípicos

Os antipsicóticos são os fármacos mais utilizados no tratamento da esquizofrenia. Existem duas principais classes de antipsicóticos: os de primeira geração (típicos) e os de segunda geração (atípicos) (LALLY; MACCABE, 2015).

Os antipsicóticos típicos foram os primeiros a serem usados na clínica e seu mecanismo de ação principal consiste no bloqueio dos receptores dopaminérgicos do tipo D2. A ação farmacológica sobre a via mesolímbica é aceita como o mecanismo envolvido nos efeitos terapêuticos que os antipsicóticos típicos apresentam sobre os sintomas positivos. No entanto, como esse bloqueio ocorre de forma intensa e sem distinção entre as vias dopaminérgicas, esses fármacos acabam provocando diversos efeitos colaterais, como efeitos extrapiramidais, associados à ação sobre a via nigroestriatal, aumento da prolactina, devido ao bloqueio dos receptores D2 na via tuberoinfundibular, e possível agravamento dos sintomas negativos e cognitivos, em decorrência do bloqueio desses receptores associados à via mesocortical (STĘPNICKI; KONDEJ; KACZOR, 2018).

Os antipsicóticos atípicos ou de segunda geração surgiram para tentar transpor esses efeitos colaterais, já que se ligam com menor afinidade aos receptores D2 e atuam

também em receptores de outros sistemas de neurotransmissão, como o serotoninérgico. Além disso, essa classe de fármacos se mostrou parcialmente eficaz em aliviar os sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia (ARINGHIERI et al., 2018). No entanto, têm sido observados outros efeitos colaterais associados ao seu uso, como ganho de peso e distúrbios metabólicos (STĘPNICKI; KONDEJ; KACZOR, 2018).

Dentre os antipsicóticos atípicos como a clozapina, a olanzapina e a risperidona, que apresentam toleráveis efeitos motores adversos (LEUCHT et al., 2013) e alguma eficácia em melhorar os sintomas da esquizofrenia (ARINGHIERI et al., 2018), a olanzapina se destaca, estando entre os antipsicóticos atípicos mais utilizados no mundo e mais eficazes na redução geral dos sintomas da esquizofrenia (HÁLFDÁNARSON et al., 2017; HUHNS et al., 2019).

Diferenças sexuais na esquizofrenia

A incidência da esquizofrenia é maior em homens do que em mulheres (razão de 1,4:1). Além disso, os homens manifestam a doença de 1-5 anos antes do que as mulheres, enquanto estas apresentam um segundo pico de manifestação após os 40 anos (SANTOS et al., 2022). Com relação aos sintomas da esquizofrenia, os negativos e cognitivos costumam ser menos graves em mulheres, enquanto há evidências destas apresentarem maior gravidade de sintomas positivos (GOGOS et al., 2019). As mulheres também apresentam uma melhor resposta aos antipsicóticos durante seu período reprodutivo do que os homens (FRANCESCHINI; FATTORE, 2021).

Alguns indícios apontam para um papel protetor dos hormônios femininos em relação à esquizofrenia: quanto mais cedo ocorre a primeira menstruação mais tarde ocorre o surgimento da doença (MCGREGOR; RIORDAN; THORNTON, 2017); em alguns períodos do ciclo menstrual e durante a gravidez, quando os níveis hormonais se encontram mais elevados, as mulheres apresentam uma melhora nos sintomas psicóticos; o inverso ocorre nas fases de diminuição dos níveis hormonais como no pós-parto e na menopausa (GOGOS et al., 2019); a reposição desses hormônios promove uma melhor resposta aos antipsicóticos em mulheres que estão na menopausa (FRANCESCHINI; FATTORE, 2021).

O estrogênio mostrou ser eficaz em diminuir o dano e a morte neuronal (SANTOS et al., 2022) e, juntamente com a progesterona, em aumentar a plasticidade e

a transmissão sináptica (DA SILVA; RAVINDRAN, 2015). Além disso, o estrogênio acelera a maturação do cérebro em períodos críticos do neurodesenvolvimento, tornando-o menos vulnerável a insultos (DA SILVA; RAVINDRAN, 2015).

Em relação aos principais sistemas de neurotransmissão envolvidos na esquizofrenia, como detalhado abaixo, sabe-se também que existem dimorfismos sexuais que contribuem para diferenças na manifestação da doença, embora os estudos ainda sejam escassos. Além disso, os hormônios sexuais podem modular os sistemas glutamatérgico e dopaminérgico.

Em pacientes diagnosticados com esquizofrenia, de modo geral, os estudos sobre as diferenças entre os sexos no sistema dopaminérgico focam em diferenças de resposta aos antipsicóticos. Nesse sentido, foi demonstrado que mulheres precisam de doses menores de antipsicóticos para alcançar níveis semelhantes de ocupação de receptores D2 àqueles encontrados em homens (EUGENE; MASIÁK, 2017). Adicionalmente, já foi demonstrado que existem diferenças sexuais na regulação dopaminérgica estriatal como, por exemplo, maior efluxo de dopamina induzido pelo haloperidol e pelo quinpirole em fêmeas do que em machos (WALKER; RAY; KUHN, 2006). Juntos, esses dados indicam maior responsividade do sistema dopaminérgico em fêmeas e corroboram a ideia de maior prevalência de sintomas positivos e melhor resposta aos antipsicóticos no sexo feminino.

Em relação ao sistema glutamatérgico, mulheres com esquizofrenia apresentam suprarregulação da glutamina sintetase, enzima envolvida na degradação do glutamato, em comparação com homens que também manifestam o transtorno (MARTINS-DE-SOUZA et al., 2010). Adicionalmente, mulheres com esse transtorno apresentam maior densidade de receptores NMDA em relação aos homens com esquizofrenia (WICKENS; BANGASSER; BRIAND, 2018). Interessantemente, o estrogênio estimula a neurotransmissão glutamatérgica, principalmente através do aumento do número de receptores NMDA e AMPA (BARTH; VILLRINGER; SACHER, 2015).

Consistente com os achados em humanos, estudos com roedores mostraram que fêmeas apresentam maiores densidades da subunidade NR1 do receptor NMDA quando comparadas aos machos (WANG et al., 2015). Assim, considerando que a hipofunção do receptor NMDA é considerada peça-chave na fisiopatologia da esquizofrenia, os dados mencionados acima demonstraram um tônus glutamatérgico maior no sexo feminino, que pode atuar de forma protetiva.

Fica evidente que as diferenças sexuais nos sistemas de neurotransmissão têm papel fundamental no dimorfismo sexual identificado na esquizofrenia. Apesar disso, há escassez de estudos experimentais que avaliem o impacto das diferenças sexuais em alterações comportamentais e neuroquímicas em modelos desse transtorno.

Modelos animais

Os mecanismos neurobiológicos que estão envolvidos na fisiopatologia da esquizofrenia ainda não são totalmente conhecidos. O uso de modelos animais tem se mostrado essencial para preencher essas lacunas no conhecimento (WINSHIP et al., 2019). Estudos com animais permitem maior controle de variáveis que podem interferir no curso da doença (FRANCESCHINI; FATTORE, 2021). Permitem também a aplicação de técnicas que não poderiam ser utilizadas em humanos, como manipulações genéticas e intervenções/análises em períodos específicos do neurodesenvolvimento (SIGURDSSON, 2016).

Apesar de não ser possível observar sintomas como alucinações e delírios em modelos animais, existem alterações comportamentais bem descritas que estão associadas aos diferentes sintomas do transtorno. Nesse sentido, o aumento da atividade locomotora, a diminuição da interação social e os déficits na inibição pelo pré-pulso têm sido associados aos sintomas positivos, negativos e cognitivos da esquizofrenia respectivamente (LEE; ZHOU, 2019).

Exposição à fenciclidina - modelo farmacológico da esquizofrenia

A fenciclidina (PCP) é um inibidor não-competitivo dos receptores NMDA (JANHUNEN et al., 2015) que se liga em um sítio localizado dentro do poro do canal iônico. Sendo assim, este deve estar aberto para que a PCP possa exercer seus efeitos (BERTRON; SETO; LINDSLEY, 2018).

A PCP era usada como anestésico em procedimentos cirúrgicos feitos em humanos (WANG et al., 2020). No entanto, após o uso dessa substância, os pacientes passavam a apresentar manifestações comportamentais muito semelhantes aos sintomas da esquizofrenia (BERTRON; SETO; LINDSLEY, 2018). A ocorrência desse fenômeno fez com que esse composto deixasse de ser usado na prática clínica (LODGE;

MERCIER, 2015) e começasse a ser usado como droga de abuso (WANG et al., 2020). Como a exposição à PCP é capaz de mimetizar todos os tipos de sintomas da esquizofrenia, na década de 1960, muitos usuários dessa substância eram internados com diagnóstico equivocado desse transtorno mental (BERTRON; SETO; LINDSLEY, 2018). Além disso, como a exposição a essa droga pode causar danos neuronais severos (WANG et al., 2020), seus efeitos podem durar semanas após o indivíduo deixar de usá-la (BERTRON; SETO; LINDSLEY, 2018).

A ativação adequada dos receptores NMDA durante o neurodesenvolvimento é essencial para a sobrevivência, diferenciação e migração neuronal e para a sinaptogênese (NAKAZAWA; JEEVAKUMAR; NAKAO, 2017). Inclusive, há um período crítico do neurodesenvolvimento em que ocorre um pico de expressão desses receptores. Em humanos esse pico ocorre durante o terceiro trimestre de gravidez. Já em roedores, como ratos e camundongos, este período corresponde às primeiras duas semanas do período pós-natal (PN) (BUBENÍKOVÁ-VALEŠOVÁ et al., 2008). Assim, o uso de substâncias que bloqueiam esses receptores durante esse período tem sido um dos modelos utilizados para testar como a hipofunção glutamatérgica pode resultar em alterações comportamentais e/ou neuroquímicas em outras fases do desenvolvimento do indivíduo (UNO; COYLE, 2019).

É importante ressaltar que muitos estudos que utilizaram esse modelo incluíram apenas machos e avaliaram as alterações comportamentais e/ou neuroquímicas nesses animais na idade adulta (NAKATANI-PAWLAK et al., 2009; AKILLIOGLU et al., 2012; AKILLIOGLU; BINOKAY; KOCAHAN, 2012; GASKIN; ALEXANDER; FONE, 2014; RODRÍGUEZ et al., 2017; ZHU et al., 2017). Além disso, dentre os que avaliaram os efeitos em animais de ambos os sexos, falharam em detectar diferenças sexuais nas alterações associadas ao transtorno (WANG et al., 2003; RASMUSSEN et al., 2007; ANASTASIO; JOHNSON, 2008; ANASTASIO et al., 2009; BOCTOR; FERGUSON, 2009, 2010; BROBERG et al., 2010; LIU et al., 2011; KJAERBY et al., 2013; NOZARI et al., 2015; PLATAKI et al., 2021).

Assim, considerando o reduzido número de estudos experimentais que avaliaram diferenças sexuais na esquizofrenia; o importante papel do sistema glutamatérgico na fisiopatologia desse transtorno; que existem diferenças sexuais inerentes a esse sistema que podem contribuir para que a esquizofrenia se expresse de forma diferente entre os sexos; e que a esquizofrenia é considerada um transtorno do neurodesenvolvimento, iremos utilizar o modelo de exposição neonatal à PCP para investigar a influência do

sexo em alterações comportamentais e neuroquímicas associadas à esquizofrenia. Adicionalmente iremos avaliar o impacto da olanzapina, um antipsicótico atípico, sobre essas alterações.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral:

Investigar se o modelo de exposição neonatal à fenciclidina é capaz de induzir alterações comportamentais e neuroquímicas associadas à esquizofrenia de forma sexo-dependente e o impacto da olanzapina sobre essas possíveis alterações.

1.2 Específicos:

- a) Avaliar a existência de diferenças sexuais induzidas pelo modelo de exposição neonatal à fenciclidina e o efeito da olanzapina sobre as seguintes alterações comportamentais:
 - Comportamento associado aos sintomas positivos, através do teste do campo aberto;
 - Comportamento associado aos sintomas negativos, através do teste de interação social;
 - A integridade do filtro sensorio-motor, através do teste de inibição pelo pré-pulso;
- b) Avaliar se existem diferenças sexuais induzidas pelo modelo de exposição neonatal à fenciclidina sobre o sistema glutamatérgico em estágios precoces do curso fisiopatológico da esquizofrenia:
 - Através da análise da densidade da subunidade NR1 do receptor NMDA e da proteína de densidade pós-sináptica PSD-95.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso Animal (CEUA033/2018) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da cepa C57BL/6.

As matrizes utilizadas na geração dos animais experimentais foram fornecidas por uma colônia de camundongos C57BL/6 mantida na Universidade Federal Fluminense (Niterói, Brasil) por mais de 60 gerações. Os acasalamentos ocorreram na proporção de 1-2 fêmeas para 1 macho. Assim que a prenhez foi detectada, a fêmea foi isolada e observada diariamente até o nascimento dos filhotes – considerado como dia pós-natal 1 (PN1). Os animais usados nos experimentos descritos a seguir foram criados e mantidos no biotério do Laboratório de Neurofisiologia da UERJ em um ciclo de luminosidade de 12/12 horas, com temperatura controlada (21-22°C) e livre acesso a água e comida.

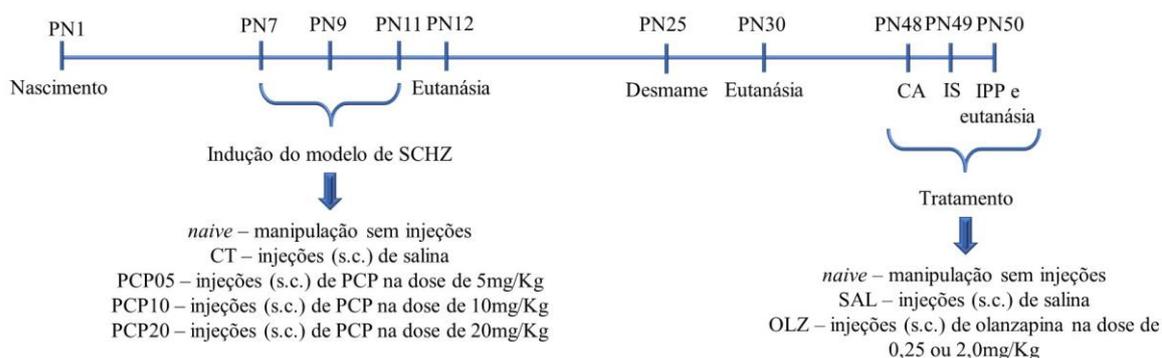
2.2 Formação dos grupos experimentais

Em PN7, 9 e 11, os filhotes foram pesados e receberam injeções subcutâneas (s.c.) de salina (NaCl 0.9%) ou PCP (5, 10 ou 20mg/Kg) sendo cada ninhada designada a um grupo experimental: SAL (18 ninhadas), PCP5 (18 ninhadas), PCP10 (17 ninhadas) e PCP20 (16 ninhadas). Para avaliar o estresse provocado pela aplicação das injeções também foi utilizado um grupo *Naive* (9 ninhadas), que foi submetido ao mesmo procedimento de manipulação, mas não recebeu nenhuma injeção. Ninhadas com menos de 4 ou mais de 10 filhotes não foram utilizadas.

Após o último dia de injeção, os animais de cada ninhada foram designados para 3 diferentes idades de avaliação: PN12, PN30 ou PN48. Em PN12, alguns desses filhotes foram eutanasiados por decapitação e seus cérebros retirados para posterior análise neuroquímica. Os filhotes remanescentes permaneceram com as mães até PN25, quando foram desmamados e divididos por sexo (2-4 animais por gaiola). Em PN30, uma parte dos filhotes foi eutanasiada por deslocamento cervical para avaliação

neuroquímica. Em PN48 iniciava-se uma bateria de testes comportamentais para verificar a indução de alterações comportamentais associadas com a esquizofrenia pela administração neonatal de PCP. Adicionalmente, também avaliamos a reversão dessas possíveis alterações pelo antipsicótico atípico olanzapina. Assim, neste dia, os animais foram individualizados, identificados e subdivididos naqueles que receberam injeções de salina e os que receberam injeções de OLZ (0,25 ou 2,0 mg/Kg, s.c.). Com isso, 8 grupos experimentais foram formados: CT, CT-OLZ, PCP5, PCP5-OLZ, PCP10, PCP10-OLZ, PCP20 e PCP20-OLZ. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais entre PN48 e PN50. Em PN50, em seguida ao último teste, foram eutanasiados por deslocamento cervical e seus cérebros retirados para posterior análise neuroquímica.

Figura 4 - Linha do tempo com os principais procedimentos realizados durante o estudo.



Legenda: CA - campo aberto; IS - interação social; IPP - inibição pelo pré-pulso.

Fonte: a autora, 2022

2.3 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados de PN48 a PN50. Os animais foram habituados à sala de teste por 10 minutos e receberam uma injeção de salina ou olanzapina 30 minutos antes do início de cada teste. Em PN48 e 49 a dose de olanzapina administrada foi de 0,25mg/Kg, enquanto em PN50 foi de 2,0mg/Kg. Vale ressaltar também que o grupo *Naive* não recebeu nenhuma injeção antes dos testes.

2.3.1 Teste do campo aberto (CA)

O teste do CA foi realizado em PN48, na fase escura do ciclo de luminosidade do biotério (após às 13h). Este teste foi utilizado para medir a atividade locomotora, uma vez que um aumento nesse parâmetro tem sido relacionado aos sintomas positivos da esquizofrenia (SAMS-DODD, 1998).

O equipamento utilizado no teste é composto por uma caixa de acrílico transparente (46 x 46 x 46 cm) apoiada sobre uma plataforma, conectada a um computador, e que contém 16 feixes de luz infravermelha posicionados 1,5cm acima da base da caixa (Figura 5). Um animal por vez foi colocado na quina da caixa e pôde explorá-la livremente por 10 minutos. Antes da entrada de cada animal, a caixa foi limpa com álcool 35% e seca com papel toalha.

A medida da atividade locomotora foi obtida através de um programa que converte o número de feixes de luz interrompidos pela movimentação do animal em distância horizontal percorrida em centímetros.

Figura 5 - Monitores de atividade do Laboratório de Neurofisiologia da UERJ utilizados no teste do CA.



Fonte: A autora, 2022.

2.3.2 Teste de interação social (IS)

O teste de IS foi realizado em PN49 e, assim como o CA, também ocorreu na fase escura do ciclo. Este teste foi utilizado para mensurar a interação social entre os animais, pois a diminuição desse comportamento em roedores tem sido relacionada aos sintomas negativos da esquizofrenia (SAMS-DODD, 1998, 1999).

O teste de IS foi feito no mesmo equipamento em que ocorreu o teste do CA (Figura 5), o qual, portanto, serviu como habituação para o teste da IS. Dois animais da mesma ninhada, do mesmo sexo e que receberam o mesmo tratamento foram colocados em quinas opostas da caixa, com a cabeça voltada para o centro, de forma que iniciassem o teste um de frente para o outro. O teste durou 15 minutos e foi gravado por uma câmera posicionada acima da caixa.

Para facilitar a contabilização das atividades de interação social através dos vídeos obtidos, a imagem da caixa de teste teve sua área dividida em 16 quadrantes com tamanhos iguais.

As interações sociais foram divididas em duas categorias: interações mútuas e não-mútuas. Foram consideradas interações mútuas aquelas em que ambos os animais entravam em contato (cheirar, montar) e, mesmo após se afastarem, ainda permaneciam a menos de um quadrante de distância. Já as interações não-mútuas consistiram naquelas em que ambos os animais se deslocavam no mesmo sentido (perseguição) com uma distância menor do que um quadrante entre eles. O comportamento de autolimpeza (“grooming”), não importando a distância entre os indivíduos, foi considerado o fim da interação social, mútua ou não-mútua. A ausência dessas interações configurou o isolamento social.

O tempo de permanência dos indivíduos nesses eventos foi contabilizado e, a partir dos dados brutos, foi criado um índice de interação social, que correspondeu à:

$$IS = \frac{\text{Tempo de interação mútua} + \text{Tempo de interação não-mútua}}{\text{Tempo total}} \times 100 \quad (1)$$

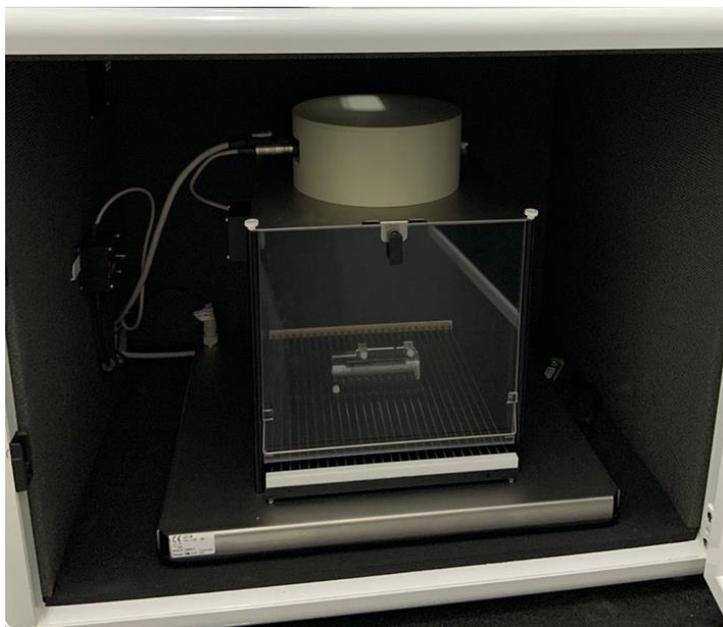
2.3.3 Teste de inibição pelo pré-pulso (IPP)

A IPP consiste na diminuição da resposta de sobressalto a um estímulo de maior intensidade, o pulso, quando este é precedido por um estímulo de menor intensidade, o

pré-pulso. A IPP funciona como uma medida da integridade do filtro sensorio-motor, que se encontra prejudicada na esquizofrenia (WU et al., 2018). Esse filtro protege o cérebro de uma sobrecarga sensorial, pois permite que haja a distinção entre estímulos relevantes e irrelevantes (BRAFF; GEYER; SWERDLOW, 2001).

