



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP 09210-580

Bloco L, 3ºAndar, Fone (11) 3356-7617

iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica submetido
para avaliação no Edital Nº 4/2022 -
PROPES (11.01.07)

Título do projeto:

Investigação do sistema purinérgico em um modelo animal de esquizofrenia

Palavras-chave do projeto: modelo MAM, sistema purinérgico, esquizofrenia, neuroinflamação

Área do conhecimento do projeto: Neurociência, neuropsicofarmacologia

Sumário

1 Resumo.....3

2 Introdução e Justificativa4

3 Objetivos5

4 Materiais e Métodos6

5 Cronograma de atividades9

6 Referências.....11

1 Resumo

A Esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico com origem em fatores genéticos somados a fatores ambientais de estresse, como bullying ou assédio sexual, entre outros em fases cruciais do neurodesenvolvimento. Os sintomas se manifestam principalmente no fim da adolescência e início da vida adulta e são separados em três categorias principais: sintomas positivos, como delírio, alucinação e desordem de pensamento; sintomas negativos, como redução da expressão emocional e sociabilidade, anedonia; e sintomas cognitivos, como desordem de pensamento. Um dos modelos animais usados para a reprodução dos sintomas da esquizofrenia é o modelo MAM, que consiste na administração de uma injeção intraperitoneal no décimo sétimo dia de gestação e implica na interrupção temporária do neurodesenvolvimento fetal, como consequência, os filhotes na fase adulta apresentam hiperlocomoção, déficits em testes de interação social (IS) e em teste de PPI. Estudos recentes indicam uma associação entre vários aspectos da esquizofrenia com o sistema purinérgico. O presente estudo se propõe a investigação da ação dos antagonistas P2X, brilliant blue g (BBG) e suramina em modelos MAM de esquizofrenia e sua relação com a neuroinflamação causada por estresse oxidativo. Os principais objetivos deste projeto são: avaliar os efeitos agudo e crônico do BBG e da suramina nas respostas comportamentais de ratos do modelo MAM.

2 Introdução e Justificativa

Esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico que afeta cerca de 0,3% a 0,66% da população (McGrath et al., 2008). Os sintomas são classificados em três categorias: sintomas positivos, caracterizados por delírio, alucinações e desordem de pensamento; sintomas negativos, caracterizados por redução de expressão emocional e sociabilidade, e anedonia; e sintomas cognitivos, como falta de atenção, redução da memória de aprendizagem, baixo desempenho de raciocínio e resolução de problemas (Carbon & Correl, 2014). Sua origem não é ainda esclarecida, mas já existem evidências que corroboram para fatores genéticos associados a fatores de estresse ambiental em fases cruciais do neurodesenvolvimento.

Vários modelos foram colocados para explicar a base neuroquímica da Esquizofrenia, entre eles a desregulação no modelo Dopaminérgico. Há uma hiperfunção dopaminérgica na área tegmental ventral (VTA), com uma alteração no aumento do número de neurônios dopaminérgicos espontaneamente ativos do VTA. Isso provocaria uma resposta excessiva a estímulos na via mesolímbica, o que é visto como a causa dos principais sintomas da esquizofrenia (Ref Grace).

O tratamento da doença requer estudos de modelos pré-clínicos para ganho de um melhor entendimento da fisiopatologia. Um modelo que demonstra os efeitos sintomáticos, condizentes com os observados em esquizofrenia humana, é o Modelo MAM. A administração de uma injeção intraperitoneal da toxina acetato de metilazoximetanol, no décimo sétimo dia de gestação, causa a interrupção temporária da mitose e prejudica o neurodesenvolvimento, principalmente da formação do hipocampo, interrompendo temporariamente o neurodesenvolvimento da prole (Grace & Gomes, 2019). Dentre os vários déficits comportamentais observados em ratos cujas mães receberam MAM, observam-se na vida adulta hiperlocomoção induzida por um psicotomimético, déficits no teste de interação social (IS) e no teste de inibição pré-pulso (PPI) (Moore et al., 2006; Perez et al., 2019). Esses ratos também mostraram uma redução na densidade de células que expressam parvalbumina (PV+) no hipocampo ventral e CPF (Du & Grace, 2016; Perez et al., 2019), aumento da atividade da área tegmental ventral, estresse oxidativo e marcadores neuroinflamatórios (Zhu et al., 2021), hipótese que relaciona neuroinflamação com esquizofrenia.

