

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Determinação dos efeitos da suplementação de Ômega-3 em um modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia induzido por poly(I:C) em ratos neonatos.

Eduarda Dias da Rosa

Orientadora
Profa. Dra. Clarissa Severino Gama

Porto Alegre, março de 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Determinação dos efeitos da suplementação de Ômega-3 em um modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia induzido por poly(I:C) em ratos neonatos.

Eduarda Dias da Rosa

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, março de 2018.

CIP - Catalogação na Publicação

Rosa, Eduarda Dias da

Determinação dos efeitos da suplementação de Ômega-3 em um modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia induzido por poly(I:C) em ratos neonatos. / Eduarda Dias da Rosa. -- 2018.

92 f.

Orientador: Clarissa Severino Gama.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Esquizofrenia. 2. Ômega-3. 3. Poly(I:C). 4. Desafio imune neonatal. I. Gama, Clarissa Severino, orient. II. Título.

“What would life be if we had no courage to attempt anything?”

Vincent Van Gogh

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Clarissa Gama, agradeço pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela orientação, ensinamentos e disponibilidade.

À bancada do Laboratório de Psiquiatria Molecular, pela troca de experiências, descontração e apoio. Principalmente aos ICs, Larissa Oliveira, Érica Aguar, Gabriel Henrique e Barbara Antqueviezc por toda ajuda no dia a dia, dedicação e alegria.

Aos meus queridos amigos do 'Sofrimento Molecular', Luiza Géa, Diego Rabelo, Thaís Martini e Gabriela Berni, que além de grandes amigos são grandes profissionais. Tornaram os meus dias mais felizes! Uma honra poder aprender e conviver com vocês.

À minha amiga Luiza Géa, que foi fundamental para que eu conseguisse desenvolver este trabalho. Obrigada pela atenção, pelo tempo, pelas ideias e pela amizade.

À Pâmela Ferrari, Bruna Panizzutti e Carolina Gubert, por estarem sempre presentes na minha vida.

Aos meus colegas de faculdade Fernanda Ferreira, Lucas Giombelli, Ágata Mantese e Jéssica Bauer, que apesar da distância sempre estão dispostos a uma boa conversa e risadas.

À minha família, pelo amor, confiança e apoio oferecidos durante toda minha vida. Por serem meu exemplo de força, perseverança, coragem e vontade de ir sempre além. Sem vocês, nada seria possível!

Ao meu namorado, Luciano Bianchi, incentivador e apoiador da minha vida. Obrigada pelo carinho, paciência e confiança.

SUMÁRIO

PARTE I

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
LISTA DE FIGURAS.....	4
1. INTRODUÇÃO	5
1.1. ESQUIZOFRENIA	5
1.2. NEUROFISIOPATOLOGIA DA ESQUIZOFRENIA.....	6
1.3. HIPÓTESE DOPAMINÉRGICA E HIPÓTESE GLUTAMATÉRGICA	7
1.4. ESQUIZOFRENIA E SISTEMA IMUNE.....	8
1.5. ESQUIZOFRENIA E ESTRESSE OXIDATIVO	9
1.6. ESQUIZOFRENIA E NEUROPLASTICIDADE	10
1.7. ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS	11
1.8. ESQUIZOFRENIA E ÔMEGA-3	13
1.9. MODELOS ANIMAIS DE ESQUIZOFRENIA E POLY(I:C)	15
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	18
3.1. OBJETIVO GERAL	18
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18

PARTE II

4. RESULTADOS.....	20
4.1. CAPÍTULO I	20

PARTE III

5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO.....	59
7. REFERÊNCIAS	60
ANEXOS	73
1. APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA / HCPA)	74
2. INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE MANUSCRITO NA REVISTA <i>SCHIZOPHRENIA RESEARCH</i>	75

PARTE I

RESUMO

A hipótese neurodesenvolvimental da esquizofrenia (SZ) tem origem numa perturbação do desenvolvimento ou maturação encefálica no período perinatal. Nesse contexto, objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação com ômega-3 (ω -3) em dois diferentes períodos de vida (período de crescimento fetal e durante a adolescência) em parâmetros comportamentais e bioquímicos em um modelo de desafio imune neonatal induzido por ácido poliinosínico:policitidílico (Poly(I:C)). Para isso, fêmeas wistar grávidas foram divididas em dois grupos para o tratamento de prevenção a partir do 16º ao 21º dia de gestação: um grupo recebeu ω -3 na dose de 0,8g/Kg via gavagem (*grupo O*), e o outro recebeu Tween (*grupo T*) na mesma dose e via. Após o nascimento, do 5º ao 7º dia pós-natal (PN) cada grupo de recém nascidos foi subdividido em dois grupos: um recebeu poly(I:C) na dose de 2mg/kg (*grupo OP ou TP*) e outro recebeu salina na dose 1 ml/kg (*grupo OS ou TS*), ambos via intraperitoneal. Na adolescência, do 30º ao 44º dia PN, os animais receberam o segundo tratamento de prevenção com ω -3, seguindo a mesma suplementação da gestação: com ω -3 (*grupo OPO, TPO e TSO*) ou Tween (*grupo OPT, OST, TPT e TST*). No total, foram 7 grupos de tratamento (n~15 animais/grupo): TST, TPT, TSO, TPO, OST, OPT e OPO. No 45º dia PN foram realizados os testes comportamentais de Y-maze, campo aberto e interação social (*three-chamber sociability and social novelty*). Ao final foi realizada a eutanásia dos animais seguida da coleta do sangue troncular e dissecação das estruturas cerebrais - córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo (HC). O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e o estresse oxidativo, através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathione peroxidase (GPx), foram avaliadas no soro e nas estruturas cerebrais. Os resultados foram expressos em mediana e intervalo interquartil (IQR). A análise foi realizada por Mann-Whitney U para comparações entre dois grupos (TST x TPT) e, para comparações múltiplas, empregou-se Kruskal-Wallis. Os resultados mostram que a administração neonatal de poly(I:C) foi capaz de induzir um comprometimento significativo na interação social e no interesse por novos conspecificos quando comparado ao controle (TST), sendo estes comportamentos considerados como um sintoma negativos da SZ. O desafio imune também aumentou significativamente a peroxidação lipídica no HC. A associação de suplementação ω -3 durante o crescimento fetal e durante a adolescência (OPO) foi capaz de proteger os animais de déficits de interesse social quando comparados ao grupo TPT. Além disso, apresentou níveis séricos significativamente elevados de BDNF e níveis mais baixos de peroxidação lipídica no HC do que o grupo TPT. Em conclusão, os resultados do presente trabalho mostram de forma inédita o efeito benéfico da suplementação subsequente com ω -3 em dois períodos distintos da vida de ratos submetidos a um modelo neurodesenvolvimental de SZ. Embora os mecanismos por trás desses resultados não sejam totalmente elucidados, o estudo acrescenta evidências dos benefícios da suplementação com ω -3 em pacientes com risco de desenvolver SZ.

Palavras-chave: Esquizofrenia. Ômega-3. Poly(I:C). Desafio imune neonatal. Interação social.

ABSTRACT

The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia (SZ) originates in a disturbance of development or maturation of the brain in the perinatal period. In this context, the objective of this study was to evaluate the effect of omega-3 (ω -3) supplementation on behavioral and biochemical parameters in a neonatal immune challenge model induced by polyinosinic:polycytidylic acid (Poly(I:C)) in two different periods of life (fetal growth period and adolescence). For this, pregnant rats were divided into two groups for the prevention treatment from the GD16 to 21: one group received ω -3 0.8 g/kg (*group O*); and the other received Tween (*group T*) at the same dose, serving as control group, both via orogastric gavage once daily. From the postnatal day (PN) 5 to 7, each offspring (from group O and T) was divided into two subgroups: one received poly(I:C) 2mg/kg i.p. (*groups OP and TP*) and the other received saline 1ml/kg i.p. (*groups OS and TS*). In the adolescence, from the PN30 to 44, the offspring was treated with ω -3 (*groups OPO, TPO and TSO*) or Tween (*groups OPT, OST, TPT and TST*), following the same supplementation protocol of pregnant rats (*group O* and *group T*). In total, rats were divided 7 treatment groups ($n \sim 15$ animals per group): TST (control group), TPT, TSO, TPO, OST, OPT and OPO. On the PN45 all groups were submitted to the behavioral tests of Y-maze, open field and social interaction (three-chamber sociability and social novelty). At the end, the euthanasia of the animals was performed, followed by the collection of the trunk blood and dissection of the cerebral structures - prefrontal cortex (CPF) and hippocampus (HC). Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and oxidative stress, through thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and glutathione peroxidase (GPx), were evaluated in serum and brain structures. The results were expressed as median and interquartile range (IQR). The analysis was performed by Mann-Whitney U for comparisons between two groups (TST x TPT). For multiple comparisons Kruskal-Wallis was used. The results show that the neonatal administration of poly(I:C) was able to induce a significant impairment in social interaction and interest in new conspecifics when compared to control (TST), being these behaviors considered negative symptoms of SZ. The association of ω -3 supplementation during fetal growth and during adolescence (OPO) was able to protect the animals from social interest deficits when compared to the TPT group. In addition, the OPO group had significantly elevated serum levels of BDNF and lower levels of lipid peroxidation in HC than the TPT group. In conclusion, the results of the present study unprecedentedly show the beneficial effect of subsequent supplementation with ω -3 in two distinct periods of life of rats submitted to a neurodevelopmental model of SZ. Although the mechanisms behind these results are not fully elucidated, the study adds evidence of the benefits of ω -3 supplementation in subjects with risk for developing SZ.

Keywords: Schizophrenia. Omega-3. Poly(I:C). Neonatal immune challenge. Social interaction.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA	Ácido α -linolênico
Akt/ PKB	Proteína cinase B
AP-1	Proteína ativadora-1
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
BHE	Barreira hematoencefálica
COX	Cicloxigenase
CPF	Córtex pré-frontal
CREB	Proteína de ligação responsiva ao AMPc
DHA	Ácido docosahexaenóico
DSM-V	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
EPA	Ácidos eicosapentaenoico
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GPx	Glutaiona peroxidase
GSH	Glutationa
HC	Hipocampo
IL-6	Interleucina 6
INF-β	Interferon β
iNOS	Oxido nítrico sintase induzida
IRF3	Fator regulador de interferon 3
LA	Ácido linolênico
LC:PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa
LOX	Lipoxigenase
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MDA	Malonilaldeído
MK-801	Dizocilpina
NFκB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartato
P38	Proteína cinase ativada por mitógeno p38
PI3-K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PN	Pós-natal
Poly(I:C)	Ácido poliinosínico:policitidílico
PPI	Inibição de pré-pulso
PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados
SNC	Sistema nervo central
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TLR-3	<i>Toll-like 3</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alpha
TRIF	Adaptador indutor de Interferon- β contendo domínio TIR
TRkB	Tirosina cinase B
UHR	<i>Ultra high risk</i>
ω-3	Ômega-3
ω-6	Ômega-6

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Via metabólica da síntese de ácidos graxos ômega-3. 12
- Figura 2.** Envolvimento das vias de sinalização TLR3 em distúrbios neuropsiquiátricos. 55
- Figura 3.** Os ácidos graxos ômega-3 aumentam a síntese e a sinalização intracelular de BDNF. 57

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esquizofrenia

A esquizofrenia é uma doença mental crônica e grave, comprometendo o funcionamento psicossocial do indivíduo nos mais variados graus. Atinge cerca de 1% da população mundial, considerando todo seu espectro de sintomas (Owen, Sawa, & Mortensen, 2016). Geralmente, é relatada como um pouco mais frequente nos homens do que nas mulheres. Sendo o começo da doença mais precoce para o sexo masculino, emergindo tipicamente no fim da adolescência e início da vida adulta (Kahn et al., 2015). Em relação às mulheres, um melhor prognóstico e uma melhor adaptação social é possível devido a um curso mais brando da doença (Mari & Leitão, 2000). Observa-se um risco aumentado de desenvolver esse transtorno quando há histórico familiar, principalmente em casos de parentesco de primeiro grau ou quando há mais de um membro da família afetado (Hilker et al., 2017).

Esse transtorno é o resultado de uma complexa interação entre fatores de risco genéticos e ambientais, que influenciam o desenvolvimento encefálico inicial e a trajetória da adaptação biológica às experiências de vida (Brown, 2011; Kahn et al., 2015). Neste contexto, eventos como processos inflamatórios, alterações de membrana celular e estresse oxidativo, estão fortemente ligados às hipóteses etiopatogênicas dessa doença (Diwadkar et al., 2014).

A esquizofrenia é considerada uma síndrome cujos sintomas podem ser divididos em dois grandes grupos: positivos (psicóticos) e negativos (American Psychiatric Association, 2013). Os sintomas positivos são alterações qualitativas em relação ao normal, que podem ser subdivididos em dois tipos: psicóticos e de desorganização. Incluem alucinações, percepções irreais de audição, delírios, comportamento amplamente desorganizado, agitação extrema, com perda do juízo crítico da realidade, ou seja, reflete um excesso e distorção de certas funções. Já os sintomas negativos aparentam uma diminuição ou perda de funções mentais, como por exemplo, embotamento afetivo, falta de motivação e iniciativa, apatia, alogia, avolição, indiferença emocional, entre outros (Schultz, North, & Shields, 2007).

Os pacientes também apresentam déficit em vários domínios cognitivos, sendo acentuados nos domínios de atenção/vigilância, linguagem, percepção, fluência

verbal, aprendizagem, memória, funcionamento executivo e processamento de informações. Além do déficit na cognição social, que é à base das interações sociais, interferindo na percepção das emoções, na resolução de problemas e na aptidão social (Vaz-Serra et al., 2010). O pobre funcionamento cognitivo é um dos principais fatores que explicam as elevadas taxas de deficiência e encargos associados a esquizofrenia (Ustün & Chisholm, 2001).

Na esquizofrenia a reatividade do substrato neural é alterada pelo tempo de doença. Onde o início dos sintomas psicóticos caracteriza o início da doença, porém os prejuízos cognitivos e funcionais ocorrem principalmente durante os primeiros 5 anos após o diagnóstico, também conhecido como período de diagnóstico recente ou estágio inicial. Após esse período tende-se a ter uma estabilidade dos prejuízos cognitivos e funcionais (Lieberman et al., 2001). Esse padrão de deterioração cognitiva tem sido amplamente descrito na literatura, e é um dos maiores responsáveis pela incapacidade apresentada pelos pacientes (Ayesa-Arriola et al., 2013; Harvey et al., 2012).

O diagnóstico é eminentemente clínico, considerando a duração dos sintomas, a capacidade funcional da paciente, histórico de desenvolvimento, histórico familiar e genético. É realizado através do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) e da CID 10 (Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde) (American Psychiatric Association, 2013).

1.2. Neurofisiopatologia da Esquizofrenia

A esquizofrenia apresenta uma etiologia multifatorial, englobando alterações genéticas (Ripke et al., 2014) - no neurodesenvolvimento - e vulnerabilidades ambientais precoces (Brown, 2011) - especialmente sofrimento perinatal (Ayhan et al., 2011). Juntos, estes fatores sugerem que o transtorno seja poligênico (Lewis & Lieberman, 2000). Os principais mecanismos fisiopatológicos, propostos para a esquizofrenia, envolvem alterações em diferentes sistemas de neurotransmissores, especialmente os sistemas dopaminérgico e glutamatérgico.

1.3. Hipótese Dopaminérgica e Hipótese Glutamatérgica

Em relação a fisiopatologia da esquizofrenia, a hipótese de hiperfunção dopaminérgica surgiu devido à capacidade dos antipsicóticos antagonizarem os receptores D2 e diminuírem os sintomas psicóticos nos pacientes (Kahn et al., 2015), e também por induzir quadros psicóticos com uso de anfetamina, agente caracterizado por induzir liberação de dopamina (Bressan & Pilowsky, 2003). Com isso, muitos autores sugerem um aumento da interatividade dopaminérgica na via mesolímbica cerebral como responsável pelos sintomas positivos da esquizofrenia, enquanto os denominados sintomas negativos são caracterizados pela pouca interatividade dopaminérgica na região mesocortical cerebral (Howes, Mccutcheon, & Stone, 2016; Miyake et al., 2011).

No entanto, a teoria dopaminérgica, vista isoladamente, é falha em explicar algumas questões, tais como a atividade limitada dos atipsicóticos clássicos em relação aos sintomas negativos e ao prejuízo cognitivo. Além do fato de 20-35% dos pacientes apresentarem uma resposta parcial ou nenhuma resposta ao tratamento antipsicótico (Plitman et al., 2014). Por isso passou-se a investigar participação de outros neurotransmissores na neurobiologia da esquizofrenia.

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), estando relacionado com mecanismos de neurodegeneração e com a gênese da psicose. Além de estar envolvido em funções cognitivas fundamentais - tais como memória e aprendizado (Coyle et al., 2010). A hipótese glutamatérgica da esquizofrenia, destaca o papel central do glutamato associado à hipofunção dos receptores glutamatérgicos tipo N-metil-Daspartato (NMDA). Esses receptores são essenciais para a plasticidade neuronal, incluindo sinaptogênese e excitotoxicidade. Além disso, a hiperatividade dos neurônios glutamatérgicos em diferentes regiões cerebrais, incluindo córtex pré-frontal (CPF), estaria relacionada aos sintomas positivos, cognitivos e manifestações emocionais do transtorno (Howes et al., 2016; Paz et al., 2008).

As vias neuronais do modelo dopaminérgico estão integradas com as vias do modelo glutamatérgico, principalmente em regiões específicas, fortemente envolvidas na fisiopatologia da doença, deixando claro que são conceitos complementares na compreensão da patogênese da esquizofrenia (Howes et al., 2016).

1.4. Esquizofrenia e Sistema Imune

Há muitas evidências de que a inflamação durante o desenvolvimento encefálico possa contribuir para a patogênese da esquizofrenia (Aguiar et al., 2010; Khandaker et al., 2015; Koga et al., 2015; Najjar et al., 2013). Como em outros distúrbios cerebrais, o sistema imunológico, por meio de inflamação local ou sistêmica, parece desempenhar um papel não só no desenvolvimento, mas também na progressão da doença. Sendo comum aos estudos a conclusão de que há um desequilíbrio pró-inflamatório (Khandaker et al., 2015).

Com base nisso, é plausível que mediadores pro e anti-inflamatórios possam entrar a partir da periferia, ou escapar do cérebro para a circulação sistêmica, em determinados cenários neuropatológicos (Leza et al., 2015). Uma vez dentro do SNC, o sinal das citocinas é amplificado, o que ativa a microglia, conduzindo à secreção de mais mediadores pró-inflamatórias, quimiocinas e proteases. Além disso, as citocinas também aumentam o estresse oxidativo através do aumento da concentração de óxido nítrico, e ativam o eixo hipotalâmico-pituitário-supra-renal, que conduz à liberação de cortisol. Essa cascata de sinalização pode contribuir para os sintomas negativos, cognitivos e positivos da esquizofrenia (Khandaker et al., 2015).

A microglia, quando previamente ativada, pode reagir mais fortemente a um novo estímulo (Cherry, Olschowka, & O'Banion, 2014), ou seja, é susceptível de manter uma memória imunológica da neuropatologia, que por sua vez está relacionado com a capacidade de resposta aumentada à uma nova inflamação sistêmica (Khandaker et al., 2015). Assim, insultos durante o desenvolvimento, como infecções sistêmicas graves na infância, podem ter um primeiro efeito na microglia, aumentando a ativação microglial e o risco de desenvolver psicose após infecções subsequentes (Perry, Nicoll, & Holmes, 2010).

Estudos demonstram a relação existente entre quadros infecciosos no período gestacional e o desenvolvimento da esquizofrenia, o que é muito relevante uma vez que essa doença é descrita como um transtorno de origem neurodesenvolvimental (Aguiar et al., 2010; Miller et al., 2013; Stöber, Franzek, & Beckmann, 1997). Evidências epidemiológicas mostram um risco aumentando de desenvolver a esquizofrenia depois da exposição pré-natal a infecções por vários patógenos diferentes, que incluem: influenza, rubéola, *Toxoplasma gondii*, herpes simples, entre

outros. Essa variedade de agentes infecciosos envolvidos, sugere que um fator comum da resposta imune a esses patógenos pode ser um mediador crítico da associação entre a infecção pré ou perinatal e o aumento do risco a esquizofrenia (Aguiar et al., 2010; Khandaker et al., 2015).

