UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CAMILA MARCELINO LOUREIRO

**Estudo translacional do receptor N-metil-d-aspartato em primeiro episódio psicótico e
em modelos animais de psicose**

Ribeirão Preto

2021

Versão corrigida

CAMILA MARCELINO LOUREIRO

Estudo translacional do receptor N-metil-d-aspartato em primeiro episódio psicótico e em modelos animais de psicose

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Clínica Médica) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP), para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Investigação Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Paulo Louzada Junior

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Loureiro. Camila Marcelino

Estudo translacional do receptor N-metil-d-aspartato em primeiro episódio psicótico e em modelos animais de psicose. Ribeirão Preto, 2021.

313 f. :il. 30 cm

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Clínica Médica).
Área de concentração: Investigação Biomédica – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Louzada Junior

1. Glutamato; 2. Esquizofrenia; 3. Fenciclidina; 4. Irmãos; 5. Isolamento social; 6. Metilação do DNA; 7. NMDAR; 8. Variante de Nucleotídeo Único; 9. Primeiro episódio psicótico; 10. Trauma na infância.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Marcelino Loureiro

Estudo translacional do receptor N-metil-d-aspartato em primeiro episódio psicótico e em modelos animais de psicose.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Clínica Médica) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP), para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovada em: 28/05/2021

Banca Examinadora

Prof. Dr. Paulo Louzada-Junior

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Profa. Dra. Cristiane Otero Reis Salum

Instituição: UFABC

Assinatura: _____

Prof. Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Profa. Dra. Sântia Iole Nogueira Belangero

Instituição: UNIFESP

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Edvanir e Maria Imaculada

Talvez no primeiro toque,
talvez no primeiro olhar,
talvez na primeira vez
que eu ouvi você falar
que eu segurei sua mão.
que recebi atenção.
pequeno, recém-nascido,
eu não tive consciência
e essa minha inocência
lhe fez um “Desconhecido”

O tempo não muda os olhos
mas mudou o meu olhar,
passei a lhe conhecer
passei a lhe admirar.
e, muito observador,
observei que amor
é algo que se constrói.
Ali tinha percebido
que aquele desconhecido
já eram MEUS GRANDES HERÓIS.

Bráulio Bessa

Obrigada por esse amor incondicional que me preenche, me surpreende e me estimula a crescer. A recíproca é verdadeira e a gratidão é eterna. Eu tenho muito orgulho de ser filha de vocês. Amo muito vocês, papai e mamãe!

Ao meu esposo Fábio,

Pra você guardei o amor
Que nunca soube dar
O amor que tive e vi sem me deixar
Sentir sem conseguir provar
Sem entregar
E repartir
Pra você guardei o amor
Que sempre quis mostrar
O amor que vive em mim vem visitar
Sorrir, vem colorir solar
Vem esquentar
E permitir
Quem acolher o que ele tem e traz
Quem entender o que ele diz
No giz do gesto o jeito pronto
Do piscar dos cílios
Que o convite do silêncio
Exibe em cada olhar
Guardei
Sem ter porquê
Nem por razão
Ou coisa outra qualquer
Além de não saber como fazer
Pra ter um jeito meu de me mostrar
Achei
Vendo em você
E explicação
Nenhuma isso requer
Se o coração bater forte e arder
No fogo o gelo vai queimar

Pra você guardei o amor, Nando Reis

Aos pacientes psicóticos,

Em vocês, encontramos valores que os livros não nos ensinaram. Sem escolher, o destino os colocou em nossas mãos para que executássemos com mais responsabilidade o que aprendemos. Confiando, sem receio, suas vidas aos nossos cuidados para serem fonte de nosso conhecimento e aperfeiçoamento prático. Hoje, agradeço, com muito carinho, a cada um de vocês por nos fazerem mais humanos, humildes e profissionais.

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

Ter o título de doutor sempre foi um dos meus maiores sonhos. Eu sempre acreditei que este seria o momento da minha máxima realização profissional e pessoal. E, hoje, ao fim destes quatro anos, eu sinceramente vejo que não estava enganada. Este, com certeza, é o momento mais sublime e o maior aprendizado da minha vida. Foi o período de maior crescimento e de amadurecimento profundo. Nessa jornada eu também realizei um dos maiores desafios da minha vida pessoal que foi experienciar o meu tão sonhado doutorado sanduíche. Foi uma oportunidade fantástica e extremamente recompensadora, pois além de todas as vivências acadêmicas, a experiência no exterior me possibilitou expandir os horizontes culturais.

E foi nessa jornada desafiante e grandiosa que cruzaram pessoas que enriqueceram o meu convívio, por isso, eis que chegou o momento de expressar meus sinceros agradecimentos aos muitos adoráveis familiares e amigos que verdadeiramente formaram uma rede de solidariedade e muito afeto ao longo de toda a minha caminhada.

A Deus, por ter me guiado em mais uma jornada e por me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos, sem fracassar diante das dificuldades. Obrigada pela força e pela fé!

Aos meus avós, Vô João, Vó Cida e Vó Nete que me falavam que o maior valor de uma pessoa era o saber da sabedoria, ensinando-me a ter sempre coragem para seguir e muita dedicação em tudo o que eu almejava. Obrigada meus amados avós!

Aos meus queridos pais, Edvanir e Maria Imaculada, que abriram a porta do mundo para mim com educação. Que trabalham e sacrificam seus sonhos em favor dos meus e não são apenas meus pais, mas meus amigos. Aqueles que além da educação formal, se esforçaram para que a formação humana fosse a mais importante. Agora, novamente encerro mais um sonho meu e, tenho certeza, que é de vocês também; sempre com vocês ao meu lado.

Ao meu querido esposo Fábio, pela compreensão e tolerância das oscilações do meu humor e pelo apoio incondicional. Que finge ser plateia para eu ensaiar e que sempre acreditou e acredita em mim. Eu te amo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Louzada Junior, que se portou como só o fazem os mestres. Acreditou sempre em meu trabalho e deu-me liberdade necessária dividindo comigo sempre as suas experiências, expectativas e aprendizado. Minha especial admiração e gratidão. Juntamente com ele, gostaria de agradecer à minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Cristina Marta Del Ben, sempre solícita e muito atenciosa. Ela já se revezou tantas vezes no papel de professora, orientadora, conselheira, que seria impossível enquadrá-la. Gostaria de dizer que nada do que foi feito até aqui teria se concretizado se não fosse seu empenho em me guiar para sempre seguir em frente. O incentivo que ambos me deram em todos os meus engajamentos de pesquisa e o amparo durante todo o processo de escrita foram um alento, um carinho. Parablenho-os por sempre priorizarem a qualidade do ensino e o compromisso com a minha educação e crescimento acadêmico. Meus agradecimentos por tantas contribuições.

Aos meus supervisores do doutorado sanduíche, Professor Gavin Paul Reynolds e Dra. Caroline Dalton e à equipe do Centro de Pesquisa em Ciências Biomoleculares da Sheffield Hallam University, que me abraçaram calorosamente no frio da Inglaterra. Obrigada pelas críticas, pela liberdade, disponibilidade, o apoio e pelas oportunidades que me foram concedidas. Aos amigos que Sheffield me deu (Carol, Cristina, Filipe, Maíra, Sabrina, Vanessa, Vivian, Yara), obrigada pelo carinho, confiança, pelo suporte, acolhimento e a generosa companhia.

Às minhas triplicatas, Fabiana e Helene, que me proporcionaram tanto conhecimento, tanta qualificação e, com certeza, a concretização de toda a pesquisa que hoje aqui apresento. Que triplis, né, minha filha? Sempre um prazer enorme estar e compartilhar tanto conhecimento com vocês. Sou imensamente grata por toda a nossa amizade e as nossas trajetórias.

À minha mais inteligente amiga, Rosana. Meus agradecimentos pela disposição, pelas esmerosas contribuições e os valiosos conselhos. Nunca conheci uma pessoa tão correta e tão honesta em toda a minha vida. Me espelho diariamente nas suas qualidades. Para além destas qualidades, eu imensamente agradeço a sua amizade, o apoio e a confiança com que me brindou.

A todos meus companheiros de pesquisa, em especial, agradeço à Daiane, Daniela, Elizabeth, Juliana (e suas pimpolhas Bel e Manu), Marcos, Taciana (e amada Flora) e Vinícius pelos momentos de convívio, risos, trocas e afetos. Em um exercício pleno de cooperação e disponibilidade construímos uma pequena família. Sou profundamente grata à vocês pela

indescritível solidariedade e a valiosa parceria que nunca se limitou aos questionamentos teóricos e existenciais.

À minha amiga Natália que já extrapolou as fronteiras do 3º andar do HC e tornou-se uma amiga da vida e para tudo. Obrigada pelo seu carinho, apoio e sua amizade incondicional. Minha especial admiração e gratidão por você.

Às minhas amigas do STREAM e também “bruxinhas”, Amália, Camila, Carolina, Débora, Gabriela e Paola que encararam bravamente todos os prazeres e as dificuldades da coleta de dados. Vocês valorizaram a minha contribuição como participante da equipe, ao mesmo tempo em que me permitiam ser a “gerente” de vocês. Sou-lhes bastante grata, sem distinção. Vocês souberam tornar o meu cotidiano mais leve graças à boa vontade e ao entusiasmo.

Ao pessoal da Secretaria do 3º andar, em especial, Lúcia, Marilene, Raquel e Tânia, pela eficiência, dedicação e simpatia. Devo dizer que aprendi muito com vocês sobre a generosa solidariedade e o carinho desprendido gratuitamente. Meu muito obrigada por todo o respeito e a disponibilidade que vocês sempre tiveram comigo.

Ao Laboratório de Nutrição e Metabolismo coordenado pelo Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão, que compartilhou o seu ambiente de trabalho comigo e tanto contribuiu enriquecendo este trabalho. Assim como, gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Rafael Deminice pelos grandes ensinamentos, pela atenção zelosa, confiabilidade e toda a ajuda fornecida durante esta jornada.

Ao Laboratório de Bioquímica, em especial à Profa. Dra. Sâmia Joca, por ceder o seu espaço de trabalho e participar ativamente com valiosas sugestões que tanto contribuíram para o aperfeiçoamento desta pesquisa.

Ao Laboratório Biomolecular de Ribeirão Preto do HCFMRP-USP, em especial à Stella e à Paula, pela amizade, pelo estímulo e esmeradas orientações. Ao Laboratório de Imunologia Clínica, especialmente à Livia, pelas valiosas contribuições, ensinamentos e atenção. Obrigada pela competência e toda a dedicação em me ajudar.

À equipe médica do Setor de Psiquiatria da Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas da e da Unidade Psiquiátrica de Internação Breve da FMRP-USP, em especial ao Dr. Alcion

Sponholz e ao Dr. Gabriel Elias Oliveira, pela atenção e presteza no acompanhamento dos pacientes e no fornecimento dos dados clínicos. E aos médicos Natália Mota, Rebecca Pessoa e Lívio Leal com quem aprendi a trabalhar em equipe e amadureci como profissional. Obrigada pela confiança e por todo o ensinamento durante estes anos.

À pós-doutoranda Fernanda Coeli-Lacchini e ao Prof. Dr. Ricard Lacchini que não mediram esforços para me auxiliar nas análises genéticas e compartilharam todo o conhecimento deles comigo. Não tenho palavras para agradecer a disponibilidade, dedicação e atenção comigo.

Agradeço às minhas primas e amigas (que não nomearei porque são muitas amigas - risos) pela torcida diária e por compartilhar de todos os meus sentimentos. Vocês são muito importantes para mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, do Departamento de Clínica Médica da FMRPUSP, pelos excelentes professores e pela qualidade de formação que é oferecida. Parabéns por alto grau de formação educacional.

Aos participantes deste estudo, que contribuíram com a dimensão e o aperfeiçoamento para estudos na área da Saúde Mental. Agradeço profundamente a todos e cada um em particular, principalmente pelas sinceras palavras e por dividirem comigo um pouco da história de vida de vocês.

À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro e institucional, imprescindíveis para a minha dedicação exclusiva para a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Todos vocês são co-autores deste trabalho.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton

Resumo

RESUMO

LOUREIRO, CM. **Estudo translacional do receptor N-metil-d-aspartato em primeiro episódio psicótico e em modelos animais de psicose.** 2021. 313 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2021.

Introdução. A metilação do DNA pode mediar as interações gene-ambiente nas psicoses. O receptor N-metil-d-aspartato (NMDAR) é essencial para o neurodesenvolvimento, além de ser sensível a estressores ambientais, como o trauma na infância. No entanto, os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento das psicoses são pouco elucidados. Por isso, desenvolvemos um estudo translacional para investigar as influências genético-epigenético-ambiental no primeiro episódio psicótico (PEP) e em modelos animais de psicose (ambiental e farmacológico). **Objetivos.** Humanos: comparar o perfil de aminoácidos relacionados ao sistema glutamatérgico, as variantes de nucleotídeo único (SNVs) e a metilação do DNA dos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* do NMDAR no sangue de pacientes em PEP, irmãos não psicóticos e controles da comunidade. Em adição, investigar se a exposição ao trauma na infância poderia influenciar os parâmetros investigados. Animais: comparar as expressões gênica e protéica e a metilação dos genes *Grin1*, *Grin2a* e *Grin2b* do NMDAR em amostras cerebrais [hipocampo e córtex pré-frontal (CPF)] e no sangue de ratos submetidos ao isolamento social após o desmame e nas mesmas estruturas cerebrais de ratas submetidas ao tratamento com fenciclidina subcrônica (PCP), avaliando também se as alterações são tecido-específicas e se ocorrem correlações cérebro-sangue. **Métodos.** Humanos: estudo caso-controle, transversal. Incluídos 166 pacientes em PEP, 76 irmãos e 166 controles pareados por idade e sexo nas análises de aminoácidos (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas) e SNVs (RT-PCR). Selecionados 35 pacientes com espectro da esquizofrenia, 21 irmãos e 35 controles pareados por idade, sexo e escolaridade nas análises de metilação do DNA (pirosequenciamento). Animais: ratos da linhagem *Wistar* alojados isoladamente ou em grupos logo após o desmame (21 dias; n=10/grupo) durante 10 semanas e expostos ao teste do campo aberto. Ratas da linhagem *Hooded-Lister* abrigadas em dois grupos (n=10/grupo) em ratas que receberam 2 mg/kg de PCP ou veículo por sete dias. Após os testes comportamentais, os tecidos cerebrais foram dissecados para as extrações de RNA/DNA e as subunidades do NMDAR mensuradas por qRT-PCR, ELISA e pirosequenciamento. Para humanos e animais, os dados foram analisados usando testes paramétricos e não paramétricos de acordo com a

distribuição dos dados. **Resultados.** Humanos: pacientes em PEP – redução dos níveis plasmáticos de GABA comparados aos irmãos e controles; hipermetilação do *LINE-1* e hipometilação do *GRIN2B* com os CpGs correlacionados à menor QI comparados aos controles. Irmãos não psicóticos – redução plasmática do ácido glutâmico, ácido glutâmico+glutamina e prolina comparados aos controles e aumento de triptofano comparados aos pacientes e controles; maior frequência da variante G do rs1805502 (*GRIN2B*) e hipermetilação do *LINE-1* comparados aos controles e hipermetilação do *GRIN1* nos irmãos com trauma na infância em relação aos irmãos sem trauma. Controles – hipometilação de *GRIN2B* associado ao trauma na infância. Animais: animais isolados – hiperlocomoção na periferia e centro da arena; RNAm diminuído no CPF para todos os marcadores; aumento da proteína NR1 no hipocampo e sangue; hipermetilação de *Grin1* no CPF e sangue e do *Grin2b* no hipocampo e sangue. Ratas submetidas ao PCP – prejuízos no reconhecimento de novos objetos; níveis aumentados de RNAm de *Grin2a* e *Grin2b* no CPF; baixos níveis de proteína NR1 no CPF e hipocampo; hipermetilação do *Grin1* e *Grin2b* no CPF e no hipocampo. Associações entre RNAm/proteína e metilação do DNA encontradas em ambas as áreas cerebrais e no sangue. **Conclusão.** Humanos: os pacientes em PEP apresentaram redução plasmática de GABA e os irmãos não afetados podem ser um possível grupo de risco para anormalidades metabólicas, bem como os irmãos apresentaram maior frequência da variante de risco relacionada ao *GRIN2B*. A repressão epigenética do *GRIN2B* pode ser um fator contribuinte no primeiro episódio de esquizofrenia e associado à redução do QI em pacientes. Animais: alterações na metilação observadas nos modelos animais podem estar subjacentes às mudanças nas expressões de RNAm/proteínas do NMDAR causadas pela criação do isolamento e pela administração de PCP. Essas alterações podem estar correlacionadas com interrupções na neurotransmissão glutamatérgica, resultando em um desequilíbrio excitatório semelhante ao que ocorre nas psicoses. No entanto, a direção oposta da metilação do DNA entre humanos e animais pode ser explicada pelas diferentes sequências de DNA estudadas. Este estudo apóia a nossa hipótese de que as alterações nos NMDARs estão presentes no cérebro e sangue, sugerindo que os mecanismos epigenéticos estão envolvidos na fisiopatologia das psicoses e podem ser alvos para futuras estratégias farmacoterapêuticas.