O aparelho no qual é feito o teste de IPP consiste em uma câmara com isolamento acústico, onde há uma plataforma sensível ao movimento e sobre a qual o animal fica contido e é exposto a estímulos sonoros (Figura 6). Através dessa plataforma ocorre a captação da resposta de sobressalto do animal aos estímulos sonoros e essa informação é transmitida para um computador.

Figura 6 - Equipamento do Laboratório de Neurofisiologia da UERJ utilizado no teste da IPP.



Fonte: A autora, 2022.

O teste de IPP foi realizado em PN50, na fase clara do ciclo e foi dividido em 4 partes. A primeira parte (habituação) teve uma duração de 5 minutos e consistiu em expor o animal a um ruído de fundo de 65 dB. Em seguida, durante a etapa de pré-teste, o animal foi exposto a 10 pulsos ($P=120\text{dB}$, 40ms). Depois, o animal foi exposto a 50 eventos distribuídos de forma semirrandômica, que consistiram em 10 não-estímulos (apenas o barulho de fundo de 65dB), 10 pulsos ($P=120\text{dB}$, 40ms) e 30 pulsos precedidos (100ms) por pré-pulsos ($PP = 70, 75 \text{ ou } 80 \text{ dB} + P = 120\text{dB}$). Por fim, em

uma etapa chamada de pós-teste, o animal foi exposto a mais 10 pulsos (P = 120dB, 40ms).

Um percentual de inibição foi calculado para cada intensidade de pré-pulso. Para isso foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\%IPP = 100 - \left[\frac{\text{média das respostas de sobressalto PP+P}}{\text{média das respostas de sobressalto ao P}} \right] \times 100 \quad (2)$$

2.4 Coleta e processamento das amostras

Após a eutanásia dos animais em PN12, 30 e 50, os cérebros foram coletados e as regiões cerebrais foram dissecadas. Todos os tecidos foram armazenados em freezer -80°C. Contudo, apenas as regiões do córtex frontal (CF) (terço anterior) e do hipocampo (HP) obtidas em PN30 foram analisadas neste trabalho pela técnica de Western Blotting.

A primeira etapa foi a homogeneização dos tecidos em 250µl de tampão fosfato (pH 7,4) contendo um coquetel inibidor de proteases (Complete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack, Roche Applied Science, Mannheim, GE) e ortovanato de sódio (Sigma Aldrich, Mannheim, GE). Em seguida, ocorreu a centrifugação (13000 rpm - 4°C - 25 minutos) do homogenato e o recolhimento do sobrenadante obtido nesse processo. A dosagem da quantidade total de proteínas presentes em cada amostra foi feita por meio do kit Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, EUA) e pôde ser visualizada através da leitura no espectrofotômetro UVM 340 (ASYS) com comprimento de onda de 562nm. O extrato foi desnaturado a partir da adição de tampão contendo 2-mercaptoetanol e azul de bromofenol (50mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,001% azul de bromofenol) e de aquecimento (90°C por 5minutos). As amostras foram armazenadas em freezer -45°C até o dia da análise por Western Blotting.

2.5 Western Blotting

A técnica de Western Blotting foi utilizada com o objetivo de analisar possíveis alterações na expressão das proteínas NR1 e PSD-95. A subunidade NR1 do receptor NMDA foi escolhida por estar presente em todos os subtipos de receptor NMDA e ser considerada indispensável para sua funcionalidade (TENDILLA-BELTRÁN et al., 2021)(Tendilla-Beltran, 2021). A PSD-95 foi escolhida por estar envolvida com a recrutamento, transporte e estabilização de receptores NMDA no neurônio pós-sináptico, sendo, portanto, um elemento essencial na neurotransmissão glutamatérgica (COLEY; GAO, 2018).

Foram feitos géis de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) e em cada poço desses géis foi pipetado 10µg de proteínas totais. Em seguida, as proteínas foram transferidas por eletroforese para membranas de PVDF (Hybond P ECL membrane; Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA). Com o intuito de evitar ligações inespecíficas do anticorpo, as membranas foram incubadas por 1 hora a 25°C com uma solução de T-TBS (*Tris Buffered Saline + Tween*) contendo 0,5g de leite em pó desnatado. Posteriormente, passaram por uma lavagem de 10 minutos apenas com T-TBS e foram incubadas *overnight* sob agitação constante com anticorpo primário (1:1.000) específico para cada proteína (NR1: cat#05-432, Sigma-Aldrich; PSD-95, cat#3450, Cell Signaling).

No dia seguinte, as membranas foram lavadas (3 lavagens de 5 minutos cada) com T-TBS e foram incubadas com anticorpos secundários por 1 hora a 25°C (anti-rabbit, 1:10.000, cat#B8895, Sigma-Aldrich; anti-mouse, 1:10.000, cat#AP124B, Sigma-Aldrich). Após essa etapa, as membranas passaram por mais 3 lavagens (5 minutos cada) e foram incubadas com estreptavidina conjugada à enzima peroxidase por 1 hora a 25°C (cat#: RPN1231V, Sigma-Aldrich). Por fim, as membranas passaram por mais um ciclo de lavagens (como descrito anteriormente) e foram expostas ao revelador Immobilon Forte (cat#: WBLUF0500, Millipore Corporation) para possibilitar a visualização das bandas.

As imagens das bandas foram analisadas e quantificadas com auxílio do programa Image J (media cybernetics) e os resultados obtidos foram normalizados pela actina (cat#: A2228, Sigma-Aldrich).

2.6 Análise estatística

A primeira análise feita para cada variável obtida a partir dos testes comportamentais foi uma ANOVA global comparando os grupos *Naive* e SAL. Não havendo diferença significativa entre eles, os animais foram agrupados em um único grupo controle (CT). Em seguida, ANOVAs globais univariadas ou de repetição (uANOVAs ou rANOVAS, respectivamente) com os fatores Exposição Neonatal, Tratamento e Sexo foram realizadas para cada variável.

Para os testes do CA e IS uANOVA foram realizadas para a atividade locomotora (distância total percorrida) e para o índice de interação social, respectivamente.

No PPI foram analisadas três variáveis: o percentual de inibição pelo pré-pulso (%IPP), a resposta de sobressalto e a habituação. Uma rANOVA foi realizada para cada variável. Em todas, além dos fatores Exposição Neonatal, Tratamento e Sexo, foram adicionados os fatores de repetição. Na análise do %IPP o fator de repetição foram as três intensidades de pré-pulso (PP) aplicadas no teste (70, 75 e 80dB). Na análise da resposta de sobressalto o fator repetido foram as intensidades dos estímulos sonoros usados na avaliação do %IPP, que foram: P (120dB) e este precedido pelas três intensidades de PP (PP70+P, PP75+P e PP80+P). Na habituação, o objetivo era analisar se houve diminuição na resposta de sobressalto aos pulsos no pós-teste quando comparada à resposta de sobressalto aos pulsos no pré-teste. Sendo assim, foi realizada uma rANOVA de repetição considerando o fator Etapa.

Em seguida as ANOVAs globais, foram feitas ANOVAs de menor ordem, desenhadas para responder às perguntas experimentais do estudo. Para verificar se a exposição neonatal à fenciclidina teve efeito sobre os comportamentos associados à esquizofrenia, as ANOVAs não incluíram os animais tratados com olanzapina.

Para verificar se o tratamento com olanzapina impactou os comportamentos avaliados de forma positiva ou negativa, realizamos ANOVAs, utilizando comparações par-a-par entre animais somente expostos à fenciclidina no período neonatal e aqueles expostos à fenciclidina no período neonatal e tratados com olanzapina na adolescência.

Finalmente, possíveis interações entre os efeitos da exposição neonatal à fenciclidina e o tratamento com olanzapina foram identificados pela utilização de ANOVAs que incluíram somente animais tratados com olanzapina. Nesta análise, os

animais expostos à fenciclidina e tratados com olanzapina foram comparados com os animais somente tratados com olanzapina (CT-OLZ).

Com relação às análises dos marcadores neuroquímicos, a variável utilizada foi o percentual de densidade da proteína de interesse (NR1 ou PSD-95) em relação à proteína controle (β -actina). Uma vez que a idade analisada foi PN30, a uANOVA global para cada marcador em cada região analisada (CF ou HP), utilizou como fatores Exposição Neonatal e Sexo. Quando houve efeito da Exposição Neonatal ou interação com Sexo, uANOVAs de menor ordem foram utilizadas. O teste posthoc *Fisher's Protected Least Significant Difference* (FPLSD) foi utilizado quando apropriado.

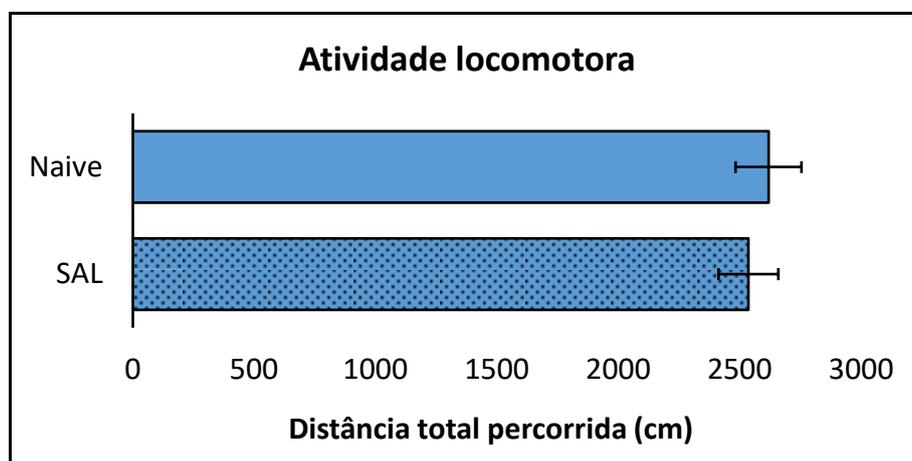
Todos os dados foram analisados usando o IBM SPSS Statistics for Windows, Versão 21.0 (IBM Corp, Armonk, N.Y., U.S.A.) e compilados como médias e erros padrão. A significância foi assumida para efeitos quando o valor de p foi $< 0,05$ e para interações quando $p < 0,1$.

3 RESULTADOS

3.1 Campo aberto

Com o objetivo de verificar se o estresse associado às injeções aplicadas nos animais no período neonatal e 30 min antes do teste do CA afetaram a locomoção dos animais adolescentes, realizamos uma uANOVA comparando os grupos *Naive* e SAL. A análise estatística não identificou diferenças significativas entre os grupos (Figura 7), assim, análises subsequentes resultaram da junção dos animais em um único grupo CT.

Figura 7 - Atividade locomotora de camundongos dos grupos *Naive* e SAL.



Animais *Naive* não receberam nenhuma injeção, mas passaram por todos os procedimentos de manipulação, e animais SAL receberam injeções subcutâneas de salina durante o período neonatal e em PN48, 30 minutos antes do teste do campo aberto. Valores representam média \pm EPM.
Fonte: A autora, 2022.

A uANOVA global mostrou que a exposição à fenciclidina no período neonatal [$F(3,204)=10,2$; $p<0,000$] e o tratamento com olanzapina [$F(3,204)=130,6$; $p<0,000$] afetaram a atividade locomotora dos animais. Adicionalmente, o efeito da exposição neonatal se mostrou sexo-dependente [Exposição Neonatal x Sexo - $F(3,204)=2,2$; $p=0,091$].

Para avaliar o impacto da exposição neonatal à fenciclidina, uANOVAs de menor ordem sem incluir os animais tratados com a olanzapina foram realizadas para cada sexo. Foi confirmado que a exposição neonatal afetou o comportamento de forma sexo-dependente. As fêmeas [Exposição Neonatal - $F(3,42)=3,5$; $p=0,023$] expostas às

duas maiores concentrações de fenciclidina (10 e 20mg/Kg) apresentaram hipoatividade locomotora quando comparadas às fêmeas do grupo CT (Figura 8). Já os machos [Exposição Neonatal - $F(3,53)=3,5$; $p=0,023$] expostos a todas as concentrações de PCP utilizadas nesse estudo (5, 10 e 20mg/Kg) mostraram menor atividade locomotora quando comparados aos machos do grupo CT (Figura 8). O que indica maior sensibilidade deste sexo, uma vez que a menor dose já foi capaz de gerar alteração comportamental.

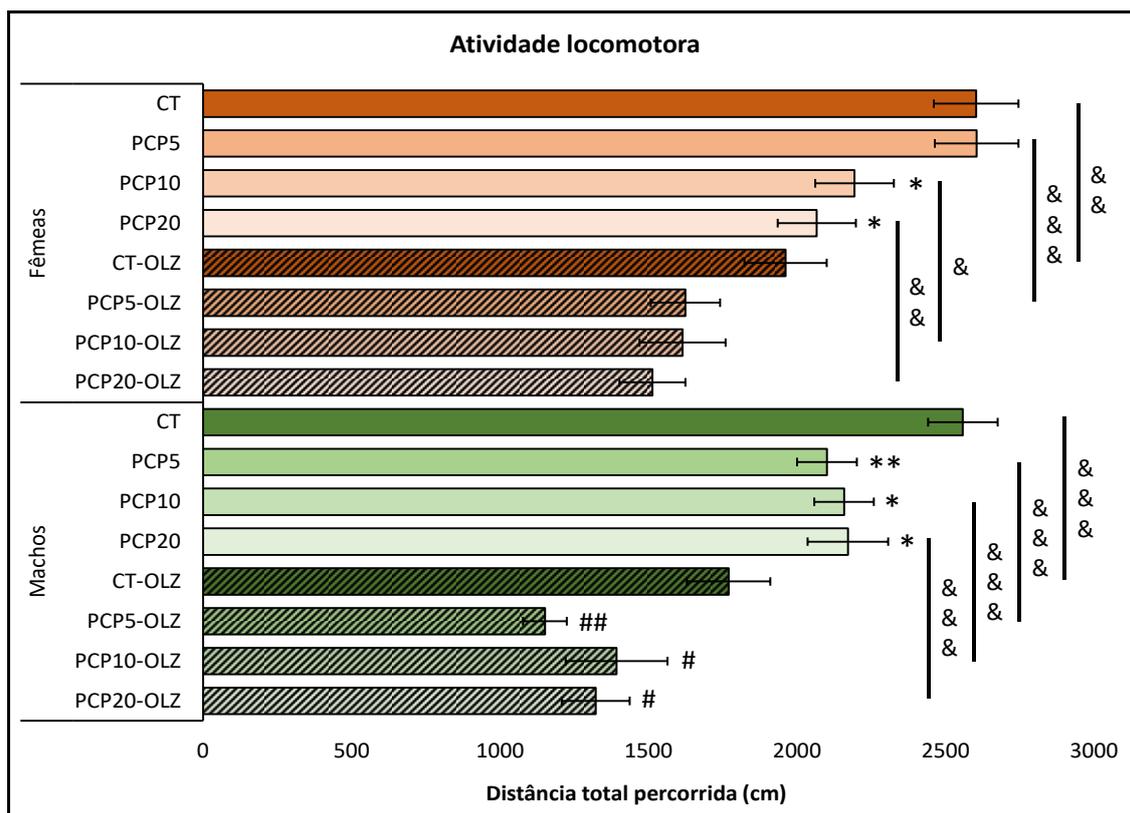
Para avaliar o impacto do tratamento com a olanzapina *per se* e sobre as alterações provocadas pela fenciclidina, foram realizadas ANOVAs de menor ordem, separadas por sexo. O tratamento com olanzapina causou redução da locomoção em animais machos (CT > CT-OLZ – $F(1,29)=18,8$; $p=0,0001$) e fêmeas (CT > CT-OLZ – $F(1,29)=10,1$; $p=0,003$) não expostos à fenciclidina (Figura 8). Similarmente, nos animais dos grupos modelados para esquizofrenia, a olanzapina intensificou a hipolocomoção induzida pela exposição neonatal à fenciclidina em ambos os sexos (Machos - PCP5 > PCP5-OLZ: $F(1,24)=50,4$, $p<0,001$; PCP10 > PCP10-OLZ: $F(1,22)=13,5$; $p<0,001$; PCP20 > PCP20-OLZ: $F(1,29)=23,1$; $p<0,001$. Fêmeas: PCP10 > PCP10-OLZ - $F(1,24)=7,5$; $p=0,012$; PCP20 > PCP20-OLZ: $F(1,21)=10,1$; $p=0,004$) (Figura 8). Em fêmeas expostas a menor dose de fenciclidina, embora a exposição neonatal não tenha interferido na locomoção, o tratamento com olanzapina causou hipoatividade (PCP5 > PCP5-OLZ – $F(1,26)=27$; $p<0,001$) (Figura 8), o que indica que este antipsicótico pode impactar o comportamento de animais modelados para esquizofrenia, ainda que estes apresentem alterações subclínicas.

As uANOVAs de menor ordem excluindo os animais expostos à salina na adolescência identificou efeito do Tratamento em machos ($F(3,51)=3,8$; $p=0,016$), sendo que todos os grupos modelados para esquizofrenia e expostos à olanzapina (PCP5-OLZ, PCP10-OLZ e PCP20-OLZ) tiveram menor atividade locomotora que animais CT-OLZ (Figura 8). Este efeito foi restrito aos machos. uANOVA realizada para os dados de fêmeas não mostrou diferenças significativas entre os grupos (Figura 8).

Assim, nossos dados indicam que a exposição neonatal à fenciclidina causou hipoatividade na adolescência e que machos foram mais sensíveis. O tratamento com olanzapina não mitigou esse efeito. Inversamente, acentuou o efeito hipolocomotor da fenciclidina em ambos os sexos. De fato, a olanzapina, *per se* causou danos, já que, mesmo em animais controle (não expostos à fenciclidina), causou hipolocomoção.

Adicionalmente, o fato de machos expostos à fenciclidina e tratados com olanzapina apresentarem menor atividade que os animais somente expostos à fenciclidina sugere que, durante a adolescência, a olanzapina pode acentuar disfunções já presentes em estágios iniciais da doença de forma mais robusta no sexo masculino.

Figura 8 - Atividade locomotora de animais modelados para esquizofrenia e tratados com olanzapina.



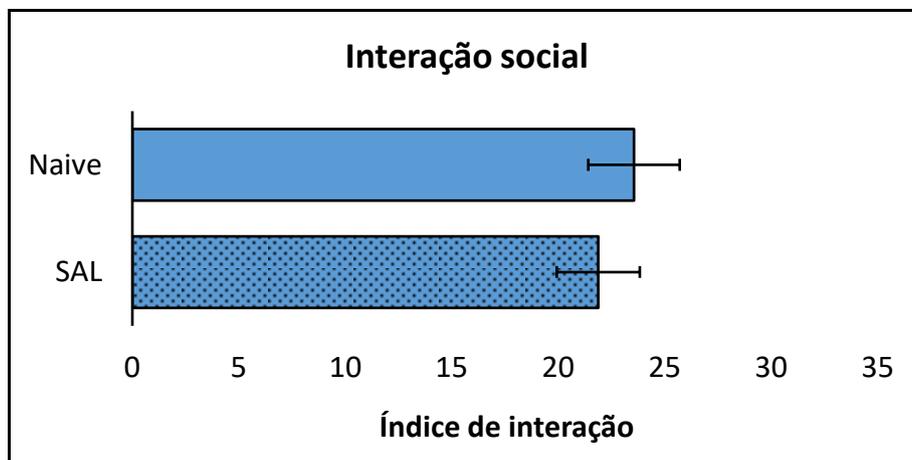
Camundongos fêmeas e machos controle (CT) ou expostos à PCP (5, 10 ou 20mg/kg) durante o período neonatal e que, em PN48, 30 minutos antes do teste do campo aberto, receberam injeções subcutâneas de salina ou olanzapina (OLZ; 0,25mg/kg). Valores representam média±EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. CT; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. CT-OLZ; & $p < 0,05$, && $p < 0,01$, &&& $p < 0,001$ para comparações CT x CT-OLZ, PCP5 x PCP5-OLZ, PCP10 x PCP10-OLZ, PCP20 x PCP20-OLZ. Fonte: A autora, 2022.

3.2 Interação Social

Assim como descrito para o teste do campo aberto, aqui também avaliamos o efeito do estresse associado as injeções administradas durante o período neonatal e 30min antes dos testes comportamentais, sobre a interação social na adolescência. Para isso realizamos uma uANOVA comparando os grupos *Naive* e SAL. Não houve

diferenças significativas entre os grupos (Figura 9), assim, análises subsequentes resultaram da junção dos animais em um único grupo CT.

Figura 9 - Índice de interação social dos animais dos grupos *Naive* e SAL.



Animais do grupo *Naive* não receberam nenhuma injeção, mas passaram por todos os procedimentos de manipulação. Animais do grupo SAL receberam injeções subcutâneas de salina durante o período neonatal e em PN49, 30 minutos antes do teste de interação social. Valores representam média \pm EPM. Fonte: A autora, 2022.