Estudos recentes mostram uma relação da Esquizofrenia com o Sistema Purinérgico. Os receptores purinérgicos são compostos por proteínas de membrana presentes em quase todos os tecidos de mamíferos, inclusive no sistema nervoso. Esses receptores participam dos processos sinápticos por meio de comunicações entre neurônios-glia e glia com outros tipos de

células da glia (ou seja, astrócitos, oligodendrócitos e micróglia). Com base em seus ligantes endógenos, os receptores purinérgicos são classificados nas categorias P1 e P2, onde os receptores P1 ou adenosina são uma família de receptores acoplados à proteína G (GPCR) com quatro subtipos: A1, A2A, A2B e A3 e os receptores P2 são divididos em duas famílias de receptores que medeiam a sinalização intracelular evocada pelo ATP extracelular (Territo et al., 2021). Assim receptores puriginérgicos parecem exercer um importante papel na neurodegeneração, e seus antagonistas um papel em neuroproteção ou neuroregeneração.

Dessa forma, o uso de antagonistas P2X7R, como o Brilliant Blue G (BBG), pode ser eficaz na investigação da EZ. Além disso, é necessário avaliar se há uma alteração nos receptores purinérgicos em animais do modelo MAM de EZ.

Além dos receptores P2X7, os receptores purinérgicos metabotrópicos, incluindo o subtipo P2Y6, parecem atuar na neuroproteção e na neuroregeneração (Calovi et al., 2019). Sabe-se que o P2Y6R participa da ativação microglial e fagocitose, estando envolvido com o processo inflamatório de doenças neurodegenerativas e psiquiátricas (Anwar et al., 2020). O antagonismo dos receptores P2X7 ou P2Y6 resultou em efeitos neuroregenerativos ou neuroprotetores, respectivamente, possivelmente através da modulação de respostas neuroinflamatórias (Oliveira-Giacomelli et al., 2019)

O presente projeto tem como objetivos e justificativa a importância da investigação e avaliação se há alterações nos receptores puriginérgicos no modelo MAM de esquizofrenia, tratados ou não com BBG e Suramina

3 Objetivos

O objetivo principal deste projeto é investigar alterações comportamentais em animais do modelo MAM, sob tratamento agudo e crônico de antagonistas de receptores purinérgicos, antagonista P2X, o BBG e a suramina.

Os objetivos específicos são

- i) Investigar os efeitos do tratamento agudo de BBG e suramina no modelo MAM nos testes de PPI, IS e locomoção na arena
- ii) Investigar os efeitos do tratamento crônico (15 dias) de BBG e suramina no modelo MAM nos testes de PPI, IS e locomoção na arena

4 Materiais e Métodos

4.1 Animais

Serão utilizados ratos Wistar, 10 fêmeas e 5 machos, com aproximadamente 90 dias de idade e peso corporal de aproximadamente 250 g no início dos experimentos. Serão alojadas individualmente em gaiolas de polipropileno (40 x 33 x 18 cm) com uma camada de maravalha (3 cm), com água e comida ad libitum, e mantidas no biotério da UFABC com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo de iluminação claro-escuro de 12 x 12 h (início às 7 horas). Após o nascimento e desmame (PN21) serão separados filhotes machos das fêmeas, que serão mantidos nas mesmas condições anteriores, porém em até 5 por gaiola. Serão utilizados 60 ratos no total, 30 animais para cada experimento, contando com 5 animais por tratamento/ experimento, sendo os tratamentos salina/salina, MAM/salina, Salina/BBG, MAM/BBG, salina/Suramina, salina/BBG.

4.2 Drogas

O MAM (metilazoximetanol, Midwest Research Institute, Kansas City, EUA) será dissolvido em salina e administrado com injeção intraperitoneal na dose de 25mg/kg (Lodge, 2013). BBG e a Suramina serão administrados via intraperitoneal na dose de 50 mg/kg/ ml durante 15 dias.