Palavras-chave: Aminoácidos; Biomarcadores metabólicos; Espectrometria de massa por cromatografia em fase gasosa; Esquizofrenia; Expressão de proteínas; Expressão de RNAm; Fenciclidina; *GRIN1*; *GRIN2A*; *GRIN2B*; Irmãos; Isolamento social após o desmame; Metilação do DNA; NMDAR; Variante de nucleotídeo único; Primeiro episódio psicótico; Trauma na infância.

Abstract

ABSTRACT

LOUREIRO, CM. **Translational study of the N-methyl-d-aspartate receptor in a first psychotic episode and in animal models of psychosis.** 2021. 313 p. Thesis (Doctor in Clinical Medicine) – Ribeirão Preto Medical School. University of São Paulo. Ribeirão Preto, 2021.

Background. DNA methylation can mediate gene-environment interactions in psychosis. N-methyl-d-aspartate receptor (NMDAR) is essential for neurodevelopment, as well as are sensitive to environmental stressors, such as childhood trauma. However, the mechanisms underlying the development of these disorders are poorly elucidated. For this reason, our study has a strong translational relevance integrating genetic-epigenetic-environmental factors in first-episode psychosis (FEP) patients and on animal models of psychosis (early stress and pharmacology). **Aims. Humans:** to compare the amino acids profile related to the glutamatergic system, the single nucleotide variants (SNVs) and DNA methylation of the *GRIN1*, *GRIN2A* and *GRIN2B* NMDAR genes in blood samples from first-episode psychosis (FEP) patients, non-psychotic siblings and community-based controls. In addition, to investigate whether exposure to childhood trauma could influence the parameters investigated. **Animals:** we compared the NR1 and NR2 mRNA/protein and the DNA methylation of *Grin1*, *Grin2a* and *Grin2b* of NMDAR promoter region in the blood, prefrontal cortex (PFC) and hippocampus of male *Wistar* rats exposed to isolation rearing and in the PFC and hippocampus of female *Lister-Hooded* rats submitted to phencyclidine (PCP) administration. We also verified if these alterations are tissue-specific or if the brain changes are extended to the blood. **Methods. Humans:** This is a case-control, cross-sectional study. Included 166 FEP patients, 76 siblings and 166 controls matched for age and sex for the analysis of amino acids (gas chromatography-mass spectrometry) and SNVs (RT-PCR). Selected a subsample of 35 patients with schizophrenia spectrum, 21 siblings and 35 controls matched for age, sex and years of schooling for DNA methylation analysis (pyrosequencing). **Animals:** *Wistar* rats were kept isolated or grouped (n=10/group) from weaning for 10 weeks and then exposed to the Open Field; while *Lister-Hooded* rats were sheltered in two groups (n=10/group) divided in rats that received 2 mg/kg of PCP or vehicle for seven days. Afterwards the behavioural tests, the tissues were dissected for RNA/DNA extractions and NMDAR subunits were analysed using qRT-PCR, ELISA and pyrosequencing. For humans and animals, data were analysed by parametric and non-parametric tests. **Results. Humans:** FEP patients – reduced GABA plasma levels when compared to siblings and controls; *LINE-1* hypermethylation and *GRIN2B* hypomethylation

when compared to controls with CpGs correlated with a measure of intellectual quotient. Non-psychotic Siblings – reduced glutamic acid, glutamic acid+glutamine and proline plasma levels in comparison to controls and increased tryptophan when compared to FEP patients and controls; higher genotype frequency of SNV rs1805502 (*GRIN2B*) when compared to controls; *LINE-1* hypermethylation in comparison to controls; *GRIN1* hypermethylation in siblings with childhood trauma in comparison to siblings without a history of trauma. Controls – *GRIN2B* hypomethylation associated with childhood trauma. Animals: isolated-reared animals – hyperlocomotion in the periphery and in the centre of the arena when compared to the grouped; decreased mRNA in PFC for all markers; increased NR1 protein in the hippocampus; hypermethylation of *Grin1* in PFC and blood and *Grin2b* in hippocampus and blood, compared to grouped rats. PCP rats – increased mRNA levels of *Grin2a* and *Grin2b* in the PFC; low NR1 protein levels in the PFC and in the hippocampus and hypermethylation of *Grin1* and *Grin2b* in PFC and hippocampus. Associations between mRNA/protein and DNA methylation were found for both brain areas and in the blood. **Conclusions.** Humans: FEP patients presented reduced GABA plasma profile, while unaffected siblings may be a possible risk group for metabolic abnormalities, as well as siblings presented higher frequency of risk variant related to the *GRIN2B* gene. Epigenetic hyper-repression of the *GRIN2B* promoter may be a contributing factor in the first episode of schizophrenia and associated with intelligence quotient impairments in patients. Animals: this study indicates that epigenetic DNA methylation may underlie NMDAR mRNA/protein expression alterations caused by isolation rearing and/or by PCP administration. Alterations in NMDAR genes of animals may correlated with disruptions in glutamatergic neurotransmission, resulting in an imbalance in the excitatory equivalent to that seen in psychosis. However, the opposite direction of DNA methylation between human and rat studies may be explained by the different DNA sequences studied. This study supports our hypothesis that changes in NMDARs are present across the brain-blood, indicating that epigenetic mechanisms are involved in the pathophysiology of schizophrenia and other psychoses and can be valuable targets for future pharmacotherapeutic strategies.

Keywords: Amino acids; Childhood trauma; DNA methylation; Metabolic biomarkers; First episode-psychosis; Gas chromatography mass spectrometry; *GRIN1*; *GRIN2A*; *GRIN2B*; Isolation rearing from weaning; mRNA expression; NMDAR; Phencyclidine; Protein expression; Schizophrenia; Siblings; Single nucleotide variant.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração simplificada de uma estrutura heteromérica do NMDAR. Nesta figura o NMDAR é composto pelas subunidades NR1 e NR2 (A-D) e seus domínios de ligação na sua ativação em condições normais e os possíveis fatores biológicos envolvidos na disfunção do NMDAR na esquizofrenia.	65
Figura 2. Cromatograma da análise quantitativa de detecção dos aminoácidos baseada na razão massa-carga de cada aminoácido por GC-MS. A figura ilustra o pico do aminoácido glutamato com os seus íons correspondentes (SIM, detector de massas no modo de monitoramento dos íons selecionados nos picos 170 e 230 para o ácido glutâmico).	91
Figura 3. <i>Beanplot</i> dos níveis plasmáticos dos aminoácidos. Estão demonstrados os valores brutos em $\mu\text{mol/L}$ de pacientes em PEP, irmãos e controles ($n=408$) [figura adaptada do artigo (LOUREIRO <i>et al.</i> , 2020a)]. *Representa a comparação dos grupos com valores de $p<0,05$. Os dados foram analisados pelo MLG ajustados por sexo, idade e IMC.	97
Figura 4. Gráfico de discriminação alélica. A legenda representa os alelos homozigoto dominante, heterozigoto e homozigoto recessivo para determinada SNV.	111
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 1% com brometo de etídio, PCR para o gene <i>GRIN2B</i> em humanos. A primeira banda corresponde ao corante fluorescente marcador de DNA (DNA Ladder) e a última coluna demonstra o controle negativo (sem a presença de banda).	123
Figura 6. Ferramenta <i>BLAST</i> que demonstra a região promotora do <i>GRIN2B</i> (Cromossomo 12, NG_031854.1) mostrando os CpGs escolhidos para serem analisados (numerados de 1 a 5 e sublinhados) e a localização de cada sequência escolhida para análise (ensaios para humanos, caixas vermelhas) no pirosequenciamento nesses alvos de CpG.	123
Figura 7. Picograma das regiões específicas de metilação do <i>GRIN2A</i> da amostra de controle analisadas por pirosequenciamento no sistema Pyromark Q24. O rótulo de qualidade de um CpG afetado pode mudar de azul para amarelo, indicando menor qualidade da verificação, mas que o teste ainda pode ser aceitável, ou para vermelho, indicando falha na qualidade. Nesta figura, em específico, podemos notar os dois CpGs com qualidade azul indicando excelente qualidade do experimento.	124
Figura 8. Desempenho do QI entre os pacientes com primeiro episódio de esquizofrenia, irmãos e controles. Os valores são mostrados como média $\pm$ EPM [figura adaptada do artigo (FACHIM <i>et al.</i> , 2019)].	128

Figura 9. Metilação do <i>LINE-1</i> no sangue de pacientes em primeiro episódio de esquizofrenia, irmãos e controles. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM [figura adaptada do artigo (FACHIM <i>et al.</i> , 2019)].	129
Figura 10. Sem alteração da metilação do <i>GRIN1</i> nos pacientes e irmãos comparados aos controles. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM [figura adaptada do artigo (FACHIM <i>et al.</i> , 2019)].	129
Figura 11. Sem alteração da metilação do <i>GRIN2A</i> no sangue de pacientes e irmãos, comparados aos controles. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM.	130
Figura 12. Metilação do promotor do gene <i>GRIN2B</i> no sangue de pacientes em primeiro episódio de esquizofrenia, irmãos e controles. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ [figura adaptada do artigo (FACHIM <i>et al.</i> , 2019)].	131
Figura 13. Correlação entre as alterações de metilação nos CpGs 1 (A), 4 (B) e 5 (C) do <i>GRIN2B</i> e o desempenho de QI em pacientes e irmãos [figura adaptada do artigo (FACHIM <i>et al.</i> , 2019)].	135
Figura 14. Correlação entre as concentrações plasmáticas de NR2 e a metilação do <i>GRIN2B</i> em CpG1 nos pacientes.	136
Figura 15. Indivíduos com ou sem trauma na infância em relação à metilação do <i>LINE-1</i> . Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM [figura adaptada do artigo (LOUREIRO <i>et al.</i> , 2021)].	146
Figura 16. (A) Irmãos com trauma na infância apresentaram hipermetilação do <i>GRIN1</i> no CpG1 em relação aos irmãos sem trauma. (B) Nenhuma diferença significativa na metilação do <i>GRIN2A</i> entre os grupos diagnóstico, trauma na infância ou interação entre os grupos de diagnóstico e trauma. (C) Sem alterações de metilação do <i>GRIN2B</i> entre os grupos em relação ao trauma na infância ou interação entre os grupos de diagnóstico e trauma. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. * $p<0,001$ [figura adaptada do artigo (LOUREIRO <i>et al.</i> , 2021)].	148
Figura 17. Sequência analisada do gene <i>GRIN1</i> em humanos. Os três CpGs e seus respectivos fatores de transcrição estão destacados em negrito e agrupados na caixa vermelha [figura adaptada do artigo (LOUREIRO <i>et al.</i> , 2021)].	150
Figura 18. Gráficos das curvas padrão obtidos pelo método ELISA. Método quantitativo para a subunidade NR1 (ng/mL) (A) e sanduíche para a subunidade NR2 (pg/mL) (B) nos ensaios com amostras de animais.	172
Figura 19. Gráfico de não amplificação dos genes do NMDAR por RT-qPCR.	174

Figura 20. Efeito da condição de criação (isolado vs. agrupado) no número de cruzamentos na periferia e centro da arena (20 min) após 10 semanas de isolamento social. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ [figura adaptada do artigo (CORSI-ZUELLI <i>et al.</i> , 2018)].	176
Figura 21. Efeito da condição de criação (isolados versus agrupados) na expressão dos genes do NMDAR no CPF e hipocampo de ratos. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. ** $p < 0,01$ [figura adaptada do artigo (LOUREIRO <i>et al.</i> , 2020b)].....	177
Figura 22. Efeitos da condição de criação (isolados versus agrupados) sobre a expressão das proteínas NR1 e NR2 no CPF, hipocampo e sangue periférico de ratos. Concentrações aumentadas de NR1 no hipocampo e sangue periféricos dos ratos isolados quando comparados aos agrupados (A); e sem alterações na expressão protéica de NR2 tanto nos tecidos cerebrais como no sangue periférico (B). Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. ** $p < 0,01$ [figura adaptada do artigo (LOUREIRO <i>et al.</i> , 2020b)].	178
Figura 23. Porcentagem da metilação da média dos CpGs do <i>Line-1</i> no CPF, hipocampo e sangue de ratos submetidos ao isolamento social após o desmame (isolados versus agrupados). Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM [figura adaptada do artigo (LOUREIRO <i>et al.</i> , 2020b)].	179
Figura 24. Porcentagem da metilação do DNA dos genes <i>Grin1</i> , <i>Grin2a</i> e <i>Grin2b</i> no CPF, hipocampo e sangue de ratos submetidos ao isolamento social após o desmame (isolados versus agrupados). Hipermetilação do <i>Grin1</i> no CPF e no sangue periférico ambos no CpG5 dos ratos isolados comparados aos agrupados (A); sem alterações na metilação do <i>Grin2a</i> tanto nos tecidos cerebrais como no sangue periférico entre os grupos (B); e hipermetilação do <i>Grin2b</i> no hipocampo e sangue periférico ambos no CpG4 de ratos isolados em comparação aos agrupados (C). Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ [figura adaptada do artigo (LOUREIRO <i>et al.</i> , 2020b)].....	180
Figura 25. Correlações entre a metilação do DNA e as expressões gênica/protéica dos tecidos cerebrais e sangue de animais isolados e agrupados. Correlação negativa entre os níveis de RNAm de <i>Grin1</i> e de metilação de <i>Grin1</i> em CpG5 no CPF em ambos os ratos (A); correlação negativa entre a metilação de <i>Grin2b</i> no CpG4 e os níveis de proteína NR2 no hipocampo nos ratos isolados (B) [figuras A e B adaptadas do artigo (LOUREIRO <i>et al.</i> , 2020b)]; correlação positiva entre a metilação do <i>Grin2b</i> no CpG4 no sangue periférico e hipocampo de ratos isolados (C) e correlação positiva entre os níveis protéicos de NR1 no hipocampo e sangue periférico em ambos os ratos (D).	182