A uANOVA global mostrou que tanto a exposição neonatal à fenciclidina quanto o tratamento com olanzapina interferiram no comportamento de interação social na adolescência e os efeitos foram sexo-dependentes [Exposição Neonatal x Sexo - $F(3,113)=4,1$, $p=0,008$; Tratamento - $F(1,113)=24,2$, $p<0,001$; Exposição Neonatal x Tratamento x Sexo - $F(3,113)=3,3$, $p=0,024$].

Para avaliar em separado o impacto da exposição neonatal à fenciclidina foi realizada uma uANOVA de menor ordem para cada sexo que excluiu os animais expostos a olanzapina. Machos [Exposição Neonatal - $F(3,29)=6,0$, $p=0,003$] dos grupos PCP5 e PCP20 apresentaram menor interação social que os machos do grupo CT (Figura 10), o que indica que essas doses foram capazes de mimetizar um comportamento associado aos sintomas negativos da esquizofrenia. A exposição à fenciclidina não afetou o comportamento das fêmeas (Figura 10).

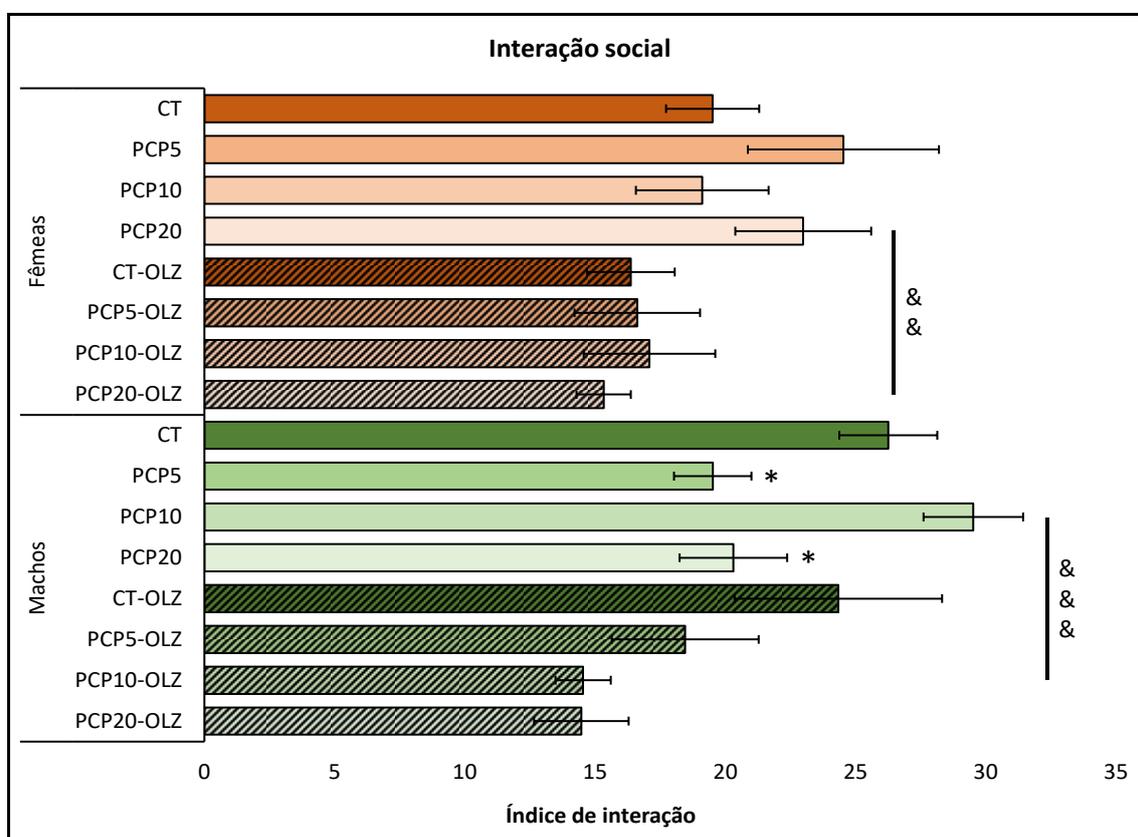
Não houve diferenças entre o grupo CT e o grupo CT-OLZ, o que indica que a olanzapina, *per se*, não alterou o comportamento. A olanzapina também não mitigou deficiências na interação social, como demonstrado pela ausência de diferenças entre os machos PCP5 e PCP5-OLZ e PCP20 e PCP20-OLZ (Figura 10). Cabe notar, contudo, que embora machos do grupo PCP10 não tenham apresentado interação social

deficiente, o tratamento com a olanzapina reduziu o índice de interação (PCP10 > PCP10-OLZ - $F(1,13)=55,0$, $p<0,001$), o que indica que este antipsicótico pode causar redução da interação social em animais adolescentes modelados para esquizofrenia mas que não apresentam sintomas negativos. Efeito semelhante foi identificado em fêmeas PCP20-OLZ (PCP20 > PCP20-OLZ - $F(1,15)=10,6$, $p=0,005$).

A análise do impacto da olanzapina também incluiu a comparação somente entre os grupos que receberam este antipsicótico. A uANOVA de menor ordem realizada para este fim não mostrou efeito do Tratamento ou interação entre Tratamento e Sexo, o que corrobora que a redução da interação social causada pela exposição à fenciclidina no período neonatal não foi mitigada pela olanzapina.

Em conjunto, esses dados indicam que a exposição à fenciclidina no período neonatal causou prejuízos na interação social dos animais adolescentes e que a olanzapina não foi capaz de reverter esses efeitos. O fato da olanzapina reduzir a interação social em animais expostos a doses de fenciclidina que causaram alterações subclínicas sugere potencial dano no uso desse medicamento durante a adolescência.

Figura 10 - Índice de interação social de animais modelados para esquizofrenia e tratados com olanzapina.

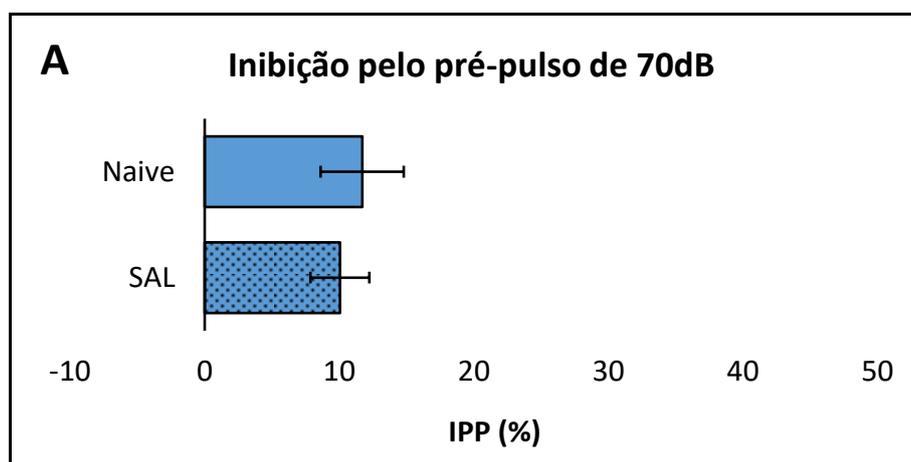


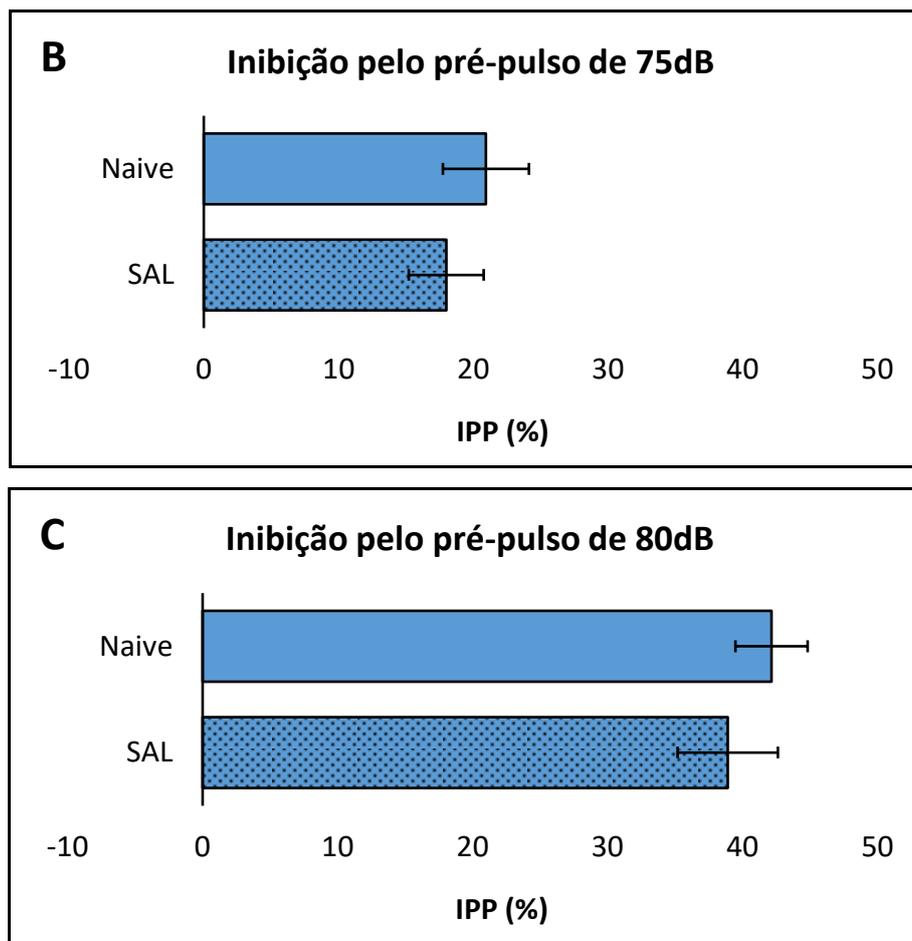
Fêmeas e machos controle (CT) ou expostos à PCP (5, 10 ou 20mg/kg) durante o período neonatal e que, em PN49, 30 minutos antes do teste de interação social, receberam injeções subcutâneas de salina ou olanzapina (OLZ; 0,25mg/kg). Valores representam média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs CT; $\&\&p < 0,01$, $\&\&\&p < 0,001$ para comparações PCP20 x PCP20-OLZ e PCP10 x PCP10-OLZ respectivamente. Fonte: A autora, 2022.

3.3 Inibição pelo pré-pulso

A análise do teste de IPP, de forma semelhante aos demais comportamentos, teve início pela comparação entre animais *Naive* e SAL. Uma vez que o teste de IPP incluiu três intensidades diferentes de pré-pulso (70, 75 e 80dB), para a investigação do impacto do estresse associado às injeções aplicadas nos animais no período neonatal e 30 minutos antes dos testes comportamentais sobre o %IPP durante a adolescência, foi usada uma ANOVA de repetição. Foi identificado efeito da intensidade de pré-pulso [F(2,62)=85; $p < 0,001$]. Esse efeito é explicado pelo fato de maiores intensidades de pré-pulso causarem maior percentual de inibição na resposta de sobressalto. Contudo, não houve diferenças significativas entre os grupos (Figura 11), assim, análises subsequentes resultaram da junção dos animais em um único grupo CT.

Figura 11 - Percentual de inibição pelo pré-pulso de animais dos grupos *Naive* e SAL.





Legenda: A - PP70dB; B - PP75dB; C - PP80dB.

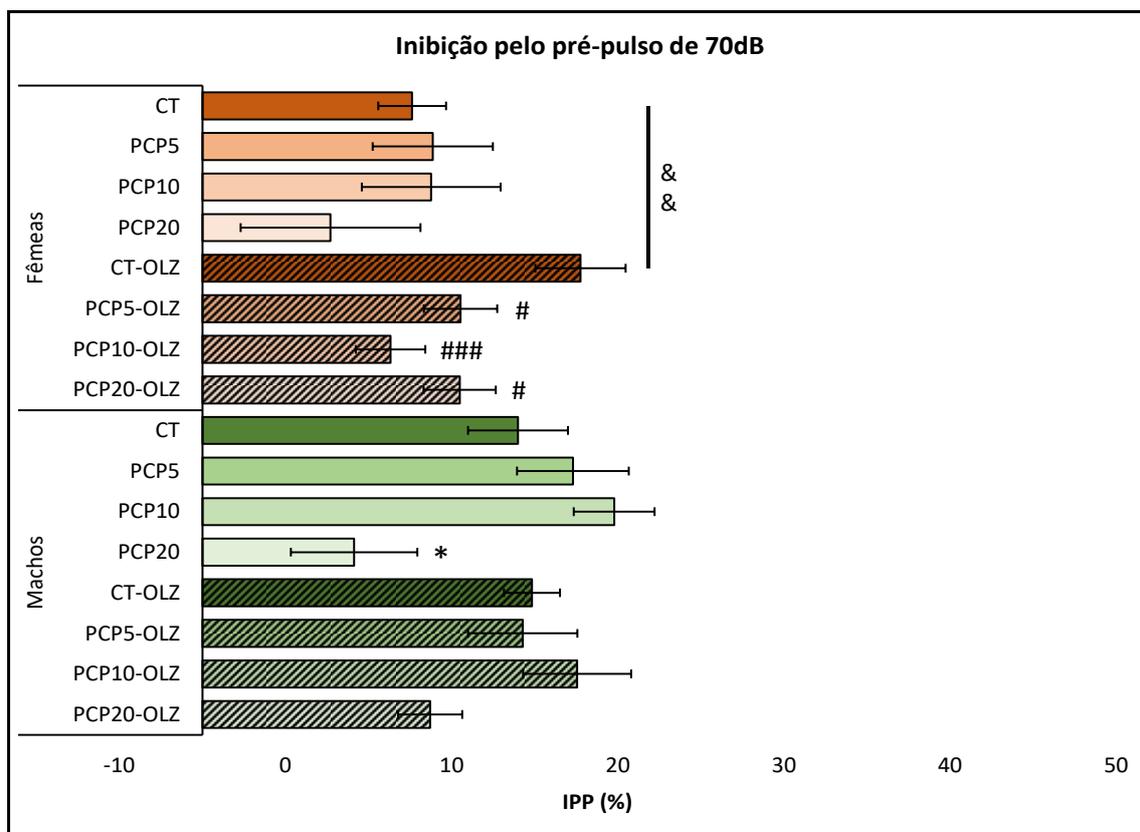
Animais *Naive* não receberam nenhuma injeção, mas passaram por todos os procedimentos de manipulação. Animais SAL receberam injeções subcutâneas de salina durante o período neonatal e em PN50, 30 minutos antes do teste de inibição pelo pré-pulso. Valores representam média \pm EPM. Fonte: A autora, 2022.

A ANOVA global de repetição que incluiu todos os grupos experimentais mostrou que a intensidade do pré-pulso [$F(2,354)=297,5$; $p<0,001$] afeta o %IPP e que há interação desse fator com os fatores exposição neonatal à fenciclidina [$F(6,354)=1,9$; $p=0,075$] e tratamento com olanzapina [$F(2,354)=4,4$; $p=0,013$], além de uma interação tripla envolvendo intensidade de pré-pulso, tratamento e sexo [$F(2,354)=2,5$; $p=0,081$]. Também foram identificados efeitos da exposição neonatal à fenciclidina [$F(3,177)=4,6$; $p=0,004$] e do sexo [$F(1,177)=13,0$; $p<0,001$] e interação entre tratamento com olanzapina e sexo [$F(1,177)=4,3$; $p=0,040$].

Em seguida, foram feitas análises separadas para cada intensidade de pré-pulso para cada sexo. Quando o pré-pulso de 70dB precedeu o pulso, a uANOVA de menor ordem mostrou que a exposição neonatal à fenciclidina [$F(3,177)=4,6$; $p=0,004$] e o

sexo [$F(1,177)=9,3$; $p=0,003$] interagiram [$F(3,177)=2,7$; $p=0,048$] e afetaram o %IPP. A análise do impacto da exposição neonatal à fenciclidina, que não incluiu os animais tratados com olanzapina, confirmou que a exposição neonatal afetou o comportamento de forma sexo-dependente, pois apenas os machos [$F(3,53)=4,2$; $p=0,010$] expostos à fenciclidina na dose de 20mg/Kg apresentaram menor %IPP quando comparados aos machos do grupo CT (Figura 12). uANOVAs de menor ordem comparando os animais de cada grupo tratados com olanzapina com os não tratados também mostraram que o tratamento foi capaz de alterar o comportamento de forma sexo-dependente. Fêmeas [$F(1,25)=9$; $p=0,006$] do grupo CT-OLZ apresentaram maior %IPP quando comparadas às fêmeas do grupo CT (Figura 12). No entanto, o tratamento com olanzapina não foi capaz de reverter os déficits causados pela exposição neonatal à maior dose de fenciclidina observados nos machos (PCP20 = PCP20-OLZ) (Figura 12). Analisando somente os grupos que receberam olanzapina na adolescência, novamente foi possível observar um efeito sexo-dependente do tratamento, pois as fêmeas [$F(3,41)=4,3$; $p=0,010$] modeladas para a esquizofrenia no período neonatal e tratadas com olanzapina na adolescência mostraram uma redução significativa do %IPP quando comparadas às fêmeas do grupo CT-OLZ (Figura xx). Este resultado sugere que alterações causadas pela fenciclidina impediram o aumento no %IPP mediado pela olanzapina.

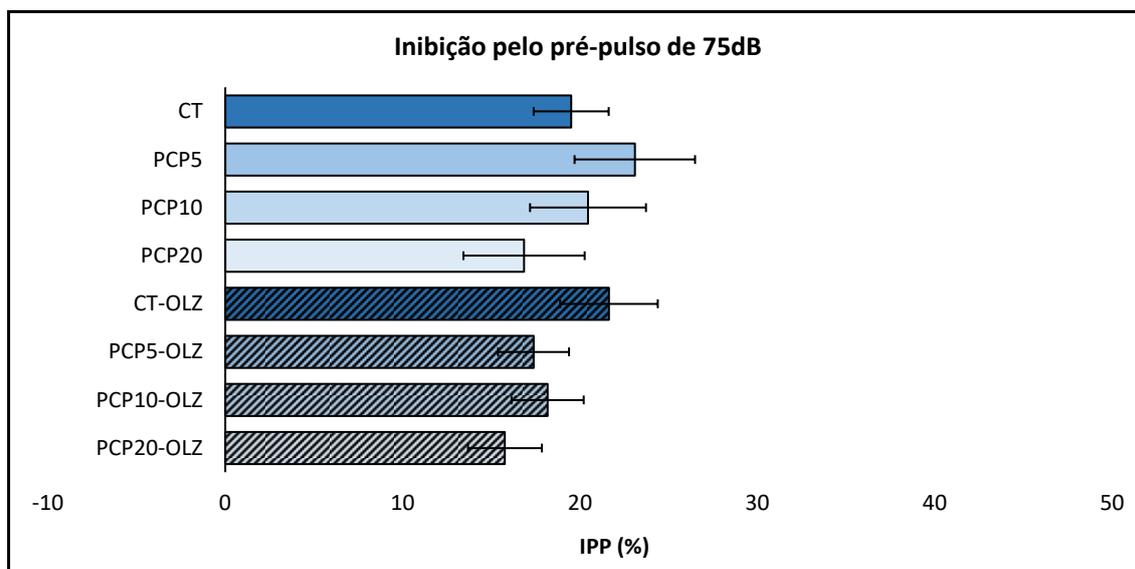
Figura 12 - Percentual de inibição pelo pré-pulso de 70dB de animais modelados para esquizofrenia e tratados com olanzapina.



Fêmeas e machos controle (CT) ou expostos à (PCP (5, 10 ou 20mg/kg) durante o período neonatal e que, em PN50, 30 minutos antes do teste de inibição pelo pré-pulso, receberam injeções subcutâneas de salina ou olanzapina (OLZ; 2,0mg/kg). Valores representam média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. CT; # $p < 0,05$, ###= $0,001$ vs CT-OLZ; && $p < 0,05$ para comparação CT x CT-OLZ. Fonte: A autora, 2022.

A análise do pré-pulso de 75dB não identificou efeito da exposição neonatal à fenciclidina. Foi possível observar somente efeito do sexo [$F(1,177)=12,7$; $p < 0,001$] e interação entre tratamento com olanzapina e sexo [$F(1,177)=8,8$; $p=0,003$]. Contudo, análises subsequentes não identificaram efeitos da olanzapina (Figura 13).