Além disso, a exposição a vírus neurotrópicos durante a infância está associada com risco aumentado de experiências psicóticas subclínicas na adolescência (Khandaker et al., 2014). Há também evidências de que o risco de esquizofrenia é quase o dobro em adultos que tiveram infecção viral no SNC durante a primeira infância, mostrando que a fase na qual a infecção ocorre, podendo aumentar o risco de distúrbios neuropsiquiátricos no futuro, não se limita ao período pré-natal (Khandaker et al., 2012). Assim, as ligações entre esquizofrenia e uma série de infecções, e também com doenças autoimunes (Eaton et al., 2006), sugerem um caminho comum subjacente, provavelmente envolvendo uma resposta imune inflamatória.

1.5. Esquizofrenia e Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é um estado em que há um desequilíbrio entre processos pró-oxidantes e o sistema de defesa antioxidante, que ocorre como uma consequência do aumento produção de radicais livres e/ou quando o sistema de defesa está ineficiente. Os efeitos tóxicos dos radicais livres causam defeitos na membrana celular, através da oxidação de seus lipídios, e também aumentam o metabolismo oxidativo de catecolaminas, principalmente no cérebro (Dadheech et al., 2008).

O cérebro é considerado particularmente vulnerável ao dano oxidativo por várias razões, mas principalmente pelo fato de apresentarem um alto consumo de oxigênio. Em condições em que há produção aumentada de radicais livres ou sua eliminação está diminuída, um desequilíbrio para o estado pró-oxidante é formado, que também pode assumir uma importância fundamental na patogênese de doenças cerebrais agudas ou crônicas, como a esquizofrenia (Dadheech et al., 2008; Koga et al., 2015; Mahadik & Scheffer, 1996). Portanto, acredita-se que o aumento do estresse oxidativo pode ser bastante relevante para a fisiopatologia da esquizofrenia.

Estudos que avaliam pacientes com diagnóstico de esquizofrenia mostram um aumento nos níveis de peroxidação lipídica em soro (Gama et al., 2006), plasma

(Dietrich-Muszalska et al., 2009), glóbulos vermelhos (Herken et al., 2001) e plaquetas (Dietrich-Muszalska et al., 2005). E esse aumento podem ser interpretados como um sinal da lesão peroxidativa de fosfolipídios de membrana e esta lesão poderia afetar o funcionamento neuronal por alterações da fluidez ou receptores da membrana (Mahadik, Evans, & Lal, 2001). Além disso, estudos indicam que os pacientes com diagnóstico de esquizofrenia tem uma redução na glutathiona (GSH) total (Lauer et al., 2000) e que níveis de glutathiona peroxidase (GPx) estão diminuídos tanto em pacientes tratados como em pacientes não tratados (Miljevic et al., 2010).

1.6. Esquizofrenia e Neuroplasticidade

Evidências indicam ainda que a esquizofrenia é um transtorno sutil do desenvolvimento e da plasticidade cerebral, uma vez que alterações na migração neuronal, sinaptogênese e “poda” neuronal são associadas ao aparecimento subsequente da doença (Miyamoto et al., 2003). Com isso, tem-se sugerido que mecanismos relacionados à neuroplasticidade estejam envolvidos no transtorno. Visto que um déficit no fornecimento de neurotrofina a neurônios corticais pode ser um fator subjacente na fisiopatologia da esquizofrenia (Gorski et al., 2003; Thome, Foley, & Riederer, 1998).

O fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) é uma neurotrofina envolvida de várias formas com o desenvolvimento e com a plasticidade neuronal, inclusive na maturação de neurônios inibitórios GABA. Evidências indicam que os níveis dessa neurotrofina estão diminuídos em portadores de esquizofrenia (Favalli et al., 2012), e essa diminuição já foi relacionada com o primeiro surto psicótico (Green et al., 2011) e com o prejuízo cognitivo apresentado por esses pacientes (Glantz & Lewis, 2000), mostrando a relação dessa neurotrofina e a patogênese da doença.

Além disso, anormalidades no cérebro de portadores de esquizofrenia tem sido relacionadas com uma alteração na expressão do gene BDNF. Estudos pós-mortem utilizando o CPF e o hipocampo (HC) desses pacientes, mostra reduções na expressão do RNAm de BDNF e da proteína BDNF madura (Hashimoto et al., 2005; Weickert et al., 2003)..

É possível que os níveis de BDNF reduzidos levem a uma deficiência no suporte neurotrófico, causando a proliferação diminuída e/ou “poda” excessiva de sinapses, que podem estar na base da fisiopatologia da esquizofrenia (Glantz & Lewis, 2000; Selemon, Rajkowska, & Goldman-Rakic, 1995).

1.7. Ácidos graxos poliinsaturados

Os ácidos graxos tem diferentes papéis fisiopatológicos no organismo, sendo de extrema importância para estrutura da membrana celular e processos metabólicos (Youdim, Martin, & Joseph, 2000). Sabe-se que os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) constituem 20% do peso seco do cérebro, e são críticos para o seu desenvolvimento normal, bem como para manutenção da estrutura da membrana e para função neuronal, embora o mecanismo exato da modulação da função neuronal ainda permanece desconhecido (Yamashima, 2008).

Os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LC:PUFAs) incluem a família de ácidos graxos ômega-6 (ω -6) e ômega-3 (ω -3) cujos precursores são o ácido linolênico (LA) e o ácido α -linolênico (ALA), respectivamente. O ω -6 e ω -3 são sintetizados durante o período perinatal e seus níveis podem ser mantidos na vida adulta apenas por ingestão dietética. Assim, estes ácidos devem ser obtidos através da alimentação para que possam ser aproveitados pelos tecidos corporais (Van der Kemp et al., 2012). O ácido graxo α -linolênico (ALA) está presente em óleos vegetais como linhaça, canola e soja, além de vegetais verdes folhosos. Deste ácido derivam os ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), ambos encontrados em peixes e óleos de peixes como sardinha, salmão, bagre e atum (Covington, 2004; Heird & Lapillonne, 2005).

O mecanismo proposto para os benefícios dos ácidos graxos parece estar relacionado à sua incorporação nas membranas celulares, promovendo mudanças na sua fluidez e função, bem como alterações na expressão gênica e produção de eicosanóides (Riediger et al., 2009). Os fosfolipídios do EPA e DHA são liberados da membrana celular pela ação da enzima fosfolipase A2, sendo metabolizados por duas vias. A primeira delas envolve as enzimas COX (ciclooxigenase) e LOX (lipoxigenase) e, a segunda, a via das resolvinas e protectinas (Balanza-Martinez et al., 2011; Riediger et al., 2009) (figura 1).

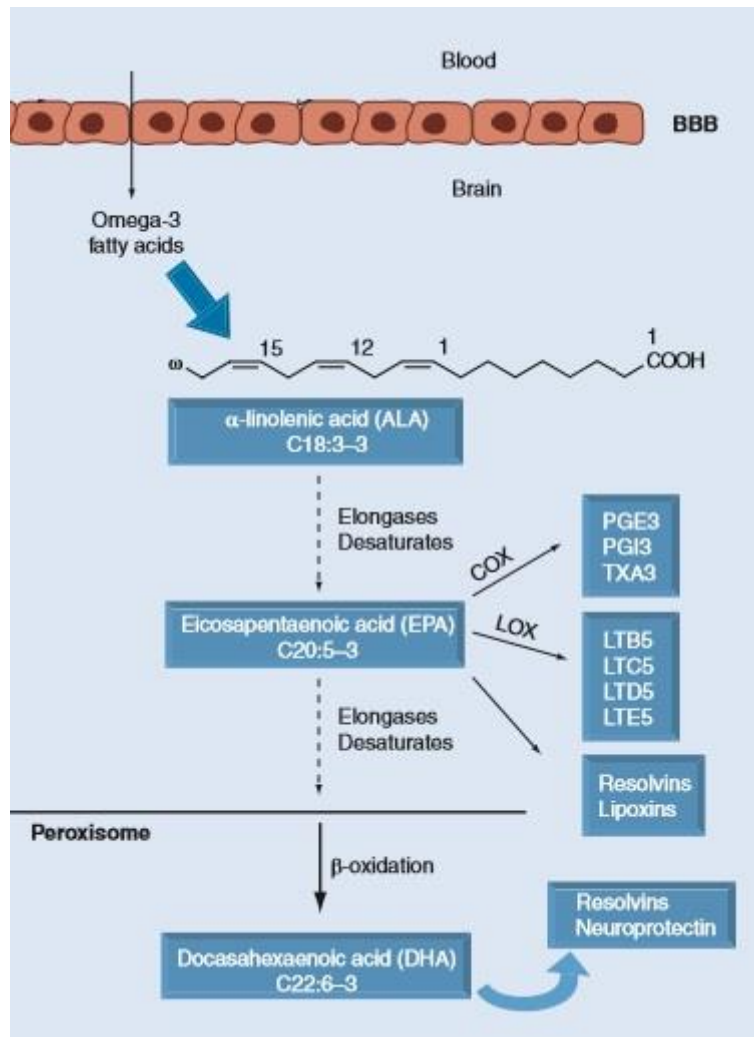


Figura 1. Via metabólica da síntese de ácidos graxos ômega-3. ALA é convertido em ácido graxo de cadeia longa através de reações de dessaturação e alongamento. A síntese de DHA requer a passagem de dos ácidos graxos precursores para o peroxissoma, onde sofrem um ciclo de β-oxidação para produzir DHA. EPA sintetiza prostanóides e leucotrienos pelas enzimas COX e LOX, respectivamente. EPA e DHA também podem sintetizar resolvinas: proteínas que possuem funções neuroprotetoras. Essas reações ocorrem principalmente no fígado, mas elas também podem ocorrer no cérebro, uma vez que omega-3 ultrapassa a BHE (adaptado de (Balanza-Martinez et al., 2011)

A maioria dos lipídios do cérebro são glicerofosfolídeos compostos principalmente por DHA e ácido araquidônico, onde exercem papéis importantes no desenvolvimento e funcionamento do SNC, uma vez que os PUFAs conseguem atravessar a BHE (Balanza-Martinez et al., 2011; Sastry, 1985). DHA é o principal LC:PUFA presente na substância cinzenta do cérebro dos mamíferos, correspondendo a aproximadamente 10-20% da composição dos PUFAs no córtex pré-frontal em adultos (Carver et al., 2001). Há evidências de que o acúmulo de DHA é crucial pro neurodesenvolvimento (McNamara, 2013) e pode exibir efeitos

neurotróficos (Sable, Kale, & Joshi, 2013) e neuroprotetores (McNamara, Vannest, & Valentine, 2015) no cérebro. Uma vez que o DHA liberado das membranas celulares - mediante a ativação da enzima fosfolipase A2, quando em situações de dano neuronal - origina um composto denominado Neuroprotectina D1, um docosanoide com importante papel neuroprotetor no SNC (Lukiw & Bazan, 2008).

Estudos em animais já demonstraram que a suplementação de ω -3 foi capaz de melhorar parâmetros em diferentes tarefas de memória e aprendizado em ratos Wistar (Chung, Chen, & Su, 2008), enquanto que uma restrição dietética desses ácidos graxos leva a uma piora nesses testes comportamentais (Lim et al., 2005). Além de reafirmarem a capacidade neuroprotetora e antioxidante atribuída ao ω -3 (Bas et al., 2007; Wu et al., 2004).

A deficiência dietética e baixos níveis endógenos de ácidos graxos ω -3 estão associados a um pior prognóstico de doenças psiquiátricas e alguns estudos clínicos evidenciaram que a suplementação destes ácidos foi benéfica em pacientes com depressão maior, transtorno bipolar e esquizofrenia (Peet & Stokes, 2005).

1.8. Esquizofrenia e Ômega-3

Distúrbios no metabolismo dos PUFAs são observados em pacientes com diagnóstico de esquizofrenia, o que levou à formulação da hipótese da membrana como um dos mecanismos fisiopatológicos propostos para esta doença (Horrobin et al., 1994; Horrobin, 1998; Ohara, 2007). Nesse contexto, a redução desses ácidos graxos está relacionada com o aumento da atividade da fosfolipase A2 (Law, Cotton, & Berger, 2006) e da peroxidação lipídica (Ohara, 2007). Bem como está relacionada com uma maior rigidez da membrana e com alterações na conformação e no funcionamento de proteínas, receptores e canais iônicos (van der Kemp et al., 2012).

Além disso, o ω -3 desempenham um papel central em vários estágios de desenvolvimento encefálico, especialmente no período embrionário, pré-natal e no pós-natal compreendendo até o segundo ano de vida (Mcnamara, 2013). São, portanto, importantes para o neurodesenvolvimento e em mecanismos biológicos de regulação do comportamento, ou seja, processos alterados na esquizofrenia e conhecidos por desempenhar um papel crucial na patogênese da doença (Berger et al., 2002; McNamara & Carlson, 2006).

A suplementação com ω -3 em modelos animais de esquizofrenia, induzidos por cetamina, demonstraram que esse PUFA foi capaz de: reduzir a atividade da acetilcolinesterase induzida pela cetamina nos tecidos cerebrais, fornecendo evidências de que os ω -3 e cetamina afetam o sistema colinérgico, que está alterado na doença (Zugno et al., 2015a); melhorar parâmetros oxidativos (Zugno et al., 2014) e níveis neutrotóxicos (Zugno et al., 2015b); bem como prevenir sintomas positivos, negativos e cognitivos induzidos pelo modelo (Gama et al., 2012).

Em um ensaio clínico randomizado controlado com placebo, resultados mostram que a intervenção de 6 meses com ω -3 pode ser um valioso complemento terapia, sendo capaz de diminuir a intensidade dos sintomas e de melhorar o nível de funcionamento em esquizofrênicos em primeiro episódio (Pawelczyk et al., 2016). Outro importante estudo publicado por Amminger e colaboradores (2010), mostrou o efeito do ω -3 como prevenção primária em populações com alto risco (UHR) de desenvolver psicose. A estatística esperada para conversão de psicose era de aproximadamente 30% e o grupo placebo seguiu essa probabilidade, mas o grupo que recebeu o tratamento com ω -3 durante 12 semanas, reduziu essa porcentagem para 5% (Amminger et al., 2010). Após 6 anos de acompanhamento dos pacientes, os pesquisadores constataram que o ω -3 também exerceu um efeito de prevenção para o desenvolvimento de outros transtornos, como depressão e ansiedade. Visto que o grupo que recebeu tratamento com ω -3 por 12 semanas na fase inicial do estudo, mostrou uma menor taxa de desenvolvimento de transtornos em relação ao grupo placebo (Amminger et al., 2015). O mesmo protocolo de intervenção com ômega-3 foi realizado em pacientes de um consórcio Norte-Americano de estudos longitudinais de pródromos (NAPLS), porém o ensaio foi insuficiente para replicar o efeito de conversão visto no estudo de Amminger e colaboradores. Uma vez que a taxa de conversão para psicose na presente amostra foi menor do que a tipicamente observada em uma população de alto risco e, apesar de ser demonstrada uma melhora geral dos sintomas e do funcionamento ao longo do tempo em todos os indivíduos, não houve evidência clara de um efeito diferencial na amostra que recebeu ômega-3 em comparação ao placebo (Cadenhead et al., 2017). Contudo, quando replicado em pacientes com UHR de um consórcio envolvendo Ásia, Austrália e Europa (NEURAPRO), não foram encontradas diferenças estatisticamente

significativas nas taxas de conversão entre os indivíduos que receberam ômega-3 e placebo (McGorry et al., 2017).

Com base em estudos pré-clínicos e em estudos clínicos, podemos entender porque os LC:PUFAs vem ganhando especial atenção e porque precisam ser melhor estudados em vários transtornos psiquiátricos, incluindo a esquizofrenia.

1.9. Modelos animais de Esquizofrenia e Poly(I:C)

Como descrito anteriormente, a esquizofrenia possui etiologia multifatorial, envolvendo fatores ambientais e genéticos, produzindo uma complexa síndrome. E, por tanto, é muito difícil de ser induzida em animais (Salgado, Hetem, & Sandner, 2006), contudo, o desenvolvimento de modelos animais mostra-se importante para a elucidação de suas bases biológicas e para investigação de alvos terapêuticos na fase pré-clínica (Lipska & Weinberger, 2000).

O modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia induzido em roedores pela administração do ácido poliinosínico:policitidílico (poly(I:C)), vem sendo muito empregada tanto via ativação imune materna como via ativação imune perinatal (Ibi & Yamada, 2015; Macêdo et al., 2012; U. Meyer & Feldon, 2012). Estes modelos são fundamentais para o estabelecimento de relações causais e para a identificação de mecanismos celulares e moleculares que afetam o desenvolvimento normal do cérebro em caso de exposições imunológicas do início da vida (Macêdo et al., 2012).

O poly(I:C) é um análogo sintético de RNA de cadeia dupla, que pode mediar respostas imunes através da ativação do receptores *Toll-like 3* (TLR3), ativando o sistema imune inato (U. Meyer & Feldon, 2012; Wang et al., 2004). Ou seja, induz respostas imunológicas análogas às observadas durante infecção viral, através da regulação positiva da expressão do complexo de histocompatibilidade (Verdijk et al., 1999), e mais notavelmente ao induzir a libertação de citocinas pró-inflamatórias (Doukas, Cutler, & Mordes, 1994; Kimura et al., 1994). Visto que, a administração sistêmica de poly(I:C) leva ao aumento os níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL) -6, fator de necrose tumoral (TNF)-alpha e IL-1 β dentro de 2 horas após a injeção (Bronson et al., 2012).

Este análogo sintético apresenta duas vantagens em comparação com uma infecção viral em um modelo animal: em primeiro lugar, ele desencadeia uma resposta

imune não específica, onde há indução de citocinas não acompanhadas pela produção de anticorpos específicos e de ácidos nucleicos virais; em segundo lugar, os efeitos de poly(I:C) estão limitadas no tempo (duração de aproximadamente 48 h) e, portanto, pode ser sincronizada com precisão para um período específico do neurodesenvolvimento (Zuckerman et al., 2003).

Estudos utilizando ativação imune materna, induzida por poly(I:C), mostram um impacto negativo sobre o desenvolvimento encefálico da prole (Réus et al., 2015; Van den Eynde et al., 2014). Além disso, o tratamento de ratos neonatos com poly(I:C) foi capaz de provocar disfunções cerebrais na idade adulta, caracterizadas pelo comprometimento da neurotransmissão glutamatérgica hipocampal (Ibi et al., 2009) e por prejuízos no comportamento desses animais, como por exemplo, déficits na interação social (Bitanirwe et al., 2010).

Ribeiro e colaboradores (2013) demonstraram que a administração neonatal de poly(I:C), do 5º ao 7º dia pós-natal (PN), foi capaz de causar déficits de PPI (inibição de pré-pulso) e de memória de trabalho, dois endofenótipos comportamentais para a esquizofrenia (Amann et al., 2010), apenas em animais em idade adulta (Ribeiro et al. 2013). Estes déficits comportamentais foram acompanhadas por um aumento progressivo na ativação microglial e na imunoexpressão de iNOS desde a adolescência até a idade adulta (Ribeiro et al., 2013).

2. JUSTIFICATIVA

Diversos estudos epidemiológicos sugerem que a infecção pré-natal e pós-natal do SNC, por diferentes agentes patogênicos, podem aumentar o risco para vários transtornos do neurodesenvolvimento, incluindo esquizofrenia. Evidenciando influência da ativação imune perinatal no desenvolvimento encefálico (Ibi & Yamada, 2015). Essa relação já foi demonstrada no tratamento de neonatos com poly(I:C) (2-6PN), onde esse análogo sintético RNA foi capaz de provocar disfunções cerebrais na idade adulta dos ratos, caracterizadas pelo comprometimento da neurotransmissão glutamatérgica hipocampal, por déficits de memória e no PPI e pelo prejuízo nos comportamentos sociais (Ibi et al., 2009). Sendo que déficits no PPI, aumento progressivo da ativação microglial e imunomarcção da iNOS já foram demonstrados a partir da PN30 (Ribeiro et al., 2013). Além disso, por se tratar a esquizofrenia de um transtorno neurodesenvolvimental, que normalmente se apresenta seus sintomas na adolescência ou em adultos jovens, a pesquisa de tratamentos que auxiliem, em longo prazo, quando aplicados nesse estágio, é de grande relevância.