Figura 26. Picograma das regiões específicas de metilação do <i>Grin1</i> da amostra de CPF da rata que recebeu veículo analisadas por pirosequenciamento no sistema Pyromark Q24. O rótulo de qualidade de um CpG afetado pode mudar de azul para amarelo, indicando menor qualidade da verificação, mas que o teste ainda pode ser aceitável, ou para vermelho, indicando falha na qualidade. Nesta figura em específico, podemos notar dois CpGs com qualidade azul e os três últimos em amarelo. Também podemos notar que todas as amostras estão marcadas em azul indicando excelente qualidade do experimento.	191
Figura 27. Comprometimento no reconhecimento de novos objetos nas ratas submetidas à administração de PCP subcrônica [figura adaptada do artigo (GRAYSON; IDRIS; NEILL, 2007)].	193
Figura 28. Efeitos do tratamento subcrônico com PCP (PCP versus veículo) na expressão gênica das subunidades do NMDAR no CPF e hipocampo de ratas. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$. Considerado o gene <i>Actb</i> como referência.	194
Figura 29. Efeitos do tratamento com PCP (PCP versus veículo) na expressão de proteínas para subunidades NMDAR no CPF e hipocampo de ratas. Concentrações protéicas de NR1 (ng/mg) (A); concentrações protéicas de NR2 (pg/mg) (B). Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. ** $p < 0,01$	195
Figura 30. Porcentagem da metilação do <i>Line-1</i> no CPF (A) e hipocampo (B) de ratas submetidas ao tratamento subcrônico de PCP (PCP versus veículo). Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM [figura adaptada do artigo (FACHIM <i>et al.</i> , 2016)].	196
Figura 31. Porcentagem média da metilação do DNA dos genes <i>Grin1</i> (A), <i>Grin2a</i> (B) e <i>Grin2b</i> (C) no CPF e hipocampo de ratas submetidas ao tratamento subcrônico de PCP (PCP versus veículo). Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$	197
Figura 32. Correlação negativa entre a metilação do DNA do <i>Grin2b</i> e os níveis de proteína NR2 no hipocampo de ratas submetidas ao PCP.	199
Figura 33. Fatores genéticos e ambientais relacionados ao NMDAR envolvidos no desenvolvimento da esquizofrenia e outras psicoses	214

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis clínicas e sóciodemográficas dos pacientes em PEP, irmãos não psicóticos e controles de base populacional.....	95
Tabela 2. Tamanhos de efeito e a estatística de tamanho de efeito de linguagem comum correspondente entre pacientes em PEP-irmãos-controles em relação ao perfil plasmático dos aminoácidos	98
Tabela 3. Comparações entre os pares correspondentes de pacientes em PEP-irmãos em relação ao perfil de aminoácidos no plasma e os tamanhos de efeito e a estatística de tamanho de efeito na linguagem comum correspondente.....	99
Tabela 4. Diferenças entre os níveis plasmáticos de aminoácidos em relação às variáveis clínicas em pacientes em PEP.....	101
Tabela 5. Volume de reagentes utilizados na reação de PCR-TR.....	109
Tabela 6. Sequência contextual para as SNVs associadas aos genes do NMDAR.....	110
Tabela 7. Distribuição das frequências genótípicas e alélicas para as SNVs dos genes dos NMDAR nos pacientes em PEP, irmãos e controles	113
Tabela 8. Comparação das frequências das variantes genéticas entre pacientes em PEP, irmãos e controles de base populacional.....	115
Tabela 9. Lista dos primers projetados para cada gene e os iniciadores biotinilados utilizados nas reações de PCR e pirosequenciamento dos humanos	122
Tabela 10. Variáveis sociodemográficas e clínicas de pacientes em primeiro episódio de esquizofrenia, irmãos e controles.....	127
Tabela 11. Metilação do gene <i>GRIN2B</i> (CpGs 1, 4 e 5) dos pacientes em relação às variáveis sóciodemográficas e clínicas.....	133
Tabela 12. Variáveis sociodemográficas e clínicas dos grupos de diagnóstico associados ao trauma (n=103).....	145
Tabela 13. Correlações entre a metilação do DNA dos genes do NMDAR em relação aos escores do CTQ em controles, irmãos e pacientes em PEP	151
Tabela 14. Níveis plasmáticos dos aminoácidos em relação aos genótipos dos genes do NMDAR e interação grupo diagnóstico & genótipo	159
Tabela 15. Correlação parcial entre os níveis plasmáticos dos aminoácidos e a metilação do DNA dos genes do NMDAR em controles (C), irmãos (I) e pacientes em PEP (P).....	162
Tabela 16. Associações entre os genótipos das SNVs e a interação grupo diagnóstico & genótipo em relação a metilação dos genes do NMDAR	164

Tabela 17. Lista dos primers projetados para cada gene e os iniciadores biotinilados utilizados nas reações de PCR e pirosequenciamento dos ratos 174

Tabela 18. Correlações entre a metilação do DNA e as expressões de mRNA e proteína das subunidades do NMDAR nos tecidos cerebrais de ratas submetidas ao PCP e veículo 198

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	Ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico
APA	American Psychiatric Association
APEP	Ambulatório de Primeiro Episódio Psicótico
BPRS	Escala Breve de Avaliação Psiquiátrica
cAMP	Adenosina 3'.5'-monofosfato cíclico
CEQ	Cannabis Experiences Questionnaire
CID	Classificação Internacional de Doenças
CPF	Córtex pré-frontal
CpG	Dinucleotídeo citosina-fosfato-guanina
CV	Coeficiente de Variação
D2	Receptor de dopamina tipo 2
DA	Dopamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
DP	Desvio Padrão
DRS	Distrito Regional de Saúde
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Desordens Mentais
DUP	Duração de Psicose Não Tratada
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EOP	Esquizofrenia e Outras Psicoses
eQTLs	Loci quantitativos associados à expressão de alelo
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

GABA	Ácido gama-aminobutírico
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GLN	Glutamina
GLU	Ácido glutâmico
GLY	Glicina
GWAS	Estudos de associação genômica ampla
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
KA	Cainato
KYNA	Ácido quinurênico
iGluRs	Receptores ionotrópicos de glutamato
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LTP	Potenciação de longa duração
meQTLs	Metilação de loci quantitativos associados à expressão de alelo
mGluRs	Receptores metabotrópicos de glutamato
Min	Minutos
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NMDARs	Receptores do tipo NMDA
NOR	Reconhecimento de novos objetos
NOS	Cronograma dos Sintomas de Nottingham
OCM	Outra Condição Médica
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde

OR	Odds Ratio
PCP	Fenciclidina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEP	Primeiro Episódio Psicótico
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real
QI	Quociente de inteligência
SCID	Structured Clinical Interview for DSM
Seg	Segundos
SER	Serina
SIM	Sistema de ionização de elétrons
SNC	Sistema Nervoso Central
SNV	Variante de nucleotídeo simples
SPA	Substância Psicoativa
SRT	Serotonina
SUS	Sistema Único de Saúde
THC	Tetrahydrocannabinol
TIG-NV	Teste de Inteligência Geral Não Verbal
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TMB	Peroxidase de 3.3'.5.5'-Tetramethylbenzidine
TRP	Triptofano
TYR	Tirosina
α7nACh	Receptor nicotínico de acetilcolina

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	55
1.1. ESQUIZOFRENIA E OUTRAS PSICOSES – DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	55
1.2. PATOGÊNESE DA ESQUIZOFRENIA E OUTRAS PSICOSES	57
1.2.1. <i>Hipótese glutamatérgica</i>	57
1.2.2. <i>Hipótese dos triplos mecanismos: interação entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais</i>	61
1.3. HIPOFUNÇÃO DO NMDAR NA ESQUIZOFRENIA E OUTRAS PSICOSES	65
1.3.1. <i>NMDAR: estrutura e função</i>	65
1.3.2. <i>Achados clínicos da hipofunção do NMDAR na esquizofrenia e outras psicoses</i>	66
1.4. FATORES GENÉTICOS, EPIGENÉTICOS E AMBIENTAIS ASSOCIADOS AO NMDAR NA ESQUIZOFRENIA E OUTRAS PSICOSES	69
1.4.1. <i>Fatores genéticos</i>	69
1.4.2. <i>Fatores epigenéticos</i>	71
1.4.3. <i>Fatores ambientais</i>	73
1.5. MODELOS ANIMAIS DE ESQUIZOFRENIA	74
1.5.1. <i>Modelo ambiental: isolamento social a partir do desmame</i>	74
1.5.2. <i>Modelo farmacológico: injeção subcrônica de PCP, um antagonista não-competitivo do NMDAR</i>	75
2. JUSTIFICATIVA	79
3. OBJETIVO GERAL	82
3.1. ESTUDO COM HUMANOS	82
3.1.1. <i>Objetivos específicos</i>	82
3.1.2. <i>Hipóteses</i>	82
3.2. MODELOS EXPERIMENTAIS	83
3.2.1. <i>Objetivos específicos</i>	83
3.2.2. <i>Hipóteses</i>	83
4. PERFIL PLASMÁTICO DE AMINOÁCIDOS NO PRIMEIRO EPISÓDIO PSICÓTICO, IRMÃOS NÃO AFETADOS E CONTROLES DA COMUNIDADE.....	86
4.1. OBJETIVOS E HIPÓTESES	86
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	87
4.2.1. <i>Contextualização e delineamento do estudo humano</i>	87

4.2.2. Coleta de dados	87
4.2.3. Participantes	87
4.2.4. Instrumentos de avaliação	88
4.2.4.1. Diagnóstico e gravidade de sintomas e psicopatologia	88
4.2.4.2. Avaliação de fatores de risco ambientais	89
4.2.5. Material biológico	89
4.2.5.1. Quantificação plasmática dos aminoácidos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	90
4.2.6. Análise estatística	91
4.2.7. Aspectos éticos	93
4.3. RESULTADOS	93
4.3.1. Características sociodemográficas e clínicas da amostra	93
4.3.2. Níveis plasmáticos dos aminoácidos - Comparação dos grupos	96
4.3.3. Associações entre níveis plasmáticos de aminoácidos e características sociodemográficas e clínicas nos pacientes em PEP	100
4.4. DISCUSSÃO	103
4.4.1. Perfil plasmático de aminoácidos em pacientes em PEP em relação a irmãos não psicóticos e controles de base populacional	103
4.4.2. Perfil plasmático de aminoácidos em irmãos não psicóticos em comparação com controles de base populacional	105
4.4.3. Limitações e pontos fortes	106
4.5. CONCLUSÃO	107
5. INVESTIGAÇÃO DAS VARIANTES DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO RELACIONADOS AOS GENES <i>GRIN1</i>, <i>GRIN2A</i> E <i>GRIN2B</i>	108
5.1. OBJETIVOS E HIPÓTESES	108
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	108
5.2.1. Genes candidatos e seleção das variantes genéticas	108
5.2.2. Análises moleculares	109
5.2.2.1. Genotipagem dos genes <i>GRIN1</i>, <i>GRIN2A</i> e <i>GRIN2B</i> por RT-PCR	109
5.2.3. Análise estatística	111
5.3. RESULTADOS	112
5.3.1. Variáveis sociodemográficas e clínicas dos participantes	112
5.3.2. Distribuições dos genótipos das SNVs <i>GRIN1</i> , <i>GRIN2A</i> e <i>GRIN2B</i>	112

5.3.3. Comparações entre os genótipos dos genes <i>GRIN1</i> , <i>GRIN2A</i> e <i>GRIN2B</i> com a gravidade de sintomas nos pacientes em PEP	116
5.4. DISCUSSÃO	116
5.4.1. Limitações e pontos fortes	118
5.5. CONCLUSÃO	119
6. INVESTIGAÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA NOS GENES <i>LINE-1</i>, <i>GRIN1</i>, <i>GRIN2A</i> E <i>GRIN2B</i>	120
6.1. OBJETIVOS E HIPÓTESES	120
6.2. MATERIAL E MÉTODOS	120
6.2.1. Instrumentos de avaliação	121
6.2.1.1. Avaliação Neurocognitiva.....	121
6.2.2. Análises moleculares	121
6.2.2.1. Protocolo de extração de DNA e RNA e conversão em cDNA	121
6.2.2.2. Tratamento do DNA com bissulfito de sódio, sequenciamento de PCR e pirosequenciamento	121
6.2.3. Análise estatística	125
6.3. RESULTADOS.....	125
6.3.1. Características demográficas e clínicas dos participantes	125
6.3.2. Metilação global do DNA (<i>LINE-1</i>)	128
6.3.3. Metilação dos genes do NMDAR.....	129
6.3.4. Correlações entre as variáveis clínicas e a metilação do <i>LINE-1</i>	131
6.3.5. Correlações entre as variáveis clínicas e a metilação dos genes do NMDAR.....	132
6.4. DISCUSSÃO	137
6.4.1. Limitações e pontos fortes	139
6.5. CONCLUSÃO	140
7. AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO DOS GENES <i>LINE-1</i> E DO NMDAR EM RELAÇÃO AO TRAUMA NA INFÂNCIA	142
7.1. OBJETIVOS E HIPÓTESES	142
7.2. MATERIAL E MÉTODOS	142
7.2.1. Instrumentos de avaliação	142
7.2.1.1. Avaliação de fatores de risco ambientais.....	142
7.2.2. Análise estatística	143
7.3. RESULTADOS.....	144
7.3.1. Participantes.....	144

7.3.2. <i>Metilação do LINE-1 em relação ao trauma</i>	146
7.3.3. <i>Metilação do GRIN1 em relação ao trauma</i>	146
7.3.4. <i>Metilação do GRIN2A em relação ao trauma</i>	147
7.3.5. <i>Metilação do GRIN2B em relação ao trauma</i>	147
7.3.6. <i>Correlação entre a metilação dos genes do NMDAR e a pontuação total de CTQ</i> ..	150
7.4. DISCUSSÃO	152
7.4.1. <i>Limitações e pontos fortes</i>	154
7.5. CONCLUSÃO	155
8. INTERAÇÕES ENTRE AMINOÁCIDOS, VARIANTES E METILAÇÃO RELACIONADOS AOS GENES DO NMDAR	157
8.1. OBJETIVOS E HIPÓTESES	157
8.2. MATERIAL E MÉTODOS	157
8.2.1. <i>Análise estatística</i>	157
8.3. RESULTADOS	158
8.3.1. <i>Associações com as concentrações plasmáticas de aminoácidos</i>	158
8.3.1.1. Aminoácidos e variantes	158
8.3.1.2. Aminoácidos e metilação dos genes do NMDAR	161
8.3.2. <i>Associações com os variantes</i>	163
8.3.2.1. Variantes e metilação dos genes do NMDAR	163
8.4. DISCUSSÃO	166
8.5. CONCLUSÃO	166
9. ALTERAÇÕES DO NMDAR EM RATOS SUBMETIDOS AO ISOLAMENTO SOCIAL A PARTIR DO DESMAME	169
9.1. OBJETIVOS E HIPÓTESES	169
9.2. MATERIAL E MÉTODOS	169
9.2.1. <i>Isolamento social a partir do desmame</i>	169
9.2.1.1. Teste do Campo Aberto	169
9.2.2. <i>Material biológico</i>	170
9.2.2.1. Concentrações protéicas de NR1 e NR2	170
9.2.2.2. Protocolo de extração de DNA e RNA e conversão em cDNA	172
9.2.2.3. Protocolo de PCR para expressão gênica (RT-qPCR)	173
9.2.2.4. Tratamento do DNA com bissulfito de sódio, sequenciamento de PCR e pirosequenciamento	174
9.2.3. <i>Análise estatística</i>	175