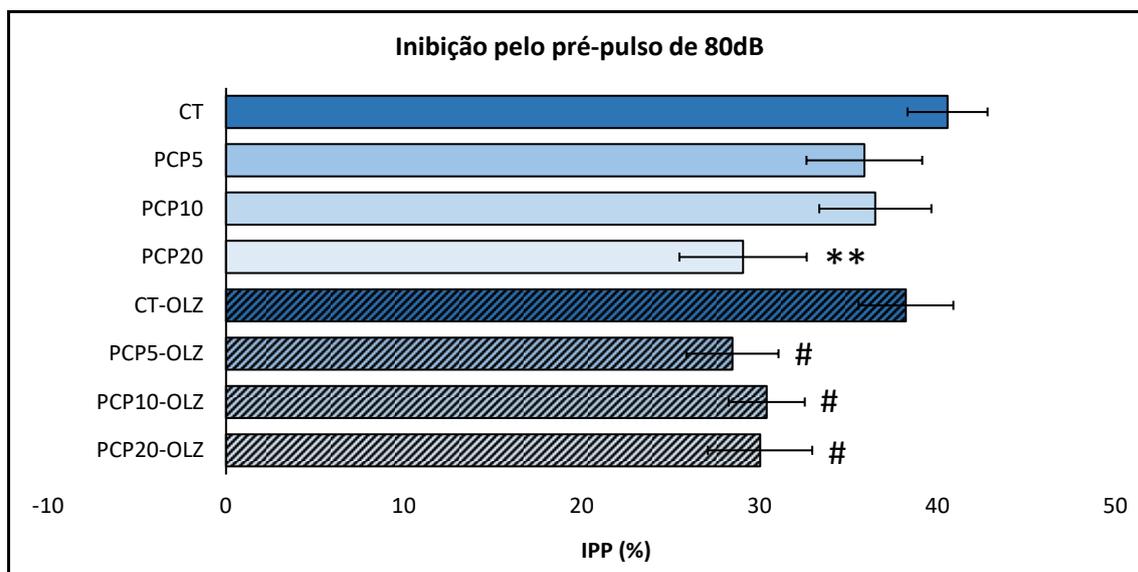
Figura 13 - Percentual de inibição pelo pré-pulso de 75dB de animais modelados para esquizofrenia e tratados com olanzapina.



Animais controle (CT) ou expostos à PCP (5, 10 ou 20mg/kg) durante o período neonatal e que, em PN50, 30 minutos antes do teste de inibição pelo pré-pulso, receberam injeções subcutâneas de salina ou olanzapina (OLZ; 2,0mg/kg). Valores representam média \pm EPM.
Fonte: A autora, 2022.

A uANOVA incluindo todos os fatores indicou que quando o pré-pulso de 80dB precedeu o pulso, houve efeito da exposição neonatal à fenciclidina [$F(3,177)=4,92$; $p=0,003$] e efeito do sexo [$F(1,177)=5,2$; $p=0,024$]. Como não houve interação da exposição neonatal com o sexo, a análise subsequente, que não incluiu os animais tratados com olanzapina, foi então realizada com machos e fêmeas juntos. Esta confirmou o efeito da exposição neonatal à fenciclidina [$F(3,95)=2,9$; $p=0,038$], sendo que animais expostos à dose de 20mg/Kg apresentaram menor %IPP quando comparados ao grupo CT (Figura 14). O tratamento com olanzapina não interferiu no %IPP conforme demonstrado pelas comparações entre animais tratados e não tratados com olanzapina. No entanto, a análise somente com os animais dos diferentes grupos que receberam tratamento com olanzapina revelou efeito do Tratamento [$F(3,82)=2,8$; $p=0,045$], sendo que todos os grupos modeladas para a esquizofrenia no período neonatal e tratados com olanzapina na adolescência mostraram uma redução significativa do %IPP quando comparados ao grupo CT-OLZ.

Figura 14 - Percentual de inibição pelo pré-pulso de 80dB de animais modelados para esquizofrenia e tratados com olanzapina.



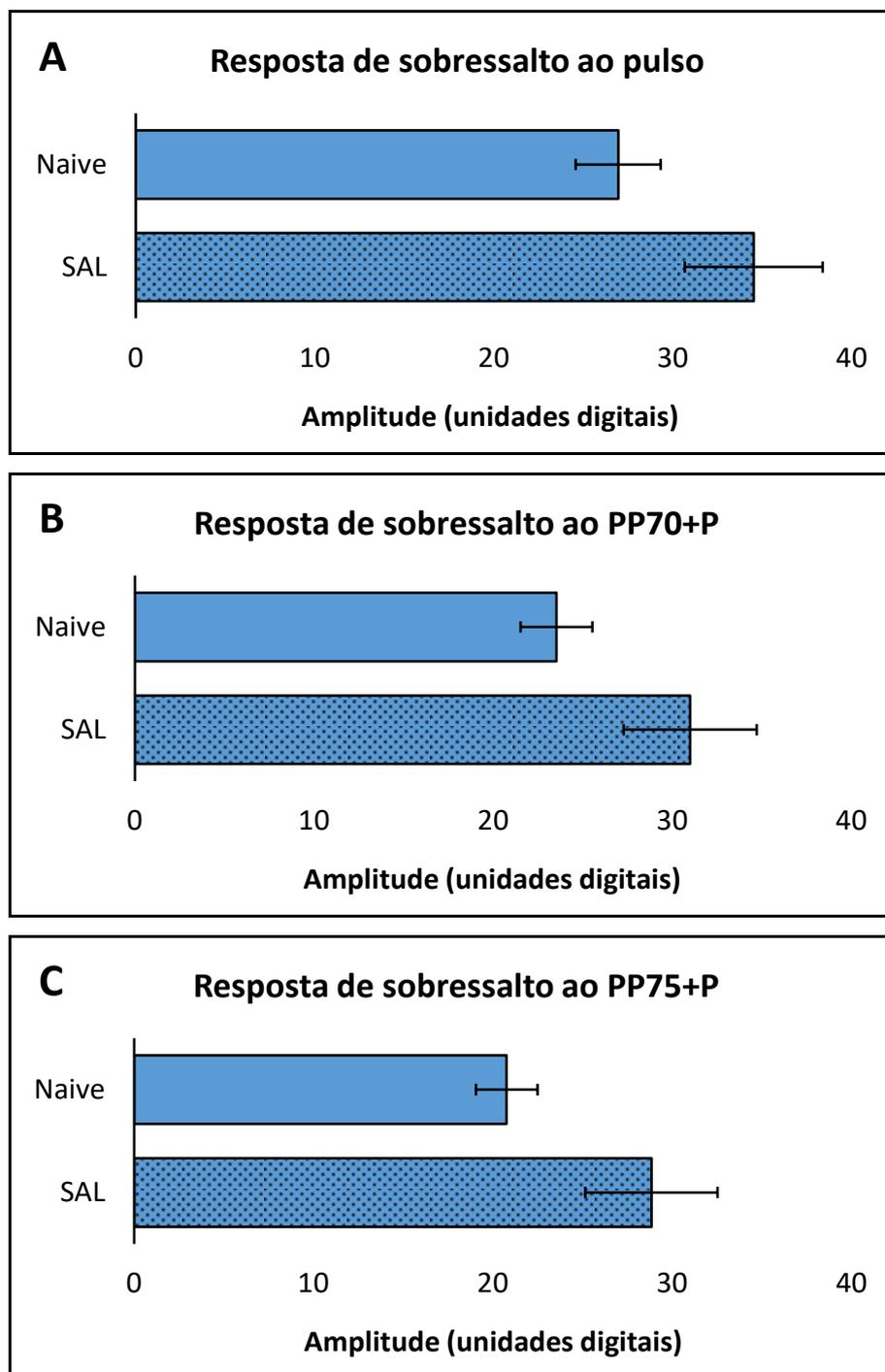
Animais controle (CT) ou expostos à PCP (5, 10 ou 20mg/kg) durante o período neonatal e que, em PN50, 30 minutos antes do teste de inibição pelo pré-pulso, receberam injeções subcutâneas de salina ou olanzapina (OLZ; 2,0mg/kg). Valores representam média \pm EPM. ** $p < 0,01$ vs CT; # $p < 0,05$ vs CT-OLZ.

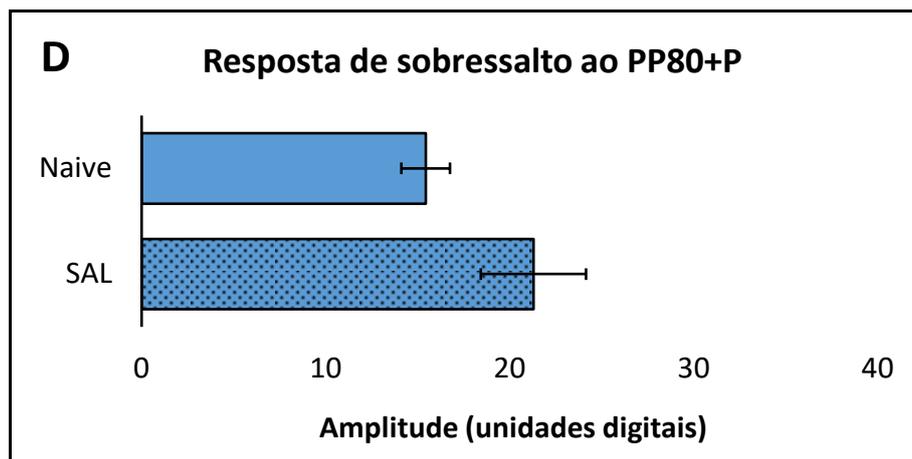
Fonte: A autora, 2022.

Os resultados do teste IPP demonstram que animais machos e fêmeas modelados para esquizofrenia no período neonatal apresentam deficiência no filtro sensorio-motor, com indícios de maior severidade em machos. O tratamento com olanzapina na adolescência novamente não foi capaz de mitigar os danos causados pela fenciclidina no período neonatal.

Outra variável medida no teste de IPP foi a resposta de sobressalto. Novamente, a ANOVA de repetição feita entre os grupos *Naive* e *SAL* não mostrou diferença significativa entre eles (Figura 15). Sendo assim, os animais desses grupos foram unidos em um único grupo CT.

Figura 15 - Resposta de sobressalto aos estímulos sonoros aplicados no teste da IPP de animais dos grupos *Naive* e SAL.





Legenda: A - P; B - PP70+P; C - PP75+P; D - PP80+P.

Animais *Naive* não receberam nenhuma injeção, mas passaram por todos os procedimentos de manipulação, e animais SAL receberam injeções subcutâneas de salina durante o período neonatal e em PN50, 30 minutos antes do teste de inibição pelo pré-pulso. Valores representam média \pm EPM.

Fonte: A autora, 2022.

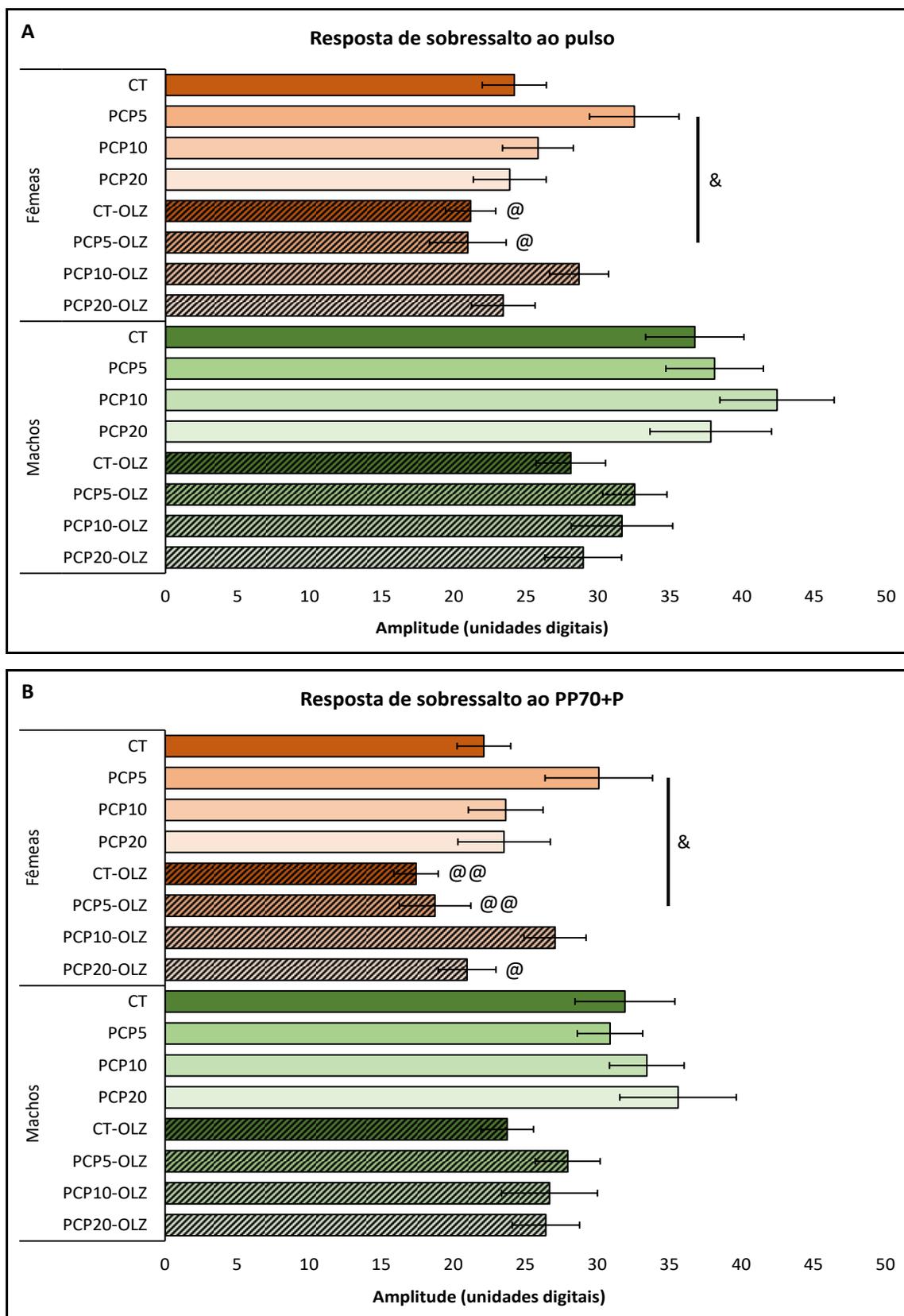
Como houve quatro intensidades de estímulos sonoros diferentes (pulsos de 120dB e pulsos precedidos pelos pré-pulsos de 70, 75 ou 80dB), a ANOVA global realizada novamente foi a de repetição. Com esta foi possível observar efeitos da intensidade de estímulo [$F(3,531)=312,1$; $p=0,000$]. Esse efeito indica que a resposta de sobressalto foi progressivamente reduzida a medida em que a intensidade de pré-pulso aumentava, o que está de acordo com a literatura. Adicionalmente, foi identificado efeito do tratamento com olanzapina [$F(1,177)=10,9$; $p=0,001$] e do sexo [$F(1,177)=23,9$; $p=0,000$], além de interações entre intensidade de estímulo e tratamento [$F(3,531)=8,6$; $p=0,000$], intensidade de estímulo e sexo [$F(1,177)=23,9$; $p=0,000$] e uma interação tripla entre intensidade de estímulo, tratamento com olanzapina e sexo [$F(3,531)=4,1$; $p=0,007$]. Não houve efeito ou interações envolvendo Exposição Neonatal.

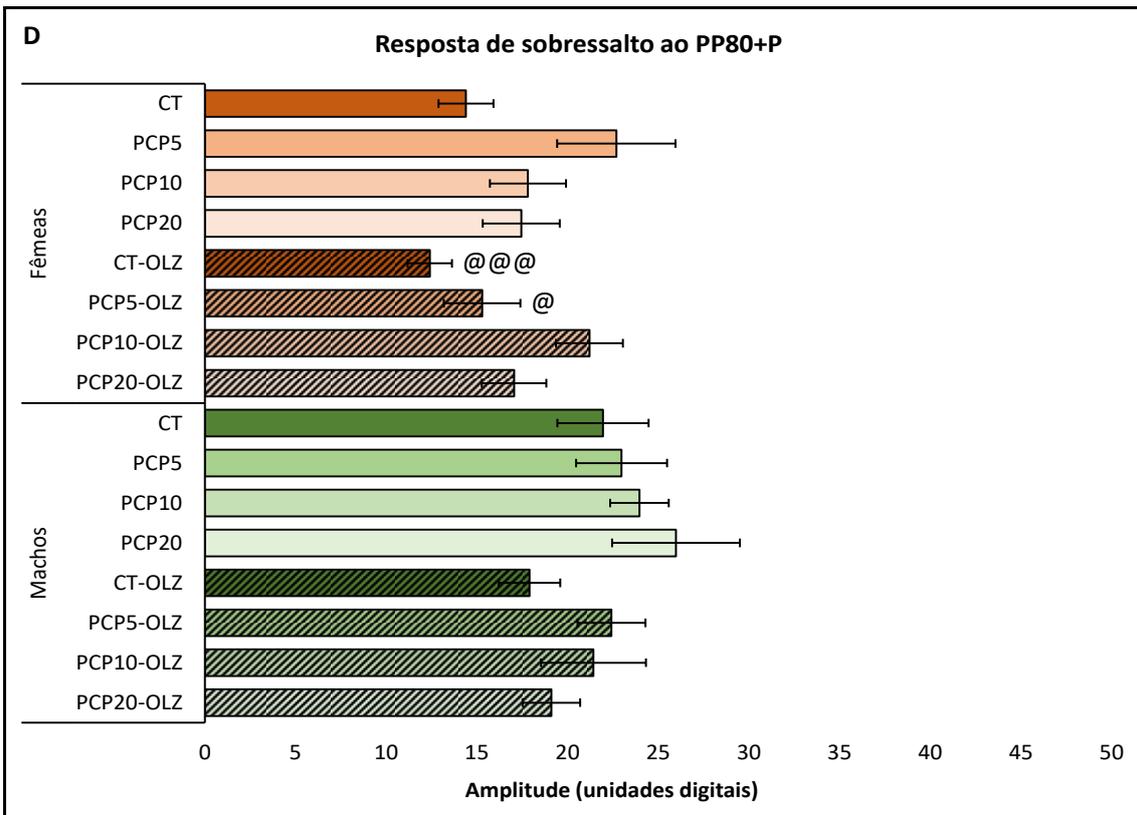
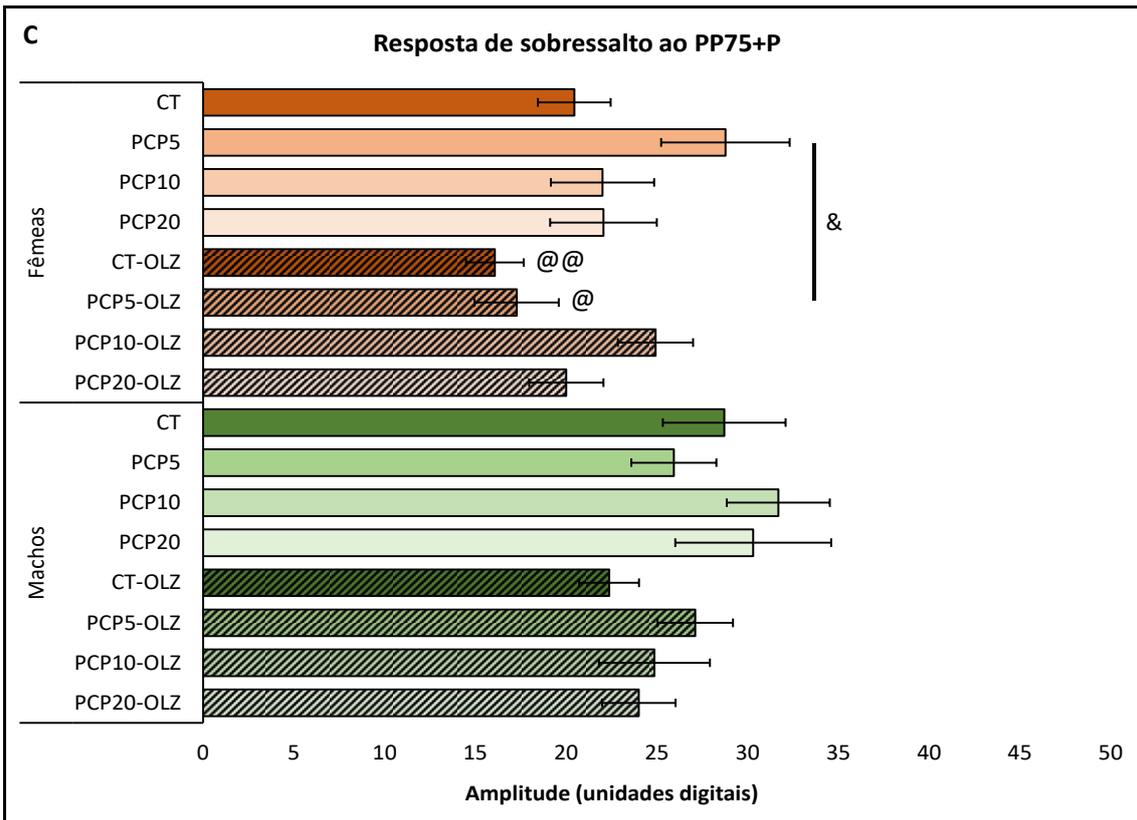
Para investigar quais as alterações associadas aos efeitos e interações identificadas, em seguida, foram feitas uANOVAs de menor ordem para cada intensidade de estímulo sonoro. Além disso, a presença da interação tripla citada anteriormente e a ausência de interação entre a exposição neonatal à fenciclidina e os outros fatores fez com que as análises seguintes tivessem como enfoque o papel do tratamento com a olanzapina na resposta de sobressalto. Analisando apenas os grupos que foram tratados com olanzapina na adolescência, foi possível observar um efeito sexo-dependente do tratamento. Quando o pré-pulso de 70dB precedeu o pulso (Figura

16B), as fêmeas [$F(3,41)=4,5$; $p=0,008$] do grupo PCP10-OLZ apresentaram maior resposta de sobressalto quando comparadas às fêmeas de todos os outros grupos tratados com olanzapina. Já quando os pré-pulsos de 75dB e 80dB precederam o pulso (Figuras 16C e 16D, respectivamente), as fêmeas do grupo PCP10-OLZ apresentaram maior resposta de sobressalto apenas quando comparadas às fêmeas dos grupos CT-OLZ e PCP5-OLZ.