Sendo assim, o uso de um modelo animal de esquizofrenia induzido por poly(I:C), prevenido com ω -3 - previamente e após a indução do comportamento tipo esquizofrênico - permitirá a avaliação das capacidades desse PUFA tanto sobre os sintomas (comportamento) quanto sobre rotas e substâncias mais específicas, tais como fatores neurotróficos e oxidantes, durante a adolescências dos animais. Esse estudo torna-se ainda mais relevante ao considerarmos que a deficiência dietética e, conseqüentemente, os baixos níveis endógenos de ω -3, estão associados a um pior prognóstico de doenças psiquiátricas, e que estudos já evidenciaram que a suplementação destes ácidos foi benéfica em pacientes com depressão maior, transtorno bipolar e esquizofrenia (Peet & Stokes, 2005). Além da capacidade neuroprotetora e antioxidante já descrita para esse ácido graxo (Bas et al., 2007; Wu et al., 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da suplementação com ômega-3 em dois diferentes períodos de vida (durante o crescimento fetal e durante a adolescência entre 30 e 44 dias) em parâmetros comportamentais e bioquímicos durante a adolescência dos animais em um modelo de esquizofrenia induzido por poly(I:C).

3.2. Objetivos Específicos

Caracterizar o comportamento tipo esquizofrênico apresentado pelos animais após o desafio imune com poly(I:C):

- Avaliar a atividade locomotora através do teste de campo aberto;
- Avaliar a interação social;
- Avaliar a memória de trabalho;

Realizar análises bioquímicas nas amostras de tecido cerebral e soro obtidos dos animais pelas quais se objetiva:

- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo, através dos níveis de peroxidação lipídica, além de avaliar a atividade das enzimas antioxidantes da glutathione peroxidase (GPx) nas amostras de córtex pré-frontal, hipocampo e soro obtidos dos animais;
- Quantificar os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em estruturas cerebrais (córtex pré-frontal e hipocampo) e soro.

Investigar o efeito da suplementação com ômega-3 tanto sobre os sintomas (comportamento) quanto sobre fatores neurotróficos e oxidantes nesse modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia:

- Avaliar o efeito da prevenção com ω -3 durante o período de crescimento fetal;
- Avaliar o efeito da prevenção com ω -3 durante a adolescências dos animais;
- Avaliar o efeito da suplementação subsequente de ω -3 em dois períodos diferentes da vida: durante o crescimento fetal e durante a adolescência.

PARTE II

4. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados sob a forma de um artigo científico que será submetido para publicação na revista *Schizophrenia Research*.

4.1. Capítulo I

Omega-3 supplementation during fetal growth and adolescence increases BDNF serum levels, prevents negative symptoms and brain oxidative damage: a Poly(I:C) schizophrenia model in rats.

Title: Omega-3 supplementation during fetal growth and adolescence increases BDNF serum levels, prevents negative symptoms and brain oxidative damage: a Poly(I:C) schizophrenia model in rats.

Category: Full-length paper

Authors: Eduarda Dias da Rosa^{1,2}, Luiza Paul Géa^{2,3}, Bruna Schilling Panizzutti^{2,4}, Letícia Czepielewski^{2,4}, Larissa Fagundes de Oliveira², Érica Zeferino Aguiar², Clarissa Severino Gama^{1,2,4}.

Author's affiliation:

¹ Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

² Laboratory of Molecular Psychiatry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

³ Department of Pharmacology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

⁴ Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

Corresponding author:

Clarissa Severino Gama

Laboratório de Psiquiatria Molecular – Centro de Pesquisa Experimental

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP 90035-903 – Porto Alegre – Brazil

Phone: +55 51 33598845

Fax: +55 51 33598846

Email: clarissasgama@gmail.com

Word count of the abstract: 246

Word count of the body of the manuscript: 3816

Number of references: 56

Number of figures: 3

Number of table: 1

Abstract

The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia (SZ) originates in a disturbance of development or maturation of the brain in the perinatal period. In this context, the objective of this study was to evaluate the effect of omega-3 supplementation on behavioral and biochemical parameters in a neonatal immune challenge model induced by polyinosinic:polycytidylic acid (Poly(I:C)) in two different periods of life (fetal growth period and adolescence). For this, pregnant rats were divided into two groups for treatment from the gestational day 16 to 21: one group received omega-3 and the other received Tween. From the postnatal day (PN) 5 to 7, offspring was divided into two subgroups: one received poly(I:C) and the other received saline. In the adolescence, from the PN30 to 44, the offspring groups was treated with omega-3 or Tween, following the same supplementation protocol of pregnant rats. On the PN45 all 7 groups were submitted to the behavioral tests of Y-maze, open field and social interaction. Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and oxidative stress, through thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and glutathione peroxidase, were evaluated in serum and brain structures. Our main result showed that the association of omega-3 supplementation during fetal growth and during adolescence was able to protect the animals from social interest deficits during adolescence. In addition, these animals had significantly elevated serum levels of BDNF and lower levels of lipid peroxidation in hippocampus. These results give additional support for the use of omega-3 supplement in subjects with risk for developing SZ.

Keywords: Schizophrenia. Omega-3. Poly(I:C). Neonatal immune challenge. Social interaction.

1. INTRODUCTION

Schizophrenia (SZ) has a multifactorial etiology, including genetic alterations (Ripke et al., 2014) – in neurodevelopment – and early environmental vulnerabilities (Brown, 2011) – especially perinatal suffering – which suggests that the disorder is polygenic (Lewis & Lieberman, 2000). Several epidemiological evidence suggest that prenatal and postnatal infection of the central nervous system (CNS) by different pathogens increase the risk for various neurodevelopmental disorders, including SZ (Khandaker et al., 2012; 2014; 2015; Koga et al, 2016) ; corroborating the influence of the perinatal immune activation in the encephalic development (Ibi & Yamada, 2015; Macêdo et al., 2012).

Polyinosinic:polycytidylic acid (poly(I:C)), a synthetic analogue of double-stranded RNA, can mediate immune responses through the activation of Toll-like receptors 3 (TLR3), activating the innate immune system and mimicking acute phase viral infection (Meyer & Feldon, 2010). Studies have demonstrated the treatment of newborn rats with poly(I:C) was able to induce brain dysfunction in adulthood. For instance, significant deficits in social interaction (Bitanhirwe et al., 2010) and in memory and pre-pulse inhibition (PPI) (Ibi et al., 2009; Ribeiro et al., 2013). These behavioral deficits were accompanied by a progressive increase in microglial activation and inducible nitric oxide synthase (iNOS) immunoexpression from periadolescence to adulthood (Ribeiro et al., 2013).

Although the etiology of SZ is not completely elucidated, evidence indicate that oxidative stress due to accumulation of reactive oxygen species (ROS) or imbalance in the activity of endogenous antioxidant systems is associated with the pathophysiology of the disease (Koga et al., 2016). It has been demonstrated that patients with SZ exhibit increased levels of lipid peroxidation, in serum (Gama et al., 2006), plasma (Dietrich-Muszalska et al., 2009), red blood cells (Herken et al., 2001) and platelet levels (Dietrich-Muszalska et al., 2005). In addition, activity of glutathione peroxidase (GPx) and total glutathione levels (GSH), a well-known intracellular antioxidant system is decreased in both treated and untreated SZ patients (Lauer et al., 2000; Miljevic et al., 2010).

Dysregulated synaptic plasticity with changes in neurotrophins may also contribute to the pathophysiology of SZ. The neurotrophin brain-derived neurotrophic factor

(BDNF) is considered a crucial protein in psychiatric illness and plays an important role in neurodevelopment and neural plasticity. Evidence indicate regardless of treatment the levels of BDNF are decreased in SZ patients (Favalli et al., 2012) and are related to the first psychotic episode (Green et al., 2011).

Currently, evidence supports the beneficial effects of the supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in a variety of neurodegenerative disorders and other neurological conditions (Dyall, 2015). Omega-3 is synthesized during the perinatal period and its benefits can only be maintained in adult life by dietary intake (Browning et al., 2012; Mcnamara, 2013). It has different pathophysiological roles in the body, being of utmost importance for cell membrane structure and metabolic processes which are essential components for brain function and transmission of neuronal impulses (McNamara & Carlson, 2006). The mechanism behind its benefit seems to be related to the incorporation of these fatty acids into cellular membranes, promoting changes in their fluidity and function (Dyall, 2015).

Omega-3 supplementation in an animal model of SZ induced by ketamine shown to prevent positive, negative and cognitive symptoms induced by the model (Gama et al., 2012). In addition, it is already demonstrated the effect of omega-3 treatment as a primary prevention in ultrahigh risk (UHR) populations of developing psychosis (Amminger et al., 2010). And after a 6-year follow-up of that population, the authors observed the group receiving omega-3 supplementation in the initial phase of the study exhibited lower rate of developing other psychiatry associated disorders, such as depression and anxiety, than the placebo group, evidencing a prevention effect of this fatty acid in psychotic disorder (Amminger et al., 2015). However, when replicated in UHR patients from a consortium involving Asia, Australia and Europe (NEURAPRO), no statistically significant differences in conversion rates were found between subjects receiving omega-3 and placebo (McGorry et al., 2017).

Based on previous findings, the aim of this study was to determine whether omega-3 prevention treatment could affect working memory, locomotor activity and social interaction during adolescence (prodromal phase where schizophrenic symptoms typically occur in humans) in neurodevelopmental model of SZ induced by poly(I:C). Additionally, we evaluate the impact of omega-3 supplementation on central and peripheral oxidative and neurotrophic parameters.

2. METHODS

2.1. Animals

A total of 21 adult Wistar rats (male:female=1:2) were used to breed, generating a total of 104 male and female pups. The animals were maintained at a controlled temperature (23 ± 1 °C) with a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM) and free access to water and food. Procedures were conducted in accordance with the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) guidelines for the care and use of laboratory animals. All animal treatments were approved by the institutional Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2.2. Drugs

Omega-3 PUFAs (VitGold, Paraná, Brazil) – composed by 18% eicosapentaenoic acid and 12% docosaexaenoic acid – at a dose of 0.8 g/kg without dilution. For the control group, Tween (polysorbate 20; Neon, São Paulo, Brazil) an inert oil with no impact on omega-3 fatty acid metabolism was chosen. Poly(I:C) (polyinosinicpolycytidylic acid potassium salt; Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) at a dose of 2mg/kg i.p. were prepared in water.

2.3. Experimental Design

Pregnant females were monitored for the insemination day, which was counted as gestational day 0 (GD0). Pregnant rats were divided into two groups for the prevention treatment from the GD16 to 21. One group received omega-3 0.8 g/kg (*group O*); and the other received Tween (*group T*) at the same dose, serving as control group, both via orogastric gavage once daily.

From the postnatal day (PN) 5 to 7, each offspring (from group O and T) was divided into two subgroups: one received poly(I:C) 2mg/kg i.p. (*groups OP and TP*) and the other received saline 1ml/kg i.p. (*groups OS and TS*) (Ribeiro et al., 2013). Translated to humans, the PN5-7 period is equivalent to the end of the third trimester

of pregnancy, and it is also a period of high vulnerability to developmental disorders (Semple et al., 2013).

In the adolescence, from the PN30 to 44, the offspring was treated with omega-3 (groups OPO, TPO and TSO) or Tween (groups OPT, OST, TPT and TST), following the same supplementation protocol of pregnant rats (*group O* and *group T*).

In total, rats were divided 7 treatment groups (n ~ 15 animals per group): TST (control group), TPT, TSO, TPO, OST, OPT and OPO. On the PN45 all groups were submitted to the behavioral tests followed by euthanasia, considering that behavioral changes and progressive increase of microglial activation and iNOS immunostaining have already been demonstrated from PN30 (Ribeiro et al., 2013). Figure1 presents an overview of the experimental design.

2.4. Behavioral Assessments

2.4.1. Working Memory Test

Spontaneous alternation task in the Y-maze was used to assess cognitive performance. Each rat was placed at the end of the same arm and allowed to freely move through the maze during 8 min. The number of alternations defined as entries in all three arms on consecutive occasions – was recorded. The percentage of alternations was calculated as the total of alternations/(total arm entries – 2), as previously described (Ribeiro et al., 2013).

2.4.2. Spontaneous Locomotor Activity

Exploratory activity in a novel environment was assessed using open field test (Archer, 1973) in a round arena (80 cm in diameter and 50 cm in height). Each rat was placed in the center of the apparatus and allowed to explore for 5 min under moderately light conditions. All tests were recorded and the distance travelled (m) in the arena was measured automatically using the software ANY-maze 5.2.

2.4.3. Three-chamber Sociability and Social Novelty Preference

The social interaction was assessed by the three-chamber sociability and social novelty test, as previously described (Bambini-Junior et al., 2014). A 5 min long habituation was performed immediately before the Sociability Test. At the beginning, an object (empty cage) was positioned in one of the lateral chambers, and a set animal+object was placed in the opposite lateral chamber. This animal (rat 1) was an experimentally naive Wistar rat with no previous contact with the tested animals. All testing rats were allowed to explore for 10 min. A mathematical transformation designed to allow the direct comparison of the social behavior of the groups – called Sociability Index (SI) – was used. The SI was calculated as $(\text{time exploring rat 1} - \text{time exploring novel object}) / (\text{time exploring rat 1} + \text{time exploring novel object})$. Immediately after that, the Social Novelty Test began. The novel rat 1 remained in its cage and a new unfamiliar rat (rat 2) was placed in the empty cage on the opposite chamber. Testing rats were allowed to explore for 10 min. In an analogous manner, a Social Novelty Preference Index (SNI) was used. The SNI was calculated as $(\text{time exploring rat 2} - \text{time exploring rat 1}) / (\text{time exploring rat 2} + \text{time exploring rat 1})$.

All tests were recorded and the time spent in each chamber as well as the time spent exploring the rat 1 or the novel object or the rat 2 were analyzed using the software ANY-maze 5.2. The index ranges from -1 to 1 and as the score becomes more positive and closer to 1, more social or more interested in social novelty is the animal.

2.5. Blood and tissue collection

The animals were decapitated using a guillotine, the trunk blood was collected, and their brain structures prefrontal cortex (PFC) and hippocampus (HC) were carefully dissected. Both structures were homogenized with cold protease inhibitor (GE healthcare) and stored at -80°C until further to biochemical analysis.

2.5.1. Oxidative Stress and Neurotrophin Levels

Lipid peroxidation was measured by malondialdehyde (MDA) levels using thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) colorimetric assay kit (Cayman Chemical Company, USA), according to the manufacturer's instructions and the results are expressed as MDA equivalents. The activity of GPx was determined indirectly through an enzymatic assay using commercial kit (Cayman Chemical Company, USA), according to the manufacturer's instructions and the results are represented by GPx activity (U). BDNF levels were measured as previously described (Borba et al., 2016). The total protein concentration was measured using bovine serum albumin as a standard, as previously described (Lowry et al., 1951).

2.6. Statistical Analysis

All results are expressed as median *and interquartile range (IQR)*. Data analyses were performed using IBM SPSS Statistics version 20. The results were analyzed using the Mann-Whitney U test for comparisons between two groups (TST x TPT). For multiple comparisons was employed Kruskal-Wallis, assuming as significant the adjusted *p*-value for the multiple comparisons. The accepted level of significance for the tests was ≤ 0.05 .

3. RESULTS

3.1. Neonatal immune challenge induced deficits in social interaction and social interest in adolescence

The behavioral analysis (table 1) by Mann-Whitney revealed significant impairment in social interaction ($U=16$, $p=.001$, $n=24$) and in the interest for new conspecifics ($U=20$, $p=.002$, $n=24$) in the rats neonatally challenged with poly(I:C) (TPT) when compared to controls (TST), considered as negative schizophrenia-like symptoms in the adolescence of the animals. This impairment was maintained in all groups of analysis (prevention during fetal growth, prevention during adolescence and double prevention protocols of omega-3 supplementation). The other behavioral tests showed no significant statistical difference. Regarding biochemical analyses, the neonatal administration of poly(I:C) significantly increase lipid peroxidation in the HC ($U=73.5$, $p=.017$, $n=19$, Table 1). Despite that, no changes were observed in the other biomarkers analyzed.

3.2. Omega-3 during fetal growth was not able to prevent the deficits caused by neonatal immune challenge

Improvement in the SNI was observed in poly(I:C) injected animals submitted to prevention protocol of omega-3 supplementation (group OPT) when compared to the control groups TST ($H(3)=18.483$, $p=.001$, $n=51$) and OST ($H(3)=18.483$, $p=.002$, $n=51$). Prevention treatment with omega-3 did not exert any influence on the other behavioral parameters and biochemical analyses. However, the group OST exhibited a significant decrease of BDNF serum levels in comparison to the control group TST ($H(3)=9.446$, $p=.030$, $n=54$).

3.3. Supplementation with omega-3 during adolescence was not able to prevent the deficits in social interaction and social interest

Prevention treatment during adolescence with omega-3 in poly(I:C) injected rats (group TPO) was not able to improve the deficit in social interaction and social interest in comparison to the TPT group (figure 2); and TSO control group presented less interest in the social novelty in comparison to the TST control group ($H(3)=14.006$, $p=.005$, $n=51$). Regarding biochemical analyses, the TPO group exhibited lower lipid peroxidation in the HC than the TPT group ($H(3)=11.904$, $p=.010$, $n=41$), higher GPx activity in the PFC compared to the TST control group ($H(3)=9.236$, $p=.022$, $n=40$), and higher serum BDNF levels in relation to the TSO control group ($H(3)=10.187$, $p=.020$, $n=53$).

3.4. Positive effects of double prevention treatment with omega-3

The association of omega-3 supplementation during fetal growth and during adolescence (represented by OPO group) was able to protect animals immune challenged with poly(I:C) from deficits in social interest when compared to TPT group ($H(2)=11.549$, $p=.049$, $N=36$) (figure 3). In addition, the OPO group exhibited significantly higher serum levels of BDNF ($H(2)=10,028$, $p=.008$, $n=39$) and lower levels of lipid peroxidation in the HC ($H(2)=12,848$, $p=.001$, $n=29$) than the TPT group.

3. DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study which examined the effects of omega-3 at two different periods in life - during fetal growth and during adolescence - on the behavioral and biochemical parameters in an animal model of SZ induced by poly(I:C).

Our results showed neonatal immune challenge with poly(I:C) was able to induce an impairment in sociability and preference for social novelty in animals during adolescence; and these social deficits were improved by the subsequent administration of omega-3 at two different periods in life: during fetal growth and during adolescence (represented by OPO group).

The face validity of positive symptoms in animal models is questionable in so far as it is impossible to mimic them completely. Thus, we evaluated these symptoms with a focus on locomotor hyperactivity and IPP deficits (Van Den Buuse, 2010). Where PPI changes, considered an endophenotype for schizophrenia (Macêdo et al., 2012), have a great translational value, representing the "interface of psychosis and cognition" (Arguello & Gogos, 2010). In the absence of this apparatus, we opted for the evaluation of the spontaneous locomotor activity; however we did not find changes related to this behavior. Probably this may be related to the period in which the test was performed, since this type of alteration has already been seen in adult rats at PN60 (Monte et al., 2017) and also because this test has little face validity despite having excellent predictive validity (Powell & Geyer, 2007).

The poly(I:C) model of immune activation in mice, has demonstrated the vulnerability to specific forms of schizophrenia-related functional and structural abnormalities is critically influenced by the precise timing of the prenatal immunological challenge. Prenatal exposure during the early/middle gestational period generates phenotypes related to positive symptoms. While the exposure on late gestational period (from GD17) is related to behavioral relate to negative/cognitive symptoms of the disorder (Macêdo et al., 2012). Based on this, it may be suggested the early postnatal immune challenge may mimic some critical functional abnormalities relevant to the negative symptoms (NS), knowing that late gestational stage and PN5-7 in rats corresponding the third trimester of human pregnancy (Semple et al., 2013). However, experimental support for this hypothesis needs further exploration.