9.2.4. Aspectos éticos.....	175
9.3. RESULTADOS.....	175
9.3.1. Teste de campo aberto: hiperlocomção.....	175
9.3.2. Expressão gênica nos tecidos cerebrais.....	176
9.3.3. Expressão das proteínas NR1 e NR2 nos tecidos cerebrais e sangue periférico.....	177
9.3.4. Metilação do DNA dos genes do NMDAR nos tecidos cerebrais e sangue periférico.....	178
9.3.5. Correlações entre RNAm, proteína e metilação do DNA em ratos isolados e agrupados.....	181
9.3.5.1. Correlações entre a metilação do DNA e os níveis de RNAm/proteína das subunidades NMDAR entre tecidos cerebrais e sangue.....	181
9.4. DISCUSSÃO.....	183
9.4.1. Alterações nas subunidades do NMDAR em ratos submetidos à criação em isolamento.....	183
9.4.2. Limitações e pontos fortes.....	186
9.5. CONCLUSÃO.....	187
10. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SUBCRÔNICA DE FENCICLIDINA NAS SUBUNIDADES DO NMDAR EM RATAS.....	189
10.1. OBJETIVOS E HIPÓTESES.....	189
10.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	189
10.2.1. Injeção subcrônica de PCP.....	189
10.2.1.1. Reconhecimento de novos objetos e atividade locomotora.....	190
10.2.1.2. Expressão proteica e gênica, tratamento do DNA com bissulfito de sódio, sequenciamento de PCR e pirosequenciamento.....	191
10.2.2. Análise estatística.....	192
10.2.3. Aspectos éticos.....	192
10.3. RESULTADOS.....	192
10.3.1. Reconhecimento de novos objetos e atividade de locomoção.....	192
10.3.2. Expressões de RNAm e proteicas nos tecidos cerebrais.....	193
10.3.3. Metilação dos genes <i>Line-1</i> , <i>Grin1</i> , <i>Grin2a</i> e <i>Grin2b</i> dos tecidos cerebrais.....	195
10.3.4. Correlações entre RNAm, proteína e metilação do DNA em ratas tratadas com PCP versus veículo.....	198
10.3.4.1. Correlações entre a metilação do DNA, RNAm e proteína do NMDAR.....	198
10.4. DISCUSSÃO.....	199

10.4.1. Limitações	202
10.5. CONCLUSÃO.....	202
11. CONSIDERAÇÕES FINAIS	205
11.1. UMA VISÃO INTEGRADA DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ESQUIZOFRENIA E OUTRAS PSICOSES ASSOCIADOS AO NMDAR.....	205
11.1.1. Limitações.....	207
11.1.2. Pontos fortes	208
12. CONCLUSÃO.....	212
12.1. ESTUDOS EM HUMANOS	212
12.2. ESTUDOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS.....	212
REFERÊNCIAS	216
<i>Apêndices</i>	<i>247</i>
<i>Anexos</i>	<i>251</i>

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. ESQUIZOFRENIA E OUTRAS PSICOSES – DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Os transtornos psicóticos contribuem significativamente para a carga global de doenças ao reduzir a qualidade de vida e aumentar as taxas de morbi-mortalidade nos indivíduos. Em 2013, os transtornos psicóticos acometeram 23,6 milhões de pessoas em todo o mundo (WHITEFORD *et al.*, 2013), com taxas de recuperação em um a cada sete indivíduos (JÄÄSKELÄINEN *et al.*, 2013). Recentemente, foi demonstrada uma estimativa de prevalência média das psicoses ao longo da vida de 7,49 por 1.000 pessoas (MORENO-KÜSTNER; MARTÍN; PASTOR, 2018), enquanto a incidência foi de 21,4 por 100.000 pessoas-ano (IC95%, 19,4-23,4 por 100.000 pessoas-ano) (JONGSMA *et al.*, 2018). Em nosso meio, a incidência de psicose foi maior nos grupos adulto jovens, homens e entre pessoas que se auto-relataram como pretas ou pardas, com uma incidência de psicose menor na cidade de Ribeirão Preto (16,69 por 100.000 pessoas-ano em risco; IC95% 15,68-17,70), estado de São Paulo, em comparação com a incidência média nos demais municípios da região (21,25 por 100.000 pessoas-ano em risco; IC95% 20,20– 22,31) (DEL-BEN *et al.*, 2019).

Os transtornos psicóticos incluem tanto as psicoses afetivas, como o transtorno depressivo maior e o transtorno afetivo bipolar, assim como as psicoses não afetivas que têm a esquizofrenia como o seu principal diagnóstico (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). A esquizofrenia apresenta uma prevalência ao longo da vida de aproximadamente 1% (KIRKBRIDE *et al.*, 2012), sendo a 11^a causa mundial de incapacidade em 2013 (JÄÄSKELÄINEN *et al.*, 2013; WHITEFORD *et al.*, 2013). Ela é a responsável por uma enorme carga de cuidados de saúde que conferem consequências devastadoras tanto para o indivíduo afetado quanto para os membros da família (KAPLAN; ISARANUWATCHAI; HOCH, 2017; WHITEFORD *et al.*, 2013). Somados a isso, os custos anuais para a esquizofrenia variam de US\$ 94 milhões a US\$ 102 bilhões em todo o mundo (YI CHONG *et al.*, 2016). Por fim, os transtornos psicóticos estão associados à redução da expectativa de vida, com um risco de mortalidade 2,54 vezes maior do que o risco da população em geral (WALKER; MCGEE; DRUSS, 2015), e, especificamente, a esquizofrenia apresenta uma média de 15 anos de vida mais curta do que a população em geral e risco de morte por suicídio de 5% a 10% (HJORTHØJ *et al.*, 2017). Portanto, há uma necessidade clínica e social urgente de melhorar o prognóstico da esquizofrenia e outras psicoses.

O primeiro episódio psicótico (PEP) usualmente acomete indivíduos adultos jovens, podendo apresentar uma fase prodrômica (FUSAR-POLI *et al.*, 2012a, 2012c, 2013), a qual

está associada com sintomas psicóticos mais sutis, além de déficits cognitivos (FUSAR-POLI *et al.*, 2012d), alterações cerebrais neuroquímicas (FUSAR-POLI *et al.*, 2011a; FUSAR-POLI; MEYER-LINDENBERG, 2013), estruturais (FUSAR-POLI *et al.*, 2011b, 2012b) e funcionais progressivas que ocorrem antes do início do tratamento (ANDREOU; BORGWARDT, 2020; FUSAR-POLI *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2013; HAIJMA *et al.*, 2013).

A abordagem diagnóstica para a esquizofrenia e outras psicoses se caracteriza por ser descritiva e atórica baseada, principalmente, no Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013) e na Classificação Internacional de Doenças atualmente na 11ª revisão da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Os sintomas psicóticos se caracterizam pela presença de, pelo menos, dois de cinco sintomas, sendo pelo menos um deles delírios, alucinações ou discurso desorganizado e, os demais, comportamento amplamente desorganizado ou catatônico e sintomas negativos. A sintomatologia deve estar presente por uma parte significativa do tempo e uma ou mais áreas importantes do funcionamento, como trabalho, relações interpessoais ou autocuidado, apresentam-se acentuadamente abaixo do nível alcançado antes do início dos sintomas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Portanto, formular o diagnóstico no momento do primeiro contato com os serviços para o primeiro episódio psicótico é importante para a elaborar estratégias de promoção, prevenção e intervenção precoces.

Somada a isso, os pacientes em PEP frequentemente apresentam comorbidades, como a obesidade e as disfunções metabólicas (BIOQUE *et al.*, 2018; FLEISCHHACKER *et al.*, 2013), as quais por um período prolongado podem levar ao desenvolvimento da síndrome metabólica e isto pode ser devido, em parte, aos efeitos do tratamento com antipsicóticos. Os antipsicóticos são a principal classe de medicamentos prescritos para o tratamento da esquizofrenia e outras psicoses e são classificados em dois grupos: antipsicóticos de primeira geração, que geralmente acarretam efeitos colaterais motores e antipsicóticos de segunda geração, que podem ser a primeira linha no tratamento destes transtornos devido ao menor número de efeitos extrapiramidais (BIAN *et al.*, 2008; GRUNDMANN; KACIROVA; URINOVSKA, 2014). No entanto, dentre os antipsicóticos de segunda geração, a olanzapina está associada com os maiores efeitos de promoção de peso e correlacionada com distúrbios metabólicos (ALLISON *et al.*, 1999; DENT *et al.*, 2012).

Já foi demonstrado que um tratamento precoce e eficaz pode fornecer um melhor prognóstico funcional a longo prazo (ALVAREZ-JIMENEZ *et al.*, 2011). No entanto, é importante destacar que embora os antipsicóticos tenham sido utilizados por várias décadas no

tratamento da esquizofrenia e outras psicoses, estes ainda apresentam uma capacidade limitada de melhorar os sintomas negativos e déficits cognitivos que são preditores robustos de incapacidade funcional persistente na esquizofrenia e outras psicoses (LIM *et al.*, 2016). Consequentemente, estratégias terapêuticas inovadoras no tratamento da esquizofrenia e outras psicoses têm sido de interesse clínico, especialmente considerando que a combinação de tratamentos apresentam melhor resposta comparados ao tratamento farmacológico isolado (AGID; KAPUR; REMINGTON, 2008; GARDNER-SOOD *et al.*, 2015; GRUNDMANN; KACIROVA; URINOVSKA, 2014; LEUCHT *et al.*, 2009). Têm-se sugerido estratégias terapêuticas individualizadas e direcionadas, particularmente para a estratificação de pacientes e estratégias de medicina personalizada, bem como a investigação de mecanismos moleculares em amostras biológicas periféricas como uma nova abordagem para explorar biomarcadores ou para identificar mecanismos alterados relacionados a esquizofrenia e outras psicoses (DAVISON *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2018; NICHOLSON; LINDON, 2008).

Embora a esquizofrenia tipicamente apareça no início da vida adulta, diversos fios de evidências indicam que a sua patogênese começa em estágios iniciais do neurodesenvolvimento (MURRAY; LEWIS; LECTURER, 1987). Evidências estas que incluem o aumento de taxas de complicações uterinas, como as infecções maternas e a desnutrição durante a gestação e ainda complicações obstétricas que incluem nascimento pré-termo e preeclâmpsia (DAVIES *et al.*, 2020). Estudos de pós-morte também fornecem *insights* de alterações moleculares que podem ocorrer durante o neurodesenvolvimento, como as anormalidades na função do receptor N-metil-d-aspartato (NMDAR, do inglês *N-methyl-d-aspartate receptor*) e no sinal glutamatérgico que podem contribuir para um desequilíbrio entre o balanço excitatório-inibitório e a disfunção de redes cerebrais observada em indivíduos com esquizofrenia (YANG *et al.*, 2016). Embora a neurobiologia da esquizofrenia e outras psicoses não seja clara, muito progresso foi feito quanto a uma melhor compreensão de quais receptores de neurotransmissores estão especificamente envolvidos nestas doenças. No entanto, apesar de todo este conhecimento, pouco se sabe sobre como as alterações moleculares se desenvolvem, transformam e se estabelecem ao longo do tempo após o PEP.

1.2. PATOGÊNESE DA ESQUIZOFRENIA E OUTRAS PSICOSES

1.2.1. Hipótese glutamatérgica

Nos últimos 50 anos, o modelo dopaminérgico tem sido a principal hipótese neuroquímica das psicoses, em que o bloqueio do subtipo D2 do receptor de dopamina por agonistas e/ou doadores dopaminérgicos (tais como a anfetamina) produzem psicose em

peessoas saudáveis e tem explicado certos aspectos da psicopatologia da esquizofrenia, especialmente os sintomas positivos (SNYDER, 1976; TAMMINGA; LAHTI, 1996). A hipótese da dopamina na esquizofrenia, formulada na década de 1960, após a descoberta das ações antipsicóticas da clorpromazina, foi extremamente bem-sucedida como princípio heurístico para interpretar os aspectos da etiologia da esquizofrenia, visto que os antipsicóticos bloqueadores do subtipo D2 foram e ainda são capazes de reduzir significativamente estes sintomas.

No entanto, embora a hipótese da dopamina contribua de maneira importante para a saliência dos sintomas positivos, várias hipóteses e contribuições de outros sistemas de neurotransmissores, têm sido elaboradas para explicar a fisiopatologia da esquizofrenia e outras psicoses, como a desregulação do sistema glutamatérgico (HU *et al.*, 2015; LAKHAN; CARO; HADZIMICHALIS, 2013). Uma das hipóteses posteriores e mais recentes da psicose refere-se a noção de que a hiperatividade da dopamina é, na verdade, uma consequência posterior da desregulação do glutamato no córtex pré-frontal. Mais especificamente, a hipótese glutamatérgica sugere que NMDAR hipofuncionais em interneurônios GABA no córtex pré-frontal levam à sinalização do glutamato pela estimulação excessiva da via da dopamina mesolímbica na área tegmental ventral, explicando o aparecimento dos sintomas positivos.

Nos anos 70, foi demonstrado que anestésicos dissociativos como a fenciclidina (PCP, do inglês *Phencyclidine*) e o seu derivado, a quetamina, induziam, em voluntários saudáveis, sintomas semelhantes aos observados em pacientes com esquizofrenia, incluindo não apenas os sintomas psicóticos e os distúrbios de pensamento, mas também os sintomas negativos e cognitivos (JAVITT; ZUKIN, 1991a; KRYSTAL *et al.*, 1994). Já no início dos anos 80 foi relatado que eles atuavam como antagonistas não competitivos do subtipo NMDA de receptores glutamatérgicos (MOGHADDAM; KRYSTAL, 2012), sugerindo que a esquizofrenia poderia resultar de uma hipofunção do NMDAR.

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) e está envolvido em funções fisiológicas importantes, como plasticidade sináptica, memória e aprendizado (KANTROWITZ, 2018). Os receptores glutamatérgicos podem ser classificados em metabotrópicos (mGluRs, do inglês *metabotropic glutamate receptors*) e ionotrópicos (iGluRs, do inglês *ionotropic glutamate receptors*). Os mGluRs são receptores acoplados à proteína-G e respondem aos mecanismos intracelulares por meio da ativação de segundos mensageiros, enquanto os iGluRs são os próprios canais iônicos e são classificados segundo seus agonistas, como NMDA, cainato e ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA) (DANBOLT, 2001; HOLLMANN *et al.*, 1994).

No sistema normal de sinapse glutamatérgica, os co-agonistas glicina e D-serina são metabolizados e liberados no espaço inter-sináptico (STAHL, 2008). Quando o neurônio pré-sináptico libera glutamato, ele se liga aos receptores NMDA e AMPA, sendo estes últimos ativados e responsáveis pela rápida despolarização na célula pós-sináptica através da entrada de íons Na^+ e Ca^{2+} . Essa despolarização remove o bloqueio exercido pelo íon Mg^{2+} do interior do canal do NMDAR, consolidando na transmissão sináptica do glutamato (MICHAELIS *et al.*, 2002). A sinalização termina quando neurônios e astrócitos recolhem neurotransmissores e co-ativadores (STAHL, 2008). Porém, em modelos para estudos da esquizofrenia e outras psicoses, os antagonistas, quando administrados, podem se ligar ao local do co-ativador do NMDA levando a uma atividade reduzida falha na neurotransmissão glutamatérgica, que é consistente com uma hipofunção do NMDAR (UNO; COYLE, 2019).

Visto que evidências sugerem alterações da neurotransmissão glutamatérgica na esquizofrenia e outras psicoses, diversos estudos têm investigado o seu papel tanto a nível periférico quanto cerebral (LAI *et al.*, 2016), no entanto, os resultados ainda apresentam-se contraditórios. Já foram demonstrados níveis aumentados de glutamato no sangue de pacientes com esquizofrenia comparados aos controles (SONG *et al.*, 2014; TORTORELLA *et al.*, 2001), assim como aumento dos níveis plasmáticos de glutamato e serina em pacientes com esquizofrenia e seus familiares de primeiro grau (OHNUMA *et al.*, 2008). No entanto, um estudo demonstrou níveis plasmáticos reduzidos de glutamato em pacientes em PEP que foram restabelecidos após o tratamento, sugerindo que há atividade glutamatérgica reduzida durante o início da doença (PALOMINO *et al.*, 2007). As medidas para estimar diretamente a neurotransmissão glutamatérgica em pacientes vivos usando técnicas de neuroimagem também têm sido muito utilizadas. Já foram demonstrados níveis reduzidos de glutamato no hipocampo de pacientes com esquizofrenia (STAN *et al.*, 2015), bem como níveis reduzidos de glutamato + glutamina (Glx) em pacientes esquizofrênicos comparados aos controles (ĆURČIĆ-BLAKE *et al.*, 2017). Em contrapartida, o grupo que analisou os níveis de glutamato e glutamina tanto cerebral, como no plasma, não encontraram correlação (SHULMAN *et al.*, 2006). E, recentemente, um grupo de pesquisa encontrou níveis aumentados de glutamato e Glx no córtex de pacientes em PEP comparado aos controles saudáveis (KIM *et al.*, 2018).