Com relação às análises feitas entre os grupos tratados com olanzapina e seus respectivos pares tratados com salina, não foram identificadas diferenças significativas em nenhuma das comparações realizadas para os machos. Em relação às fêmeas, somente houve diferença entre os animais tratados ou não com a olanzapina no grupo exposto à menor dose de fenciclidina durante o período neonatal. Foi possível observar que em quase todas as intensidades de estímulos sonoros (exceto quando o pulso foi precedido pelo pré-pulso de 80dB), as fêmeas do grupo PCP5-OLZ apresentaram uma redução significativa da resposta de sobressalto em relação às fêmeas do grupo PCP5 (Figura 16A, 16B e 16C). Vale ressaltar também que, apesar de não ter atingido a significância estatística, as fêmeas do grupo PCP5 apresentaram um aumento da resposta de sobressalto quando comparadas às fêmeas do grupo CT. Sendo assim, o tratamento com a olanzapina reduziu esse efeito do PCP5.

Figura 16 - Resposta de sobressalto aos estímulos sonoros aplicados no teste da IPP de animais modelados para esquizofrenia e tratados com olanzapina.





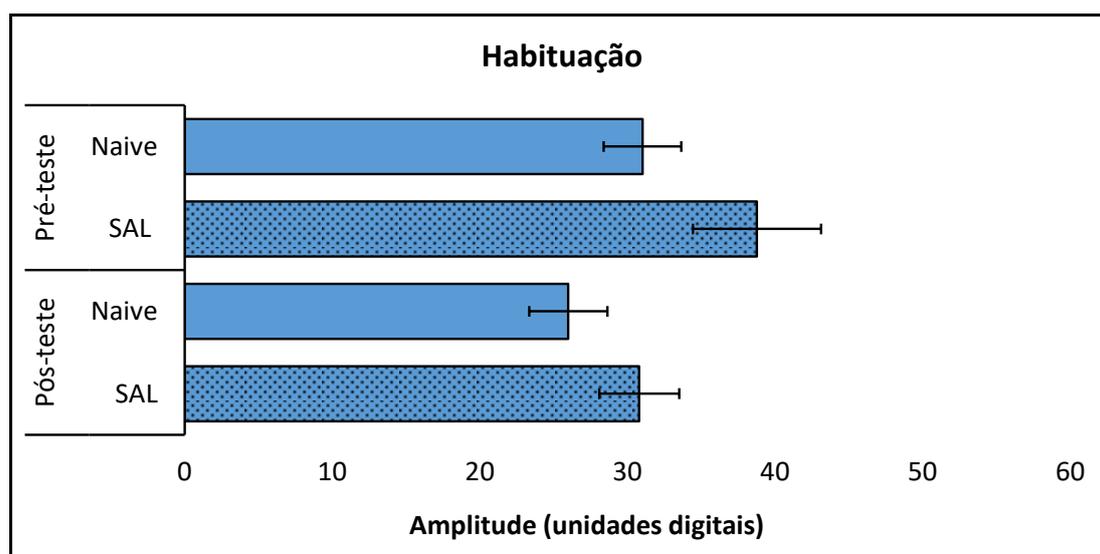
Legenda: A - P; B - PP70+P; C - PP75+P; D - PP80+P.

Animais fêmeas e machos controle (CT) ou expostos à PCP (5, 10 ou 20mg/kg) durante o período neonatal e, que em PN50, 30 minutos antes do teste de inibição pelo pré-pulso, receberam injeções subcutâneas de salina ou olanzapina (OLZ; 2,0mg/kg). Valores representam média \pm EPM. @p<0,05, @@p<0,01, @@@p<0,001 vs. PCP10-OLZ; &p<0,05 PCP5-OLZ vs. PCP5.

Fonte: A autora, 2022.

O terceiro parâmetro obtido no teste de IPP consistiu na comparação entre as respostas de sobressalto obtidas durante o pré-teste e durante o pós-teste. Assim como ocorreu nas outras variáveis, a ANOVA de repetição feita entre os grupos *Naive* e SAL não mostrou diferenças entre eles (Figura 17). Assim, esses animais foram agrupados em um único grupo CT.

Figura 17 - Resposta de sobressalto aos pulsos aplicados nas fases de pré e pós-teste do teste da IPP de camundongos dos grupos *Naive* e SAL.

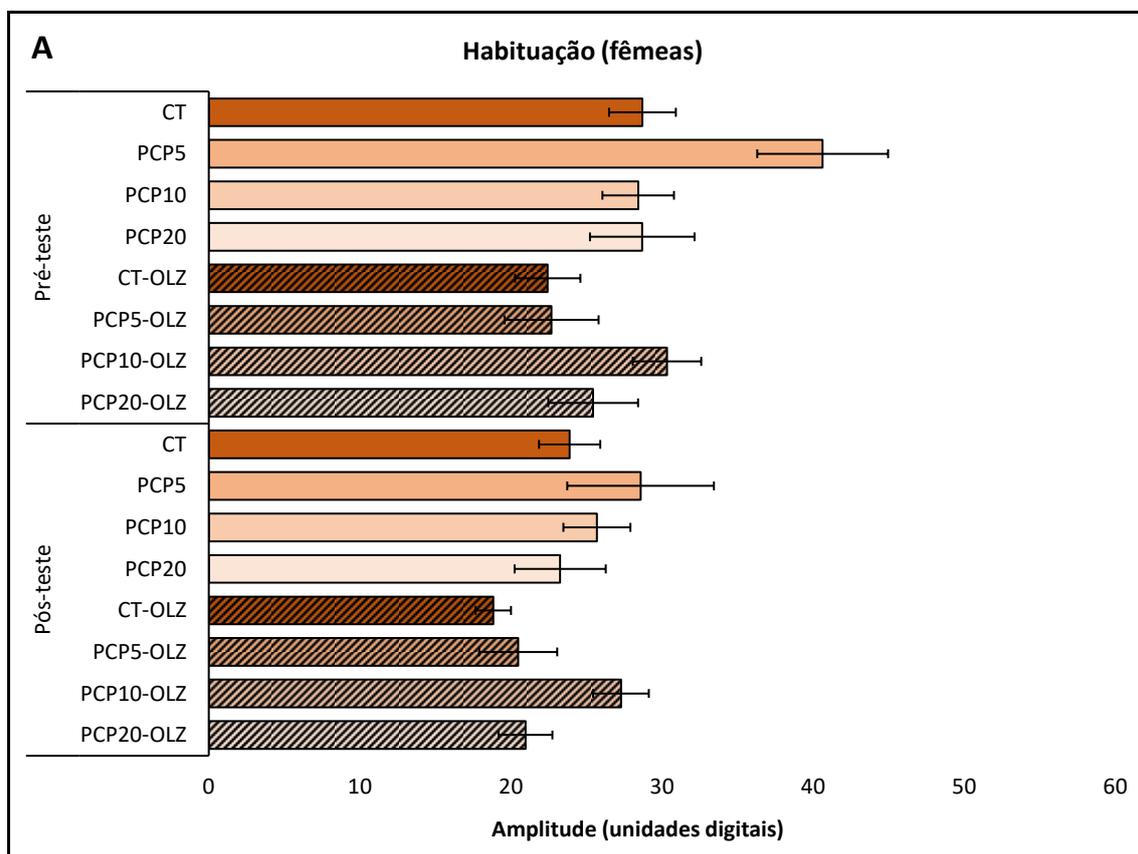


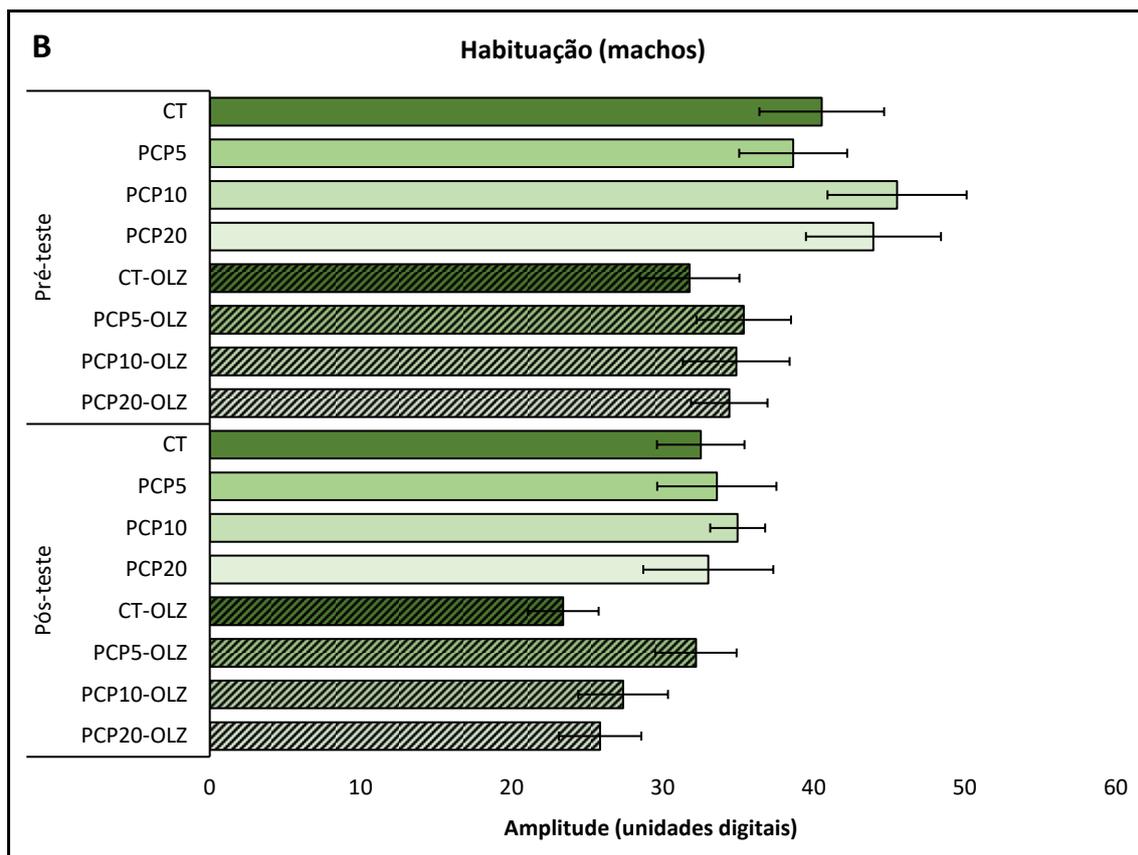
Animais *Naive* não receberam nenhuma injeção, mas passaram por todos os procedimentos de manipulação, e animais SAL receberam injeções subcutâneas de salina durante o período neonatal e em PN50, 30 minutos antes do teste de inibição pelo pré-pulso. Valores representam média \pm EPM. Fonte: A autora, 2022.

A ANOVA global de repetição realizada em seguida mostrou efeito da etapa [F(1,177)=77,8; p=0,000] e interação desse fator com o sexo [F(1,177)=4,35; p=0,038]. O efeito da etapa indica que há redução da resposta de sobressalto do pré para o pós-teste, ou seja, que ocorreu habituação. O efeito do sexo ocorreu porque machos (Figura 18B) tiveram respostas de sobressalto mais intensas que fêmeas (Figura 18A). Como

não houve interação da etapa com a exposição neonatal à fenciclidina e nem com o tratamento com a olanzapina, ambos os fatores não influenciaram nesse processo.

Figura 18 - Resposta de sobressalto aos pulsos aplicados nas fases de pré e pós-teste do teste da IPP de animais modelados para esquizofrenia e tratados com olanzapina.





Legenda: A – fêmeas; B – machos.

Camundongos controle (CT) ou expostos à PCP (5, 10 ou 20mg/kg) durante o período neonatal e que, em PN50, 30 minutos antes do teste de inibição pelo pré-pulso, receberam injeções subcutâneas de salina ou olanzapina (OLZ; 2,0mg/kg). Valores representam média \pm EPM.

Fonte: A autora, 2022.

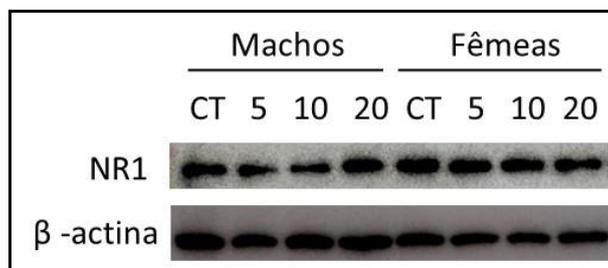
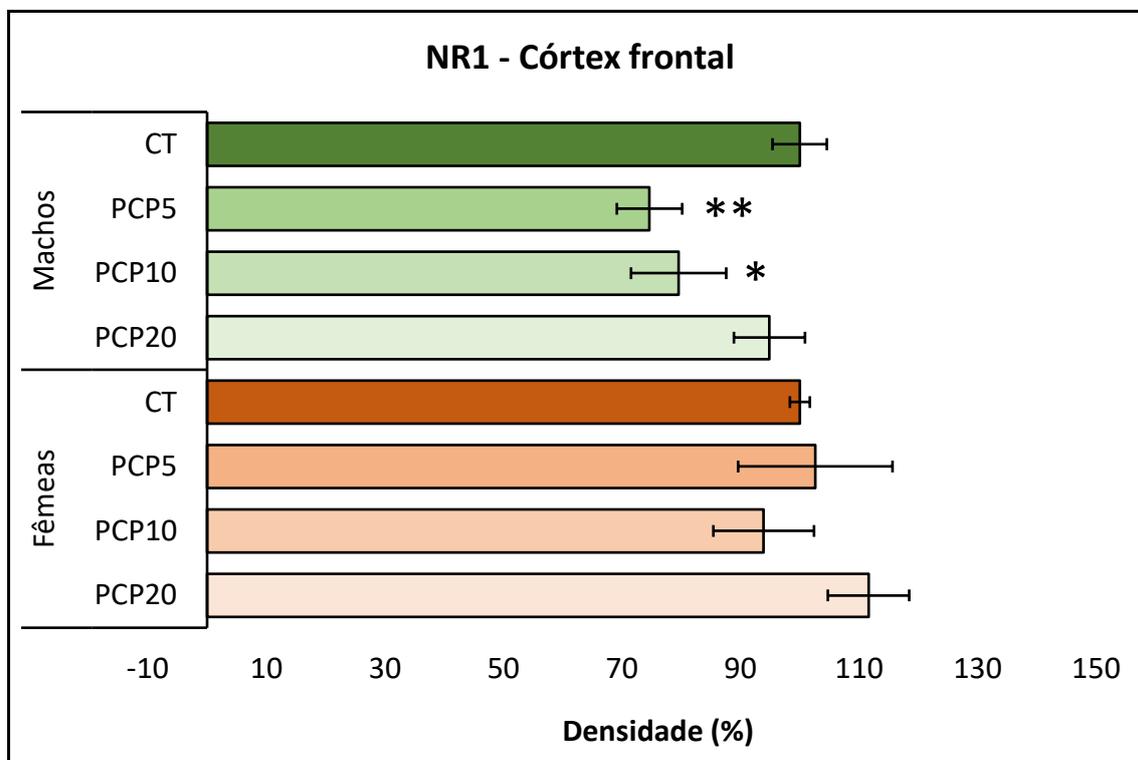
3.4 Western Blotting

Por meio da técnica de *Western Blotting*, as proteínas NR1 e PSD-95 presentes nas regiões do CF e do HP de animais na idade de PN30 foram quantificadas. No CF, a ANOVA global mostrou efeito próximo à significância da exposição neonatal à fenciclidina [$F(3,39)=2,7$; $p=0,062$] e efeito significativo do sexo [$F(1,39)=8,6$; $p=0,006$] na expressão do NR1. Considerando-se este cenário, juntamente aos efeitos sexo-dependentes identificados na análise das variáveis comportamentais, na análise subsequente, avaliamos separadamente machos e fêmeas.

Verificamos que os animais machos [Exposição neonatal: $F(3,20)=3,9$; $p=0,025$] dos grupos PCP5 e PCP10 apresentaram diminuição da expressão do NR1 em comparação aos animais do grupo CT (Figura 19). As análises da PSD-95 no CF, assim

como as análises dessa proteína e do NR1 no HP não mostraram alterações significativas entre os grupos (Figura 20).

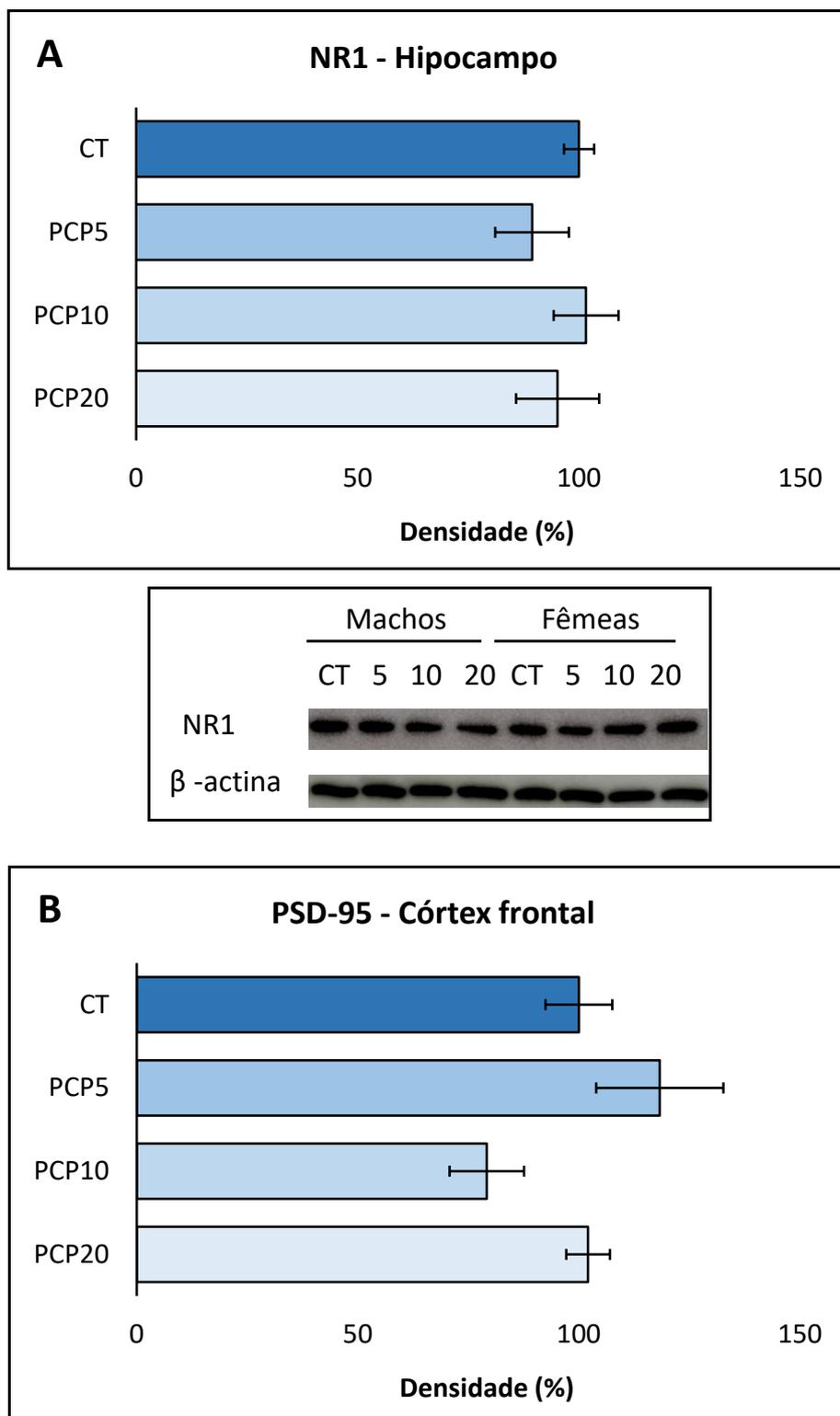
Figura 19 - Percentual de densidade da subunidade NR1 do receptor NMDA no CF de animais modelados para esquizofrenia.