Behavioral abnormalities induced by immune challenge in rodents appear to be associated with imbalances in the central dopamine system (Fortier et al., 2007; Meyer et al., 2008; Meyer et al., 2005). Furthermore, maternal immune activation by poly(I:C) can lead to structural abnormalities in the adult offspring's dopamine system including reduced expression of dopamine receptors in the medial PFC (Meyer et al., 2008). Therefore, disruption of normal dopaminergic development may thus represent a mechanism through immune challenge may contribute to the development NS.

Withdrawal from social contact is among the NS of SZ and is often one of the first symptoms exhibited, persisting throughout the course of the illness (Harvey et al., 2006; Lyne et al., 2017). Patients with more prominent NS may have suffered functional deterioration during the risk phase of psychosis, since these symptoms seem to have an insidious onset, emerging before positive symptoms (Meyer et al., 2014). In addition, deficits in social function could be attributed to changes in social cognition, an important domain for solving social problems (Penn et al., 2008). However, NS are not adequately treated with the available antipsychotic medications (Lyne et al., 2017), which represent an important gap in the treatment of SZ with profound impact on patients' functionality. In this way, anti-inflammatory and neuroprotective agents, such as omega-3 fatty acids, have shown some promising results for the treatment of NS, or prevention of their subsequent onset (Lyne et al., 2017).

Previous studies in humans and rodents indicate that omega-3 deficiency alters the transmission of monoamines such as dopamine and serotonin in the brain (Bos et al., 2016; Chalon, 2006). A greater activation of the mesolimbic pathway is described while the mesocortical pathway is less active in omega-3 deficient rats compared to controls (Zimmer et al., 2002). This data strengthens the theory that the functional integrity and resilience of cortical neurons is mediated in part by cortical DHA composition. Besides that, a greater severity of NS was found in SZ patients with low omega-3 levels when compared to those with high omega-3 levels in red blood cells (Bentsen et al., 2013).

Additionally, omega-3 levels in erythrocyte membrane of antipsychotic-naive UHR individuals were significantly lower in the NS dominant group when compared to the positive-symptoms-dominant group, suggesting abnormalities in PUFA metabolism may be associated with the pathophysiology of SZ in this population (Kim et al., 2016).

In addition, a review demonstrated all reported changes in brain structure or metabolic function as a result of omega-3 status or supplementation were related to improvements in NS severity (Bos et al., 2016). Therefore, it has been suggested PUFA supplementation would improve dopaminergic neurotransmission, especially in PFC, which are linked to NS. This could explain the improvement in the social deficit - caused by poly(I:C) - through the supplementation with omega-3 in the animals of the present study.

In addition, our data shown that supplementation of omega-3 combined during fetal growth and adolescence was able to increase serum levels of BDNF and decrease levels of lipid peroxidation in the HC. Neither the administration of omega-3 during fetal growth (OPT group) nor during adolescence (TPO group) exerted behavioral improvements in animals injected with poly(I:C). However, the omega-3 supplementation during adolescence ameliorated some biochemical parameters such as a reduction of hippocampal lipid peroxidation, and increase of GPx activity in the PFC and serum BDNF levels.

Importantly, oxidative stress is a well-known mechanism long implicated in the pathogenesis of SZ. It has been already been described that neonatal challenge with poly(I:C) from PN5-7 is related to oxidative imbalance, leading to decreased levels of GSH and increased lipid peroxidation in brain areas such as PFC and HC in adult rats (Ribeiro et al., 2013). This is consistent with the result of the present study, where lipid peroxidation is increased in HC of adolescent rats submitted to the same neurodevelopmental model of SZ.

Omega-3 reportedly has neuroprotective effects via mechanisms such as suppression of inflammation, regulation of neurogenesis and protection against oxidative stress, where DHA has been found to increase levels of GSH (Dyall, 2015). Further, resolvins and neuroprotectins derived from DHA help counteract neuroinflammation and consequently reducing oxidative stress, prevent the oxidative membrane damage and restore the function by improving the outcome (Tassoni et al., 2008). Studies in animals and humans have indicated the dietary intake of omega-3 is effective in the prevention of oxidative cell injury throughout the body, but predominantly in the brain (Mahadik et al., 2001). Supplementation with omega-3 in animal models of SZ, induced by ketamine, demonstrated a prevention of lipid damage in the HC and ST and protein damage in the PFC, being associated with a reduction

of GPx (Zugno et al., 2014). This corroborates our results, considering that omega-3 supplementation during fetal growth and adolescence or just during adolescence was able to reduce lipid peroxidation in our SZ model.

Some of the neuroprotective effects of omega-3 in experimental models may in part be explained by the involvement of this PUFAs in the BDNF/tyrosine kinase receptor B (TrkB) signaling pathway (Rao et al., 2007; Wu et al., 2004). It was demonstrated that omega-3 deprivation led to the decrease of DHA, BDNF, pCREB and p38 MAPK levels in the rat PFC, whereas the addition of DHA induced BDNF protein expression in cortical astrocytes (Rao et al., 2007). Moreover, it seems that not only the increase of BDNF levels, but also DHA enhance neurotrophic signaling by activating: the PI3-K / Akt and MAPK pathways; consequently leading to phosphorylation of CREB and activation of BDNF transcription (Balanza-Martinez et al., 2011). In SZ animal models, it has already been described that by activating ERK and AKT, omega-3 enhances the CREB/BDNF/TrkB pathway, increases synaptic plasticity, reduces the loss of hippocampal neurons and antagonizes the cognitive dysfunction in SZ rats induced by MK-801 (Fang et al., 2017). Besides that, Zugno and colleagues (2015) demonstrated that omega-3 supplementation delayed the effects of ketamine on reducing the levels of BDNF in the PFC of adolescent rats (Zugno et al., 2015). Similarly, we also found an increase in serum BDNF levels of poly(I:C) injected animals that received PUFAs (in double prevention and in prevention treatment only during adolescence), suggesting a neuroprotective effect of this fatty acid in SZ.

It is known that most of brain DHA deposition occurs during the third trimester of gestation and first year of life, coinciding with a rapid brain growth (Cetin et al., 2009). Once high levels of DHA are achieved in the brain, these are maintained during later life, presumably depending on an optimal dietary supply, and omega-3 supplementation; considering that the dietary intake of omega-3 in adults has been shown to be the determinant for the maintenance of DHA levels in various lipid pools (Browning et al., 2012). This may explain the results with the subsequent supplementation of omega-3 in different periods of life in this study. Deficiencies or imbalances in these nutrients strongly affect brain function not only during development but also throughout life and especially during periods of neuroinflammation (Lauritzen et al., 2016).

In conclusion, we demonstrated that supplementation of omega-3 combined during fetal growth and adolescence increased serum levels of BDNF and decreased levels of lipid peroxidation in the HC, showing negative symptoms prevention. The neurobiological mechanisms underpinning its effects of omega-3 are unknown and still need to be established, as well as, the most suitable timing, dosage and duration of interventions must also be determined. Nevertheless, these results give additional support for the use of omega-3 supplement in subjects with risk for developing SZ and a compelling evidence for studies of omega-3 use during pregnancy.

Role of funding source

The authors received funding resources from institutions CNPq and CAPES belonging to the Brazilian Government.

Contributors

Authors EDR, LPG, BSP, LFO and EZA performed the experiments and gave helpful input in the experimental design. Authors EDR, LPG and LC undertook de statistical. Authors EDR, LPG, BSP and CSG designed the study and analyzed the data. All authors have contributed to and approved the final manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that have no conflict of interest for the present investigation.

Acknowledgement

The authors thank FIPE number 16-0241 from Hospital de Clínicas de Porto Alegre for financial support.

4. REFERENCES

- Amminger, G. P., Schäfer, M. R., Papageorgiou, K., Klier, C. M., Cotton, S. M., Harrigan, S. M., ... Berger, G. E. (2010). Long-chain omega-3 fatty acids for indicated prevention of psychotic disorders: a randomized, placebo-controlled trial. *Archives of General Psychiatry*, *67*(2), 146–154.
<https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.192>
- Amminger, G. P., Schäfer, M. R., Schlögelhofer, M., Klier, C. M., & McGorry, P. D. (2015). Longer-term outcome in the prevention of psychotic disorders by the Vienna omega-3 study. *Nature Communications*, *6*, 7934.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8934>
- Archer, J. (1973). Tests for emotionality in rats and mice: A review. *Animal Behaviour*, *21*(2), 205–235. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(73\)80065-X](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(73)80065-X)
- Arguello, P. A., & Gogos, J. A. (2010). Cognition in mouse models of schizophrenia susceptibility genes. *Schizophrenia Bulletin*, *36*(2), 289–300.
<https://doi.org/10.1093/schbul/sbp153>
- Balanza-Martinez, V., Fries, G. R., Colpo, G. D., Silveira, P. P., Portella, A. K., Tabares-Seisdedos, R., & Kapczinski, F. (2011). Therapeutic use of omega-3 fatty acids in bipolar disorder. *Expert Review of Neurotherapeutics*, *11*(7), 1029–1047. <https://doi.org/10.1586/ern.11.42>
- Bambini-Junior, V., Zanatta, G., Della Flora Nunes, G., Mueller de Melo, G., Michels, M., Fontes-Dutra, M., ... Gottfried, C. (2014). Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. *Neuroscience Letters*, *583*, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.09.039>
- Bentsen, H., Osnes, K., Refsum, H., Solberg, D. K., & Bøhmer, T. (2013). A randomized placebo-controlled trial of an omega-3 fatty acid and vitamins E+C in schizophrenia. *Translational Psychiatry*, *3*(August).
<https://doi.org/10.1038/tp.2013.110>
- Bitanirwe, B. K., Peleg-Raibstein, D., Mouttet, F., Feldon, J., & Meyer, U. (2010). Late prenatal immune activation in mice leads to behavioral and neurochemical abnormalities relevant to the negative symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, *35*(12), 2462–2478.
<https://doi.org/10.1038/npp.2010.129>

- Borba, E. M., Duarte, J. A., Bristot, G., Scotton, E., Camozzato, A. L., & Chaves, M. L. F. (2016). Brain-Derived Neurotrophic Factor Serum Levels and Hippocampal Volume in Mild Cognitive Impairment and Dementia due to Alzheimer Disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra*, 6(3), 559–567. <https://doi.org/10.1159/000450601>
- Bos, D. J., van Montfort, S. J. T., Oranje, B., Durston, S., & Smeets, P. A. M. (2016). Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on human brain morphology and function: What is the evidence? *European Neuropsychopharmacology*, 26(3), 546–561. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.12.031>
- Bridgette D. Semple, Klas Blomgren, Kayleen Gimlin, Donna M. Ferriero, and L. J. N.-H. N.-H. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*, 106–107, 1–16. <https://doi.org/doi:10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>.
- Brown, A. S. (2011). The environment and susceptibility to schizophrenia. *Progress in Neurobiology*, 93(1), 23–58. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.09.003>
- Browning, L. M., Walker, C. G., Mander, A. P., West, A. L., Madden, J., Gambell, J. M., ... Calder, P. C. (2012). Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids into lipid pools when given as supplements providing doses equivalent to typical intakes of oily fish¹⁻⁴. *American Journal of Clinical Nutrition*, 96(4), 748–758. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.041343>
- Cetin, I., Alvino, G., & Cardellicchio, M. (2009). Long chain fatty acids and dietary fats in fetal nutrition. *Journal of Physiology*, 587(14), 3441–3451. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.173062>
- Chalon, S. (2006). Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 75(4–5), 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2006.07.005>
- Dietrich-Muszalska, A., Olas, B., Głowacki, R., & Bald, E. (2009). Oxidative/nitrative modifications of plasma proteins and thiols from patients with schizophrenia. *Neuropsychobiology*, 59(1), 1–7. <https://doi.org/10.1159/000202822>
- Dietrich-Muszalska, A., Olas, B., & Rabe-Jablonska, J. (2005). Oxidative stress in blood platelets from schizophrenic patients. *Platelets*, 16(7), 386–391. <https://doi.org/10.1080/09537100500128872>
- Dyall, S. C. (2015). Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: A review of the

- independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(APR), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00052>
- Favalli, G., Li, J., Belmonte-de-Abreu, P., Wong, A. H. C., & Daskalakis, Z. J. (2012). The role of BDNF in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, 46(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2011.09.022>
- Fortier, M. E., Luheshi, G. N., & Boksa, P. (2007). Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy. *Behavioural Brain Research*, 181(2), 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.04.016>
- Gama, C. S., Canever, L., Panizzutti, B., Gubert, C., Stertz, L., Massuda, R., ... Zugno, A. I. (2012). Effects of omega-3 dietary supplement in prevention of positive, negative and cognitive symptoms: A study in adolescent rats with ketamine-induced model of schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 141(2–3), 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2012.08.002>
- Gama, C. S., Salvador, M., Andreazza, A. C., Kapczinski, F., & Silva Belmonte-de-Abreu, P. (2006). Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: A study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 30(3), 512–515. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.11.009>
- Green, M. J., Matheson, S. L., Shepherd, A., Weickert, C. S., & Carr, V. J. (2011). Brain-derived neurotrophic factor levels in schizophrenia: A systematic review with meta-analysis. *Molecular Psychiatry*, 16(9), 960–972. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.88>
- Harvey, P. D., Koren, D., Reichenberg, A., & Bowie, C. R. (2006). Negative symptoms and cognitive deficits: What is the nature of their relationship? *Schizophrenia Bulletin*, 32(2), 250–258. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbj011>
- Herken, H., Uz, E., Özyurt, H., Söğüt, S., Virit, O., & Akyol, O. (2001). Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 6(1), 66–73. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000789>
- Ibi, D., Nagai, T., Kitahara, Y., Mizoguchi, H., Koike, H., Shiraki, A., ... Yamada, K. (2009). Neonatal poly:I:C treatment in mice results in schizophrenia-like

- behavioral and neurochemical abnormalities in adulthood. *Neuroscience Research*, 64(3), 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.03.015>
- Ibi, D., & Yamada, K. (2015). Therapeutic targets for neurodevelopmental disorders emerging from animal models with perinatal immune activation. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 28218–28229. <https://doi.org/10.3390/ijms161226092>
- Kim, S. W., Jhon, M., Kim, J. M., Smesny, S., Rice, S., Berk, M., ... Amminger, G. P. (2016). Relationship between erythrocyte fatty acid composition and psychopathology in the Vienna omega-3 study. *PLoS ONE*, 11(3), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151417>
- Koga, M., Serritella, A. V., Sawa, A., & Sedlak, T. W. (2016). Implications for reactive oxygen species in schizophrenia pathogenesis. *Schizophrenia Research*, 176(1), 52–71. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.06.022>
- Lauer, C. J., Dydak, U., Hell, D., Holsboer, F., Boesiger, P., Do, K. Q., & Trabesinger, A. H. (2000). Schizophrenia: glutathione de @ cit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Neuroscience*, 12.
- Lauritzen, L., Brambilla, P., Mazzocchi, A., Harsløf, L., Ciappolino, V., & Agostoni, C. (2016). DHA Effects in Brain Development and Function. *Nutrients*, 8(1), 6. <https://doi.org/10.3390/nu8010006>
- Lewis, D., & Lieberman, J. (2000). Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron*, 28(2), 325–334. [https://doi.org/S0896-6273\(00\)00111-2](https://doi.org/S0896-6273(00)00111-2) [pii]
- Lowry, O. H. (1951). The folin by oliver. *Readings*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4)
- Lyne, J., O'Donoghue, B., Roche, E., Renwick, L., Cannon, M., & Clarke, M. (2017). Negative symptoms of psychosis: A life course approach and implications for prevention and treatment. *Early Intervention in Psychiatry*, (July), 1–11. <https://doi.org/10.1111/eip.12501>
- Macêdo, D. S., Araújo, D. P., Sampaio, L. R. L., Vasconcelos, S. M. M., Sales, P. M. G., Sousa, F. C. F., ... Carvalho, A. F. (2012). Animal models of prenatal immune challenge and their contribution to the study of schizophrenia: A systematic review. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(3), 179–186. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500031>

- Mahadik, S. P., Evans, D., & Lal, H. (2001). Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 25(3), 463–493.
[https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(00\)00181-0](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(00)00181-0)
- Mao-sheng FANG, Xing LI, Hong QIAN, Kuan ZENG, M. Y., & Yong-jie ZHOU, Hui LI, Xiao-chuan WANG, Y. L. (2017). ω -3PUFAs Prevent MK-801-induced Cognitive Impairment in Schizophrenic Rats via the CREB/BDNF/TrkB Pathway. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*.
<https://doi.org/10.1007/s11596-017-1762-4>.
- McGorry, P. D., Nelson, B., Markulev, C., Yuen, H. P., Schäfer, M. R., Mossaheb, N., ... Paul Amminger, G. (2017). Effect of ω -3 polyunsaturated fatty acids in young people at ultrahigh risk for psychotic disorders: The NEURAPRO randomized clinical trial. *JAMA Psychiatry*, 74(1), 19–27.
<https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2016.2902>
- Mcnamara, R. K. (2013). Deciphering the Role of Docosahexaenoic Acid in Brain Maturation and Pathology with Magnetic Resonance Imaging. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 88(1), 33–42.
<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2012.03.011>.Deciphering
- McNamara, R. K., & Carlson, S. E. (2006). Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: Potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 75(4–5), 329–349. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2006.07.010>
- Meyer, E. C., Carrión, R. E., Cornblatt, B. A., Addington, J., Cadenhead, K. S., Cannon, T. D., ... Seidman, L. J. (2014). The relationship of neurocognition and negative symptoms to social and role functioning over time in individuals at clinical high risk in the first phase of the north american prodrome longitudinal study. *Schizophrenia Bulletin*, 40(6), 1452–1461.
<https://doi.org/10.1093/schbul/sbt235>
- Meyer, U., & Feldon, J. (2010). Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Progress in Neurobiology*, 90(3), 285–326.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.10.018>
- Meyer, U., Feldon, J., Schedlowski, M., & Yee, B. K. (2005). Towards an immunoprecipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Neuroscience*

- and Biobehavioral Reviews*, 29(6), 913–947.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.10.012>
- Meyer, U., Nyffeler, M., Schwendener, S., Knuesel, I., Yee, B. K., & Feldon, J. (2008). Relative prenatal and postnatal maternal contributions to schizophrenia-related neurochemical dysfunction after in utero immune challenge. *Neuropsychopharmacology*, 33(2), 441–456.
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301413>
- Miljevic, C., Nikolic, M., Nikolic-Kokic, A., Jones, D. R., Niketic, V., Lecic-Tosevski, D., & Spasic, M. B. (2010). Lipid status, anti-oxidant enzyme defence and haemoglobin content in the blood of long-term clozapine-treated schizophrenic patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(2), 303–307. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.11.024>
- Monte, A. S., Mello, B. S. F., Borella, V. C. M., da Silva Araujo, T., da Silva, F. E. R., Sousa, F. C. F. d., ... Macêdo, D. (2017). Two-hit model of schizophrenia induced by neonatal immune activation and peripubertal stress in rats: Study of sex differences and brain oxidative alterations. *Behavioural Brain Research*, 331, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.057>
- Penn, D. L., Sanna, L. J., & Roberts, D. L. (2008). Social cognition in schizophrenia: An overview. *Schizophrenia Bulletin*, 34(3), 408–411.
<https://doi.org/10.1093/schbul/sbn014>
- Powell, S. B., & Geyer, M. A. (2007). Overview of Animal Models of Schizophrenia. *Current Protocols in Neuroscience*, 1–20.
<https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0924s39>
- Rao, J. S., Ertley, R. N., Lee, H. J., DeMar, J. C., Arnold, J. T., Rapoport, S. I., & Bazinet, R. P. (2007). n-3 Polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism. *Molecular Psychiatry*, 12(1), 36–46. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001888>
- Ribeiro, B. M. M., do Carmo, M. R. S., Freire, R. S., Rocha, N. F. M., Borella, V. C. M., de Menezes, A. T., ... Macêdo, D. (2013). Evidences for a progressive microglial activation and increase in iNOS expression in rats submitted to a neurodevelopmental model of schizophrenia: Reversal by clozapine. *Schizophrenia Research*, 151(1–3), 12–19.
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2013.10.040>

- Ripke, S., Neale, B. M., Corvin, A., Walters, J. T. R., Farh, K. H., Holmans, P. A., ... O'Donovan, M. C. (2014). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, *511*(7510), 421–427. <https://doi.org/10.1038/nature13595>
- Tassoni, D., Kaur, G., Weisinger, R. S., & Sinclair, A. J. (2008). The role of eicosanoids in the brain. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, *17*(SUPPL. 1), 220–228. <https://doi.org/10.1002/9783527613625.ch8>
- Van Den Buuse, M. (2010). Modeling the positive symptoms of schizophrenia in genetically modified mice: Pharmacology and methodology aspects. *Schizophrenia Bulletin*, *36*(2), 246–270. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbp132>
- Wu, A., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2004). Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *Journal of Neurotrauma*, *21*(10), 1457–1467. <https://doi.org/10.1089/neu.2004.21.1457>
- Zimmer, L., Vancassel, S., Cantagrel, S., Breton, P., Delamanche, S., Guilloteau, D., & Durand, G. (2002). The dopamine mesocorticolimbic pathway is affected by deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids 1 – 3, 662–667.
- Zugno, A. I., Chipindo, H. L., Volpato, A. M., Budni, J., Steckert, A. V., de Oliveira, M. B., ... Gama, C. S. (2014). Omega-3 prevents behavior response and brain oxidative damage in the ketamine model of schizophrenia. *Neuroscience*, *259*, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.11.049>

Table 1. Comparison of behavioral performance and biochemical parameters between control (TST) and poly(I:C) (TPT) groups.