Evidências também têm indicado níveis anormais de aminoácidos, subjacentes às alterações no perfil metabólico, que estão correlacionados com a psicose (DOMINGUES *et al.*, 2015; SALEEM *et al.*, 2017). Vinte e um alfa-aminoácidos intracelulares estão presentes nas proteínas humanas. Doze aminoácidos nomeados não essenciais são sintetizados por moléculas fornecidas pelo organismo e assistem à necessidade das células, tais como o ácido glutâmico

(GLU), glutamina (GLN), glicina (GLY), prolina (PRO), serina (SER) e tirosina (TYR); o remanescente, que são os aminoácidos conhecidos como essenciais, não podem ser sintetizados no corpo e, portanto, são fornecidos pela ingestão de dieta, tais como o triptofano (TRP) (BRÖER; BRÖER, 2017; HOFFER, 2014). Estudos identificaram que ambos os aminoácidos essenciais e não essenciais desempenham um papel importante no metabolismo energético (SHIMOMURA; KITaura, 2018; WU, 2009), incluindo aqueles relacionados aos principais precursores de neurotransmissores (CHOI; TARAZI, 2010), tais como a dopamina, o glutamato, o ácido gama amino-n-butírico (GABA) e a serotonina.

Os níveis anormais de aminoácidos envolvidos na co-ativação de neurotransmissores dopaminérgicos, GABAérgicos, glutamatérgicos e serotoninérgicos no cérebro de pacientes com esquizofrenia e outras psicoses são achados bem descritos (NUZZO *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2016). No entanto, essas investigações se baseiam principalmente em cérebros pós-morte de pacientes com esquizofrenia crônica. Isto constitui uma limitação importante, dada a longa exposição ao tratamento farmacológico (KADDURAH-DAOUK *et al.*, 2007) e as outras comorbidades (diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, obesidade) (ANJUM *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2015b), que são condições associadas com alterações no perfil metabólico nestes pacientes (LEPPIK *et al.*, 2018; MOHAN *et al.*, 2011). Por estas razões, caracterizar o perfil de aminoácidos no sangue periférico de pacientes em PEP pode ser uma estratégia razoável para superar estas ressalvas, facilitando a compreensão dos processos patofisiológicos da esquizofrenia e outras psicoses (CAO *et al.*, 2018) e a implementação de estratégias preventivas.

A identificação de marcadores moleculares no sangue periférico de pacientes em PEP é uma estratégia promissora, uma vez que pode configurar futuros marcadores sanguíneos de melhor prognóstico e resposta ao tratamento com menor associação a fatores confundidores (DAVISON *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2018). Embora os estudos têm investigado o perfil metabólico de pacientes psicóticos sem e com tratamento prévio, os níveis de aminoácidos desregulados no sangue periférico têm sido associados com o aparecimento e a evolução da doença (GONG *et al.*, 2014; MADEIRA *et al.*, 2018; NAGAI *et al.*, 2017). No entanto, estes estudos foram realizados em amostras pequenas de pacientes em PEP e diferentes metodologias foram empregadas, o que não permite a generalização dos resultados. Além disso, não há estudos que investigaram se ocorre a desregulação de aminoácidos em irmãos de pacientes em PEP e a inclusão de um grupo de alto risco de fatores genético-ambientais em comum pode ampliar a compreensão do papel da vulnerabilidade familiar na psicose.

1.2.2. Hipótese dos triplos mecanismos: interação entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais

Evidências epidemiológicas têm demonstrado que os fatores genéticos e ambientais podem interagir sinergicamente aumentando o risco do desenvolvimento da psicose (DAVIS *et al.*, 2016; FRAGUAS *et al.*, 2017). Estudos demonstram que, mesmo entre irmãos gêmeos idênticos, a concordância entre pares para esquizofrenia é de apenas 50% (HILKER *et al.*, 2018) e os estudos de associação ampla do genoma em larga escala (GWAS, do inglês *Genome-Wide Association Study*) indicam apenas um risco familiar aproximado de 20%, sugerindo que alguns outros mecanismos além da variação genética contribuem para a taxa de herdabilidade da esquizofrenia e outras psicoses (AGERBO *et al.*, 2015).

Apesar dos avanços na pesquisa genética, as variantes que afetam a esquizofrenia e outras psicoses permanecem pouco caracterizadas. Os avanços genéticos mais recentes associados à esquizofrenia identificaram 128 variantes em 108 locais genômicos, permitindo o cálculo de escores de risco poligênico (PRS, do inglês *Polygenic Risk Score*) com base em centenas de alelos de baixo efeito. No entanto, este estudo ainda explica apenas 3,4% da variação nos perfis de risco para a esquizofrenia e outras psicoses (RIPKE *et al.*, 2014). Vale ressaltar que a maioria das variantes dos nucleotídeos únicos (SNVs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) associadas ao genoma destes distúrbios se enquadram no DNA não codificante, em que há enriquecimento da cromatina em estado aberto e a presença de elementos reguladores da transcrição gênica (BRYOIS *et al.*, 2018; LOH *et al.*, 2015). Tais achados fornecem evidências adicionais sobre o potencial das variantes na modulação da regulação gênica (FULLARD *et al.*, 2017), o que seria consistente com os riscos que podem ser mediados pela interação “gene $\times$ ambiente” ($G \times E$, do inglês *Gene x Environment*) (QUINN; SAVAGE; BUBB, 2019).

Recentemente, um estudo demonstrou que o risco da esquizofrenia explicado por PRS foi de cinco vezes maior em quem experienciou complicações perinatais, indicando uma interação entre fatores de risco genéticos e obstétricos. Além disso, em quem não apresentou alguma complicação obstétrica, o escore de risco não diferiu entre pacientes e controles (URSINI *et al.*, 2018). Isto sugere que a esquizofrenia e outras psicoses advém de uma interação gene-ambiente, a qual ter um gene de risco torna o indivíduo mais susceptível aos efeitos adversos de fatores ambientais de risco, como as complicações obstétricas que podem comprometer o desenvolvimento cerebral. Além das influências pré-natais (VAN OS; KENIS; RUTTEN, 2010), fatores ambientais como o abuso de drogas, traumas na infância, estressores sociais ou urbanicidade podem ser potenciais fatores de risco para a esquizofrenia e outras

psicoses contribuindo no aumento da incidência destes transtornos psicóticos (DEL-BEN *et al.*, 2019; DI FORTI *et al.*, 2019; POPOVIC *et al.*, 2019; SIDELI *et al.*, 2012). Um estudo demonstrou que as maiores diferenças na exposição ao trauma entre os gêmeos monozigóticos estavam associadas a (mais) sintomas psicóticos, reforçando que o trauma na infância pode ser um fator de risco importante para a psicose (ALEMANY *et al.*, 2013).

Somados às evidências genéticas, um estudo com, aproximadamente, 52.000 indivíduos de 21 países demonstrou que as experiências de trauma e adversidades na infância representavam 30% de todas as condições de saúde mental em adultos (KESSLER *et al.*, 2010). Da mesma forma, uma metanálise demonstrou uma associação positiva entre a adversidade infantil e a psicose, sendo 33% do risco de psicose da população atribuído às experiências traumáticas na infância (VARESE *et al.*, 2012). Um estudo mais recente de quase 24 mil indivíduos relatou que 31% dos casos de psicose foram atribuíveis à adversidade precoce (MCGRATH *et al.*, 2017). Além disso, consistentes achados têm evidenciado que estressores ambientais, como trauma na infância ou estresse no início da vida podem alterar a regulação das principais vias relacionadas ao cérebro ao longo da vida de um indivíduo, incluindo as modulações do desenvolvimento cerebral e neuroquímico na idade adulta (BENTALL *et al.*, 2012; SHEVLIN *et al.*, 2008; VARESE *et al.*, 2012). De fato, a alta sensibilidade ao estresse tem sido correlacionada com taxas aumentadas de sintomas semelhantes à esquizofrenia e outras psicoses na população geral em 39 países (DEVYLLDER *et al.*, 2016) e com intensidade significativamente maior de sintomas em indivíduos em PEP em comparação aos controles (REININGHAUS *et al.*, 2016).

O trauma na infância, incluindo abuso físico e sexual, negligência, perda e separação dos pais, é um fator de risco bem documentado para a psicose (ÁLVAREZ *et al.*, 2011; BONOLDI *et al.*, 2013; VARESE *et al.*, 2012) com um risco relativo geral variando de 1,7 a 15,0 (SIDELI *et al.*, 2012). O trauma na infância é duas vezes mais frequente em indivíduos em PEP quando comparado aos controles (MONDELLI *et al.*, 2010) e influencia o curso e os resultados da psicose: o trauma tem sido associado a um ajuste pré-mórbido mais empobrecido (AAS *et al.*, 2016; CONUS *et al.*, 2010; STAIN *et al.*, 2014), à maior duração de psicose não tratada (DUP, do inglês *duration of untreated psychosis*) (AAS *et al.*, 2016) e à sintomatologia mais grave (AAS *et al.*, 2016; ÜÇÖK; BIKMAZ, 2007). Recentemente, o nosso grupo de pesquisa demonstrou alterações de citocinas inflamatórias em pacientes em PEP e que os maus-tratos na infância foram associados a níveis plasmáticos mais altos da citocina fator de transformação do crescimento- β (TGF- β) nos pacientes e irmãos não afetados pela doença quando comparados aos controles. Em análise intra-grupos, pacientes com abuso físico na

infância apresentaram níveis aumentados de TGF- β quando comparados aos pacientes sem histórico de abuso físico, tendência também observada no grupo dos irmãos, sendo o inverso aparente no grupo dos controles, isto é, menores níveis dessa citocina em controles com abuso físico em comparação aos controles sem abuso físico. Esses achados sugerem que o trauma na infância possa servir de gatilho para as alterações imunológicas amplamente observadas nas psicoses e reforçam a importância da interação gene x ambiente na patofisiologia das psicoses (CORSI-ZUELLI *et al.*, 2020).

Já foi demonstrado também que a epigenética pode estar associada às experiências ambientais em modificações no genoma e na estrutura cerebral, potencialmente sublinhando a associação entre o trauma na infância e o desenvolvimento da psicose (HEIM; NEMEROFF, 2001; VYTHILINGAM *et al.*, 2002). Dados recentes sugerem que o trauma na infância pode afetar a metilação do DNA alterando a expressão de vários genes candidatos e contribuindo para o desenvolvimento da esquizofrenia e outras psicoses (KOROSI *et al.*, 2011; TOMASSI; TOSATO, 2017). Portanto, o trauma na infância somado às alterações epigenéticas pode tornar os indivíduos mais vulneráveis ao desenvolvimento destes distúrbios (FISCHER, 2014; GOUD ALLADI *et al.*, 2018; HANNON *et al.*, 2016a; MCCRORY; GERIN; VIDING, 2017; YANG *et al.*, 2013). Mais recentemente, tem sido demonstrada a integração dos dados do GWAS com loci de características quantitativas de expressão de RNAm e metilação (eQTLs, meQTLs, do inglês *expression Quantitative Trait Loci* e *methylation Quantitative Trait Loci*, respectivamente) para determinar os padrões de expressão e regulação gênicas que podem contribuir para a fisiopatologia da esquizofrenia e outras psicoses (BELL *et al.*, 2011; HANNON *et al.*, 2016b; HOFFMANN; ZILLER; SPENGLER, 2016). Juntamente a isso, sabe-se que as SNVs do GWAS associados à esquizofrenia se sobrepõem significativamente aos eQTLs e meQTLs em áreas cerebrais, como hipocampo e córtex pré-frontal (CPF) (HANNON *et al.*, 2016b; JAFFE *et al.*, 2016; SCHULZ *et al.*, 2017). Além disso, há evidências crescentes nas últimas duas décadas de que as experiências de trauma na infância têm sido associadas à metilação alterada nos genes expressos no SNC e relacionadas às condições psiquiátricas (KLENGEL *et al.*, 2013; PERROUD *et al.*, 2011; TURECKI; MEANEY, 2016), influenciando o padrão epigenético e, portanto, afetando a estrutura e a acessibilidade ao genoma. Esses achados sugerem que algumas variantes podem mediar o risco à esquizofrenia e outras psicoses, influenciando a metilação de genes, potencialmente de maneira diferencial em resposta a estímulos ambientais.

A epigenética é um processo biológico complexo que regula o acesso ao DNA e, portanto, a facilidade com que os genes podem ser transcritos. Mecanismos epigenéticos podem

ser definidos como alterações hereditárias de um fenótipo, como a expressão gênica em um tipo específico de célula que não é causada por alterações na sequência nucleotídica do próprio código genético (TOST, 2010). Dois mecanismos epigenéticos bem conhecidos são a metilação do DNA e a modificação de histonas que influenciam a ligação de proteínas às regiões específicas do DNA, incluindo fatores de transcrição em sequências promotoras de genes (NISHIOKA *et al.*, 2012). Embora se pensasse ser estático, agora se sabe que a cromatina é uma estrutura dinâmica que contribui para a acessibilidade do DNA (MAESHIMA *et al.*, 2016). Além de embalar o DNA, a cromatina fornece um suporte para as proteínas interagirem com o DNA, incluindo maquinaria transcricional e proteínas repressoras e pode ser regulada por alterações no DNA através da metilação.

A metilação do DNA é um processo que envolve a adição de um grupo metil às citosinas no DNA. Isso ocorre com mais frequência nos dinucleotídeos CpG (do inglês *cytosine-phosphate-guanine*), regiões do DNA em que um nucleotídeo de citosina é seguido por um nucleotídeo de guanina na sequência linear de bases (BAYRAKTAR; KREUTZ, 2018). A metilação do DNA é catalisada por metiltransferases de DNA relacionadas (DNMTs, do inglês *DNA Methyltransferases*) (GUIDOTTI *et al.*, 2011; ZHUBI *et al.*, 2009) e essas modificações alteram a transcrição de genes e podem ser altamente estáveis e herdáveis. No entanto, as evidências também sugerem que os padrões de metilação do DNA podem ser dinamicamente regulados em resposta à aprendizagem e à memória ou às experiências de vida (DAY; SWEATT, 2011).

Os mecanismos epigenéticos funcionam para controlar homeostaticamente a acessibilidade de genes e a funcionalidade transcricional (JANG *et al.*, 2017). No entanto, considerando que o epigenoma pode mudar em resposta a fatores ambientais (BERRY *et al.*, 2015), as alterações epigenéticas podem explicar parcialmente as interações $G \times E$ e, portanto, podem ajudar a explicar a etiologia da esquizofrenia e outras psicoses. Fatores genéticos e ambientais podem afetar o estado epigenético de forma independente ou por meio de suas interações e pode-se sugerir que a função do gene pode ser organizada de maneira altamente programada e duradoura, mas também de maneira ambientalmente responsiva favorecendo o aparecimento dos sintomas da esquizofrenia e outras psicoses (GIANFRANCESCO; BUBB; QUINN, 2019). Tomados em conjunto, esses achados podem ampliar o conhecimento sobre mecanismos envolvidos nos fatores de risco do desenvolvimento, como trauma na infância, que podem ter um impacto duradouro no cérebro em desenvolvimento e adulto, afetando a expressão gênica através da modulação da acessibilidade da metilação por afinidade com fatores genéticos.