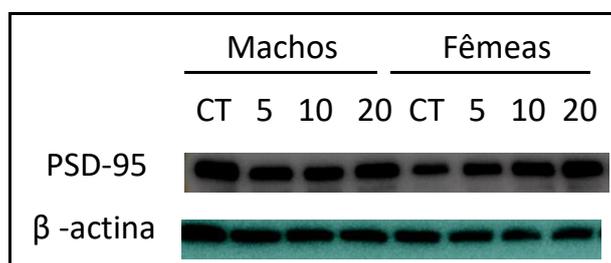
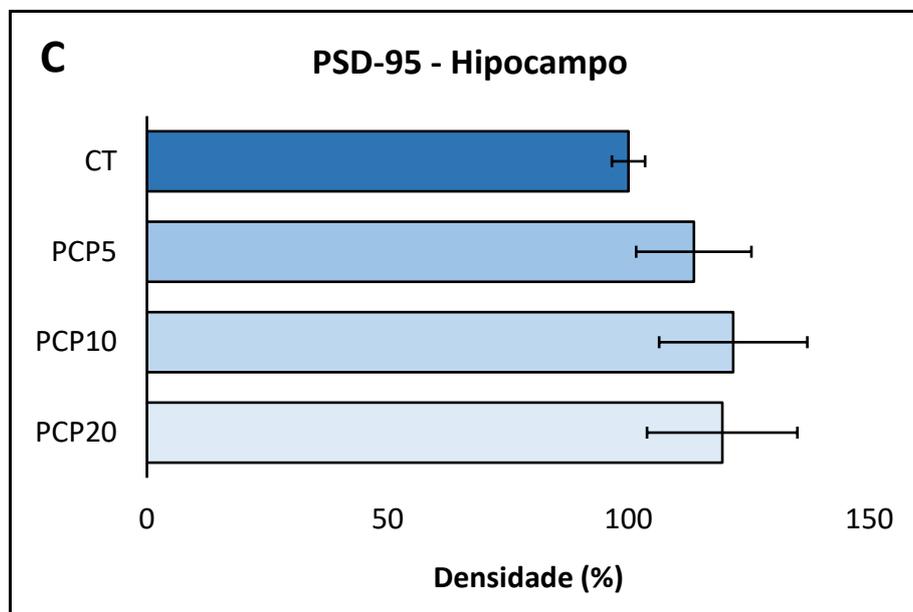
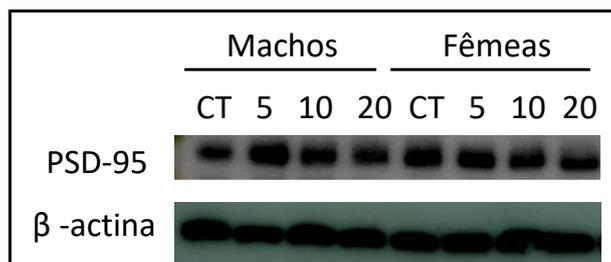


Animais machos e fêmeas controle (CT) ou expostos à PCP (5, 10 ou 20mg/kg) durante o período neonatal. Densidade da proteína NR1 corrigida pela densidade da proteína β-actina. Valores representam média ±EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. CT.

Fonte: A autora, 2022.

Figura 20 - Percentual de densidade da subunidade NR1 do receptor NMDA no HP e da proteína PSD-95 no CF e no HP de animais modelados para esquizofrenia.





Legenda: A – proteína NR1 no hipocampo; B – proteína PSD-95 no córtex frontal; C – proteína PSD-95 no hipocampo.

Animais machos e fêmeas controle (CT) ou expostos à PCP (5, 10 ou 20mg/kg) durante o período neonatal. Densidade das proteínas NR1 e PSD-95 corrigidas pela densidade da proteína β -actina. Valores representam média \pm EPM.

Fonte: A autora, 2022.

4 DISCUSSÃO

A esquizofrenia é considerada uma desordem do neurodesenvolvimento (WEINBERGER, 1987). Estudos com humanos mostram que a ocorrência de perturbações durante o período perinatal estão associadas ao aumento do risco de se desenvolver essa doença (MURRAY et al., 2017; JAARO-PELED; SAWA, 2020). Consistente com essa ideia, estudos pré-clínicos mostram que intervenções feitas nesse período são capazes de provocar diversas alterações comportamentais e neuroquímicas sabidamente relacionadas à esquizofrenia (RATAJCZAK; WOŹNIAK; NOWAKOWSKA, 2013).

O modelo utilizado no presente trabalho para a indução da esquizofrenia foi a exposição à fenciclidina no período neonatal (LIU et al., 2011; OKAMOTO et al., 2012; AMANI et al., 2013; GRAYSON et al., 2015). A fenciclidina é um antagonista glutamatérgico não competitivo dos receptores NMDA, que impede, portanto, a ação do glutamato nesses receptores comprometendo a atividade do sistema glutamatérgico durante um período crítico do desenvolvimento do sistema nervoso de roedores (DOBBING; SANDS, 1979). Especialmente entre o 7º e 14º dias pós-natais ocorre o pico de expressão de receptores NMDA (GOODLETT; HORN, 2001; GOODLETT; HORN; ZHOU, 2005; AMANI et al., 2013) e existem fortes evidências de que disfunções na sinalização glutamatérgica mediada pelos receptores NMDA durante esse período sensível são críticas para o aumento do risco para esquizofrenia (DU BOIS; HUANG, 2007; LIM; TAYLOR; MALONE, 2012a).

Além disso, diferenças sexuais em relação à prevalência, à idade de início e aos sintomas da doença, além da resposta ao tratamento com antipsicóticos têm sido observadas em humanos (FRANCESCHINI; FATTORE, 2021). Homens manifestam a doença mais cedo, possuem sintomas negativos e cognitivos mais severos e apresentam pior resposta ao tratamento quando comparados às mulheres (GOGOS et al., 2019). Apesar das diferenças serem mais desfavoráveis aos pacientes do sexo masculino, a doença é grave em ambos os sexos. Assim, a ênfase dos estudos experimentais em machos dificulta o entendimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da esquizofrenia e o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes e com menos efeitos adversos.

No presente trabalho investigamos os efeitos comportamentais induzidos pela administração neonatal à fenciclidina em camundongos adolescentes de ambos os sexos

e a possível reversão das alterações comportamentais associadas à esquizofrenia pelo antipsicótico atípico olanzapina. Além disso, considerando i) o envolvimento do sistema glutamatérgico na fisiopatologia desse transtorno; ii) o dimorfismo sexual desse sistema; e iii) visando o melhor entendimento dos mecanismos moleculares associados à indução das alterações comportamentais semelhantes à esquizofrenia pelo modelo de exposição neonatal à fenciclidina, avaliamos também a expressão da subunidade NR1 do receptor NMDA e da proteína PSD-95 no período equivalente ao início da adolescência.

Em relação aos resultados dos testes comportamentais realizados neste estudo, de modo geral, observamos que a exposição neonatal à fenciclidina provocou alterações sexo-dependentes. No teste do campo aberto, observamos que machos se mostraram mais sensíveis ao efeito hipolocomotor induzido pela exposição neonatal à fenciclidina. Similarmente, identificamos prejuízos na interação social e no filtro sensorio-motor apenas em machos. O tratamento com a olanzapina não foi capaz de reverter nenhuma das alterações comportamentais provocadas pela exposição neonatal à fenciclidina. Contudo, no teste de inibição pelo pré-pulso a exposição à olanzapina em fêmeas do grupo CT provocou melhora do %IPP. Interessantemente, observamos também que a administração de olanzapina em animais modelados para esquizofrenia intensificou os efeitos da exposição neonatal à fenciclidina, como identificado no campo aberto e induziu a expressão do dano ao comportamento em casos de alterações subclínicas, como na interação social. Consistente com os dados obtidos nas avaliações comportamentais, os resultados obtidos na técnica de Western Blotting mostraram uma diminuição sexo-dependente da densidade proteína NR1 no córtex pré-frontal. Esses resultados sugerem que a exposição à fenciclidina no período neonatal pode ser usada para modelar as diferenças sexo-dependentes identificadas em pacientes com SCHZ. A ineficácia do protocolo usado para administração de olanzapina sugere ainda a necessidade de mais estudos com o objetivo de investigar a eficácia de tratamentos farmacológicos para esquizofrenia na adolescência.

4.1 Efeitos sexo-dependentes do modelo de exposição neonatal à fenciclidina no comportamento associado a esquizofrenia

Como dito anteriormente, estudos com humanos mostraram que diferenças sexuais no sistema de neurotransmissão glutamatérgico podem estar envolvidas na fisiopatologia da esquizofrenia. Mulheres com essa desordem mental apresentam suprarregulação da glutamina sintetase, enzima envolvida na degradação do glutamato, em comparação com homens que também manifestam o transtorno (MARTINS-DE-SOUZA et al., 2010). Adicionalmente, mulheres com essa doença apresentam maior densidade de receptores NMDA em relação aos homens com esquizofrenia (WICKENS; BANGASSER; BRIAND, 2018). Os hormônios femininos parecem ser responsáveis por esse aumento do tônus glutamatérgico, pois há relatos de que o estrogênio induz o aumento do número de receptores NMDA e AMPA (BARTH; VILLRINGER; SACHER, 2015) e aumenta a probabilidade de liberação do glutamato em fêmeas (SMEJKALOVA; WOOLLEY, 2010). Além disso, existem outros mecanismos pelos quais os hormônios femininos exercem papel neuroprotetor. O estrogênio mostrou ser capaz de inibir a morte neuronal, aumentar a plasticidade sináptica e facilitar comunicação neuronal (RIECHER-RÖSSLER; BUTLER; KULKARNI, 2018). Esses fatores podem explicar por que a esquizofrenia é mais severa em homens do que em mulheres em idade reprodutiva.

Os dados obtidos no presente estudo mostraram que o modelo de exposição neonatal à fenciclidina permite explorar essas diferenças entre os sexos na esquizofrenia, pois os machos adolescentes se mostraram mais sensíveis as alterações provocadas pela fenciclidina.

4.2 Atividade locomotora

A hiperatividade locomotora observada em modelos animais tem sido relacionada aos sintomas positivos da esquizofrenia em humanos (SAMS-DODD, 1998). O desequilíbrio dopaminérgico no estriado está fortemente associado aos sintomas positivos desse transtorno mental. Similarmente, alterações na locomoção refletem alterações dopaminérgicas subcorticais (KESBY et al., 2018). Assim, alterações na locomoção são usadas como um indicador de disfunções neurobiológicas semelhantes àquelas identificadas em indivíduos com esquizofrenia.

Em nosso estudo observamos a redução da atividade locomotora provocada pela exposição neonatal à fenciclidina, o que não é corroborado por estudos anteriores com esse modelo (WANG et al., 2001; SIRCAR; SOLIMAN, 2003; ANASTASIO; JOHNSON, 2008; ANASTASIO et al., 2009; NAKATANI-PAWLAK et al., 2009; BOCTOR; FERGUSON, 2010; ZHANG et al., 2012; AMANI et al., 2013; GASKIN; ALEXANDER; FONE, 2014; RODRÍGUEZ et al., 2017; MOGHADAM et al., 2021). Um dos motivos que podem explicar essa inconsistência, é que a hiperatividade observada nesses estudos foi provocada por um desafio com PCP antes do teste do CA. Assim, as condições em que a hiperatividade, descrita em outros trabalhos que utilizaram o modelo de exposição neonatal à fenciclidina, foi manifestada é diferente das condições de avaliação do nosso trabalho, no qual avaliamos atividade locomotora espontânea.

Embora seja, de fato, incomum a descrição de redução da atividade locomotora em modelos de esquizofrenia, alguns trabalhos também encontraram a expressão de hipolocomoção espontânea. Nesse sentido, Iaccarino et al. (2013) utilizou a administração neonatal de quinurenina, um produto do metabolismo do triptofano e que atua como antagonista de receptor NMDA, como modelo de esquizofrenia. Os autores observaram redução dos cruzamentos entre câmaras, parâmetro utilizado pelo grupo para avaliar a atividade, em ratos adultos. Interessantemente, esse efeito é dependente da idade em que ocorre a exposição ao ácido quinurênico, uma vez que quando este é administrado em animais adolescentes ou adultos o efeito hipolocomotor não é observado. Esses dados reforçam a ideia de que a atividade dos receptores NMDA durante o período pós-natal recente é crucial para o desenvolvimento adequado de circuitarias neurais que estão implicadas na esquizofrenia. Em outro estudo desenvolvido por Latysheva & Rayevsky (2003), a exposição ao MK-801, um antagonista de receptor NMDA, durante o neurodesenvolvimento pós-natal resultou em hipolocomoção espontânea em ratos juvenis. Contudo, em condição de desafio com MK-801 os animais modelados para a esquizofrenia apresentaram hiperatividade locomotora em comparação ao grupo controle. Similarmente, animais modelados para a esquizofrenia através da ativação do sistema imune materno com lipopolissacarídeo (HARVEY; BOKSA, 2014) ou Poly I:C (VAN DEN EYNDE et al., 2014) apresentaram redução da atividade locomotora espontânea tardiamente. Juntos esses dados indicam que a hipolocomoção espontânea pode ser de fato uma característica dos modelos de neurodesenvolvimento da esquizofrenia.

Existem evidências de que a agitação psicomotora esteja associada com episódios de psicose (KINON et al., 2001), tanto que a expressão de hiperatividade locomotora é largamente utilizada como parâmetro comportamental associado aos sintomas positivos. No entanto, as alterações motoras na esquizofrenia se caracterizam por um estado dinâmico que envolve períodos de agitação e desaceleração psicomotora (SANO et al., 2012), refletindo, portanto, condições neurobiológicas diferentes. Apesar de não receber tanta atenção, a redução psicomotora é um sintoma característico da esquizofrenia reconhecido desde o início do estudo desse transtorno por Bleuer e Kraepelin e ocorre independentemente do uso de antipsicóticos (MORRENS; HULSTIJN; SABBE, 2007).

Nesse sentido, Farrow et al. (2005) mostrou correlação entre menor atividade motora espontânea e redução de massa no córtex cingulado anterior, uma região envolvida com comportamentos direcionados a objetivos, indicando uma associação da hipoatividade com sintomas negativos da esquizofrenia. Essa ideia foi corroborada por Bervoets et al. (2014), que mostrou associação positiva entre a sintomatologia negativa do transtorno e a iniciação de movimentos, particularmente relacionada à volição.

Assim, considerando que avaliamos a atividade locomotora espontânea, é possível que tenhamos observado a expressão de uma alteração comportamental associada aos sintomas negativos da esquizofrenia. Assim, nossos dados sugerem que o modelo de exposição neonatal à fenciclidina mimetiza o curso natural do transtorno, uma vez que durante a adolescência tipicamente ainda não são manifestados os sintomas positivos, reforçando a validade de face do modelo.

4.3 Interação social

Déficits na interação social fazem parte dos sintomas negativos da esquizofrenia (KAHN et al., 2015). Essa classe de sintomas é responsável por grande parte dos prejuízos sociais causados por essa desordem mental e estão presentes antes do primeiro evento psicótico (OWEN; SAWA; MORTENSEN, 2016). Além disso, os medicamentos existentes são pouco eficazes em tratá-los (EGERTON et al., 2020). Sendo assim, a existência de modelos animais que mimetizem esses sintomas e possibilitem estudar os mecanismos neurobiológicos envolvidos neles é de extrema importância.

No presente estudo, apenas animais machos expostos à fenciclidina nas doses de 5 e 20mg/Kg apresentaram déficits na interação social durante a adolescência. Outros dois estudos avaliaram os efeitos provocados pelo modelo de exposição neonatal à fenciclidina na interação social, no entanto, os testes foram feitos com animais adultos. (NAKATANI-PAWLAK et al., 2009) observou déficits em machos expostos à dose de 10mg/Kg. Já no trabalho de (DU BOIS; HUANG; DENG, 2008), fêmeas expostas a essa mesma dose de fenciclidina não apresentaram déficits na interação social.

Estudos com outros modelos de esquizofrenia com ênfase no neurodesenvolvimento têm investigado essas alterações no final da adolescência. Apesar de muitos deles utilizarem apenas animais machos (BLAS-VALDIVIA et al., 2009; LI et al., 2016; BATOR et al., 2018; HERNÁNDEZ-FRAUSTO; LÓPEZ-RUBALCAVA; GALVÁN, 2019; SALMANI et al., 2022), um estudo recente que avaliou a interação social tanto em fêmeas quanto em machos na idade de PN45 constatou déficits nesse parâmetro apenas em animais machos (VOJTECHOVA et al., 2021), o que corrobora os resultados obtidos no presente estudo.

As observações citadas anteriormente também corroboram os dados encontrados em estudos que investigaram os sintomas negativos na fase prodrômica da esquizofrenia em humanos. Homens apresentam sintomas negativos de forma mais frequente e acentuada do que as mulheres (CORCORAN et al., 2011; RIETSCHEL et al., 2017), além de maior nível de prejuízos no funcionamento social (WALDER et al., 2013; RIETSCHEL et al., 2017).

4.4 Inibição pelo pré-pulso

A inibição pelo pré-pulso (IPP) consiste em uma diminuição do reflexo de sobressalto a um estímulo forte (pulso) e inesperado quando este é precedido por um estímulo fraco (pré-pulso) (WU et al., 2018). O reflexo de sobressalto ocorre quando o indivíduo é exposto a um estímulo sensorial intenso e inesperado e funciona como proteção a possíveis ameaças (WU et al., 2018).

A IPP funciona como uma medida da integridade do filtro sensorio-motor, pois enquanto o pré-pulso está sendo processado, ocorre menor mobilização de processamento para outros estímulos. Isso faz com que a atenção seja direcionada a um estímulo por vez, protegendo o sistema de uma sobrecarga de estímulos sensoriais

(BRAFF; GEYER; SWERDLOW, 2001). Indivíduos com esquizofrenia apresentam déficits na IPP (BRAFF; GEYER; SWERDLOW, 2001), o que tem sido relacionado à desorganização do pensamento e à distratibilidade (TURETSKY et al., 2007).

A IPP pode ser observada em humanos, primatas não-humanos e roedores, pode ser modulada genética e farmacologicamente e é relativamente simples de medir (GEYER; DULAWA, 2003). Sendo assim, tem sido amplamente utilizada em estudos com modelos animais de esquizofrenia (AMANN et al., 2010).

No presente estudo observamos que quando o pré-pulso de 70db precedeu o pulso, houve um efeito sexo-dependente da exposição neonatal à fenciclidina, pois somente camundongos machos expostos a maior dose apresentaram déficits na IPP quando comparados aos machos do grupo CT. Quando o pré-pulso de 80db precedeu o pulso, novamente animais expostos à maior dose de fenciclidina apresentaram redução do %IPP, contudo, tanto machos quanto fêmeas foram afetados. Assim, nossos dados mostraram que o modelo utilizado foi eficiente em induzir déficits na IPP, e que os machos são mais sensíveis à ação da fenciclidina, uma vez que apresentaram prejuízos já no pré-pulso de menor intensidade.

Estudos que utilizaram o modelo de exposição neonatal à fenciclidina e avaliaram a IPP em adultos, identificaram prejuízos na integridade do filtro sensorio-motor induzido por esse modelo, contudo, em sua maioria, somente machos foram analisados (GASKIN; ALEXANDER; FONE, 2014; RODRÍGUEZ et al., 2017). Assim, mais estudos são necessários para verificar se nosso resultado de maior dano em machos é persistente ou se fêmeas têm agravamento dos sintomas mais tardiamente. Interessantemente, estudos que avaliaram a IPP em animais pré-púberes, ou não identificaram déficits (BOCTOR; FERGUSON, 2009), ou identificaram em ambos os sexos (WANG et al., 2003; ANASTASIO; JOHNSON, 2008; KJAERBY et al., 2013). Esses dados sugerem que a expressão dos efeitos sexo-dependentes identificados no presente estudo, depende de mudanças hormonais características da adolescência.

Assim, os prejuízos na IPP em machos do modelo de exposição neonatal à fenciclidina utilizado no presente estudo já eram esperados e são consistentes com outros dados da literatura. Em relação às fêmeas, é possível que tenhamos identificado menor sensibilidade desse sexo aos efeitos deletérios do modelo devido a influência dos hormônios sexuais femininos, o que reforça a hipótese que estes hormônios podem exercer papel neuroprotetor sobre os sintomas da esquizofrenia.

O estudo de van den Buuse et al. (2017) mostrou que o MK-801 provocou diminuição na IPP tanto em machos intactos quanto em machos gonadectomizados, mas só foi capaz de provocar diminuição na IPP em fêmeas após estas serem ovariectomizadas. Adicionalmente, o estudo de Gogos et al. (2012) mostrou que o tratamento com estradiol em fêmeas ovariectomizadas foi capaz de reverter a diminuição da IPP provocada pelo MK-801. Corroborando esses dados, Célia Moreira Borella et al. (2016) observou que a variação do estradiol no decorrer do ciclo estral influencia a expressão da IPP na idade adulta em fêmeas expostas à cetamina no período neonatal. Quando o teste ocorreu no proestro, fase do ciclo em que os níveis de estradiol se encontram mais altos, fêmeas expostas à cetamina apresentaram maior %IPP quando comparadas àquelas testadas no diestro, quando os níveis de estradiol estão mais baixos. Associado a isso, fêmeas do grupo cetamina durante o diestro apresentaram desbalanço oxidativo no hipocampo. De acordo com Behl (2002), o estradiol apresenta propriedades antioxidantes e estas seriam uma das formas pelas quais esse hormônio atua como neuroprotetor.

Observações feitas em dois estudos que investigaram a IPP em humanos na fase prodrômica da esquizofrenia mostraram que déficits nesse mecanismo estão presentes de forma marcante tanto em homens quanto em mulheres (QUEDNOW et al., 2008; ZIERMANS et al., 2012). No entanto, esses estudos utilizaram apenas uma intensidade de pré-pulso e esta foi mais alta que a maior intensidade de pré-pulso utilizada em nosso trabalho, de modo que não podemos descartar que homens sejam mais sensíveis aos prejuízos na IPP durante a fase prodrômica. Assim, mais estudos se fazem necessários para entender as diferenças sexuais durante essa fase da esquizofrenia, principalmente que utilizem diferentes intensidades de pré-pulso para possibilitar uma avaliação mais minuciosa da funcionalidade do filtro sensorio-motor.

4.5 Tratamento com olanzapina

No presente estudo, o tratamento com olanzapina feito 30 minutos antes do início de cada teste comportamental não foi capaz de reverter os déficits na IPP observados em machos, assim como também não reverteu o prejuízo causado pelo modelo de esquizofrenia na interação social. Além disso, causou diminuição na

atividade locomotora *per se* e acentuou a hipoatividade provocada pela exposição neonatal à fenciclidina nos animais de ambos os sexos.