4.3 Equipamentos

4.3.1 Caixas de sobressalto para teste de IPP

A resposta de sobressalto será avaliada em duas câmaras de sobressalto (SR-LAB; San Diego Instruments, San Diego, Califórnia, EUA). Cada câmara contém um cilindro claro que reside em cima de uma plataforma contendo abaixo alto-falantes de alta frequência que produzem um ruído de fundo constante de 59 dB e os estímulos acústicos emitidos durante o teste. A resposta de sobressalto do rato produz vibrações no cilindro, que são convertidos em sinais analógicos por uma unidade piezoelétrica

ligada e armazenados como dados de digitalização em um computador. Em cada início do estímulo, 59 consecutivos 1 ms leituras serão obtidos para determinar a amplitude média da resposta de sobressalto acústico. Equipamentos SR-LAB será calibrado regularmente para assegurar a medição consistentemente precisa.

4.3.2 Campo Aberto

Consiste em uma arena cilíndrica de acrílico transparente 50 cm (altura) x 60 cm (diâmetro) com base de madeira (100 cm x 80 cm) pintada em preto fosco.

4.4 Procedimentos e Delineamento Experimental

4.4.1 Teste de locomoção

Os animais serão submetidos ao teste de campo aberto. Serão colocados individualmente no centro da arena e deixados explorar por 1 hora, onde será registrada a distância percorrida por cada animal. Será utilizada iluminação de baixa intensidade durante o experimento. O comportamento (distância percorrida e velocidade) do animal será registrado pelo sistema EthoVision (Noldus).

4.4.2. Teste de Interação Social

Após a fase final do teste IPP, cada rato será colocado em uma arena contendo um rato macho adulto não familiar sob o mesmo tratamento farmacológico, MAM ou veículo, e as interações serão registradas. Cada animal será posicionado em um lado da arena e os comportamentos exibidos durante 10 minutos serão analisados. Os comportamentos registrados serão a duração das respostas ativas de aproximação do adulto (cheirar, exploração anal/genital, “focinhar”, limpeza, lambear, brincar, tentativas de copular, exploração com as patas e orientação em direção ao rato jovem), sendo acumulados como total em segundos durante 10 minutos. Os comportamentos serão subdivididos em interação social passiva e ativa de cada rato baseando-se em se o animal estava em movimento ou não. Serão calculadas as médias de tempo dos comportamentos e serão avaliadas com análises de variância.

4.4.3 Teste de PPI

Os animais serão colocados, individualmente, na caixa de sobressalto (San Diego Instruments) para a realização da sessão experimental. As sessões experimentais terão as seguintes etapas: um período de 5 minutos de aclimatização durante o qual será apresentado um ruído branco de fundo constante (65 dB). Em seguida, será apresentada uma série de 10 estímulos (pulsos; 40 ms de ruído branco na intensidade de 120dB) com intervalos de 15s em média entre eles, visando determinar a linha de base do sobressalto e a habituação ao estímulo. Após estas etapas ocorrerá o teste da IPP que constará de 35 apresentações aleatórias de 8 tipos diferentes de estímulos sonoros apresentados com intervalos de 15s em média: pulso (P), pré-pulso (PP, 20ms de som nas intensidades de 69, 73 ou 81dB de ruído branco), pulso precedido por pré-pulso (PP + P aplicados com intervalo de 100ms) e sem estímulo (ausência de som). Será calculada a média da amplitude de resposta de sobressalto (ARS) para cada tipo de estímulo. A IPP será calculada como a porcentagem da amplitude de resposta ao pré-pulso + pulso em relação à amplitude de resposta ao pulso sozinho, isto é, $\%IPP = 100 - (100 * \frac{PP}{P})$, onde o *PP* denota a média do ASR do pré-pulso + pulso e o *P* a média do ASR do pulso sozinho. Esse índice será calculado para cada animal em cada uma das intensidades de exposição do pré-pulso.

4.4.4 Delineamento Experimental

O projeto será desenvolvido em dois experimentos, cada um com metade dos animais de cada grupo.

Experimento 1: Serão feitos os cruzamentos entre os animais, metade das ratas grávidas receberá salina e a outra metade, MAM, no 17º dia de gestação. Após o nascimento dos filhotes e desmame (PN21), os machos (aproximadamente 30 animais) serão separados em 3-4 por caixa. A partir do PN45, cada rato receberá uma injeção i.p. de salina, BBG ou Suramina. Após uma hora os animais serão submetidos aos testes de PPI, locomoção na arena e IS. Estes mesmos testes comportamentais serão realizados 24 horas após a última dose (PN60) dos respectivos tratamentos.