1.3. HIPOFUNÇÃO DO NMDAR NA ESQUIZOFRENIA E OUTRAS PSICOSES

1.3.1. NMDAR: estrutura e função

Cada subunidade do NMDAR tem uma arquitetura modular típica com dois grandes domínios extracelulares do tipo concha, sendo um domínio amino-terminal envolvido na montagem e modulação de canais e de ligação e um domínio transmembrana carboxi-terminal envolvido no tráfico e sinalização do receptor. As regiões do domínio amino-terminal e do domínio carboxi-terminal são as mais divergentes e respondem por grande parte da diversidade funcional dos NMDARs (PAOLETTI; BELLONE; ZHOU, 2013). O NMDAR é um complexo heteromérico, cuja subunidade NR1 é essencial para torná-lo ativo e funcional, por isso, este receptor pode ser formado por uma ou duas subunidades NR1 combinadas a duas ou três subunidades NR2 ou NR3. D-serina e L-glicina são co-agonistas e se ligam às subunidades NR1 e NR3, que são designadas como local modulador da glicina, enquanto o glutamato se liga às subunidades NR2. A ativação do NMDAR requer três eventos simultâneos: (i) ligação simultânea dos agonistas L-glicina ou D-serina (a NR1 ou NR3) e (ii) do glutamato (às subunidades NR2) para a abertura do canal e a entrada de íons cálcio, além de (iii) despolarização da membrana pós-sináptica pela ativação de receptores AMPA para remover o bloco do cátion magnésio da subunidade NR1 (BAI; HOFFMAN, 2009; KARAKAS; FURUKAWA, 2014; YAMAKURA; SHIMOJI, 1999) (**Figura 1**).

Figura 1. Ilustração simplificada de uma estrutura heteromérica do NMDAR. Nesta figura o NMDAR é composto pelas subunidades NR1 e NR2 (A-D) e seus domínios de ligação na sua ativação em condições normais e os possíveis fatores biológicos envolvidos na disfunção do NMDAR na esquizofrenia.

Fonte: Acervo próprio (Figura elaborada pela própria autora dessa tese com as ilustrações cedidas pela Servier Medical Art).

Os NMDARs são codificados por três famílias de genes: NR1 (codificada por *GRIN1*, humanos; *Grin1*, roedores), NR2 (codificada por *GRIN2A-D*, humanos; *Grin2a-d*, roedores) e NR3 (codificada por *GRIN3A-B*, humanos; *Grin3a-b*, roedores) (MONYER *et al.*, 1992). A família do NR1 possui um gene; a do NR2 possui quatro (A, B, C e D) e a do NR3 possui dois (A e B) (BAI; HOFFMAN, 2009; BEESLEY *et al.*, 2019).

Adicionalmente, demonstrou-se que o balanço entre as subunidades NR2A e NR2B é essencial pra determinar a função neuronal, plasticidade sináptica e manutenção do desenvolvimento normal do SNC (AWADALLA *et al.*, 2010; FOSTER *et al.*, 2010; GEDDES; HUANG; NEWELL, 2011). A ruptura relacionada à mutação da expressão ou função da subunidade NR2B pode dar origem a vários fenótipos do neurodesenvolvimento que refletem alterações na formação do circuito e conectividade neuronal, plasticidade sináptica e neurotransmissão excitatória (AWADALLA *et al.*, 2010; KENNY *et al.*, 2014). É importante ressaltar que os NMDARs contribuem para a formação de circuitos para os estágios iniciais do desenvolvimento cerebral que também são conhecidos como "janela crítica do desenvolvimento". Entre as quatro subunidades do NR2 (A-D), sabe-se que as subunidades NR2A e NR2B funcionam predominantemente no prosencéfalo, conferindo características diferentes em NMDARs funcionais com uma cinética mais rápida nos NMDARs contendo NR2A (LOFTIS; JANOWSKY, 2003; MONYER *et al.*, 1994). Diversos estudos têm indicado que a maturação dos circuitos cerebrais geralmente é coincidente com a troca das subunidades do NMDAR (NR2B para NR2A e/ou NR3A para NR3B) que ocorre no início do período crítico de desenvolvimento (MONACO; GULCHINA; GAO, 2015; MONYER *et al.*, 1994; SHENG *et al.*, 1994; SNYDER; GAO, 2013; WANG; GAO, 2009). No nascimento, NR2B é a subunidade predominante, enquanto a expressão da subunidade NR2A começa no período pós-natal (MONYER *et al.*, 1994; SHENG *et al.*, 1994; ZHONG *et al.*, 1995), sendo o gene *GRIN2A* proposto como um gene de risco para esquizofrenia (HARRISON, 2015; NIU *et al.*, 2019). Esta troca das subunidades do NMDAR marca a transição do processamento neural juvenil para o adulto (DUMAS, 2005; HENSON *et al.*, 2010) e neste momento, os NMDARs podem se tornar muito vulneráveis (BREHOUSE; SONNTAG; ANDERSEN, 2008; SPEAR, 2000).

Desse modo, é provável que o NMDAR seja um potencial alvo para fármacos, uma vez que contribui diretamente para os sintomas negativos e disfunção neurocognitiva (LAU; ZUKIN, 2007), bem como para sintomas positivos via desregulação indireta do sistema dopaminérgico no cérebro (JENTSCH; ROTH, 1999; NAKAO *et al.*, 2019).

1.3.2. Achados clínicos da hipofunção do NMDAR na esquizofrenia e outras psicoses

Evidências convergentes de várias linhas distintas de pesquisa sugerem que a hipofunção do NMDAR pode contribuir para o desenvolvimento da esquizofrenia e outras psicoses (NAKAZAWA; SAPKOTA, 2020). Estudos clínicos têm demonstrado os efeitos deletérios de antagonistas não competitivos dos NMDARs com evidências de que o uso crônico de PCP induz sintomas psicóticos, além dos sintomas agudos de intoxicação (CATTS, 2010). Assim como o maleato de dizocilpina (MK-801, do inglês *Dizocilpine*) produz efeitos comportamentais semelhantes ao PCP (KOVACIC; SOMANATHAN, 2010) e a administração sistêmica de PCP, quetamina e o MK-801 induz a liberação excessiva de dopamina no estriado de roedores (JAVITT, 2007; JAVITT; ZUKIN, 1991b) e de humanos (KOKKINOU; ASHOK; HOWES, 2018), produzindo anormalidades nas vias do sistema dopaminérgico que são características da fisiopatologia da esquizofrenia e outras psicoses (SLIFSTEIN *et al.*, 2015; WEINSTEIN *et al.*, 2017).

Outro potencial mecanismo que pode levar à hipofunção do NMDAR é a neuroinflamação, a qual pode ser mediada pelo antagonista endógeno do NMDAR, o ácido quinurênico (KYNA, do inglês *kynurenic acid*), que é um metabólito neuroprotetor da via da quinurenina na degradação do triptofano (ERHARDT *et al.*, 2017; SCHWARCZ *et al.*, 2012). Estudos têm demonstrado que nos pacientes com esquizofrenia e outras psicoses pode ocorrer uma ativação da microglia que libera mediadores inflamatórios, como as interleucinas, induzindo a síntese de KYNA em astrócitos cerebrais, bem como o seu precursor quinurenina (GALLEGO *et al.*, 2018; ORLOVSKA-WAAST *et al.*, 2019; PLITMAN *et al.*, 2017; SCHWIELER *et al.*, 2015; URATA *et al.*, 2014; WANG; MILLER, 2018). Estudos com manipulações genéticas e farmacológicas para desencadear um aumento no nível de KYNA no cérebro de roedores também têm demonstrado disparos aumentados de neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo (LINDERHOLM *et al.*, 2016; TUFVESSON-ALM *et al.*, 2018). Esses efeitos podem ser explicados pela ação antagonista do KYNA nos NMDARs nos neurônios GABAérgicos, levando à desinibição dos neurônios piramidais no CPF (para a disfunção cognitiva), ou dos NMDARs na área tegmentar ventral dos neurônios GABAérgicos, resultando na desinibição dos neurônios dopaminérgicos (surgimento dos sintomas positivos) (ERHARDT *et al.*, 2017). A desinibição destes neurônios pode ser atribuída a uma diminuição na liberação de GABA desencadeada pela ação antagônica do KYNA no NMDAR em interneurônios GABAérgicos locais (ERHARDT *et al.*, 2017). Além disso, têm-se mostrado que o KYNA também pode inibir diretamente a liberação de GABA antagonizando receptores nicotínicos de acetilcolina ($\alpha 7$ nACh) pré-sinápticos nos terminais do axônio GABAérgico, permitindo a sua inibição no CPF (FLORES-BARRERA *et al.*, 2017). É concebível que o

bloqueio crônico dos receptores $\alpha 7$ nACh por KYNA possa regular de forma negativa a enzima serina racemase e D-serina nos neurônios GABAérgicos, induzindo assim a hipofunção do NMDAR e atenuando a função do neurônio GABAérgico (CORSI-ZUELLI *et al.*, 2017). No entanto, a ação do KYNA central ainda não está totalmente esclarecida, especialmente, na sua ação antagonista dos NMDARs e/ou $\alpha 7$ nACh.

Somado a isto, vários fatores podem estar subjacentes entre distúrbios autoimunes não neurológicos e as psicoses (CULLEN *et al.*, 2019), com destaque para a encefalite anti-NMDAR. Esta se caracteriza por um distúrbio autoimune com sintomas semelhantes à esquizofrenia causada por autoanticorpos contra um domínio extracelular do NMDAR (DALMAU *et al.*, 2007). Considera-se que esses anticorpos levam à internalização de *clusters* NMDA pós-sinápticos, causando a desregulação do NMDAR. Os indivíduos com a encefalite anti-NMDAR geralmente apresentam comportamento alterado, como agitação e agressividade, fala anormal, catatonia, convulsões, sintomas psicóticos (incluindo delírios e alucinações) e comprometimento cognitivo (WARREN; SISKIND; O’GORMAN, 2018). Foi relatado que 6,5% dos pacientes na primeira apresentação preencheram os critérios diagnósticos tanto para esquizofrenia e quanto mostraram-se positivos aos anticorpos anti-NMDAR (ZANDI *et al.*, 2011). Assim, a associação entre psicose e os distúrbios autoimunes periféricos atraiu a atenção dos clínicos e psiquiatras e levou a recomendações de que a presença de anticorpos anti-NMDAR deveria ser investigada rotineiramente em pacientes em PEP (CHAPMAN; VAUSE, 2011; VAN DE RIET; SCHIEVELD, 2013). Em nosso recente estudo, observamos uma maior frequência de anticorpos anti-NMDAR positivos em pacientes com o diagnóstico de transtorno afetivo bipolar (10,0%) comparados àqueles com esquizofrenia (2,4%) ou depressão psicótica (3,1%), mas não foram observadas diferenças significativas em pacientes comparados com controles. Assim como também não foram encontradas anormalidades entre os registros médicos dos pacientes positivos com anticorpos anti-NMDAR, os quais foram acompanhados por um período de três anos. Portanto, os nossos resultados não suportam a inclusão da avaliação de anticorpos IgG anti-NMDAR no plasma em protocolos de diagnóstico diferencial para a esquizofrenia e outras psicoses (LOUREIRO *et al.*, 2021).

Por fim, estudos cerebrais pós-morte têm demonstrado alterações na expressão de subunidades NMDAR associadas a esquizofrenia e outras psicoses dependendo da região do cérebro e da subunidade examinada (KRISTIANSEN *et al.*, 2007). Uma recente metanálise relatou uma diminuição geral no nível de RNAm/proteína da subunidade NR1 no CPF de indivíduos com esquizofrenia comparados aos controles (CATTS *et al.*, 2016), enquanto eles também realizaram uma revisão qualitativa sobre as subunidades NR2 (A, B e D) e NR3A e

não demonstraram alterações estatisticamente significativas na expressão do RNAm cortical ou nos níveis de proteína dessas subunidades na esquizofrenia em comparação aos controles (CATTS *et al.*, 2016). Da mesma maneira, outro estudo também concluiu que não há alterações consistentes na expressão do RNAm das subunidades do NMDAR (HU *et al.*, 2015). Por outro lado, alguns estudos sugeriram uma expressão diminuída de RNAm da subunidade NR1 no giro denteado de indivíduos com esquizofrenia em comparação aos controles (GAO *et al.*, 2000; LAW; DEAKIN, 2001) e expressões diminuídas nas subunidades NR1 e NR2B (RNAm e proteína) no hipocampo esquerdo de pacientes com esquizofrenia em comparação ao hipocampo direito (GEDDES; HUANG; NEWELL, 2014; LAW; DEAKIN, 2001; PILOWSKY *et al.*, 2006; VRAJOVÁ *et al.*, 2010), assim como diminuição da expressão do gene NR2A no cérebro pós-morte de indivíduos com esquizofrenia (BITANHIRWE *et al.*, 2009). Também foram descritas alterações na modulação das subunidades NR1, NR2A e NR2B do NMDAR em pacientes com esquizofrenia (JU; CUI, 2016), sendo observada, em tecido neuronal, menor expressão tanto da proteína quanto do RNAm (IBRAHIM *et al.*, 2000; QIU *et al.*, 2005; WEICKERT *et al.*, 2013), bem como níveis aumentados de RNAm de NR2A (LAW *et al.*, 2003).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa também demonstrou baixos níveis plasmáticos de NR1 e NR2 nos pacientes em PEP comparados aos irmãos não psicóticos e controles da comunidade. Indivíduos com concentrações plasmáticas de NR2 inferiores a 2,92 ng/ml apresentaram um risco 10,61 vezes maior de psicose, com sensibilidade de 71,9% e especificidade de 80,6%, sugerindo a subunidade NR2 como um possível biomarcador plasmático para a esquizofrenia e outras psicoses (LOUREIRO *et al.*, 2018). Além da quantificação direta das subunidades NMDAR individuais, também foi relatada uma crescente densidade pós-sináptica de NMDAR no CPF dorsolateral pós-morte em pacientes com esquizofrenia (VENUGOPAL *et al.*, 2018), reforçando o papel do NMDAR nas psicoses. Portanto, anormalidades das subunidades NR1 e NR2 podem afetar a função do NMDAR, desempenhando um papel importante na fisiopatologia da esquizofrenia e outras psicoses.

1.4. FATORES GENÉTICOS, EPIGENÉTICOS E AMBIENTAIS ASSOCIADOS AO NMDAR NA ESQUIZOFRENIA E OUTRAS PSICOSES

1.4.1. Fatores genéticos

Estudos recentes sugerem que as variações genéticas nas subunidades NMDAR podem dar origem a vários distúrbios do desenvolvimento neurológico, incluindo a esquizofrenia e outras psicoses. O sequenciamento do exoma completo revelou uma variedade de variantes

relacionados aos genes do NMDAR demonstrando que a maioria das variantes raras encontradas nos genes do NMDAR e associadas aos transtornos mentais são variações genéticas de perda de função (GENOVESE *et al.*, 2016; KATAOKA *et al.*, 2016), podendo provocar ou agravar o risco de hipofunção do NMDAR em alguns tipos de células, dependendo dos tipos de alteração genética. No entanto, a contribuição geral das variações genéticas ultra-raras do NMDAR e suas proteínas integrantes pode ser pequena entre os casos de esquizofrenia e outras psicoses.