	TST		TPT		<i>p</i>
	<i>n</i>	<i>Median (IQR)</i>	<i>n</i>	<i>Median (IQR)</i>	
Behavior					
SI	10	.584 (.447 - .719)	14	.301 (.243 - .416)	.001*
SNI	10	.473 (.423 - .561)	14	.244 (0.097 - .384)	.002*
Y-Maze %	14	61,81 (54.17 – 72.32)	14	57,89 (52.57 – 65.42)	.482
Locomotor activity	14	19.511 (12,245 – 28,310)	13	23.117 (11.691 – 27.912)	.391
Biomarkers					
TBARS _{Serum}	13	17.576 (9.381 – 23.038)	13	13.348 (8.557 – 16.038)	.311
BDNF _{Serum}	13	24.500 (20.881 – 28.400)	12	22.675 (21.271 – 26.256)	.538
GPx _{Serum}	13	1.783 (1.273 – 4.075)	14	2.165 (1.273 – 4.075)	.867
TBARS _{HC}	10	.479 (.295 - .831)	9	.817 (.551 – 1.187)	.017*
BDNF _{HC}	10	.351 (.248 - .429)	10	.336 (.246 - .464)	.971
GPx _{HC}	10	7.699 (6.586 – 10.093)	9	6.557 (5.911 – 9.295)	.356
TBARS _{PFC}	10	.121 (.098 - .224)	9	.158 (.148 - .298)	.133
BDNF _{PFC}	10	.283 (.110 - .831)	10	.345 (.146 - .542)	.971
GPx _{PFC}	10	32.999 (19.166 – 56.851)	9	40.800 (33.765 – 68.145)	.211

TST, tween-saline-tween group; TPT, tween-poly(I:C)-tween group; IQR, interquartile range; S index, Sociability index; SNP index, Social Novelty Preference index; HC, hippocampus; PFC, prefrontal cortex; *p* value obtained with Mann-Whitney U; **p*, significance. The results were expressed in: TBARS - MDA equivalents (μmol/ml) for serum and MDA equivalents (μmol/mg of protein) for HC and CPF; BDNF - ng/ml for serum and ng/mg of proteins for HC and CPF; GPx - GPx activity (U/mL) for serum and GPx activity (U/mg protein) for HC and CPF.

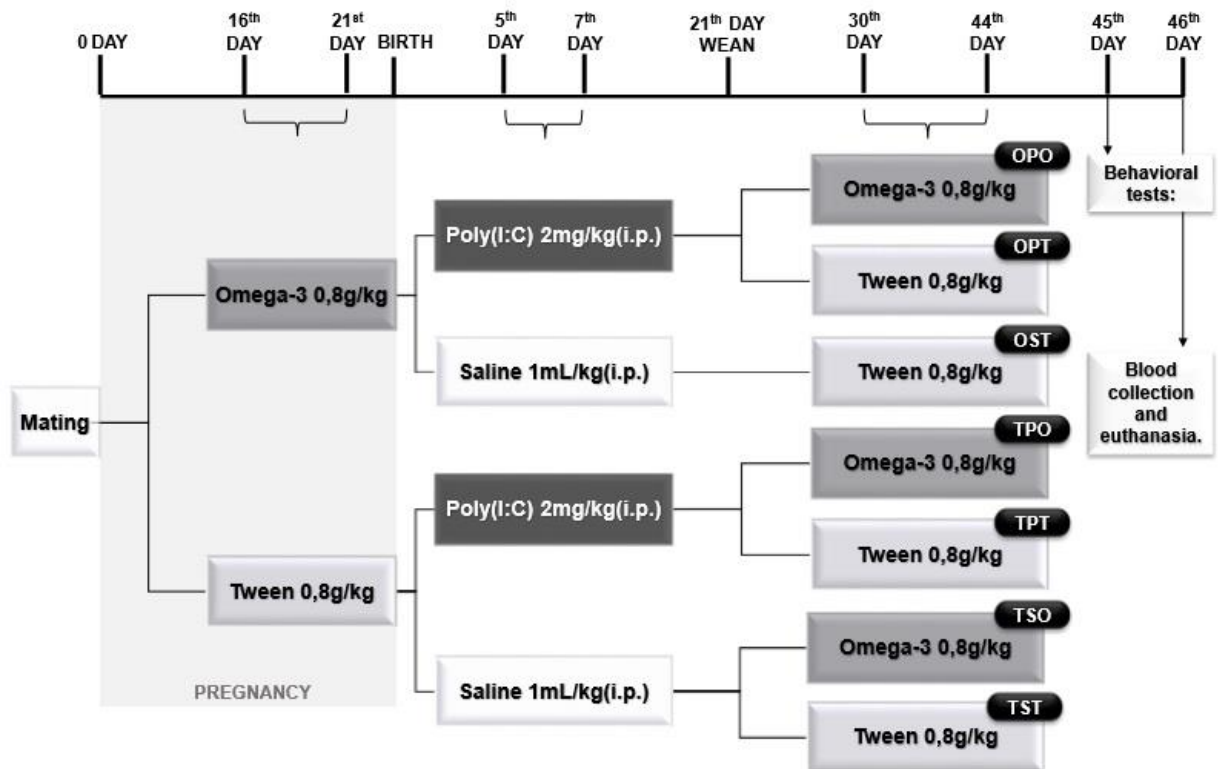


Figure 1. Schematic diagram of the experimental protocol.

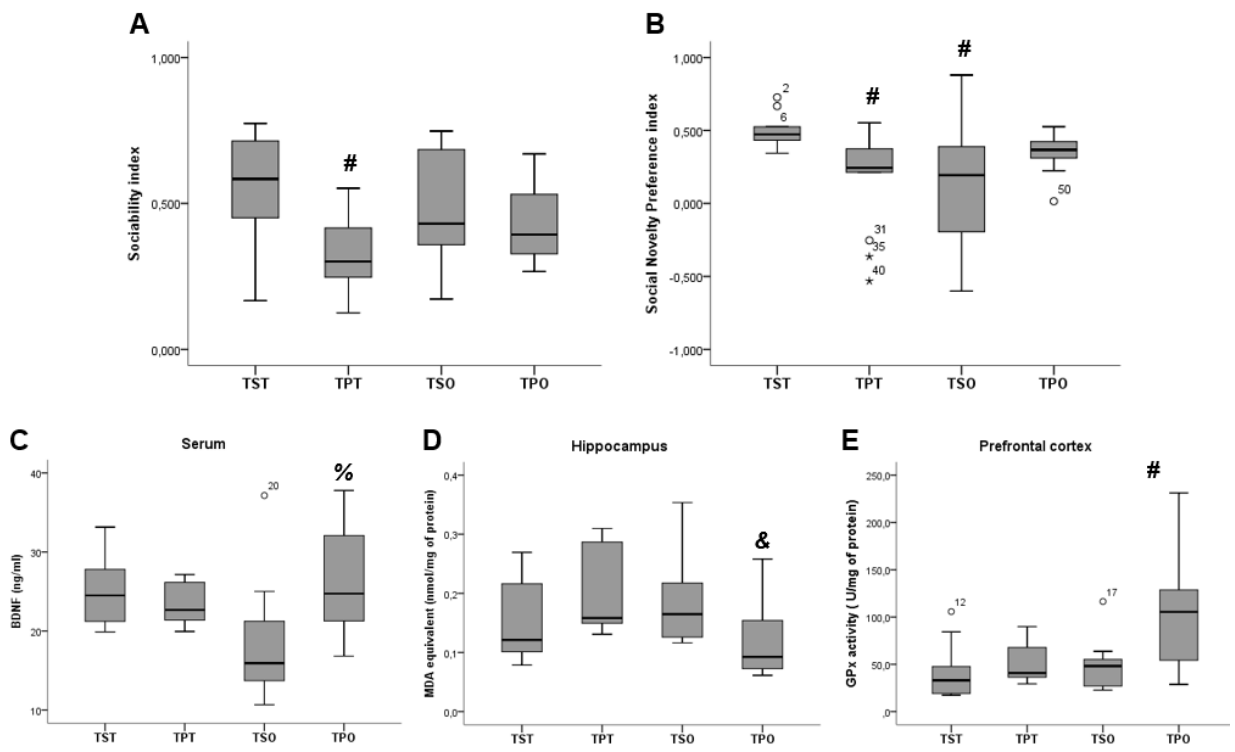


FIGURE 2. Effect of omega-3 supplementation during the adolescence (PN30-44).

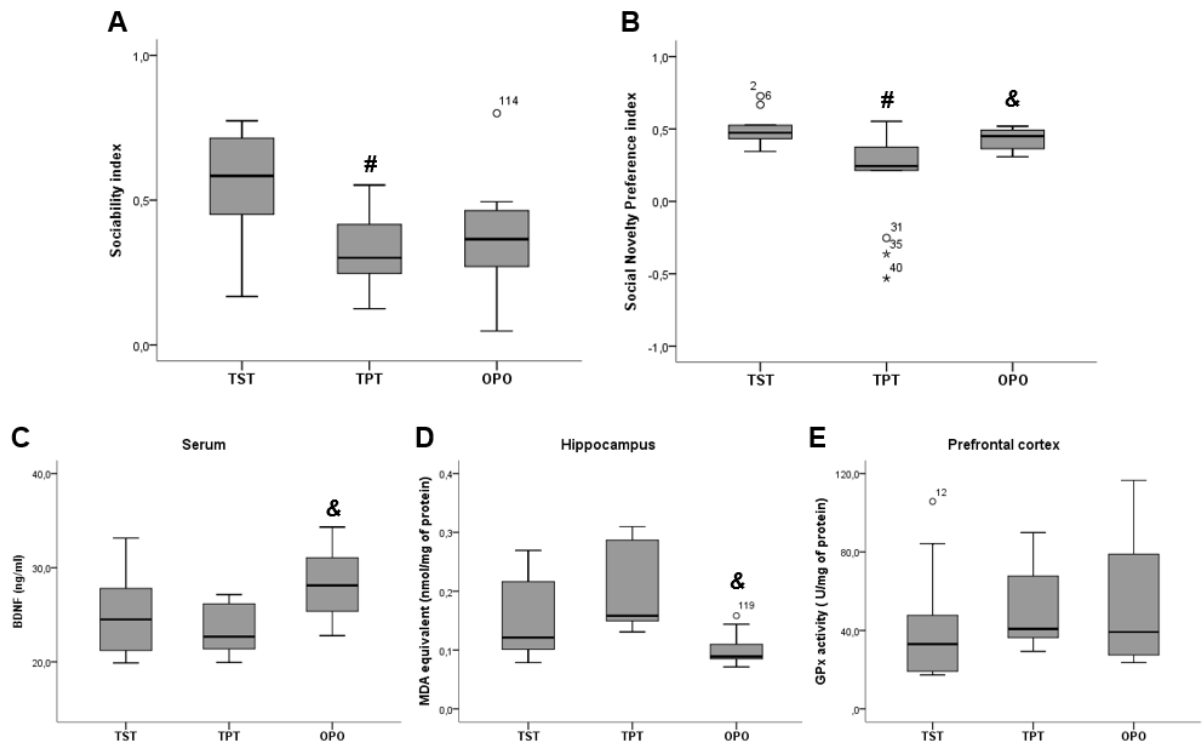


FIGURE 3. Effect of omega-3 supplementation during two different periods of life: during fetal growth (GD16-21) and during adolescence (PN30-44).

Figure legends:

Figure 1. Schematic diagram of the experimental protocol.

FIGURE 2. Effect of omega-3 supplementation during the adolescence (PN30-44) on behavioral (A-B) and biochemistry parameters in different cerebral structures and serum (C-E) of adolescent rats (PN45). Data are expressed as Median \pm IQR (n = 9-15 animals/group). # $p < 0.05$ versus the control group (TST); % $p < 0.05$ versus the control group (TSO); & $p < 0.05$ versus the poly(I:C) group (TPT).

FIGURE 3. Effect of omega-3 supplementation during two different periods of life: during fetal growth (GD16-21) and during adolescence (PN30-44) on behavioral (A-B) and biochemistry parameters in different cerebral structures and serum (C-E) of adolescent rats (PN45). Data are expressed as Median \pm IQR (n = 9-15 animals/group). # $p < 0.05$ versus the control group (TST); & $p < 0.05$ versus the poly(I:C) group (TPT).

PARTE III

5. DISCUSSÃO

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico crônico que induz sintomas positivos, negativos e cognitivos; cuja etiologia envolve importantes alterações no desenvolvimento neurológico, nos quais os processos patológicos podem iniciar durante o desenvolvimento precoce do cérebro, muito antes da doença clinicamente expressa (Kahn et al., 2015). Nesse contexto, dados da literatura demonstram que a administração pré-natal ou neonatal de poly(I:C), em modelos animais com roedores, induz a várias alterações biológicas precoces, recapitulando a neurobiologia e a sintomatologia da esquizofrenia (Ibi & Yamada, 2015; Meyer & Feldon, 2012; Wolff & Bilkey, 2010; Zuckerman et al., 2003). Sendo as alterações comportamentais observadas nesse modelo relacionadas à mediadores inflamatórios específicos, gerados durante a resposta imune inata, que age por perturbar a trajetória normal de desenvolvimento do cérebro maduro (Macêdo et al., 2012). Desta forma, este modelo se torna uma ferramenta importante para avaliar estratégias preventivas durante o período prodrômico, bem como após o desenvolvimento de sintomas esquizofrênicos na vida adulta.

Dados resultantes do presente trabalho fornecem evidência de que o desafio imune neonatal com poly(I:C) foi capaz de induzir um comprometimento na sociabilidade e preferência pela novidade social em animais durante a adolescência. Sendo esses déficits sociais prevenidos pela administração subsequente de ω -3 em dois períodos diferentes da vida: durante o crescimento fetal e durante a adolescência da prole – representado pelo grupo OPO.

A validade de face de sintomas positivos em modelos animais é questionável na medida em que é impossível mimetizá-los completamente. Dessa forma avaliamos esses sintomas com foco na hiperatividade locomotora e nos déficits de PPI (Van Den Buuse, 2010). As alterações do PPI, consideradas um endofenótipo para a esquizofrenia (Macêdo et al., 2012), possuem um grande valor translacional, representando a "interface entre psicose e cognição" (Arguello & Gogos, 2010). Na ausência desse aparelho, optamos pela avaliação da atividade locomotora espontânea, no entanto, não encontramos alterações relacionadas a esse comportamento. Isso pode estar relacionado ao período em que o teste foi realizado, uma vez que esse tipo de alteração já foi observado em ratos adultos no PN60 (Monte et al., 2017) e no PN74 (Ribeiro et al., 2013), e também como fato deste teste possuir

pouca validade de face apesar de ter excelente validade preditiva (Powell & Geyer, 2007).

O modelo de ativação imune com poly(I:C) em camundongos, tem demonstrado que alterações funcionais e estruturais relacionadas a esquizofrenia são criticamente influenciadas pelo tempo exato em que o desafio imune foi realizado. A exposição pré-natal durante o começo ou meio da gestação gera fenótipos relacionados com os sintomas positivos da doença, enquanto a exposição tardia (a partir do 17^a de gestação) está de acordo com comportamentos relacionados aos sintomas negativos e cognitivos (Macêdo et al., 2012). Com base nisso, podemos sugerir que o desafio imune no pós-natal recente (PN5-7) pode mimetizar algumas alterações funcionais relacionadas aos sintomas negativos, uma vez que ambos, o estágio gestacional tardio e o PN5-7, em ratos correspondem ao terceiro trimestre de gravidez humana (Semple et al., 2013). Contudo, o suporte experimental para essa hipótese não é totalmente elucidado e a extensão de como a ativação imune neonatal em ratos pode induzir alterações comportamental a longo prazo, relacionadas ao sintomas negativos, necessita maior exploração.

As alterações comportamentais induzidas pelo desafio imune em roedores parece estar associada com desequilíbrio dopaminérgico no SNC (Fortier et al., 2007; Meyer et al., 2008; Meyer et al., 2005) Uma vez que a ativação imune maternal com poly(I:C) durante a gestação pode levar a alterações estruturais no sistema dopaminérgico da prole durante a vida adulta, incluindo a redução na expressão de receptores de dopamina no CPF medial (Meyer et al., 2008). Portanto, uma alteração no desenvolvimento dopaminérgico normal pode representar o mecanismo pelo qual o desafio imune contribui com o desenvolvimento dos sintomas negativos da esquizofrenia.

O isolamento do contato social está entre os sintoma negativos e frequentemente é um dos primeiros sintomas apresentados pelo pacientes, persistindo através do curso da doença (Harvey et al., 2006; Lyne et al., 2017). Os pacientes que apresentam sintomas negativos mais proeminentes podem ter sofrido uma deterioração funcional durante a fase de risco de psicose, uma vez que esses sintomas parecem ter um início insidioso, emergindo antes dos sintomas positivos (Meyer et al., 2014). Além disso, déficits na função social podem ser atribuídos a alterações na cognição social, um importante domínio para a resolução de problemas.

Uma vez que pacientes com diagnóstico de esquizofrenia geralmente não utilizam o contexto quando processam as habilidades sociais e têm dificuldades de interpretar expressões faciais de afeto e emoção nas outras pessoas (Penn et al., 2008). Entretanto, os sintomas negativos, bem como os déficits cognitivos, não são adequadamente tratados com os antipsicóticos disponíveis (Lyne et al., 2017), o que representa uma importante lacuna no tratamento da esquizofrenia com profundo impacto na funcionalidade dos pacientes. Nesse sentido, pesquisas com agentes anti-inflamatórios e neuroprotetores, tais como ω -3, vêm mostrando resultados promissores tanto no tratamento de sintomas negativos e como na prevenção de seu início subsequente, o que é muito relevante considerando a baixa taxa de efeitos colaterais desse tipo de medicamento (Lyne et al., 2017).