Existem poucos trabalhos na literatura avaliando a eficácia do antipsicótico olanzapina no modelo de exposição neonatal à fenciclidina. Nos trabalhos de Wang et al. (2001) e Anastasio & Johnson (2008), a administração de olanzapina (2 mg/Kg e 1mg/Kg, respectivamente) 30 minutos antes da exposição à fenciclidina em PN7, 9 e 11 foi capaz de prevenir a expressão da hiperlocomoção e dos déficits na IPP durante a adolescência. É possível observar que neste estudo, a administração da olanzapina ocorreu no mesmo período do insulto, o que pode explicar a inconsistência desses achados com os do presente trabalho.

O antipsicótico atípico clozapina também provocou hipolocomoção em estudos utilizando outros modelos do neurodesenvolvimento, tanto em animais machos (RUETER et al., 2004; LIM; TAYLOR; MALONE, 2012b; PINAR et al., 2015) quanto em animais fêmeas (PEN; JAY; KREBS, 2011) adultos. Além de acentuar a hipolocomoção provocada pela exposição neonatal ao MK-801 (PINAR et al., 2015). Alguns desses estudos atribuem à hipolocomoção observada um possível efeito sedativo da clozapina nos animais. Esse efeito também ocorre em humanos que utilizam antipsicóticos e estaria principalmente atrelado à inibição dos receptores H1 histaminérgicos (KAAR et al., 2020). De acordo com Kaar et al. (2020), os antipsicóticos atípicos clozapina e olanzapina estão entre os que apresentam maior afinidade por esses receptores (KAAR et al., 2020). Nesse sentido, embora existam poucos trabalhos com o modelo exposição neonatal à fenciclidina, a olanzapina é um antipsicótico atípico bastante utilizado em estudos pré-clínicos. Em dose semelhante a utilizada no presente trabalho, já foi demonstrado que a olanzapina reverte a hiperlocomoção induzida pela PCP em animais adultos (GLEASON; SHANNON, 1997), indicando um efeito hipolocomotor produzido por esta droga.

Com relação à interação social, o trabalho de Nakatani-Pawlak et al. (2009) avaliou o efeito da clozapina sobre os déficits provocados pela exposição neonatal à fenciclidina em machos adultos. O tratamento ocorreu 2h antes do teste e foram utilizadas 3 doses: 0,3, 1 ou 3 mg/Kg. Todas as doses foram eficazes em mitigar os déficits na IS provocados pela exposição neonatal à fenciclidina, ao contrário do observado no presente estudo utilizando a olanzapina. Rajagopal et al. (2022) observou reversão do déficit de interação social provocado por um modelo de administração subcrônica de PCP em animais adultos pela olanzapina. De forma semelhante, Hida et

al. (2015) também observou melhora de prejuízo na memória visuo-espacial de camundongos modelados para a esquizofrenia com PCP subcrônica através da administração de olanzapina (1 e 3mg/Kg). Assim, um ponto importante a ser discutido é a dose utilizada em nosso trabalho. Diante dos dados descritos acima, a dose que utilizamos nos testes de CA e de IS foi de 0,25mg/Kg. Essa dose parece ser suficiente para causar redução da locomoção, mas não para exercer efeitos sobre a interação social, associada aos sintomas negativos.

De forma, semelhante, a administração de olanzapina nas doses de 2,5 mg/Kg (FEJGIN et al., 2007) ou de 2,0 mg/Kg (LI; HE; VOLF, 2011) em ratos machos modelados para esquizofrenia pela exposição à fenciclidina não foi capaz de reverter déficits na IPP. Interessantemente, Bakshi & Geyer (1995), usando ratos machos e doses de 1,25; 2,5; 5 ou 10 mg/kg de olanzapina observou que esta foi eficaz em reverter os déficits na IPP induzidos pela administração de PCP apenas nas doses de 5 e 10mg/Kg. Sendo assim, esses dados reforçam a ideia de que os sintomas negativos e os prejuízos no filtro sensorio-motor necessitam de doses maiores de antipsicóticos para serem mitigados.

Uma vez que a maioria dos estudos que usaram antipsicóticos atípicos em modelos animais de esquizofrenia avaliou o impacto das drogas na idade adulta, estudos futuros comparando adolescentes e adultos também são importantes para avaliar sua eficácia sobre os sintomas modelados.

4.6 Proteínas NR1 e PSD-95 no Córtex Frontal e no Hipocampo

As proteínas NR1 e PSD-95 estão intimamente ligadas à neurotransmissão glutamatérgica. A NR1 é uma subunidade obrigatória dos receptores NMDA, sendo indispensável para o seu funcionamento (TENDILLA-BELTRÁN et al., 2021). A PSD-95 atua na ancoragem, no posicionamento e na comunicação dos receptores glutamatérgicos com outras proteínas intracelulares (COLEY; GAO, 2018).

Com base nas hipóteses do neurodesenvolvimento e glutamatérgica desse transtorno, espera-se que o bloqueio dos receptores NMDA no período neonatal provoque alterações na expressão dessas proteínas em regiões sabidamente envolvidas com a esquizofrenia: CF e o HP. Avaliamos a expressão dessas proteínas em PN30,

idade equivalente ao início da adolescência em camundongos, com o intuito de investigar possíveis alterações em estágios iniciais do curso fisiopatológico da doença.

O CF está envolvido em funções cognitivas como memória de trabalho, atenção e tomada de decisão, além de processos emocionais como emoção, afeto e comportamento social (SAKURAI et al., 2015). Como estes parâmetros encontram-se prejudicados na esquizofrenia, muitos estudos têm investigado alterações no córtex pré-frontal (CPF) de indivíduos com essa desordem mental (ZHOU et al., 2015). Estes observaram uma perda significativa da substância cinzenta nessa região (SELEMON; ZECEVIC, 2015), que estaria relacionada às disfunções nas conexões dentro do próprio CPF e deste com outras áreas do sistema nervoso central (GAO et al., 2022). Como citado anteriormente disfunções glutamatérgicas que ocorrem no CPF provocam tanto direta quanto indiretamente desbalanço nas vias dopaminérgicas mesocortical e mesolímbica, estando envolvido em grande parte dos sintomas da esquizofrenia.

Alterações no HP, região envolvida em processos cognitivos como memória espacial, memória episódica e memória de curto e longo prazo, também estão presentes na esquizofrenia. Estas incluem redução do volume, conexão disfuncional com outras partes do sistema nervoso central e alterações nos níveis de proteínas sinápticas (WEGRZYN; JUCKEL; FAISSNER, 2022). Interessantemente, a redução do volume hipocampal pode ser observada inclusive em indivíduos na fase prodrômica da esquizofrenia (HARRISBERGER et al., 2016).

No presente estudo foi observada somente diminuição significativa da expressão da proteína NR1 no CF de animais machos expostos à 5 ou 10mg/Kg de fenciclidina. Esse resultado não corrobora os obtidos em outro estudo que utilizou o mesmo modelo e investigou a expressão das proteínas PSD-95 e NR1 no CF e no HP de animais machos na idade de PN35 (DU BOIS; NEWELL; HUANG, 2012). Neste foi observado aumento dos níveis das duas proteínas no HP e aumento dos níveis da PSD-95 no CF de animais expostos à dose de 10mg/Kg de fenciclidina.

Estudos com modelos genéticos em que os animais apresentavam diminuição da expressão da proteína NR1 durante todo o desenvolvimento observaram diminuição na interação social (DUNCAN et al., 2004; HALENE et al., 2009; BARKUS et al., 2012) e na IPP (DUNCAN et al., 2004) na idade adulta. Além disso, no trabalho de Belforte et al. (2010), que investigou o impacto da redução da expressão do NR1 no período pós-natal e especificamente nas regiões do CF e do HP, também foi possível observar diminuição na IPP. Esses achados corroboram os dados obtidos no presente estudo, já

que animais machos expostos à fenciclidina no período neonatal apresentaram diminuição da expressão do NR1 no CF e déficits na interação social e na IPP. Vale ressaltar também que essas alterações foram observadas durante a adolescência, mostrando que o modelo utilizado no presente estudo explora bem a hipótese de que a esquizofrenia é uma desordem do neurodesenvolvimento.

Apesar de aceito o envolvimento do sistema glutamatérgico na fisiopatologia da esquizofrenia, estudos *post-mortem* com cérebros humanos que avaliaram a expressão do NR1 mostraram resultados divergentes. Alguns estudos observaram diminuição da expressão dessa proteína no córtex de indivíduos com esquizofrenia (TOYOOKA et al., 2002; ERRICO et al., 2013; WEICKERT et al., 2013), enquanto outros não encontraram alterações significativas (KRISTIANSEN et al., 2006; HENSON et al., 2008). Com relação à PSD-95, não foram encontradas diferenças significativas na expressão dessa proteína no córtex de indivíduos com esquizofrenia (TOYOOKA et al., 2002; HAHN et al., 2006; KRISTIANSEN et al., 2006, 2010). Estudos que avaliaram a expressão dessas proteínas no HP de indivíduos com esquizofrenia também não encontraram alterações significativas (TOYOOKA et al., 2002; THOMPSON; EGBUFOAMA; VAWTER, 2003). Apesar de estudos em pacientes serem sujeitos a fatores de confusão, esses dados sugerem que outras proteínas potencialmente envolvidas com essa desordem mental devem ser investigadas em modelos animais, o que pode contribuir para o melhor entendimento da sua fisiopatologia.

CONCLUSÕES

- a) O modelo de exposição neonatal à fenciclidina foi capaz de causar alterações sexo-dependentes durante a adolescência, com destaque para o prejuízo na interação social em machos, que é semelhante ao que ocorre em humanos na fase prodrômica da esquizofrenia;
- b) O tratamento com a olanzapina não foi capaz de reverter essas alterações, além de tornar evidentes prejuízos na interação social e na IPP em animais expostos à fenciclidina no período neonatal;
- c) O modelo de exposição neonatal à fenciclidina foi capaz de causar alteração sexo-dependente na expressão da proteína NR1 no CF.

REFERÊNCIAS

ADELL, A. Brain NMDA Receptors in Schizophrenia and Depression. *Biomolecules*, v. 10, n. 6, p. 947, 2020.

AKILLIOGLU, K. et al. The investigation of neonatal MK-801 administration and physical environmental enrichment on emotional and cognitive functions in adult Balb/c mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 102, n. 3, p. 407–414, 2012.

AKILLIOGLU, K.; BINOKAY, S.; KOCAHAN, S. The effect of neonatal N-methyl-d-aspartate receptor blockade on exploratory and anxiety-like behaviors in adult BALB/c and C57BL/6 mice. *Behavioural Brain Research*, v. 233, n. 1, p. 157–161, 2012.

AMANI, M. et al. Neonatal NMDA receptor blockade alters anxiety- and depression-related behaviors in a sex-dependent manner in mice. *Neuropharmacology*, v. 73, p. 87–97, 2013.

AMANN, L. C. et al. Mouse behavioral endophenotypes for schizophrenia. *Brain Research Bulletin*, v. 83, n. 3–4, p. 147–161, 2010.

AMATO, D.; VERNON, A. C.; PAPALEO, F. Dopamine, the antipsychotic molecule: A perspective on mechanisms underlying antipsychotic response variability. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 85, p. 146–159, 2018.

ANASTASIO, N. C. et al. Differential role of N-methyl-D-aspartate receptor subunits 2A and 2B in mediating phencyclidine-induced perinatal neuronal apoptosis and behavioral deficits. *Neuroscience*, v. 163, n. 4, p. 1181–1191, 2009.

ANASTASIO, N.; JOHNSON, K. Atypical anti-schizophrenic drugs prevent changes in cortical N-methyl-d-aspartate receptors and behavior following sub-chronic phencyclidine administration in developing rat pups. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 90, n. 4, p. 569–577, 2008.

ARINGHIERI, S. et al. Molecular targets of atypical antipsychotics: From mechanism of action to clinical differences. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 192, p. 20–41, 2018.

ARYUTOVA, K.; STOYANOV, D. Pharmaco-magnetic resonance as a tool for monitoring the medication-related effects in the brain may provide potential biomarkers for psychotic disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 17, 2021.

BAKSHI, V. P.; GEYER, M. A. Antagonism of phencyclidine-induced deficits in prepulse inhibition by the putative atypical antipsychotic olanzapine. *Psychopharmacology*, v. 122, n. 2, p. 198–201, 1995.

BALU, D. T. The NMDA Receptor and Schizophrenia. In: *Advances in Pharmacology*. [s.l.] Academic Press Inc., 2016. 76p. 351–382.

- BARKUS, C. et al. GluN1 hypomorph mice exhibit wide-ranging behavioral alterations. *Genes, Brain and Behavior*, v. 11, n. 3, p. 342–351, 2012.
- BARTH, C.; VILLRINGER, A.; SACHER, J. Sex hormones affect neurotransmitters and shape the adult female brain during hormonal transition periods. *Frontiers in Neuroscience*, v. 9, p. 1–20, 2015.
- BATOR, E. et al. Adolescent Social Isolation Affects Schizophrenia-Like Behavior in the MAM-E17 Model of Schizophrenia. *Neurotoxicity Research*, v. 34, n. 2, p. 305–323, 2018.
- BEHL, C. Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 3, n. 6, p. 433–442, 2002.
- BELFORTE, J. E. et al. Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nature Neuroscience*, v. 13, n. 1, p. 76–83, 2010.
- BERTRON, J. L.; SETO, M.; LINDSLEY, C. W. DARK Classics in Chemical Neuroscience: Phencyclidine (PCP). *ACS Chemical Neuroscience*, v. 9, n. 10, p. 2459–2474, 2018.
- BERVOETS, C. et al. The nature of the relationship of psychomotor slowing with negative symptomatology in schizophrenia. *Cognitive Neuropsychiatry*, v. 19, n. 1, p. 36–46, 2014.
- BIRNBAUM, R.; WEINBERGER, D. R. Genetic insights into the neurodevelopmental origins of schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 18, n. 12, p. 727–740, 2017.
- BLAS-VALDIVIA, V. et al. Neonatal bilateral lidocaine administration into the ventral hippocampus caused postpubertal behavioral changes: An animal model of neurodevelopmental psychopathological disorders. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, v. 5, n. 1, p. 15–22, 2009.
- BOCTOR, S. Y.; FERGUSON, S. A. Neonatal NMDA receptor antagonist treatments have no effects on prepulse inhibition of postnatal day 25 Sprague-Dawley rats. *NeuroToxicology*, v. 30, n. 1, p. 151–154, 2009.
- BOCTOR, S. Y.; FERGUSON, S. A. Altered adult locomotor activity in rats from phencyclidine treatment on postnatal days 7, 9 and 11, but not repeated ketamine treatment on postnatal day 7. *NeuroToxicology*, v. 31, n. 1, p. 42–54, 2010.
- BRAFF, D. L.; GEYER, M. A.; SWERDLOW, N. R. Human studies of prepulse inhibition of startle: Normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology*, v. 156, n. 2–3, p. 234–258, 2001.
- BROBERG, B. V. et al. Assessment of auditory sensory processing in a neurodevelopmental animal model of schizophrenia-Gating of auditory-evoked potentials and prepulse inhibition. *Behavioural Brain Research*, v. 213, n. 2, p. 142–147, 2010.

- BUBENÍKOVÁ-VALEŠOVÁ, V. et al. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 32, n. 5, p. 1014–1023, 2008.
- CÉLIA MOREIRA BORELLA, V. et al. Gender and estrous cycle influences on behavioral and neurochemical alterations in adult rats neonatally administered ketamine. *Developmental Neurobiology*, v. 76, n. 5, p. 519–532, 2016.
- CLOUTIER, M. et al. The economic burden of schizophrenia in the United States in 2013. *Journal of Clinical Psychiatry*, v. 77, n. 6, 2016.
- COLEY, A. A.; GAO, W. J. PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 82, n. August 2017, p. 187–194, 2018.
- CORCORAN, C. M. et al. The relationship of social function to depressive and negative symptoms in individuals at clinical high risk for psychosis. *Psychological Medicine*, v. 41, n. 2, p. 251–261, 2011.
- COYLE, J. T.; BRAD RUZICKA, W.; BALU, D. T. Fifty Years of Research on Schizophrenia: The Ascendance of the Glutamatergic Synapse. *American Journal of Psychiatry*, v. 177, n. 12, p. 1119–1128, 2020.
- DA SILVA, T. L.; RAVINDRAN, A. V. Contribution of sex hormones to gender differences in schizophrenia: A review. *Asian Journal of Psychiatry*, v. 18, n. 2015, p. 2–14, 2015.
- DAUVERMANN, M. R.; LEE, G.; DAWSON, N. Glutamatergic regulation of cognition and functional brain connectivity: insights from pharmacological, genetic and translational schizophrenia research. *British Journal of Pharmacology*, v. 174, n. 19, p. 3136–3160, 2017.
- DOBBING, J.; SANDS, J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Human Development*, v. 3, n. 1, p. 79–83, 1979.
- DU BOIS, T. M.; HUANG, X. F. Early brain development disruption from NMDA receptor hypofunction: relevance to schizophrenia. *Brain Research Reviews*, v. 53, n. 2, p. 260–270, 2007.
- DU BOIS, T. M.; HUANG, X. F.; DENG, C. Perinatal administration of PCP alters adult behaviour in female Sprague-Dawley rats. *Behavioural Brain Research*, v. 188, n. 2, p. 416–419, 2008.
- DU BOIS, T. M.; NEWELL, K. A.; HUANG, X. F. Perinatal phencyclidine treatment alters neuregulin 1/erbB4 expression and activation in later life. *European Neuropsychopharmacology*, v. 22, n. 5, p. 356–363, 2012.
- DUNCAN, G. E. et al. Deficits in sensorimotor gating and tests of social behavior in a genetic model of reduced NMDA receptor function. *Behavioural Brain Research*, v. 153, n. 2, p. 507–519, 2004.

EGERTON, A. et al. Glutamate in schizophrenia: Neurodevelopmental perspectives and drug development. *Schizophrenia Research*, v. 223, p. 59–70, 2020.

ERRICO, F. et al. Decreased levels of d-aspartate and NMDA in the prefrontal cortex and striatum of patients with schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, v. 47, n. 10, p. 1432–1437, 2013.

EUGENE, A. R.; MASIAK, J. A pharmacodynamic modelling and simulation study identifying gender differences of daily olanzapine dose and dopamine D2-receptor occupancy. *Nordic Journal of Psychiatry*, v. 71, n. 6, p. 417–424, 2017.

FARROW, T. F. D. et al. Structural brain correlates of unconstrained motor activity in people with schizophrenia. *British Journal of Psychiatry*, v. 187, p. 481–482, 2005.

FEINBERG, I. Schizophrenia: Caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *Journal of Psychiatric Research*, v. 17, n. 4, p. 319–334, 1982.

FEJGIN, K. et al. The atypical antipsychotic, aripiprazole, blocks phencyclidine-induced disruption of prepulse inhibition in mice. *Psychopharmacology*, v. 191, n. 2, p. 377–385, 2007.

FRANCESCHINI, A.; FATTORE, L. Gender-specific approach in psychiatric diseases: Because sex matters. *European Journal of Pharmacology*, v. 896, n. November 2020, 2021.

GAO, W. J. et al. Aberrant maturation and connectivity of prefrontal cortex in schizophrenia-contribution of NMDA receptor development and hypofunction. *Molecular Psychiatry*, v. 27, n. 1, p. 731–743, 2022.

GASKIN, P. L.; ALEXANDER, S. P.; FONE, K. C. Neonatal phencyclidine administration and post-weaning social isolation as a dual-hit model of “schizophrenia-like” behaviour in the rat. *Psychopharmacology*, v. 231, n. 12, p. 2533–2545, 2014.

GEYER, M. A.; DULAWA, S. C. Assessment of Murine Startle Reactivity, Prepulse Inhibition, and Habituation. *Current Protocols in Neuroscience*, v. 24, n. 1, p. 1–15, 2003.

GLEASON, S. D.; SHANNON, H. E. Blockade of phencyclidine-induced hyperlocomotion by olanzapine, clozapine and serotonin receptor subtype selective antagonists in mice. *Psychopharmacology*, v. 129, n. 1, 1997.

GOGOS, A. et al. Sex differences in schizophrenia, bipolar disorder, and post-traumatic stress disorder: Are gonadal hormones the link? *British Journal of Pharmacology*, v. 176, n. 21, p. 4119–4135, 2019.

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*, v. 219, n. 1, p. 213–224, 2012.