Variantes de genes relacionados ao NMDAR foram associados às psicoses em estudos caso-controle realizados predominantemente na população chinesa (GUO *et al.*, 2016; IWAYAMA *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2015c; YANG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2006); no entanto, alguns deles não expressaram diferenças significativas nos genótipos do gene *GRIN1* entre esquizofrenia e controles (HUNG; CHEN; CHEN, 2002; TANI *et al.*, 2002). De maneira diferente, modelos genéticos de animais *knockdown* de NR1 e NR2A demonstraram uma associação entre a atividade reduzida do NMDAR e alterações comportamentais semelhantes à esquizofrenia (KONRADI; HECKERS, 2003; MOHN *et al.*, 1999), reforçando o papel dos genes no desenvolvimento da esquizofrenia e outras psicoses. Há também evidências que demonstraram polimorfismos do gene *GRIN2A* associados à esquizofrenia (FROMER *et al.*, 2014; KIROV *et al.*, 2012; RIPKE *et al.*, 2014) e apóiam a implicação das SNVs do gene *GRIN2B* no quociente de inteligência, memória e nos déficits de pensamento abstrato presentes na esquizofrenia (ALFIMOVA *et al.*, 2016, 2017; GUO *et al.*, 2016), indicando sua participação na cognição.

Modelos animais genéticos que usam *knockout* de NR1 e de NR2a mostraram uma associação entre a atividade do NMDAR reduzida e comportamentos do tipo esquizofrenia (KONRADI; HECKERS, 2003; MOHN *et al.*, 1999; WESSELING *et al.*, 2014). Além disso, roedores geneticamente modificados (LEE; ZHOU, 2019) para a subunidade NR1 do NMDAR demonstraram prejuízos na aprendizagem e anormalidades comportamentais estereotipadas, que são semelhantes àsquelas encontradas na esquizofrenia (JU; CUI, 2016). Em animais *knockout* para a subunidade NR1, utilizados como modelo animal de esquizofrenia e autismo, foram observadas alterações das vias de fosforilação de proteínas envolvidas na regulação da transcrição e da tradução, excitabilidade celular e liberação do neurotransmissor na fenda sináptica (WESSELING *et al.*, 2014). Modelos de camundongos com deleção de subunidades de NR2b em certas regiões encefálicas e/ou tipos de células também têm sido estudados para entender o papel das subunidades de NR2b nas funções cognitivas. Camundongos *knockout* para a subunidade NR2b no encéfalo anterior exibem atividade hiperlocomotora, efeito

depressor aumentado e comprometimento no aprendizado e na memória espacial e não espacial, enquanto os em células piramidais do hipocampo exibem déficits seletivos de memória de trabalho espacial (BADANICH *et al.*, 2011). Em contraste, os ratos *knockout* para a subunidade NR2a exibem atividade hiperlocomotora e disfunções cognitivas, incluindo déficits no aprendizado espacial, codificação do medo e no aprendizado da discriminação acompanhados por LTP hipocampal prejudicada (BRIGMAN *et al.*, 2008; SPRENGEL *et al.*, 1998). No geral, as alterações exibidas nos mutantes genéticos das subunidades NR2a e NR2b destacam o papel crucial que ambas as subunidades desempenham na plasticidade sináptica e nas funções cognitivas (GOTO *et al.*, 2011; KIYAMA *et al.*, 1998; SAKIMURA *et al.*, 1995). Devido à sobreposição de papéis das subunidades NR2a e NR2b na aprendizagem e na memória, os animais mutantes para NR2a e NR2b também têm sido estudados como modelos para a compreensão da fisiopatologia dos sintomas cognitivos da esquizofrenia.

Expomos aqui evidências clínicas, experimentais e genéticas de que a hipofunção do NMDAR pode induzir um fenótipo semelhante ao da esquizofrenia. No entanto, essas evidências não indicam se a hipofunção do NMDAR é um componente necessário da fisiopatologia nem esclarecem o mecanismo cerebral específico que causa a hipofunção NMDA no nível celular, neural ou de sistemas. Em particular, essas evidências não esclarecem se a hipofunção do NMDAR é devida a uma anormalidade endógena do próprio receptor. É improvável que as variações genéticas descobertas sejam responsáveis por todos os casos de esquizofrenia e outras psicoses ou pela sintomatologia complexa presente (RODRIGUEZ-MURILLO; GOGOS; KARAYIORGOU, 2012). Por isso, um mecanismo que pode contribuir para responder essa questão é a epigenética, que vem ampliando o seu papel na esquizofrenia e outras psicoses.

1.4.2. Fatores epigenéticos

Dadas as indicações de que a etiologia da esquizofrenia e outras psicoses podem estar nas interações G × E, evidências recentes sugerem que as alterações epigenéticas do NMDAR podem ser responsáveis por mudanças na neurotransmissão excitatória do glutamato, sugerindo o seu papel na neurobiologia da esquizofrenia e outras psicoses (GULCHINA *et al.*, 2017; SNYDER; GAO, 2019). No entanto, até agora, nós somos o primeiro grupo de pesquisa a investigar os efeitos da metilação do genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* do NMDAR no sangue periférico de pacientes em PEP (FACHIM *et al.*, 2019).

Além disso, é particularmente importante entender se e como, os NMDARs são regulados epigeneticamente, visto sua função no desempenho cognitivo e seu papel na

esquizofrenia e outras psicoses. Vários estudos demonstraram que a regulação epigenética do NMDAR contribui para o desenvolvimento normal do cérebro e para os processos de plasticidade (JANG *et al.*, 2017; KEVERNE; PFAFF; TABANSKY, 2015). Até o momento, as alterações epigenéticas observadas em estudos pós-morte em cérebros de pacientes com esquizofrenia mostraram a ocorrência de alterações na expressão de receptores glutamatérgicos (STADLER *et al.*, 2005), e, mais especificamente, uma hiperexpressão do gene promotor do *Grin2b* em modelos animais de neurodesenvolvimento para a esquizofrenia (GULCHINA *et al.*, 2017). No entanto, uma questão fundamental é entender quando e como as alterações epigenéticas contribuem para o desenvolvimento e progressão da esquizofrenia e, mais especificamente, como essas alterações acarretam a hipofunção do NMDAR durante os estágios iniciais da doença.

Uma das propriedades mais importantes do NMDAR é a sua permeabilidade ao cálcio. Juntamente com as alterações na excitabilidade celular, a hipofunção do NMDAR também leva a alterações drásticas no influxo de cálcio e na sinalização celular. As evidências indicam que a atividade da maquinaria epigenética pode ser afetada pelas mudanças no influxo de cálcio. O cálcio é o segundo mensageiro crítico que permite que a sinapse em comunicação com o núcleo altere a transcrição de genes (BADING, 2013). O influxo de cálcio mediado por NMDAR, juntamente com o cálcio dos canais de cálcio dependentes de voltagem, envolve uma variedade de cascatas de sinalização para transmitir informações sobre a atividade neuronal nos dendritos para o núcleo (BADING, 2013). Com base nesses dados, é razoável supor que alterações na transmissão sináptica glutamatérgica devido à hipofunção do NMDAR como na esquizofrenia e outras psicoses possam contribuir para uma interrupção no funcionamento da rede e/ou formação inadequada da mesma. Além da regulação epigenética dos próprios NMDARs, é importante considerar a consequência da hipofunção do NMDAR nos processos epigenéticos. Mais recentemente, a regulação epigenética do NMDAR foi associada a insultos ambientais e transtornos mentais. A exposição pré-natal ao Bisfenol A (um produto químico usado para fazer plástico para recipientes de alimentos) e que está associado a distúrbios do neurodesenvolvimento, diminuiu a metilação do *Grin2b* no hipocampo de camundongos fêmeas enquanto aumentou em amostras de DNA bucal de crianças do sexo feminino (ALAVIAN-GHAVANINI *et al.*, 2018), sugerindo que as exposições ambientais podem afetar a regulação epigenética do *Grin2b*, um gene do NMDAR importante para o desenvolvimento normal da função neuronal. Portanto, a exposição das mães ao Bisfenol A pode comprometer o neurodesenvolvimento correto das crianças pelo aumento na metilação do DNA do gene *GRIN2B* e, consequentemente, a sua supressão gênica.

1.4.3. Fatores ambientais

A neurotransmissão glutamatérgica desempenha um papel crítico na detecção, monitoramento e resposta emocional a estímulos estressantes e ameaçadores (JOHANSEN; FIELDS, 2004; SHACKMAN *et al.*, 2011). Com base principalmente em dados pré-clínicos (MARTISOVA *et al.*, 2012; ROCERI *et al.*, 2002), propõe-se que os mecanismos envolvidos na ativação do glutamato em resposta ao estresse/trauma levem a um aumento deste neurotransmissor e desencadeiem processos pró-inflamatórios e excitotoxicidade (POPOLI *et al.*, 2012). Particularmente, há uma sinalização glutamatérgica na regulação do funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (HERMAN; MUELLER; FIGUEIREDO, 2004; MAKARA; STARK, 1975) e os efeitos do estresse são mediados por glicocorticóides na sinalização glutamatérgica (POPOLI *et al.*, 2012). No entanto, há uma janela relativamente estreita entre a resposta neuroplástica adaptativa do cérebro ao estresse e os efeitos potencialmente excitotóxicos do glutamato e quando esse limite "seguro" é ultrapassado, inicia-se uma cascata neural que altera a conectividade glutamatérgica estrutural e funcional (POPOLI *et al.*, 2012; REUL HENRY, 2008), tendo a superestimulação dos NMDARs extra-sinápticos como um dos desfechos primários relacionados a esse transbordamento do glutamato induzido pelo estresse.

No entanto, do nosso conhecimento, não há estudos em humanos que investigaram alguma associação entre o trauma na infância e o NMDAR na esquizofrenia e outras psicoses até o momento. Além disso, é sabido que o trauma na infância está associado a prejuízos na memória de trabalho, função executiva, aprendizado verbal e atenção em pacientes de alto risco para a esquizofrenia e outras psicoses (BERTHELOT *et al.*, 2015; KRAAN *et al.*, 2015; YUNG *et al.*, 2020) e que pontuações mais altas de trauma na infância foram correlacionadas com sintomas positivos e depressivos, níveis mais baixos de funcionamento global e pior desempenho cognitivo em pacientes com esquizofrenia (AAS *et al.*, 2012; KELLY *et al.*, 2016; KILIAN *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2017b; POPOVIC *et al.*, 2019). Somado a isso, já foi demonstrado que o NMDAR apresenta papéis fundamentais na plasticidade neuronal, memória e conectividade neural (LAU; ZUKIN, 2007; STROEBEL; CASADO; PAOLETTI, 2018).

Por isso, ressaltando os pontos acima mencionados (i) trauma na infância associado às funções cognitivas, (ii) trauma na infância correlacionado aos sintomas positivos e depressivos e (iii) NMDA e plasticidade sináptica, formulou-se a hipótese de que haja uma resposta glutamatérgica anormal e, conseqüentemente, do seu NMDAR, nos indivíduos com histórico de trauma na infância, como um potencial fator de risco ambiental à esquizofrenia e outras psicoses. Dessa maneira, investigar a associação entre os genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B*, a

metilação do DNA destes e trauma na infância pode ser uma alternativa promissora para uma melhor compreensão da etiologia da esquizofrenia e de outras psicoses.

1.5. MODELOS ANIMAIS DE ESQUIZOFRENIA

Esforços contínuos são empreendidos no desenvolvimento de modelos animais de esquizofrenia com valor translacional, na busca de novos medicamentos e do entendimento dos mecanismos envolvidos neste transtorno e outras psicoses. Os modelos animais existentes mimetizam aspectos neurobiológicos específicos da esquizofrenia, mas não toda a sua complexidade (NAPOLITANO *et al.*, 2014).

1.5.1. *Modelo ambiental: isolamento social a partir do desmame*

Modelos animais comportamentais baseados no impacto social durante o neurodesenvolvimento no período perinatal e/ou pós-natal precoce reforçam a importância da atividade do NMDAR relacionada ao desenvolvimento cerebral e que anormalidades no sistema glutamatérgico relaciona-se com alterações neuronais e características cognitivas e/ou comportamentais semelhantes às observadas na esquizofrenia (BAIER *et al.*, 2009; LEE; ZHOU, 2019; ZHAO *et al.*, 2009). O modelo de isolamento social é amplamente utilizado e é considerado um estressor afetivo crônico que induz alterações morfológicas, comportamentais [hiperlocomção, impulsividade, agressividade, alterações sensorio-motores, (PPI, do inglês *Prepulse inhibition*) e déficits de medo, aprendizagem, memória e cognição] e neuroquímicas semelhantes às que ocorrem na esquizofrenia, o que o torna um modelo animal válido para o estudo deste transtorno (ANDERZHANOVA; KIRMEIER; WOTJAK, 2017; JONES; WATSON; FONE, 2011; KOIKE *et al.*, 2009; LUKASZ *et al.*, 2013; ROSA *et al.*, 2005).

Como mencionado anteriormente, o glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no cérebro e um mediador chave da plasticidade sináptica suportado pelas funções do NMDAR, o qual desempenha um papel importante no neurodesenvolvimento (LAKHAN; CARO; HADZIMICHALIS, 2013) e acredita-se que sua hipofunção esteja subjacente aos principais sintomas da esquizofrenia e outras psicoses (UNO; COYLE, 2019). Dessa maneira, associar um modelo animal durante o neurodesenvolvimento para aspectos da psicopatologia que se relaciona com as adversidades e o estresse no início da vida à disfunção do NMDAR torna-se essencial. Além disso, as interações entre fatores biológicos e ambientais podem ser responsáveis pelo desenvolvimento da esquizofrenia, sendo a adversidade precoce um potencial fator de risco (BAUMEISTER *et al.*, 2016; COELHO *et al.*, 2014). No entanto, até o momento, um número limitado de estudos, com resultados contraditórios, examinou o efeito do

isolamento social relacionado ao NMDAR (HERMES *et al.*, 2011; TURNOCK-JONES *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2009).

Foi demonstrado que o isolamento social em roedores aumenta a expressão do RNAm de NR2 no CPF e no hipocampo (ZHAO *et al.*, 2009) e diminui a proteína da subunidade NR1 no CPF (HERMES *et al.*, 2011). Evidências recentes também demonstraram uma metilação reduzida do DNA do promotor *Grin2b* em modelos animais de esquizofrenia em neurodesenvolvimento (GULCHINA *et al.*, 2017). Duas importantes limitações desses estudos são: a investigação das subunidades do NMDAR restrita aos tecidos cerebrais e a não integração entre os achados moleculares. Dessa maneira, não se sabe se as alterações de metilação dos genes do NMDAR encontradas nos tecidos cerebrais podem ser estendidas ao sangue periférico ou ainda serem as bases das alterações de expressão de proteína e/ou RNAm causadas pelo período de isolamento ou pelos modelos de neurodesenvolvimento da esquizofrenia e outras psicoses propostos.

1.5.2. Modelo farmacológico: injeção subcrônica de PCP, um antagonista não-competitivo do NMDAR

Em modelos farmacológicos, a administração de antagonistas exógenos ou endógenos do NMDAR em animais levou a características neuroquímicas, morfológicas, cognitivas e/ou comportamentais semelhantes às observadas nos pacientes com esquizofrenia. Essas observações aprimoraram um modelo para o estudo da neurobiologia da esquizofrenia que promove a hipofunção do NMDAR com base na administração de PCP (CADINU *et al.*, 2018; JAVITT, 2007; OLNEY; NEWCOMER; FARBER, 1999). Estudos demonstraram que o bloqueio do NMDAR produz sintomas psicóticos em voluntários (JENTSCH; ROTH, 1999; KRYSTAL *et al.*, 1994; ZUCCOLI *et al.*, 2014), exacerba os sintomas na esquizofrenia (LAHTI *et al.*, 1995) e pode imitar as características comportamentais e cognitivas da esquizofrenia (FACHIM *et al.*, 2016; REYNOLDS; NEILL, 2016), principalmente, em áreas cerebrais como hipocampo e CPF como consequência funcional (NEILL *et al.*, 2010). No entanto, até o momento, uma ampla gama de estudos em animais foi realizada com diferentes regimes de administração de PCP (aguda, subcrônica ou crônica), dosagem e coadministração com outros medicamentos, assim como os efeitos da administração de PCP em animais nos níveis molecular, eletrofisiológico e comportamental foram avaliados por uma variedade de abordagens.