Estudos anteriores, em humanos e roedores, indicam que a deficiência de ω -3 altera a transmissão de monoaminas, como a dopamina e serotonina no cérebro (Bos et al., 2016; Chalon, 2006). Quando comparados, ratos com deficiência de ω -3 com controles, é possível ver uma maior ativação da via dopaminérgica mesolímbica em relação a via mesocortical. Também foi demonstrado que os animais deficientes desse ácido graxo apresentam uma redução de 60-80% na liberação de dopamina no CPF (Zimmer et al., 2002). Esses dados dão suporte a teoria de que a integridade funcional e a resiliência dos neurônios corticais são mediados, pelo menos em parte, pela composição cortical de DHA. Além disso, uma maior severidade dos sintomas negativos são encontrados em portadores de esquizofrenia com baixos níveis de ω -3 quando comparados com os pacientes que apresentam altos níveis desses ácidos graxos nos eritrócitos (Bentsen et al., 2013). Em pacientes UHR não tratados com antipsicóticos, foi visto menores níveis de ω -3 nas membranas dos eritrócitos daqueles com predomínio de sintomas negativos, sugerindo que anormalidades no metabolismo dos PUFAs pode estar associado com a patofisiologia da doença nessa população (Kim et al., 2016). Corroborando esses resultados, uma revisão de Bos e colaboradores (2016), demonstrou que todas as mudanças relatadas na função metabólica ou estrutura encefálica, como resultados do estado ou da suplementação de ω -3, foram relacionadas com melhorias na gravidade dos sintomas negativos (Bos et al., 2016). Com isso, sugere-se que a suplementação de PUFAs pode melhorar a neurotransmissão dopaminérgica, especialmente no CPF, área relacionada com o desenvolvimento dos sintomas negativos. Esses achados da literatura podem explicar

a melhora do déficit social, causado pelo poly(I:C), através da suplementação com ω -3 nos animais do presente estudo.

Nossos resultados demonstram que a suplementação subsequente de ω -3, também foi capaz de aumentar os níveis séricos de BDNF e diminuir os níveis de peroxidação lipídica no HC dos animais. Observamos também que a administração de ω -3 somente como prevenção tanto durante o crescimento fetal como durante a adolescência não mostraram benefícios comportamentais. No entanto, podemos ressaltar alguns benefícios da suplementação preventiva com ω -3 na adolescência em relação aos parâmetros bioquímicos. Tais como uma redução na peroxidação lipídica do HC em relação ao grupo modelo e melhora a atividade de GPx no CPF e aumenta os níveis séricos de proteína BDNF em relação aos grupos controle.

Estudos sugerem que insultos ambientais pré e/ou pós-natal podem interagir com fatores genéticos específico que resultam em estresse oxidativo e aumento do risco de um duradoura disfunção cerebral no neurodesenvolvimento (Jiang et al., 2013). Essa interação pode ter início na via de sinalização do TLR3, onde TLR3 reconhece o seu ligante (fita dupla do RNA viral ou poly(I:C)) e usa a via de sinalização dependente de TRIF, que indiretamente ativa vários fatores de transcrição, incluindo fator regulador de interferon 3 (IRF3), fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB) e proteína ativadora-1(AP-1). IRF3 controla a expressão de genes para INF- β , enquanto NFkB e AP-1 regulam a expressão de genes que codificam citocinas inflamatórias (Matsumoto & Seya, 2008; Reisinger et al., 2015). Dessa forma, a expressão de muitos elementos dessa via de sinalização acaba contribuindo com o aumento do estresse oxidativo, o que pode ser atribuído ao acúmulo de mediadores pró-inflamatórios, tais como NFkB e iNOS (MacDowell et al., 2017; Ribeiro et al., 2013). Assim, demonstrando o envolvimento das vias de sinalização TLR3 em distúrbios neuropsiquiátricos devido ao impacto dessa ativação no desenvolvimento encefálico (figura 2).

O estresse oxidativo é um mecanismo bem conhecido há muito envolvido na patogênese da esquizofrenia. Na literatura, já foi descrito que o desafio neonatal com poly(I:C) no PN5-7 está relacionado a um desequilíbrio oxidativo, levando a níveis reduzidos de GSH e aumento da peroxidação lipídica em tecidos cerebrais, tais como CPF e HC, em ratos adultos (Monte et al., 2017; Ribeiro et al., 2013). Esses achados são consistentes com o resultado do presente estudo, onde foi possível ver aumento

da peroxidação lipídica no HC em ratos adolescentes submetidos ao mesmo modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia.

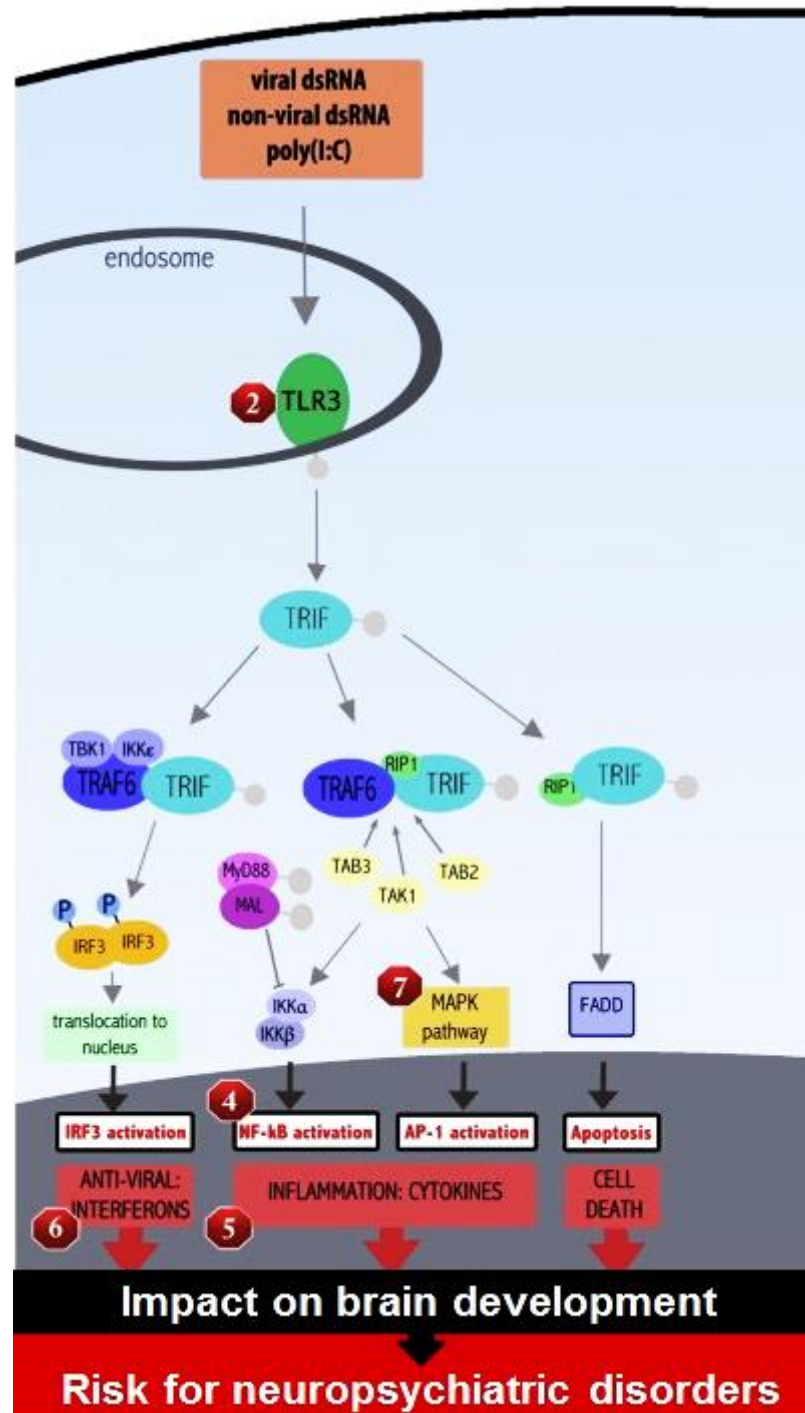


Figura 2. Envolvimento das vias de sinalização TLR3 em distúrbios neuropsiquiátricos. Vários componentes e processos das vias de sinalização subjacentes ao TLR3 têm sido implicados na etiologia de doenças neuropsiquiátricas (adaptado de (Reisinger et al., 2015)).

O ω -3 exerce seus efeitos neuroprotetores através de mecanismos como a supressão da inflamação, a regulação da neurogênese e a proteção contra o estresse oxidativo, onde DHA é descrito por aumentar os níveis de GSH (Dyall, 2015). Além disso, as resolvinas e neuroprotectinas derivadas do DHA ajudam a neutralizar a neuroinflamação e, conseqüentemente, reduzir o estresse oxidativo, através da prevenção do dano oxidativo a membrana e da restauração da sua função (Tasson et al., 2008). Estudos, em animais e em humanos, indicaram que a ingestão dietética de antioxidantes, como ω -3, é efetiva na prevenção da lesão celular oxidativa podendo corrigir tal lesão em todo o corpo, mas predominantemente no cérebro (Mahadik et al., 2001). A suplementação com ω -3 em modelos animais de esquizofrenia, induzida por cetamina, demonstrou-se capaz de prevenir danos lipídicos no HC e estriado, evitar danos às proteínas no CPF e reduzir a atividade de GPx nos mesmos tecidos (Zugno et al., 2014). Isso corrobora nossos resultados, considerando que o grupo que recebeu ω -3 apenas na adolescência ou em ambos os períodos de vida apresentou uma menor peroxidação lipídica em relação ao grupo modelo.

Alguns dos efeitos neuroprotetores do ω -3 em modelos experimentais podem em parte ser explicados por estudos que sugerem o envolvimento desses PUFAs com a via de sinalização do BDNF/tirosina cinase B (TrkB) (Rao et al., 2007; Wu et al., 2004). Já foi demonstrado que a privação de ω -3 em ratos leva a diminuição dos níveis de BDNF, pCREB e p38 MAPK no CPF, enquanto que a adição de DHA induz a expressão da proteína BDNF em astrócitos corticais (Rao et al., 2007). Mas é importante destacar que, além de aumentar os níveis de BDNF, o DHA também melhora a sinalização neurotrófica ativando duas vias de sinalização: (1) a via PI3-K / Akt; e (2) a via MAPK, ocasionando a fosforilação do CREB que se transloca no núcleo e ativa a transcrição do gene BDNF (Balanza-Martinez et al., 2011) (figura 3).

Em um modelo animal de esquizofrenia induzido por MK -801, foi possível notar que ao ativar ERK e AKT, o ω -3 melhora a via BDNF/TrkB/CREB, aumentando a plasticidade sináptica, reduzindo a perda de neurônios do HC e antagonizando a disfunção cognitiva (Fang et al., 2017). Além disso, Zugno e colaboradores demonstraram que a suplementação de ω -3 foi capaz de atrasar os efeitos da cetamina nos níveis de BDNF no CPF de ratos adolescentes (Zugno et al., 2015). O que está de acordo com os achados do nosso estudo, onde um aumento dos níveis séricos de BDNF foi encontrado em animais que receberam PUFAs (na dupla

prevenção e somente na prevenção durante a adolescência), sugerindo novamente um possível indicador de neuroproteção deste ácido graxo na doença.

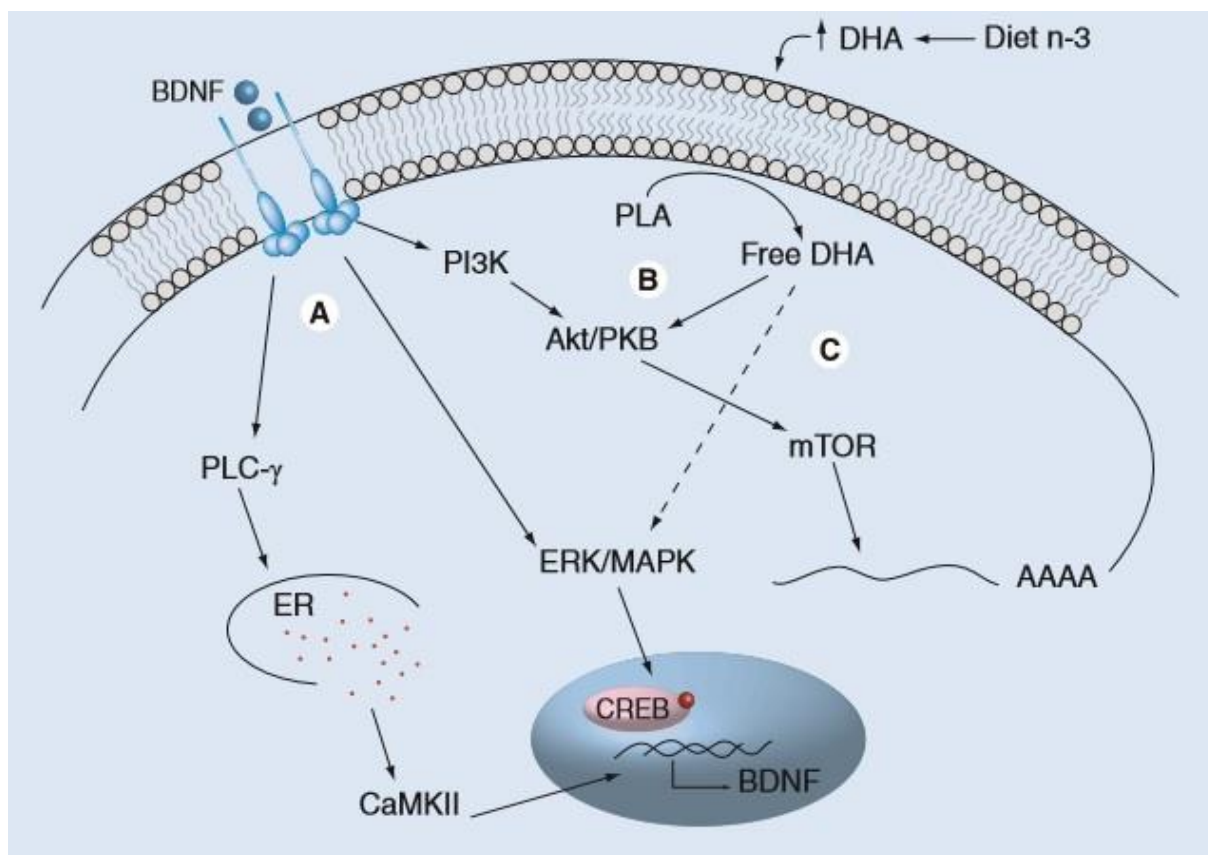


Figura 3. Os ácidos graxos ômega-3 aumentam a síntese e a sinalização intracelular de BDNF. (A) BDNF maduro se liga ao receptor TrkB e ativa três principais vias de sinalização intracelular envolvendo PLC- γ , ERK / MAPK e Akt / PKB. (B) DHA aumenta a sinalização neurotrófica ativando uma via clássica da sinalização BDNF através de PI3-K / Akt. (C) DHA aumenta a síntese de BDNF ativando a sinalização MAPK. O MAPK ativado fosforila CREB, que se transloca no núcleo e ativa a transcrição do gene BDNF (Balanza-Martinez et al., 2011).

É sabido que o pico de deposição cerebral de DHA ocorre durante o terceiro trimestre de gestação e durante o primeiro ano de vida, coincidindo com o rápido crescimento encefálico (Cetin et al., 2009). Uma vez que os níveis elevados de DHA são alcançados no cérebro, estes são mantidos durante a vida adulta, e isso presumivelmente também depende de um suprimento dietético ideal, tendo em vista que a ingestão dietética de ω -3 em adultos mostra-se determinante para a manutenção dos níveis de DHA em várias *pools* de lipídios (Browning et al., 2012). Isso pode explicar por que obtivemos melhores resultados com a suplementação subsequente de ω -3 em diferentes períodos de vida neste estudo, visto que

deficiências ou desequilíbrios nesses nutrientes afetam fortemente a função cerebral não só durante o desenvolvimento, mas também ao longo da vida, especialmente durante períodos em que há neuroinflamação (Lauritzen et al., 2016).

Este estudo apresenta uma limitação em relação às determinações comportamentais dos animais. Estas poderiam ter sido realizados em outros períodos da vida do animal, como por exemplo PN60 (adulto jovem) e PN74 (idade adulta), para avaliar o possível desenvolvimento de outras alterações, como sintomas positivos - já descrito na literatura nesses períodos de vida (Monte et al., 2017; Ribeiro et al., 2013).

Em conclusão, demonstramos que a ativação imune neonatal influencia alguns parâmetros comportamentais e bioquímicos em ratos adolescentes e que o ω -3 foi capaz de prevenir alguns danos causados por este modelo. No entanto, os mecanismos neurobiológicos subjacentes a quaisquer efeitos benéficos deste PUFA são desconhecidos e ainda precisam ser estabelecidos, bem como o tempo, a dose e a duração mais adequadas das intervenções também devem ser determinadas. Contudo, os resultados obtidos neste trabalho, em conjunto com os dados já discutidos na dissertação, dão suporte adicional para as evidências do possível uso de ω -3 em indivíduos com risco para o desenvolvimento de esquizofrenia.

6. CONCLUSÃO

- O desafio imune neonatal com poly(I:C) foi capaz de induzir déficits na interação social e interesse social - considerados como sintomas negativos da esquizofrenia- na adolescência dos animais. Bem como, foi capaz de aumentar significativamente a peroxidação lipídica no HC dos animais. Os demais parâmetros comportamentais e bioquímicos não foram alterados pelo desafio imune.
- O ω -3 administrado como prevenção durante o crescimento fetal ou durante a adolescência não foram capazes de prevenir os déficits causados pelo desafio imune neonatal.
- A prevenção com ω -3 durante o crescimento fetal não alterou os parâmetros bioquímicos dos animais.
- A prevenção com ω -3 durante a adolescência foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica no HC quando comparado ao grupo que recebeu o poly(I:C). Esse tratamento também foi capaz de aumentar a atividade GPx no CPF e os níveis séricos de BDNF em relação aos grupos controles.
- A dupla prevenção com ω -3 (tratamento durante gravidez crescimento fetal associada ao tratamento durante a adolescência) foi capaz de proteger os animais dos déficits de interesse social quando comparados ao grupo modelo. Além disso, os animais que receberam a suplementação subsequente de ω -3 apresentaram níveis séricos significativamente maiores de BDNF e níveis mais baixos de peroxidação lipídica no HC.
- Os resultados obtidos nesse trabalho, em conjunto com dados da literatura, sugerem que ω -3 pode ser um importante suplemento em indivíduos com risco para o desenvolvimento de esquizofrenia e traz uma evidência convincente para novos estudos de suplementação de ômega-3 durante a gravidez.