GOODLETT, C. R.; HORN, K. H. Mechanisms of alcohol-induced damage to the

- developing nervous system. *Alcohol Research and Health*, v. 25, n. 3, p. 175–184, 2001.
- GOODLETT, C. R.; HORN, K. H.; ZHOU, F. C. Alcohol teratogenesis: Mechanisms of damage and strategies for intervention. *Experimental Biology and Medicine*, v. 230, n. 6, p. 394–406, 2005.
- GRAYSON, B. et al. Postnatal Phencyclidine (PCP) as a Neurodevelopmental Animal Model of Schizophrenia Pathophysiology and Symptomatology: A Review. In: *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. [s.l.: s.n.]29p. 403–428.
- HAHN, C. G. et al. Altered neuregulin 1-erbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Nature Medicine*, v. 12, n. 7, p. 824–828, 2006.
- HALENE, T. B. et al. Assessment of NMDA receptor NR1 subunit hypofunction in mice as a model for schizophrenia. *Genes, Brain and Behavior*, v. 8, n. 7, p. 661–675, 2009.
- HÁLFDÁNARSON, Ó. et al. International trends in antipsychotic use: A study in 16 countries, 2005–2014. *European Neuropsychopharmacology*, v. 27, n. 10, p. 1064–1076, 2017.
- HARRISBERGER, F. et al. Alterations in the hippocampus and thalamus in individuals at high risk for psychosis. *npj Schizophrenia*, v. 2, 2016.
- HARVEY, L.; BOKSA, P. Do prenatal immune activation and maternal iron deficiency interact to affect neurodevelopment and early behavior in rat offspring? *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 35, p. 144–154, 2014.
- HENSON, M. A. et al. Developmental regulation of the NMDA receptor subunits, NR3A and NR1, in human prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, v. 18, n. 11, p. 2560–2573, 2008.
- HERNÁNDEZ-FRAUSTO, M.; LÓPEZ-RUBALCAVA, C.; GALVÁN, E. J. Progressive Alterations in Synaptic Transmission and Plasticity of Area CA1 Precede the Cognitive Impairment Associated with Neonatal Administration of MK-801. *Neuroscience*, v. 404, p. 205–217, 2019.
- HIDA, H. et al. Blonanserin ameliorates phencyclidine-induced visual-recognition memory deficits: The complex mechanism of blonanserin action involving D3-5-HT2A and D 1-NMDA receptors in the mPFC. *Neuropsychopharmacology*, v. 40, n. 3, p. 601–613, 2015.
- HJORTHØJ, C. et al. Years of potential life lost and life expectancy in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Psychiatry*, v. 4, n. 4, 2017.
- HOWES, O. D. et al. The Role of Genes, Stress, and Dopamine in the Development of Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, v. 81, n. 1, p. 9–20, 2017.
- HUHN, M. et al. Comparative efficacy and tolerability of 32 oral antipsychotics for the

acute treatment of adults with multi-episode schizophrenia: a systematic review and network meta-analysis. *The Lancet*, v. 394, n. 10202, p. 939–951, 2019.

HYUN, J. S.; INOUE, T.; HAYASHI-TAKAGI, A. Multi-scale understanding of nmda receptor function in schizophrenia. *Biomolecules*, v. 10, n. 8, p. 1–14, 2020.

IACCARINO, H. F. et al. The effect of transient increases in kynurenic acid and quinolinic acid levels early in life on behavior in adulthood: Implications for schizophrenia. *Schizophrenia Research*, v. 150, n. 2–3, p. 392–397, 2013.

JAARO-PELED, H.; SAWA, A. Neurodevelopmental Factors in Schizophrenia. *Psychiatric Clinics of North America*, v. 43, n. 2, p. 263–274, 2020.

JANHUNEN, S. K. et al. The subchronic phencyclidine rat model: Relevance for the assessment of novel therapeutics for cognitive impairment associated with schizophrenia. *Psychopharmacology*, v. 232, n. 21–22, p. 4059–4083, 2015.

KAAR, S. J. et al. Antipsychotics: Mechanisms underlying clinical response and side-effects and novel treatment approaches based on pathophysiology. *Neuropharmacology*, v. 172, p. 107704, 2020.

KAHN, R. S. et al. Schizophrenia. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 1, 2015.

KESBY, J. P. et al. Dopamine, psychosis and schizophrenia: The widening gap between basic and clinical neuroscience. *Translational Psychiatry*, v. 8, n. 1, 2018.

KIM, J. S. et al. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neuroscience Letters*, v. 20, n. 3, p. 379–382, 1980.

KINON, B. J. et al. Effective resolution with olanzapine of acute presentation of behavioral agitation and positive psychotic symptoms in schizophrenia. *Journal of Clinical Psychiatry*, v. 62, n. 2, 2001.

KJAERBY, C. et al. Repeated potentiation of the metabotropic glutamate receptor 5 and the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor modulates behavioural and GABAergic deficits induced by early postnatal phencyclidine (PCP) treatment. *Neuropharmacology*, v. 72, p. 157–168, 2013.

KLEIN, M. O. et al. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 39, n. 1, p. 31–59, 2019.

KORPI, E. R. et al. Cerebrospinal fluid amino acid concentrations in chronic schizophrenia. *Psychiatry Research*, v. 20, n. 4, p. 337–345, 1987.

KRISTIANSEN, L. V. et al. Changes in NMDA receptor subunits and interacting PSD proteins in dorsolateral prefrontal and anterior cingulate cortex indicate abnormal regional expression in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, v. 11, n. 8, p. 737–747, 2006.

- KRISTIANSEN, L. V. et al. Expression of the NR2B-NMDA receptor subunit and its Tbr-1/CINAP regulatory proteins in postmortem brain suggest altered receptor processing in schizophrenia. *Synapse*, v. 64, n. 7, p. 495–502, 2010.
- KRZYSTANEK, M.; PAŁASZ, A. NMDA receptor model of antipsychotic drug-induced hypofrontality. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 6, 2019.
- LALLY, J.; MACCABE, J. H. Antipsychotic medication in schizophrenia: A review. *British Medical Bulletin*, v. 114, n. 1, p. 169–179, 2015.
- LATYSHEVA, N. V.; RAYEVSKY, K. S. Chronic neonatal N-methyl-D-aspartate receptor blockade induces learning deficits and transient hypoactivity in young rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 27, n. 5, p. 787–794, 2003.
- LEE, G.; ZHOU, Y. NMDAR Hypofunction Animal Models of Schizophrenia. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 12, 2019.
- LEUCHT, S. et al. Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: A multiple-treatments meta-analysis. *The Lancet*, v. 382, n. 9896, p. 951–962, 2013.
- LI, C. et al. Sub-chronic Antipsychotic Drug Administration Reverses the Expression of Neuregulin 1 and ErbB4 in a Cultured MK801-Induced Mouse Primary Hippocampal Neuron or a Neurodevelopmental Schizophrenia Model. *Neurochemical Research*, v. 41, n. 8, p. 2049–2064, 2016.
- LI, M.; HE, E.; VOLF, N. Time course of the attenuation effect of repeated antipsychotic treatment on prepulse inhibition disruption induced by repeated phencyclidine treatment. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 98, n. 4, p. 559–569, 2011.
- LIM, A. L.; TAYLOR, D. A.; MALONE, D. T. Consequences of early life MK-801 administration: Long-term behavioural effects and relevance to schizophrenia research. *Behavioural Brain Research*, v. 227, n. 1, p. 276–286, 2012a.
- LIM, A. L.; TAYLOR, D. A.; MALONE, D. T. A two-hit model: Behavioural investigation of the effect of combined neonatal MK-801 administration and isolation rearing in the rat. *Journal of Psychopharmacology*, v. 26, n. 9, p. 1252–1264, 2012b.
- LIU, F. et al. Changes in gene expression after phencyclidine administration in developing rats: A potential animal model for schizophrenia. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 29, n. 3, p. 351–358, 2011.
- LODGE, D.; MERCIER, M. S. Ketamine and phencyclidine: The good, the bad and the unexpected. *British Journal of Pharmacology*, v. 172, n. 17, p. 4254–4276, 2015.
- LOKE, H.; HARLEY, V.; LEE, J. Biological factors underlying sex differences in neurological disorders. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 65, p. 139–150, 2015.

MARTINS-DE-SOUZA, D. et al. Proteome analysis of the thalamus and cerebrospinal fluid reveals glycolysis dysfunction and potential biomarkers candidates for schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, v. 44, n. 16, p. 1176–1189, 2010.

MCCUTCHEON, R. A.; ABI-DARGHAM, A.; HOWES, O. D. Schizophrenia, Dopamine and the Striatum: From Biology to Symptoms. *Trends in Neurosciences*, v. 42, n. 3, p. 205–220, 2019.

MCCUTCHEON, R. A.; KRYSTAL, J. H.; HOWES, O. D. Dopamine and glutamate in schizophrenia: biology, symptoms and treatment. *World Psychiatry*, v. 19, n. 1, p. 15–33, 2020.

MCCUTCHEON, R. A.; REIS MARQUES, T.; HOWES, O. D. Schizophrenia - An Overview. *JAMA Psychiatry*, v. 77, n. 2, p. 201–210, 2020.

MCGREGOR, C.; RIORDAN, A.; THORNTON, J. Estrogens and the cognitive symptoms of schizophrenia: Possible neuroprotective mechanisms. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 47, p. 19–33, 2017.

MOGHADAM, A. A. et al. Pairing of neonatal phencyclidine exposure and acute adolescent stress in male rats as a novel developmental model of schizophrenia. *Behavioural Brain Research*, v. 409, p. 113308, 2021.

MORRENS, M.; HULSTIJN, W.; SABBE, B. Psychomotor slowing in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, v. 33, n. 4, p. 1038–1053, 2007.

MURRAY, R. M. et al. 30 Years on: How the Neurodevelopmental Hypothesis of Schizophrenia Morphed into the Developmental Risk Factor Model of Psychosis. *Schizophrenia Bulletin*, v. 43, n. 6, p. 1190–1196, 2017.

NAKATANI-PAWLAK, A. et al. Neonatal phencyclidine treatment in mice induces behavioral, histological and neurochemical abnormalities in adulthood. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 32, n. 9, p. 1576–1583, 2009.

NAKAZAWA, K.; JEEVAKUMAR, V.; NAKAO, K. Spatial and temporal boundaries of NMDA receptor hypofunction leading to schizophrenia. *npj Schizophrenia*, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2017.

NAKAZAWA, K.; SAPKOTA, K. The origin of NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 205, p. 107426, 2020.

NOZARI, M. et al. Sex-specific restoration of MK-801-induced sensorimotor gating deficit by environmental enrichment. *Neuroscience*, v. 299, p. 28–34, 2015.

OKAMOTO, M. et al. Neonatal administration of phencyclidine decreases the number of putative inhibitory interneurons and increases neural excitability to auditory paired clicks in the hippocampal CA3 region of freely moving adult mice. *Neuroscience*, v. 224, 2012.

OWEN, M. J.; SAWA, A.; MORTENSEN, P. B. Schizophrenia. *The Lancet*, v. 388, n.

10039, p. 86–97, 2016.

PATEL, P. K. et al. Adolescent Neurodevelopment and Vulnerability to Psychosis. *Biological Psychiatry*, v. 89, n. 2, p. 184–193, 2021.

PEN, G. Le; JAY, T. M.; KREBS, M. O. Effect of antipsychotics on spontaneous hyperactivity and hypersensitivity to MK-801-induced hyperactivity in rats prenatally exposed to methylazoxymethanol. *Journal of Psychopharmacology*, v. 25, n. 6, p. 822–835, 2011.

PERÄLÄ, J. et al. Lifetime prevalence of psychotic and bipolar I disorders in a general population. *Archives of General Psychiatry*, v. 64, n. 1, p. 19–28, 2007.

PERRY, T. L. Normal cerebrospinal fluid and brain glutamate levels in schizophrenia do not support the hypothesis of glutamatergic neuronal dysfunction. *Neuroscience Letters*, v. 28, n. 1, p. 81–85, 1982.

PINAR, N. et al. Effect of clozapine on locomotor activity and anxiety-related behavior in the neonatal mice administered MK-801. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, v. 15, n. 3, p. 74–79, 2015.

PLATAKI, M. E. et al. Effect of Neonatal Treatment With the NMDA Receptor Antagonist, MK-801, During Different Temporal Windows of Postnatal Period in Adult Prefrontal Cortical and Hippocampal Function. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 15, p. 1–15, 2021.

QUEDNOW, B. B. et al. Impaired Sensorimotor Gating of the Acoustic Startle Response in the Prodrome of Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, v. 64, n. 9, p. 766–773, 2008.

RAJAGOPAL, L. et al. Pimavanserin augments the efficacy of atypical antipsychotic drugs in a mouse model of treatment-refractory negative symptoms of schizophrenia. *Behavioural Brain Research*, v. 422, 2022.

RAO, N. et al. Impaired prefrontal cortical dopamine release in schizophrenia during a cognitive task: A [¹¹C]FLB 457 positron emission tomography study. *Schizophrenia Bulletin*, v. 45, n. 3, p. 670–679, 2019.

RASMUSSEN, B. A. et al. Long-term effects of developmental PCP administration on sensorimotor gating in male and female rats. *Psychopharmacology*, v. 190, n. 1, p. 43–49, 2007.

RATAJCZAK, P.; WOŹNIAK, A.; NOWAKOWSKA, E. Animal models of schizophrenia: Developmental preparation in rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, v. 73, n. 4, p. 472–484, 2013.

RIECHER-RÖSSLER, A.; BUTLER, S.; KULKARNI, J. Sex and gender differences in schizophrenic psychoses—a critical review. *Archives of Women's Mental Health*, v. 21, n. 6, p. 627–648, 2018.

RIETSCHER, L. et al. Clinical high risk for psychosis: gender differences in symptoms and social functioning. *Early Intervention in Psychiatry*, v. 11, n. 4, p. 306–313, 2017.

RODRÍGUEZ, G. et al. Δ 9-tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC) administration after neonatal exposure to phencyclidine potentiates schizophrenia-related behavioral phenotypes in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 159, p. 6–11, 2017.

RUETER, L. E. et al. Chronic low dose risperidone and clozapine alleviate positive but not negative symptoms in the rat neonatal ventral hippocampal lesion model of schizophrenia. *Psychopharmacology*, v. 176, n. 3–4, p. 312–319, 2004.

SAKURAI, T. et al. Converging models of schizophrenia - Network alterations of prefrontal cortex underlying cognitive impairments. *Progress in Neurobiology*, v. 134, p. 178–201, 2015.

SAKURAI, T.; GAMO, N. J. Cognitive functions associated with developing prefrontal cortex during adolescence and developmental neuropsychiatric disorders. *Neurobiology of Disease*, v. 131, 2019.

SALMANI, N. et al. Nicotine-conditioned place preference, reversal learning and social interaction in MK-801-induced schizophrenia model: Effects of post-weaning enriched environment. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 49, n. 8, p. 871–880, 2022.

SAMS-DODD, F. Effects of continuous D-amphetamine and phencyclidine administration on social behaviour, stereotyped behaviour, and locomotor activity in rats. *Neuropsychopharmacology*, v. 19, n. 1, p. 18–25, 1998.

SAMS-DODD, F. Phencyclidine in the social interaction test: An animal model of schizophrenia with face and predictive validity. *Reviews in the Neurosciences*, v. 10, n. 1, p. 59–90, 1999.

SANO, W. et al. Enhanced Persistency of Resting and Active Periods of Locomotor Activity in Schizophrenia. *PLoS ONE*, v. 7, n. 8, p. 1–7, 2012.

SANTOS, S. et al. Male sex bias in early and late onset neurodevelopmental disorders: Shared aspects and differences in Autism Spectrum Disorder, Attention Deficit/hyperactivity Disorder, and Schizophrenia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 135, 2022.

SELEMON, L. D.; ZECEVIC, N. Schizophrenia: A tale of two critical periods for prefrontal cortical development. *Translational Psychiatry*, v. 5, n. 8, p. e623-11, 2015.

SIGURDSSON, T. Neural circuit dysfunction in schizophrenia: Insights from animal models. *Neuroscience*, v. 321, p. 42–65, 2016.

SIRCAR, R.; SOLIMAN, K. F. A. Effects of postnatal PCP treatment on locomotor behavior and striatal D2 receptor. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 74, n. 4, p. 943–952, 2003.

- SLIFSTEIN, M. et al. Deficits in prefrontal cortical and extrastriatal dopamine release in schizophrenia a positron emission tomographic functional magnetic resonance imaging study. *JAMA Psychiatry*, v. 72, n. 4, p. 316–324, 2015.
- SMEJKALOVA, T.; WOOLLEY, C. S. Estradiol acutely potentiates hippocampal excitatory synaptic transmission through a presynaptic mechanism. *Journal of Neuroscience*, v. 30, n. 48, p. 16137–16148, 2010.
- SNYDER, M. A.; GAO, W. J. NMDA receptor hypofunction for schizophrenia revisited: Perspectives from epigenetic mechanisms. *Schizophrenia Research*, v. 217, p. 60–70, 2020.
- STEPNICKI, P.; KONDEJ, M.; KACZOR, A. A. Current concepts and treatments of schizophrenia. *Molecules*, v. 23, n. 8, 2018.
- TENDILLA-BELTRÁN, H. et al. The prefrontal cortex as a target for atypical antipsychotics in schizophrenia, lessons of neurodevelopmental animal models. *Progress in Neurobiology*, v. 199, 2021.
- THOMPSON, P. M.; EGBUFOAMA, S.; VAWTER, M. P. SNAP-25 reduction in the hippocampus of patients with schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 27, n. 3, p. 411–417, 2003.
- TOYOOKA, K. et al. Selective reduction of a PDZ protein, SAP-97, in the prefrontal cortex of patients with chronic schizophrenia. *Journal of Neurochemistry*, v. 83, n. 4, p. 797–806, 2002.
- TREEN, D. et al. Are there glutamate abnormalities in subjects at high risk mental state for psychosis? A review of the evidence. *Schizophrenia Research*, v. 171, n. 1–3, p. 166–175, 2016.
- TURETSKY, B. I. et al. Neurophysiological endophenotypes of schizophrenia: The viability of selected candidate measures. *Schizophrenia Bulletin*, v. 33, n. 1, p. 69–94, 2007.
- UNO, Y.; COYLE, J. T. Glutamate hypothesis in schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, v. 73, n. 5, p. 204–215, 2019.
- VAN DEN BUUSE, M. et al. Selective enhancement of NMDA receptor-mediated locomotor hyperactivity by male sex hormones in mice. *Psychopharmacology*, v. 234, n. 18, p. 2727–2735, 2017.
- VAN DEN EYNDE, K. et al. Hypolocomotive behaviour associated with increased microglia in a prenatal immune activation model with relevance to schizophrenia. *Behavioural Brain Research*, v. 258, n. 2014, p. 179–186, 2014.
- VOJTECHOVA, I. et al. Behavioral alterations and decreased number of parvalbumin-positive interneurons in wistar rats after maternal immune activation by lipopolysaccharide: Sex matters. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 6, 2021.

- WALDER, D. J. et al. Sexual dimorphisms and prediction of conversion in the NAPLS psychosis prodrome. *Schizophrenia Research*, v. 144, n. 1–3, p. 43–50, 2013.
- WALKER, Q. D.; RAY, R.; KUHN, C. M. Sex differences in neurochemical effects of dopaminergic drugs in rat striatum. *Neuropsychopharmacology*, v. 31, n. 6, p. 1193–1202, 2006.
- WANG, C. et al. Long-term behavioral and neurodegenerative effects of perinatal phencyclidine administration: Implications for schizophrenia. *Neuroscience*, v. 107, n. 4, p. 535–550, 2001.
- WANG, C. et al. Blockade of phencyclidine-induced cortical apoptosis and deficits in prepulse inhibition by M40403, a superoxide dismutase mimetic. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 304, n. 1, p. 266–271, 2003.
- WANG, C. et al. Potential mechanisms for phencyclidine/ketamine-induced brain structural alterations and behavioral consequences. *NeuroToxicology*, v. 76, n. November 2019, p. 213–219, 2020.
- WANG, Y. et al. Prenatal chronic mild stress induces depression-like behavior and sex-specific changes in regional glutamate receptor expression patterns in adult rats. *Neuroscience*, v. 301, p. 363–374, 2015.
- WEGRZYN, D.; JUCKEL, G.; FAISSNER, A. Structural and Functional Deviations of the Hippocampus in Schizophrenia and Schizophrenia Animal Models. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 10, 2022.
- WEICKERT, C. S. et al. Molecular evidence of N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, v. 18, n. 11, p. 1185–1192, 2013.
- WEINBERGER, D. R. Implications of Normal Brain Development for the Pathogenesis of Schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, v. 44, n. 7, p. 660–669, 1987.
- WICKENS, M. M.; BANGASSER, D. A.; BRIAND, L. A. Sex differences in psychiatric disease: A focus on the glutamate system. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 11, p. 1–12, 2018.
- WILLIAMS, O. O. F. et al. Sex differences in dopamine receptors and relevance to neuropsychiatric disorders. *Brain Sciences*, v. 11, n. 9, 2021.
- WINSHIP, I. R. et al. An Overview of Animal Models Related to Schizophrenia. *Canadian Journal of Psychiatry*, v. 64, n. 1, p. 5–17, 2019.
- WU, Z. et al. The role of N-methyl-D-aspartate receptors and metabotropic glutamate receptor 5 in the prepulse inhibition paradigms for studying schizophrenia: Pharmacology, neurodevelopment and genetics. *Behavioural Pharmacology*, v. 29, n. 1, p. 13–27, 2018.
- ZHANG, R. et al. Myelination deficit in a phencyclidine-induced neurodevelopmental model of schizophrenia. *Brain Research*, v. 1469, p. 136–143, 2012.

ZHOU, Y. et al. Prefrontal cortex and the dysconnectivity hypothesis of schizophrenia. *Neuroscience Bulletin*, v. 31, n. 2, p. 207–219, 2015.

ZHU, D. et al. Postnatal Administration of Dizocilpine Inhibits Neuronal Excitability in PFC and Induces Social Deficits Detected by MiceProfiler. *Molecular Neurobiology*, v. 54, n. 10, p. 8152–8161, 2017.

ZIERMANS, T. B. et al. Reduced prepulse inhibition as an early vulnerability marker of the psychosis prodrome in adolescence. *Schizophrenia Research*, v. 134, n. 1, p. 10–15, 2012.

ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética para Uso Animal



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Dependência à nicotina e esquizofrenia: o que há por trás dessa associação? busca pelos mecanismos biológicos**", registrada com o nº 033/2018, sob a responsabilidade de **Yael de Abreu Villaça** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 24/05/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	24/05/2022 Validade estendida: 24/05/2024
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57BL/6
Nº de animais	576
Peso/idade	03 - 30 g / 07 – 60 dias
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 12 de Abril de 2022.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