Experimento 2: Replicação do experimento 1

4.5. Coleta das amostras para a quantificação de citocinas

Serão feitas as coletas de amostra de sangue e dissecação das regiões de interesse para futuras quantificações de citocinas em outro projeto.

O sangue será coletado pela veia lateral da cauda. O animal será colocado em um suporte de restrição com a cauda exposta. A cauda será lavada com água (cerca de 30°C) para limpeza e dilatação da veia. Será aplicado creme anestésico local. Após isso, a agulha da seringa com tubo EDTA será inserida em ângulo raso em uma distância de 5cm da ponta da cauda. Após a coleta, será aplicada leve pressão no local afim de parar o sangramento. O tubo será armazenado a -80°C até o dia da análise.

Os ratos serão sacrificados por decapitação após anestesia com uretano (e o cérebro será retirado para a análise de citocinas. Serão dissecadas as regiões de interesse (CPF e hipocampo ventral). Serão imediatamente congelados a -80°C até o dia da análise, em que serão pesados, descongelados, e colocados em uma placa de petri sobre gelo onde o tecido será cortado utilizando um bisturi e depois colocado em um Eppendorf com solução tampão de lise e coquetel inibidor de protease, que será incubado por 1h a 4°C. Em seguida, será colocado em um sonicador por 7 minutos com 0,5 min de períodos de sonicação a 4°C. As amostras serão centrifugadas por 15 min a 4 ° C a 14.000 rpm, após isso, o sobrenadante será aliquoteado e armazenado a -80 ° C.

5 Cronograma de atividades

Atividades

- 1) Cruzamento dos animais (Experimento 1)
- 2) Experimentos comportamentais (Experimento 1)
- 3) Análise parcial dos dados e Escrita do primeiro relatório parcial
- 4) Cruzamento dos animais (Experimento 2)
- 5) Experimentos comportamentais (Experimento 2)
- 6) Análise dos Dados Experimentais
- 7) Escrita do relatório final

Cronograma

Atividade/ Mês	Set/ out 2022	Nov/ Dez 2022	Jan/ Fev 2023	Mar/ Abr 2023	Mai/ Jun 2023	Jul/ Ago 2023
1)	x					
2)		x				
3)			x			
4)			x			
5)				x		
6)					x	
7)						x

6 Referências

- Carbon, M., Correll, C. U., Sepehrmanesh, Z., Heidary, M. M., Akasheh, N., Akbari, H.,... Adam Moser, Kevin Range, and D. M. Y. (2017). 基因的改变 NIH Public Access. Bone, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Charlson, F.J., Ferrari, A.J., Santomauro, D.F., Diminic, S., Stockings, E., Scott, J.G., McGrath, J.J. and Whiteford, H.A., (2018). Global epidemiology and burden of schizophrenia: findings from the global burden of disease study 2016. Schizophr. Bull., 44(6), pp.1195-1203. doi: 10.1093/schbul/sby058
- Grace, A.A. and Gomes, F.V., 2019. The circuitry of dopamine system regulation and its disruption in schizophrenia: insights into treatment and prevention. Schizophr. Bull., 45(1), pp.148-157. doi: 10.1093/schbul/sbx199
- Du, Y. and Grace, A.A., (2016). Loss of parvalbumin in the hippocampus of MAM schizophrenia model rats is attenuated by peripubertal diazepam. Int. J. Neuropsychopharmacol, 19(11), p.pyw065. doi: 10.1093/ijnp/pyw065
- Moore, H., Jentsch, J.D., Ghajarnia, M., Geyer, M.A. and Grace, A.A., 2006. A neurobehavioral systems analysis of adult rats exposed to methylazoxymethanol acetate on E17: implications for the neuropathology of schizophrenia. Biol. Psychiatry, 60(3), pp.253-264. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.01.003
- Territo PR and Zarrinmayeh H (2021) P2X7 Receptors in Neurodegeneration: Potential Therapeutic Applications From Basic to Clinical Approaches. Front. Cell. Neurosci. 15:617036. doi: 10.3389/fncel.2021.617036
- Zhu X, Cabungcal JH, Cuenod M, Uliana DL, Do KQ, Grace AA. Thalamic reticular nucleus impairments and abnormal prefrontal control of dopamine system in a developmental model of schizophrenia: prevention by N-acetylcysteine. Mol Psychiatry. 2021 Jun 30. doi: 10.1038/s41380-021-01198-8. Epub ahead of print. PMID: 34193975.