7. REFERÊNCIAS

- Aguiar, C. C. T., Alves, C. D., Rodrigues, F. A. R., Barros, F. W. A., Sousa, F. C. F. de, Vasconcelos, S. M. M., & Macedo, D. S. (2010). Schizophrenia: an inflammatory disease? *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*, *59*(1), 52–57. <https://doi.org/10.1590/S0047-20852010000100008>
- Amann, L. C., Gandal, M. J., Halene, T. B., Ehrlichman, R. S., White, S. L., McCarren, H. S., & Siegel, S. J. (2010). Mouse behavioral endophenotypes for schizophrenia. *Brain Research Bulletin*, *83*(3–4), 147–161. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2010.04.008>
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM–5)*.
- Amminger, G. P., Schäfer, M. R., Papageorgiou, K., Klier, C. M., Cotton, S. M., Harrigan, S. M., ... Berger, G. E. (2010). Long-chain omega-3 fatty acids for indicated prevention of psychotic disorders: a randomized, placebo-controlled trial. *Archives of General Psychiatry*, *67*(2), 146–154. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.192>
- Amminger, G. P., Schäfer, M. R., Schölgerhofer, M., Klier, C. M., & McGorry, P. D. (2015). Longer-term outcome in the prevention of psychotic disorders by the Vienna omega-3 study. *Nature Communications*, *6*, 7934. <https://doi.org/10.1038/ncomms8934>
- Arguello, P. A., & Gogos, J. A. (2010). Cognition in mouse models of schizophrenia susceptibility genes. *Schizophrenia Bulletin*, *36*(2), 289–300. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbp153>
- Ayesa-Arriola, R., Pérez-Iglesias, R., Rodríguez-Sánchez, J. M., Pardo-García, G., Tabares-Seisdedos, R., Ayuso-Mateos, J. L., ... Crespo-Facorro, B. (2013). Predictors of neurocognitive impairment at 3 years after a first episode non-affective psychosis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *43*, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.11.012>
- Ayhan, Y., Abazyan, B., Nomura, J., Kim, R., Ladenheim, B., Krasnova, I. N., ... Pletnikov, M. V. (2011). Differential effects of prenatal and postnatal expressions of mutant human DISC1 on neurobehavioral phenotypes in transgenic mice: evidence for neurodevelopmental origin of major psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, *16*(3), 293–306. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.144>
- Balanza-Martinez, V., Fries, G. R., Colpo, G. D., Silveira, P. P., Portella, A. K., Tabares-Seisdedos, R., & Kapczinski, F. (2011). Therapeutic use of omega-3 fatty acids in bipolar disorder. *Expert Review of Neurotherapeutics*, *11*(7), 1029–1047. <https://doi.org/10.1586/ern.11.42>
- Bas, O., Songur, A., Sahin, O., Mollaoglu, H., Ozen, O. A., Yaman, M., ... Yagmurca, M. (2007). The protective effect of fish n-3 fatty acids on cerebral ischemia in rat

hippocampus. *Neurochemistry International*, 50(3), 548–554.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.11.005>

- Bentsen, H., Osnes, K., Refsum, H., Solberg, D. K., & Bøhmer, T. (2013). A randomized placebo-controlled trial of an omega-3 fatty acid and vitamins E+C in schizophrenia. *Translational Psychiatry*, 3(August).
<https://doi.org/10.1038/tp.2013.110>
- Berger, G. E., Wood, S. J., Pantelis, C., Velakoulis, D., Wellard, R. M., & McGorry, P. D. (2002). Implications of lipid biology for the pathogenesis of schizophrenia. *The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, 36(3), 355–366.
- Bitanhirwe, B. K., Peleg-Raibstein, D., Mouttet, F., Feldon, J., & Meyer, U. (2010). Late prenatal immune activation in mice leads to behavioral and neurochemical abnormalities relevant to the negative symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 35(12), 2462–2478.
<https://doi.org/10.1038/npp.2010.129>
- Bos, D. J., van Montfort, S. J. T., Oranje, B., Durston, S., & Smeets, P. A. M. (2016). Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on human brain morphology and function: What is the evidence? *European Neuropsychopharmacology*, 26(3), 546–561. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.12.031>
- Bressan, R. A., & Pilowsky, L. S. (2003). Glutamatergic hypothesis of schizophrenia. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 25(3), 177–183. <https://doi.org/10.1590/S1516-44462003000300011>
- Bridgette D. Semple, Klas Blomgren, Kayleen Gimlin, Donna M. Ferriero, and L. J. N.-H. N.-H. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*, 106–107, 1–16. <https://doi.org/doi:10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>.
- Bronson, S. L., Ahlbrand, R., Horn, P. S., Kern, J. R., & Richtand, M. (2012). factors, 220(1), 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.12.040>. Individual
- Brown, A. S. (2011). The environment and susceptibility to schizophrenia. *Progress in Neurobiology*, 93(1), 23–58. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.09.003>
- Browning, L. M., Walker, C. G., Mander, A. P., West, A. L., Madden, J., Gambell, J. M., ... Calder, P. C. (2012). Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids into lipid pools when given as supplements providing doses equivalent to typical intakes of oily fish¹⁻⁴. *American Journal of Clinical Nutrition*, 96(4), 748–758. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.041343>
- Cadenhead, K., Addington, J., Cannon, T., Cornblatt, B., Mathalon, D., McGlashan, T., ... Woods, S. (2017). 23. Omega-3 Fatty Acid Versus Placebo in a Clinical High-Risk Sample From the North American Prodrome Longitudinal Studies (NAPLS) Consortium. *Schizophrenia Bulletin*, 43(suppl_1), S16–S16.
<https://doi.org/10.1093/schbul/sbx021.042>

- Carver, J. D., Benford, V. J., Han, B., & Cantor, A. B. (2001). The relationship between age and the fatty acid composition of cerebral cortex and erythrocytes in human subjects. *Brain Research Bulletin*, *56*(2), 79–85.
- Cetin, I., Alvino, G., & Cardellicchio, M. (2009). Long chain fatty acids and dietary fats in fetal nutrition. *Journal of Physiology*, *587*(14), 3441–3451. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.173062>
- Chalon, S. (2006). Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *75*(4–5), 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2006.07.005>
- Cherry, J. D., Olschowka, J. A., & O'Banion, M. K. (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of Neuroinflammation*, *11*, 98. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-98>
- Chung, W.-L., Chen, J.-J., & Su, H.-M. (2008). Fish oil supplementation of control and (n-3) fatty acid-deficient male rats enhances reference and working memory performance and increases brain regional docosahexaenoic acid levels. *The Journal of Nutrition*, *138*(6), 1165–1171.
- Covington, M. B. (2004). Omega-3 fatty acids. *American Family Physician*, *70*(1), 133–140.
- Coyle, J. T., Balu, D., Benneyworth, M., Basu, A., & Roseman, A. (2010). Beyond the dopamine receptor: novel therapeutic targets for treating schizophrenia. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *12*(3), 359–382.
- Dadheech, G., Mishra, S., Gautam, S., & Sharma, P. (2008). Evaluation of antioxidant deficit in schizophrenia. *Indian Journal of Psychiatry*, *50*(1), 16–20. <https://doi.org/10.4103/0019-5545.39753>
- Dietrich-Muszalska, A., Olas, B., Głowacki, R., & Bald, E. (2009). Oxidative/nitrative modifications of plasma proteins and thiols from patients with schizophrenia. *Neuropsychobiology*, *59*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1159/000202822>
- Dietrich-Muszalska, A., Olas, B., & Rabe-Jablonska, J. (2005). Oxidative stress in blood platelets from schizophrenic patients. *Platelets*, *16*(7), 386–391. <https://doi.org/10.1080/09537100500128872>
- Diwadkar, V. A., Bustamante, A., Rai, H., & Uddin, M. (2014). Epigenetics, stress, and their potential impact on brain network function: a focus on the schizophrenia diatheses. *Frontiers in Psychiatry*, *5*, 71. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2014.00071>
- Doukas, J., Cutler, A. H., & Mordes, J. P. (1994). Polyinosinic:polycytidylic acid is a potent activator of endothelial cells. *The American Journal of Pathology*, *145*(1), 137–147.
- Dyall, S. C. (2015). Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: A review of the

independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(APR), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00052>

Eaton, W. W., Byrne, M., Ewald, H., Mors, O., Chen, C.-Y., Agerbo, E., & Mortensen, P. B. (2006). Association of schizophrenia and autoimmune diseases: linkage of Danish national registers. *The American Journal of Psychiatry*, 163(3), 521–528. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.163.3.521>

Favalli, G., Li, J., Belmonte-de-Abreu, P., Wong, A. H. C., & Daskalakis, Z. J. (2012). The role of BDNF in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, 46(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2011.09.022>

Fortier, M. E., Luheshi, G. N., & Boksa, P. (2007). Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy. *Behavioural Brain Research*, 181(2), 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.04.016>

Gama, C. S., Canever, L., Panizzutti, B., Gubert, C., Stertz, L., Massuda, R., ... Zugno, A. I. (2012). Effects of omega-3 dietary supplement in prevention of positive, negative and cognitive symptoms: A study in adolescent rats with ketamine-induced model of schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 141(2–3), 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2012.08.002>

Gama, C. S., Salvador, M., Andreazza, A. C., Kapczinski, F., & Silva Belmonte-de-Abreu, P. (2006). Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: A study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 30(3), 512–515. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.11.009>

Glantz, L. A., & Lewis, D. A. (2000). Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 57(1), 65–73.

Gorski, J. A., Zeiler, S. R., Tamowski, S., & Jones, K. R. (2003). Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(17), 6856–6865.

Green, M. J., Matheson, S. L., Shepherd, A., Weickert, C. S., & Carr, V. J. (2011). Brain-derived neurotrophic factor levels in schizophrenia: A systematic review with meta-analysis. *Molecular Psychiatry*, 16(9), 960–972. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.88>

Harvey, P. D., Heaton, R. K., Carpenter, W. T., Green, M. F., Gold, J. M., & Schoenbaum, M. (2012). Functional impairment in people with schizophrenia: focus on employability and eligibility for disability compensation. *Schizophrenia Research*, 140(1–3), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2012.03.025>

Harvey, P. D., Koren, D., Reichenberg, A., & Bowie, C. R. (2006). Negative

symptoms and cognitive deficits: What is the nature of their relationship?
Schizophrenia Bulletin, 32(2), 250–258. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbj011>

- Hashimoto, T., Bergen, S. E., Nguyen, Q. L., Xu, B., Monteggia, L. M., Pierri, J. N., ... Lewis, D. A. (2005). Relationship of brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB to altered inhibitory prefrontal circuitry in schizophrenia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(2), 372–383. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4035-04.2005>
- Heird, W. C., & Lapillonne, A. (2005). The role of essential fatty acids in development. *Annual Review of Nutrition*, 25, 549–571. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132254>
- Herken, H., Uz, E., Özyurt, H., Söğüt, S., Virit, O., & Akyol, O. (2001). Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 6(1), 66–73. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000789>
- Hilker, R., Helenius, D., Fagerlund, B., Skytthe, A., Christensen, K., Werge, T. M., ... Glenthøj, B. (2017). Heritability of Schizophrenia and Schizophrenia Spectrum Based on the Nationwide Danish Twin Register. *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.08.017>
- Horrobin, D. F. (1998). The membrane phospholipid hypothesis as a biochemical basis for the neurodevelopmental concept of schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 30(3), 193–208. [https://doi.org/10.1016/S0920-9964\(97\)00151-5](https://doi.org/10.1016/S0920-9964(97)00151-5)
- Horrobin, D. F., Glen, A. I., & Vaddadi, K. (1994). The membrane hypothesis of schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 13(3), 195–207.
- Howes, O., Mccutcheon, R., & Stone, J. (2016). Europe PMC Funders Group Glutamate and dopamine in schizophrenia : an update for the 21 st century, 29(2), 97–115. <https://doi.org/10.1177/0269881114563634.Glutamate>
- Ibi, D., Nagai, T., Kitahara, Y., Mizoguchi, H., Koike, H., Shiraki, A., ... Yamada, K. (2009). Neonatal polyI:C treatment in mice results in schizophrenia-like behavioral and neurochemical abnormalities in adulthood. *Neuroscience Research*, 64(3), 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.03.015>
- Ibi, D., & Yamada, K. (2015). Therapeutic targets for neurodevelopmental disorders emerging from animal models with perinatal immune activation. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 28218–28229. <https://doi.org/10.3390/ijms161226092>
- Jiang, Z., Cowell, R. M., & Nakazawa, K. (2013). Convergence of genetic and environmental factors on parvalbumin-positive interneurons in schizophrenia. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7(September), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00116>
- Kahn, R. S., Sommer, I. E., Murray, R. M., Meyer-Lindenberg, A., Weinberger, D. R., Cannon, T. D., ... Insel, T. R. (2015). Schizophrenia. *Nature Reviews Disease*

Primers, 1(November). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.67>

- Khandaker, G. M., Cousins, L., Deakin, J., Lennox, B. R., Yolken, R., & Jones, P. B. (2015). Inflammation and immunity in schizophrenia: Implications for pathophysiology and treatment. *The Lancet Psychiatry*, 2(3), 258–270. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(14\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(14)00122-9)
- Khandaker, G. M., Stochl, J., Zammit, S., Lewis, G., & Jones, P. B. (2014). Childhood Epstein-Barr Virus infection and subsequent risk of psychotic experiences in adolescence: a population-based prospective serological study. *Schizophrenia Research*, 158(1–3), 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.05.019>
- Khandaker, G. M., Zimbron, J., Dalman, C., Lewis, G., & Jones, P. B. (2012). Childhood infection and adult schizophrenia: a meta-analysis of population-based studies. *Schizophrenia Research*, 139(1–3), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2012.05.023>
- Kim, S. W., Jhon, M., Kim, J. M., Smesny, S., Rice, S., Berk, M., ... Amminger, G. P. (2016). Relationship between erythrocyte fatty acid composition and psychopathology in the Vienna omega-3 study. *PLoS ONE*, 11(3), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151417>
- Kimura, M., Toth, L. A., Agostini, H., Cady, A. B., Majde, J. A., & Krueger, J. M. (1994). Comparison of acute phase responses induced in rabbits by lipopolysaccharide and double-stranded RNA. *The American Journal of Physiology*, 267(6 Pt 2), R1596-1605.
- Koga, M., Serritella, A. V., Sawa, A., & Sedlak, T. W. (2015). Implications for reactive oxygen species in schizophrenia pathogenesis. *Schizophrenia Research*. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.06.022>
- Lauer, C. J., Dydak, U., Hell, D., Holsboer, F., Boesiger, P., Do, K. Q., & Trabesinger, A. H. (2000). Schizophrenia: glutathione de[®] cit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Neuroscience*, 12.
- Lauritzen, L., Brambilla, P., Mazzocchi, A., Harsløf, L., Ciappolino, V., & Agostoni, C. (2016). DHA Effects in Brain Development and Function. *Nutrients*, 8(1), 6. <https://doi.org/10.3390/nu8010006>
- Law, M. H., Cotton, R. G. H., & Berger, G. E. (2006). The role of phospholipases A2 in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 11(6), 547–556. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001819>
- Lewis, D., & Lieberman, J. (2000). Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron*, 28(2), 325–334. [https://doi.org/S0896-6273\(00\)00111-2](https://doi.org/S0896-6273(00)00111-2) [pii]
- Leza, J. C., García-Bueno, B., Bioque, M., Arango, C., Parellada, M., Do, K., ... Bernardo, M. (2015). Inflammation in schizophrenia: A question of balance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 55, 612–626.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.05.014>

- Lieberman, J. A., Perkins, D., Belger, A., Chakos, M., Jarskog, F., Boteva, K., & Gilmore, J. (2001). The early stages of schizophrenia: speculations on pathogenesis, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Biological Psychiatry*, 50(11), 884–897.
- Lim, S.-Y., Hoshiba, J., Moriguchi, T., & Salem, N. (2005). N-3 fatty acid deficiency induced by a modified artificial rearing method leads to poorer performance in spatial learning tasks. *Pediatric Research*, 58(4), 741–748.
<https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000180547.46725.CC>
- Lipska, B. K., & Weinberger, D. R. (2000). To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 23(3), 223–239.
[https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00137-8](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00137-8)
- Lukiw, W. J., & Bazan, N. G. (2008). Docosahexaenoic acid and the aging brain. *The Journal of Nutrition*, 138(12), 2510–2514. <https://doi.org/10.3945/jn.108.096016>
- Lyne, J., O'Donoghue, B., Roche, E., Renwick, L., Cannon, M., & Clarke, M. (2017). Negative symptoms of psychosis: A life course approach and implications for prevention and treatment. *Early Intervention in Psychiatry*, (July), 1–11.
<https://doi.org/10.1111/eip.12501>
- MacDowell, K. S., Munarriz-Cuezva, E., Caso, J. R., Madrigal, J. L. M., Zabala, A., Meana, J. J., ... Leza, J. C. (2017). Paliperidone reverts Toll-like receptor 3 signaling pathway activation and cognitive deficits in a maternal immune activation mouse model of schizophrenia. *Neuropharmacology*, 116(2017), 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.12.025>
- Macêdo, D. S., Araújo, D. P., Sampaio, L. R. L., Vasconcelos, S. M. M., Sales, P. M. G., Sousa, F. C. F., ... Carvalho, A. F. (2012). Animal models of prenatal immune challenge and their contribution to the study of schizophrenia: A systematic review. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(3), 179–186. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500031>
- Mahadik, S. P., Evans, D., & Lal, H. (2001). Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 25(3), 463–493.
[https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(00\)00181-0](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(00)00181-0)
- Mahadik, S. P., & Scheffer, R. E. (1996). Oxidative injury and potential use of antioxidants in schizophrenia. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 55(1–2), 45–54.
- Mao-sheng FANG, Xing LI, Hong QIAN, Kuan ZENG, M. Y., & Yong-jie ZHOU, Hui LI, Xiao-chuan WANG, Y. L. (2017). ω -3PUFAs Prevent MK-801-induced Cognitive Impairment in Schizophrenic Rats via the CREB/BDNF/TrkB Pathway. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*.
<https://doi.org/10.1007/s11596-017-1762-4>.

- Mari, J. J., & Leitão, R. J. (2000). A epidemiologia da esquizofrenia. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 22, 15–17. <https://doi.org/10.1590/S1516-44462000000500006>
- Matsumoto, M., & Seya, T. (2008). TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(7), 805–812. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.11.005>
- McGorry, P. D., Nelson, B., Markulev, C., Yuen, H. P., Schäfer, M. R., Mossaheb, N., ... Paul Amminger, G. (2017). Effect of ω -3 polyunsaturated fatty acids in young people at ultrahigh risk for psychotic disorders: The NEURAPRO randomized clinical trial. *JAMA Psychiatry*, 74(1), 19–27. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2016.2902>
- Mcnamara, R. K. (2013). Deciphering the Role of Docosahexaenoic Acid in Brain Maturation and Pathology with Magnetic Resonance Imaging. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 88(1), 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2012.03.011>.Deciphering
- McNamara, R. K. (2013). Deciphering the role of docosahexaenoic acid in brain maturation and pathology with magnetic resonance imaging. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 88(1), 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2012.03.011>
- McNamara, R. K., & Carlson, S. E. (2006). Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 75(4–5), 329–349. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2006.07.010>
- McNamara, R. K., Vannest, J. J., & Valentine, C. J. (2015). Role of perinatal long-chain omega-3 fatty acids in cortical circuit maturation: Mechanisms and implications for psychopathology. *World Journal of Psychiatry*, 5(1), 15–34. <https://doi.org/10.5498/wjp.v5.i1.15>
- Meyer, E. C., Carrión, R. E., Cornblatt, B. A., Addington, J., Cadenhead, K. S., Cannon, T. D., ... Seidman, L. J. (2014). The relationship of neurocognition and negative symptoms to social and role functioning over time in individuals at clinical high risk in the first phase of the north american prodrome longitudinal study. *Schizophrenia Bulletin*, 40(6), 1452–1461. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbt235>
- Meyer, U., & Feldon, J. (2012). To poly(I:C) or not to poly(I:C): Advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. *Neuropharmacology*, 62(3), 1308–1321. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.009>
- Meyer, U., Feldon, J., Schedlowski, M., & Yee, B. K. (2005). Towards an immunoprecipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(6), 913–947. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.10.012>

- Meyer, U., Nyffeler, M., Schwendener, S., Knuesel, I., Yee, B. K., & Feldon, J. (2008). Relative prenatal and postnatal maternal contributions to schizophrenia-related neurochemical dysfunction after in utero immune challenge. *Neuropsychopharmacology*, *33*(2), 441–456. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301413>
- Miljevic, C., Nikolic, M., Nikolic-Kokic, A., Jones, D. R., Niketic, V., Lecic-Tosevski, D., & Spasic, M. B. (2010). Lipid status, anti-oxidant enzyme defence and haemoglobin content in the blood of long-term clozapine-treated schizophrenic patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *34*(2), 303–307. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.11.024>
- Miller, B. J., Culpepper, N., Rapaport, M. H., & Buckley, P. (2013). Prenatal inflammation and neurodevelopment in schizophrenia: a review of human studies. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *42*, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.03.010>
- Miyake, N., Thompson, J., Skinbjerg, M., & Abi-Dargham, A. (2011). Presynaptic Dopamine in Schizophrenia. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, *17*(2), 104–109. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00230.x>
- Miyamoto, S., LaMantia, A. S., Duncan, G. E., Sullivan, P., Gilmore, J. H., & Lieberman, J. A. (2003). Recent advances in the neurobiology of schizophrenia. *Molecular Interventions*, *3*(1), 27–39. <https://doi.org/10.1124/mi.3.1.27>
- Monte, A. S., Mello, B. S. F., Borella, V. C. M., da Silva Araujo, T., da Silva, F. E. R., Sousa, F. C. F. d., ... Macêdo, D. (2017). Two-hit model of schizophrenia induced by neonatal immune activation and peripubertal stress in rats: Study of sex differences and brain oxidative alterations. *Behavioural Brain Research*, *331*, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.057>
- Najjar, S., Pearlman, D. M., Alper, K., Najjar, A., & Devinsky, O. (2013). Neuroinflammation and psychiatric illness. *Journal of Neuroinflammation*, *10*, 43. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-43>
- Ohara, K. (2007). The n-3 polyunsaturated fatty acid/dopamine hypothesis of schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *31*(2), 469–474. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2006.11.013>
- Owen, M. J., Sawa, A., & Mortensen, P. B. (2016). Schizophrenia. *The Lancet*, *388*(10039), 86–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01121-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01121-6)
- Pawelczyk, T., Grancow-Grabka, M., Kotlicka-Antczak, M., Trafalska, E., & Pawelczyk, A. (2016). A randomized controlled study of the efficacy of six-month supplementation with concentrated fish oil rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids in first episode schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, *73*, 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.11.013>
- Paz, R. D., Tardito, S., Atzori, M., & Tseng, K. Y. (2008). Glutamatergic dysfunction in schizophrenia: from basic neuroscience to clinical psychopharmacology.

European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology, 18(11), 773–786.
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2008.06.005>

Peet, M., & Stokes, C. (2005). Omega-3 fatty acids in the treatment of psychiatric disorders. *Drugs*, 65(8), 1051–1059.

Penn, D. L., Sanna, L. J., & Roberts, D. L. (2008). Social cognition in schizophrenia: An overview. *Schizophrenia Bulletin*, 34(3), 408–411.
<https://doi.org/10.1093/schbul/sbn014>

Perry, V. H., Nicoll, J. A. R., & Holmes, C. (2010). Microglia in neurodegenerative disease. *Nature Reviews. Neurology*, 6(4), 193–201.
<https://doi.org/10.1038/nrneuro.2010.17>

Plitman, E., Nakajima, S., de la Fuente-Sandoval, C., Gerretsen, P., Chakravarty, M. M., Kobylanskii, J., ... Graff-Guerrero, A. (2014). Glutamate-mediated excitotoxicity in schizophrenia: A review. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 24(10), 1591–1605. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.07.015>

Powell, S. B., & Geyer, M. A. (2007). Overview of Animal Models of Schizophrenia. *Current Protocols in Neuroscience*, 1–20.
<https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0924s39>

Rao, J. S., Ertley, R. N., Lee, H. J., DeMar, J. C., Arnold, J. T., Rapoport, S. I., & Bazinet, R. P. (2007). n-3 Polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism. *Molecular Psychiatry*, 12(1), 36–46. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001888>

Reisinger, S., Khan, D., Kong, E., Berger, A., Pollak, A., & Pollak, D. D. (2015). The Poly(I:C)-induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. *Pharmacology and Therapeutics*, 149, 213–226. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.01.001>

Réus, G. Z., Fries, G. R., Stertz, L., Badawy, M., Passos, I. C., Barichello, T., ... Quevedo, J. (2015). The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience*, 300(May), 141–154.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.018>

Ribeiro, B. M. M., do Carmo, M. R. S., Freire, R. S., Rocha, N. F. M., Borella, V. C. M., de Menezes, A. T., ... Macêdo, D. (2013). Evidences for a progressive microglial activation and increase in iNOS expression in rats submitted to a neurodevelopmental model of schizophrenia: Reversal by clozapine. *Schizophrenia Research*, 151(1–3), 12–19.
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2013.10.040>

Riediger, N. D., Othman, R. A., Suh, M., & Moghadasian, M. H. (2009). A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *Journal of the American Dietetic Association*, 109(4), 668–679.

<https://doi.org/10.1016/j.jada.2008.12.022>

- Ripke, S., Neale, B. M., Corvin, A., Walters, J. T. R., Farh, K. H., Holmans, P. A., ... O'Donovan, M. C. (2014). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, *511*(7510), 421–427. <https://doi.org/10.1038/nature13595>
- Sable, P. S., Kale, A. A., & Joshi, S. R. (2013). Prenatal omega 3 fatty acid supplementation to a micronutrient imbalanced diet protects brain neurotrophins in both the cortex and hippocampus in the adult rat offspring. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *62*(11), 1607–1622. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.06.002>
- Salgado, J. V., Hetem, L. A., & Sandner, G. (2006). [Experimental models of schizophrenia--a review]. *Revista Brasileira De Psiquiatria (São Paulo, Brazil: 1999)*, *28*(2), 135–141. <https://doi.org/S1516-44462006000200012>
- Sastry, P. S. (1985). Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Progress in Lipid Research*, *24*(2), 69–176.
- Schultz, S. H., North, S. W., & Shields, C. G. (2007). Schizophrenia: a review. *American Family Physician*, *75*(12), 1821–1829.
- Selemon, L. D., Rajkowska, G., & Goldman-Rakic, P. S. (1995). Abnormally high neuronal density in the schizophrenic cortex. A morphometric analysis of prefrontal area 9 and occipital area 17. *Archives of General Psychiatry*, *52*(10), 805-818-820.
- Stöber, G., Franzek, E., & Beckmann, H. (1997). Maternal infectious illness and schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry*, *154*(2), 292–293.
- Tassoni, D., Kaur, G., Weisinger, R. S., & Sinclair, A. J. (2008). The role of eicosanoids in the brain. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, *17*(SUPPL. 1), 220–228. <https://doi.org/10.1002/9783527613625.ch8>
- Thome, J., Foley, P., & Riederer, P. (1998). Neurotrophic factors and the maldevelopmental hypothesis of schizophrenic psychoses. Review article. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, *105*(1), 85–100. <https://doi.org/10.1007/s007020050040>
- Ustün, T. B., & Chisholm, D. (2001). Global “burden of disease”-study for psychiatric disorders. *Psychiatrische Praxis*, *28 Suppl 1*, S7-11. <https://doi.org/10.1055/s-2001-15381>
- Van Den Buuse, M. (2010). Modeling the positive symptoms of schizophrenia in genetically modified mice: Pharmacology and methodology aspects. *Schizophrenia Bulletin*, *36*(2), 246–270. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbp132>
- Van den Eynde, K., Missault, S., Fransen, E., Raeymaekers, L., Willems, R., Drinkenburg, W., ... Dedeurwaerdere, S. (2014). Hypolocomotive behaviour associated with increased microglia in a prenatal immune activation model with

- relevance to schizophrenia. *Behavioural Brain Research*, 258, 179–186.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.005>
- van der Kemp, W. J. M., Klomp, D. W. J., Kahn, R. S., Luijten, P. R., & Hulshoff Pol, H. E. (2012). A meta-analysis of the polyunsaturated fatty acid composition of erythrocyte membranes in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 141(2–3), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2012.08.014>
- Vaz-Serra, A., Palha, A., Figueira, M. L., Bessa-Peixoto, A., Brissos, S., Casquinha, P., ... Marques-Teixeira, J. (2010). [Cognition, social cognition and functioning in schizophrenia]. *Acta Médica Portuguesa*, 23(6), 1043–1058.
- Verdijk, R. M., Mutis, T., Esendam, B., Kamp, J., Melief, C. J., Brand, A., & Goulmy, E. (1999). Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(1), 57–61.
- Wang, C., Ge, Q., Ting, D., Nguyen, D., Shen, H.-R., Chen, J., ... Putnam, D. (2004). Molecularly engineered poly(ortho ester) microspheres for enhanced delivery of DNA vaccines. *Nature Materials*, 3(3), 190–196.
<https://doi.org/10.1038/nmat1075>
- Weickert, C. S., Hyde, T. M., Lipska, B. K., Herman, M. M., Weinberger, D. R., & Kleinman, J. E. (2003). Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 8(6), 592–610.
<https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001308>
- Wolff, A. R., & Bilkey, D. K. (2010). The maternal immune activation (MIA) model of schizophrenia produces pre-pulse inhibition (PPI) deficits in both juvenile and adult rats but these effects are not associated with maternal weight loss. *Behavioural Brain Research*, 213(2), 323–327.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.008>
- Wu, A., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2004). Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *Journal of Neurotrauma*, 21(10), 1457–1467.
<https://doi.org/10.1089/neu.2004.21.1457>
- Yamashima, T. (2008). A putative link of PUFA, GPR40 and adult-born hippocampal neurons for memory. *Progress in Neurobiology*, 84(2), 105–115.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.11.002>
- Youdim, K. A., Martin, A., & Joseph, J. A. (2000). Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 18(4–5), 383–399.
- Zimmer, L., Vancassel, S., Cantagrel, S., Breton, P., Delamanche, S., Guilloteau, D., & Durand, G. (2002). The dopamine mesocorticolimbic pathway is affected by deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids 1–3, 662–667.

- Zuckerman, L., Rehavi, M., Nachman, R., & Weiner, I. (2003). Immune activation during pregnancy in rats leads to a postpubertal emergence of disrupted latent inhibition, dopaminergic hyperfunction, and altered limbic morphology in the offspring: A novel neurodevelopmental model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, *28*(10), 1778–1789. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300248>
- Zugno, A. I., Canever, L., Chipindo, H., Mastella, G., Heylmann, A. S., Oliveira, M. B., ... Gama, C. S. (2015). Effects of omega-3 supplementation on interleukin and neurotrophin levels in an animal model of schizophrenia. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, *87*(2), 1475–1486. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140714>
- Zugno, A. I., Chipindo, H., Canever, L., Budni, J., Alves De Castro, A., Bittencourt De Oliveira, M., ... Gama, C. S. (2015). Omega-3 fatty acids prevent the ketamine-induced increase in acetylcholinesterase activity in an animal model of schizophrenia. *Life Sciences*, *121*, 65–69. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.11.025>
- Zugno, A. I., Chipindo, H. L., Volpato, A. M., Budni, J., Steckert, A. V., de Oliveira, M. B., ... Gama, C. S. (2014). Omega-3 prevents behavior response and brain oxidative damage in the ketamine model of schizophrenia. *Neuroscience*, *259*, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.11.049>

ANEXOS

1. Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA / HCPA).
2. Instruções para submissão de manuscrito na revista *Schizophrenia Research*.



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

Projeto: 160241

Data da Versão do Projeto: 30/06/2016

Pesquisadores:

CLARISSA SEVERINO GAMA

LUIZA PAUL GÉA

EDUARDA DIAS DA ROSA

BRUNA MARIA ASCOLI

BRUNA SCHILLING PANIZZUTTI

Título: Estudo do papel da suplementação de Ômega-3 no período pré-natal e durante a adolescência em um modelo animal de esquizofrenia (Poly I:C).

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 12 de julho de 2016.

Biol. Michael Everton Andrades
Coordenador CEUA/HCPA

Schizophrenia Research

Guide for Authors

Aims and scope:

Schizophrenia Research provides rapid publication of new international research that contributes to the understanding of schizophrenia and related disorders. The journal brings together previously separated biological, clinical and psychological research on this disorder, and stimulates the synthesis of clinical and research data into cohesive hypothesis.

Types of papers:

(1) Full-length papers: 4000 words (excluding tables, figures and references). (2) Short communications: 1000-1500 words (excluding tables, figures and references). (3) Letters to the Editors: 600-800 words, 10 references, 1 figure or table. (4) Special solicited research and/or reviews. (5) Invited comments or hypotheses. (6) Editorials. (7) Schizophrenia meeting reviews; solicited and/or submitted. (8) Book reviews.

Submission Checklist:

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

- One author designated as corresponding author
- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers
- All necessary files have been uploaded
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spell checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Colour figures are clearly marked as being intended for colour reproduction or to be reproduced in black-and-white

General

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

Upon acceptance of an article, you will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see <http://authors.elsevier.com/journal/schres>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. If excerpts from other copyrighted works are included in the submission, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Philadelphia, PA, USA: phone (+1) 215 238 7869, fax (+1) 215 238 2239, e-mail healthpermissions@elsevier.com.

Requests for materials from other Elsevier publications may also be completed on-line via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/locate/permissions>

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <http://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Sponsored Articles:

Schizophrenia Research now offers authors the option to sponsor non-subscriber access to individual articles. The access sponsorship contribution fee per article is USD 3,000. This contribution is necessary to offset publishing costs - from managing article submission and peer review, to typesetting, tagging and indexing of articles, hosting articles on dedicated servers, supporting sales and marketing costs to ensure global dissemination via ScienceDirect, and permanently preserving the published journal article. The sponsorship fee excludes taxes and other potential author fees such as color charges which are additional.

- Authors can specify that they would like to select this option after receiving notification that their article has been accepted for publication, but not before. This eliminates a potential conflict of interest by ensuring that the journal does not have a financial incentive to accept an article for publication.
- Authors who have had their article accepted and who wish to sponsor their article to make it available to non-subscribers should complete and submit the sponsored article

order

form http://www.elsevier.com/framework_authors/Sponsoredarticles/articlesponsorshipform.pdf.

Submission of manuscripts

Schizophrenia Research proceeds totally online via the Elsevier Editorial System. In case you do not have an Internet connection, please contact the appropriate Editorial Office for alternative instructions. By accessing the online submission at <http://www.ees.elsevier.com/schres> you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. When submitting a manuscript online, authors need to provide an electronic version of their manuscript and any accompanying figures and tables and are requested to direct the manuscripts to the most appropriate Editor.

Once the uploading is done, the system automatically generates an electronic (PDF) proof, which is then used for reviewing. All correspondence, including the Editor's decision and request for revisions, will be processed through the system and will reach the corresponding author by e-mail.

Once a manuscript has successfully been submitted via the online submission system authors may track the status of their manuscript using the online submission system (details will be provided by e-mail). If your manuscript is accepted by the journal, subsequent tracking facilities are available on Elsevier's Author Gateway, using the unique reference number provided by Elsevier and corresponding author name (details will be provided by e-mail).

Authors may send queries concerning the submission process or journal procedures to the Editorial Offices:

Co-Editors-in-Chief

For the Americas:

Henry A. Nasrallah, MD.,
Department of Neurology & Psychiatry
Saint Louis University School of Medicine
1438 South Grand Blvd.
St. Louis, Missouri 63104
USA
E-mail: hnasral@slu.edu

For outside the Americas:

Lynn E. DeLisi, M.D.
VA Boston Healthcare System
Harvard Medical School
940 Belmont Ave.
Brockton, Massachusetts 02301
USA
E-mail: Delisi76@aol.com

Senior Managing Editor, St. Louis Editorial Office
Amelia T. Nasrallah, MA
E-mail: NASRALAT@UCMAIL.UC.EDU

For further details on how to submit online, please refer to the online EES Tutorial for authors. Alternatively please visit our [Support Center](#).

Preparation of text

Presentation of manuscript

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Italics are not to be used for expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se*. Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Provide the following data on the title page (in the order given).

Title. Concise and informative. The title should indicate the main point of the manuscript. Note that titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract. A concise and factual abstract is required (maximum length 250 words for full-length papers or 100 words for short communications). The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. References should therefore be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords. Immediately after the abstract, provide a maximum of six keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations. Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Arrangement of the article

Subdivision of the article. Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ?), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction. State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Experimental/Materials and methods. Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. Statistical tests used for evaluation of data should be briefly explained. In case of experimental studies, animals used should be described, including information on breed, breeder, sex, age, weight and the maintenance conditions. Special chemicals and their sources should be grouped under a separate sub-heading. For drugs generic names should be used; trade names may be given in brackets where the drug is first mentioned. In case of a new drug, a chemical description (formula) should be given. The form of a drug used should also be indicated.

Results. In this section the findings should be described clearly, concisely, and in logical order without extended discussions of their significance. Only in case of short communications, the results and discussion sections may be combined. Results should usually be presented in graphic or tabular form, rather than discursively. There should be no duplication in text, tables and figures. Experimental conclusions should normally be based on adequate numbers of observations with statistical analysis of variance and the significance of differences. The number of individual values represented by a mean should be indicated.

Discussion. This section should present conclusions to be drawn from the results accompanied by an assessment of their significance in relation to previous work. Speculative discussion is not discouraged, but the speculation should be based on the data presented and identified as such. In general, the discussion should be as concise as possible.

Author Disclosure

Funding body agreements and policies Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>

Following the **Funding body agreements and policies** text, authors are required to declare their individual contribution to the manuscript under a subheading **Contributors**.

eg, Author X designed the study and wrote the protocol. Author Y managed the literature searches and analyses. Authors X and Z undertook the statistical analysis, and author W wrote the first draft of the manuscript. All authors contributed to and have approved the final manuscript.

The third aspect of the Journal's new policy concerns the **Conflict of Interest**. ALL authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three (3) years of beginning the work submitted that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work.

Examples of potential conflicts of interest which should be disclosed include employment, consultancies, stock ownership (except for personal investment purposes equal to the lesser of one percent (1%) or USD 5000), honoraria, paid expert testimony, patent applications, registrations, and grants. If there are no conflicts of interest, authors should state that there are none.

eg, Author Y owns shares in pharma company A. Author X and Z have consulted for pharma company B. All other authors declare that they have no conflicts of interest.

Finally, before the references, the Journal will publish **Acknowledgements**, in a separate section, and not as a footnote on the title page.

eg, We thank Mr A, who kindly provided the data necessary for our analysis, and Miss B, who assisted with the preparation and proof-reading of the manuscript.

NB. During the online submission process the author will be prompted to **upload these four mandatory author disclosures as separate items**. They will be automatically incorporated in the PDF builder of the online submission system. Please do not include in the main manuscripts.

References. See separate section, below.

Figure legends, tables, figures, schemes. Present these, in this order, at the end of the article. Figures and photographs of good quality should also be submitted online as a separate file.

Tables. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript

lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Nomenclature and units. Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI.

DNA sequences and GenBank Accession numbers. Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number **in bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognise the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** In the final version of the *printed article*, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the *electronic copy*, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation

cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list.

3D Neuroimaging

You can enrich your online articles by providing 3D neuroimaging data in NIfTI format. This will be visualized for readers using the interactive viewer embedded within your article, and will enable them to: browse through available neuroimaging datasets; zoom, rotate and pan the 3D brain reconstruction; cut through the volume; change opacity and color mapping; switch between 3D and 2D projected views; and download the data. The viewer supports both single (.nii) and dual (.hdr and .img) NIfTI file formats. Recommended size of a single uncompressed dataset is ≤ 100 MB. Multiple datasets can be submitted. Each dataset will have to be zipped and uploaded to the online submission system via the '3D neuroimaging data' submission category. Please provide a short informative description for each dataset by filling in the 'Description' field when uploading a dataset. Note: all datasets will be available for downloading from the online article on ScienceDirect. If you have concerns about your data being downloadable, please provide a video instead. For more information see: <http://www.elsevier.com/3DNeuroimaging>

Policy and ethics. The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of

Helsinki) for experiments involving humans; <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm> and with the internationally accepted principles in the care and use of experimental animals. This must be stated at an appropriate point in the article.

References

Citation *in* *text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web *references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference *management* *software*

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style.

Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with the authors.

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the

same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:
Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. J. Sci. Commun. 163 (2) 51-59.

Reference to a book:
Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. The Elements of Style, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:
Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Journal names should be abbreviated according to the List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-Itwa/>

Preparation of electronic illustrations and services

General points

- Always supply high-quality printouts of your artwork, in case conversion of the electronic artwork is problematic.
- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files, and supply a separate listing of the files and the software used.
- Upload all illustrations as separate files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version. This journal offers electronic submission services and graphic files can be uploaded via the online submission system.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://authors.elsevier.com/artwork/schres>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (Note the resolution

requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below.):

- EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".
- TIFF: Colour or greyscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.
- TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.
- TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (colour or greyscale): a minimum of 500 dpi is required.
- DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions on a separate sheet, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Colourful

e-Products

Figures that appear in black & white in print appear in colour, online, in ScienceDirect at <http://www.sciencedirect.com>. There is no extra charge for authors who participate.

For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for colour in print or on the Web only. Because of technical complications, which can arise by converting colour figures to "grey scale" (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white versions of all the colour illustrations. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://authors.elsevier.com/artwork/schres>

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Proofs

When your manuscript is received by the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as 'drafts'.

Authors should keep a copy of their manuscript files as proofs will be sent to them without the original manuscript. One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility. A form with queries from the copyeditor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required. The Publisher reserves the right to proceed with publication if corrections are not communicated. Return corrections within two days of receipt of the proofs. Should there be no corrections, please confirm this. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not mean you have any less time to make your corrections, just that only one set of corrections will be accepted.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the Journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding Author.