A administração aguda de PCP induz um espectro amplo de alterações comportamentais associadas à sintomas positivos (aumento do comportamento estereotipado e ataxia, mas há

relatos conflitantes sobre mudanças na atividade locomotora), negativos (interação social reduzida) e cognitivos (aprendizado latente prejudicado, déficits de atenção e flexibilidade cognitiva) da esquizofrenia (ABDUL-MONIM; NEILL; REYNOLDS, 2007; DAVID STURGEON; FESSLER; MELTZER, 1979; EGERTON *et al.*, 2005; MARTINEZ *et al.*, 1999; NODA *et al.*, 1995). As administrações subcrônica (2-14 dias) e crônica (15 dias ou mais) de PCP também têm gerado uma variedade de fenótipos comportamentais associados à esquizofrenia (ABDUL-MONIM; NEILL; REYNOLDS, 2007; BRIGMAN; GRAYBEAL; HOLMES, 2010; GRAYSON; IDRIS; NEILL, 2007; JENKINS *et al.*, 2008; MCKIBBEN *et al.*, 2010; NODA *et al.*, 1995; PRATT *et al.*, 2008). Comparado com a exposição aguda à PCP, a exposição subcrônica e crônica à PCP induz um estado do tipo esquizofrenia mais evidente e sustentado tanto em roedores quanto em humanos por fornecer um período de tempo maior para avaliar as mudanças duradouras relacionadas à hipofuncionalidade do NMDAR na esquizofrenia (ALLEN; YOUNG, 1978; COSGROVE; NEWELL, 1991; RAINEY; CROWDER, 1975).

Por fim, têm se demonstrado que o bloqueio funcional do NMDAR parece ocorrer em interneurônios corticais GABAérgicos. Pré-clinicamente, foram adotadas abordagens genéticas de camundongos para testar se a exclusão de NMDAR nos neurônios GABAérgicos confere fenótipos semelhantes à esquizofrenia e vários grupos relataram o efeito da interrupção de NMDAR seletivamente em um subconjunto de interneurônios GABAérgicos no cérebro (NAKAZAWA; JEEVAKUMAR; NAKAO, 2017), sugerindo que a hipofunção NMDAR nos neurônios GABAérgicos, particularmente nos neurônios positivos para parvalbumina, pode ser um dos eventos que levam à anormalidade dopaminérgica típica da esquizofrenia (NAKAO *et al.*, 2019). Além disso, o nosso grupo relatou hipermetilação no gene que codifica a parvalbumina em subáreas cerebrais (CPF e hipocampo) em ratos submetidos à administração subcrônica de PCP, cujo NMDAR tem uma contribuição fundamental (BITANHIRWE *et al.*, 2009; FACHIM *et al.*, 2016; HUDSON *et al.*, 2020).

Dada a forte associação entre o NMDAR e o desenvolvimento normal do cérebro, bem como o seu importante papel na esquizofrenia, procuramos entender se existe um envolvimento da hipofunção NMDAR regulada pela metilação do DNA em dois modelos animais (ambiental e farmacológico) de esquizofrenia. Dessa maneira, esses resultados podem fornecer novos entendimentos sobre as alterações moleculares da função NMDAR na esquizofrenia, o que poderia representar possíveis marcadores de diagnóstico para abordagens em psiquiatria.

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

Um grande desafio no estudo dos transtornos psiquiátricos é o conhecimento relativamente limitado dos mecanismos da doença. No entanto, à medida que a compreensão multifatorial associada a esses transtornos evolui, novas estratégias para o desenvolvimento de agentes terapêuticos e biomarcadores se tornam aparentes. Evidências epidemiológicas consistentes demonstraram que a interação entre fatores socioambientais e biológicos podem favorecer o desenvolvimento de transtornos psicóticos, sendo a experiência de trauma na infância um dos principais fatores de risco. Além disso, a epigenética tem sido proposta como uma nova estratégia para avaliar as interações entre fatores genéticos e ambientais, possibilitando ampliar a compreensão dos aspectos multifatoriais envolvidos na esquizofrenia e outras psicoses. Embora as evidências diretas sobre como as alterações epigenéticas no sangue periférico podem refletir àquelas encontradas no cérebro ainda sejam limitadas, estudos têm avançado sobre as correlações sangue-cérebro nos perfis de metilação do DNA em transtornos psiquiátricos. Isso significa que pode ser viável investigar modificações epigenéticas no DNA e avaliar os mecanismos pelos quais fatores ambientais podem agir sobre o genoma induzindo variações nas expressões gênica e proteica envolvidas na etiologia das psicoses.

Por esse motivo, como originalidade deste estudo translacional, investigamos mecanismos moleculares associados a integração de fatores ambientais, genéticos e epigenéticos relacionados ao receptor glutamatérgico NMDAR no sangue periférico de pacientes em sua primeira manifestação de psicose, objetivando diminuir possíveis fatores confundidores como duração de doença e tratamento farmacológico prolongados. Deve-se também destacar a inclusão de uma amostra de controles da comunidade que permite uma maior representatividade da população para os mecanismos estudados, bem como o envolvimento de irmãos não psicóticos como um grupo intermediário entre pacientes e controles. Além disso, visto que o maior desafio da pesquisa em humanos é o acesso ao SNC, nós também investigamos os mesmos mecanismos moleculares em áreas cerebrais de dois modelos animais de psicose, no intuito de melhor compreender a fisiopatologia da esquizofrenia e outras psicoses e permitir a identificação de potenciais biomarcadores associados ao NMDAR.

Portanto, o ineditismo deste estudo baseia-se na abordagem integrada de mecanismos associados aos genes do NMDAR, importantes para o neurodesenvolvimento, que poderão favorecer o desenvolvimento de estratégias de novos alvos para a promoção, prevenção e tratamentos individualizados em serviços de intervenção precoce de pacientes em PEP.

Objetivos e Hipóteses

3. OBJETIVO GERAL

Investigar alterações moleculares relacionadas ao NMDAR no sangue periférico de pacientes em PEP, irmãos não psicóticos e controles da comunidade, assim como no sangue periférico e tecidos cerebrais (hipocampo e CPF) em modelos animais de esquizofrenia (isolamento social a partir do desmame e injeção subcrônica de PCP) para a identificação de marcadores biológicos e uma melhor compreensão dos mecanismos da etiologia das psicoses.

3.1. ESTUDO COM HUMANOS

3.1.1. *Objetivos específicos*

a) Quantificar as concentrações plasmáticas dos aminoácidos associados ao sistema glutamatérgico em pacientes em PEP, seus irmãos não psicóticos e controles da comunidade (**Capítulo 4**);

b) Comparar as frequências das variantes genéticas associadas aos genes *GRIN1* (rs4800213, rs11146020 e rs10747050), *GRIN2A* (rs1420040) e *GRIN2B* (rs890, rs2098469, rs7298664, rs1805502 e rs1806194) do NMDAR no sangue periférico de pacientes em PEP, irmãos não psicóticos e controles da comunidade (**Capítulo 5**);

c) Comparar a metilação do DNA da região promotora dos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* do NMDAR no sangue periférico de pacientes em PEP, seus irmãos não psicóticos e controles da comunidade (**Capítulo 6**);

d) Investigar associações entre o trauma na infância e a metilação do DNA dos genes que codificam as subunidades do NMDAR nos pacientes em PEP, seus irmãos não psicóticos e controles da comunidade (**Capítulo 7**);

e) Investigar se há associações entre as concentrações plasmáticas dos aminoácidos associados ao sistema glutamatérgico, SNVs e alterações na metilação do DNA dos genes do NMDAR nos pacientes em PEP comparados aos irmãos não psicóticos e controles da comunidade (**Capítulo 8**).

3.1.2. *Hipóteses*

Em comparação a controles da comunidade e irmãos não afetados, os pacientes em PEP apresentarão: (i) reduzidos níveis plasmáticos dos aminoácidos relacionados ao glutamato, (ii) diferenças na metilação do DNA na região reguladora ou promotora dos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* que codificam as subunidades do NMDAR, (iii) variantes dos genes do NMDAR associados à doença, (iv) associações positivas entre o trauma na infância e as alterações na

metilação dos genes do NMDAR e (v) correlações entre as concentrações plasmáticas de aminoácidos, alterações da metilação e SNVs dos genes do NMDAR.

3.2. MODELOS EXPERIMENTAIS

3.2.1. *Objetivos específicos*

a) Avaliar a expressão dos genes codificadores das subunidades NR1, NR2a-b do NMDAR (*Grin1*, *Grin2a* e *Grin2b*) no sangue periférico e tecidos cerebrais (hipocampo e CPF) de animais submetidos ao isolamento social após o desmame (**Capítulo 9**) e em tecidos cerebrais dos animais submetidos à injeção subcrônica do PCP (**Capítulo 10**);

b) Avaliar as alterações na metilação do DNA na região promotora dos genes *Grin1*, *Grin2a* e *Grin2b* do NMDAR no sangue e tecidos cerebrais (hipocampo e CPF) de animais submetidos ao isolamento social após o desmame (**Capítulo 9**) e em tecidos cerebrais dos animais submetidos à injeção subcrônica do PCP (**Capítulo 10**);

c) Quantificar a expressão proteica das subunidades do NMDAR (NR1 e NR2) no sangue periférico e tecidos cerebrais (hipocampo e CPF) dos animais submetidos ao isolamento social após o desmame (**Capítulo 9**) e em tecidos cerebrais dos animais submetidos à injeção subcrônica do PCP (**Capítulo 10**);

d) Verificar se existem correlações das alterações de expressão gênica, proteica e metilação dos genes que codificam as subunidades do NMDAR em ambos os modelos experimentais e se as alterações obtidas nos tecidos cerebrais se correlacionam com os níveis periféricos, especificamente, nos animais submetidos ao isolamento social após o desmame (**Capítulos 9 e 10**).

3.2.2. *Hipóteses*

Os animais submetidos ao isolamento social após o desmame apresentarão diminuição da expressão gênica e proteica tanto no sangue periférico quanto nos tecidos cerebrais e serão correlacionadas. Os animais submetidos à injeção subcrônica do PCP apresentarão as mesmas reduções nos tecidos cerebrais e as alterações de ambos os modelos correlacionar-se-ão com a hipermetilação do DNA dos genes que codificam as subunidades do NMDAR.

Estudo com humanos

4. PERFIL PLASMÁTICO DE AMINOÁCIDOS NO PRIMEIRO EPISÓDIO PSICÓTICO, IRMÃOS NÃO AFETADOS E CONTROLES DA COMUNIDADE

Dados publicados: **Loureiro CM**, da Roza DL, Corsi-Zuelli F, Shuhama R, Fachim HA, Simões-Ambrosio LMC, Deminice R, Jordão AA, Menezes PR, Del-Ben CM, Louzada-Junior P. Plasma amino acids profile in first-episode psychosis, unaffected siblings and community-based controls. *Sci Rep*. 2020 Dec 8;10(1):21423. DOI: 10.1038/s41598-020-78559-w.

4.1. OBJETIVOS E HIPÓTESES

Neste estudo, objetivou-se caracterizar o perfil de aminoácidos relacionados aos sistemas: (i) glutamatérgico [ácido glutâmico (GLU), glutamina (GLN), glicina (GLY), ácido glutâmico + glutamina (Glx), razão GLN/GLU, prolina (PRO) e serina (SER)]; (ii) dopaminérgico: tirosina (TYR); (iii) serotoninérgico: triptofano (TRP) e (iv) GABAérgico: ácido gama-aminobutírico (GABA) no plasma de pacientes em PEP, irmãos não-psicóticos e controles da comunidade, como possíveis biomarcadores de início precoce e de risco familiar para psicose, além de explorar o papel dos antipsicóticos nos perfis de aminoácidos.

Foram selecionados os aminoácidos acima mencionados, pelas seguintes razões: (i) relacionados ao sistema glutamatérgico, a SER e a GLY são os co-agonistas do NMDAR (OHNUMA *et al.*, 2008; ZAFRA *et al.*, 2017); a GLN é um aminoácido não essencial e o precursor do ácido glutâmico (WALLS *et al.*, 2015); a PRO é um aminoácido multifuncional e modula a função da descarboxilase do ácido glutâmico (CAPPELLETTI *et al.*, 2018) e o próprio GLU; (ii) sobre o sistema dopaminérgico, investigamos a TYR, que é o precursor da dopamina (BJERKENSTEDT *et al.*, 2006); (iii) também investigamos o aminoácido TRP, o qual é o precursor da serotonina (BADAWY, 2018); e, finalmente, (iv) foi avaliado o GABA associado com o sistema GABAérgico. A primeira hipótese do estudo foi que o nível plasmático do aminoácido relativo ao sistema dopaminérgico estaria aumentado e aqueles aminoácidos associados aos sistemas glutamatérgico, GABAérgico e serotoninérgico estariam diminuídos em pacientes em PEP comparados aos irmãos não-psicóticos e controles. A segunda hipótese era a de que o tratamento com antipsicóticos alteraria os níveis plasmáticos destes aminoácidos. Finalmente, a terceira hipótese foi a de que irmãos iriam apresentar um perfil congruente a um grupo intermediário entre pacientes em PEP e controles. A inclusão de indivíduos que compartilham um *background* genético e ambiental comum com pacientes psicóticos pode facilitar a compreensão do papel da vulnerabilidade familiar para a psicose.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Contextualização e delineamento do estudo humano

Este estudo possui um delineamento transversal, o qual está incluído em um estudo caso-controle baseado nos casos incidentes de transtornos mentais com sintomas psicóticos intitulado “Esquizofrenia e outros transtornos psicóticos: determinantes sociais e biológicos”, conhecido pelo acrônimo STREAM – *Schizophrenia and Other Psychosis Translational Research: Environment and Molecular Biology*. Este, por sua vez, integra o consórcio internacional multicêntrico *European Network of National Schizophrenia Networks Studying Gene-Environment Interactions*, reconhecido pelo acrônimo EU-GEI (www.eu-gei.eu), que objetiva investigar a etiologia, os mecanismos e prognóstico da esquizofrenia e outras psicoses.

4.2.2. Coleta de dados

A coleta sistematizada de dados iniciou-se em 01 de abril de 2012 e encerrou-se em 31 de março de 2015. Foram agendadas sessões de coleta de dados em locais e horários convenientes aos participantes, sendo a maioria das coletas realizadas em visitas domiciliares.

4.2.3. Participantes

Os pacientes incluídos seguiram como critérios de inclusão: (a) ser primeiro contato com serviços de Saúde Mental devido às manifestações psicóticas; (b) ter idade entre 16-64 anos; (c) residir na área de captação do Décimo Terceiro Departamento Regional de Saúde (DRS-XIII) no momento de início dos sintomas psicóticos e (d) tratados com antipsicóticos pela primeira vez para os sintomas psicóticos. Excluídos os pacientes que apresentaram sintomas psicóticos induzidos por substâncias psicoativas ou outras condições médicas. Foram incluídos os pacientes em PEP (n=166) diagnosticados com o espectro da esquizofrenia, tais como transtorno psicótico breve, transtorno esquizofreniforme, esquizofrenia, transtorno delirante e transtorno esquizoafetivo; e psicoses afetivas, tais como transtorno afetivo bipolar e transtorno depressivo maior com características psicóticas.

Os irmãos dos pacientes (n=76) também foram convidados a participar seguindo os critérios: (a) ter o aceite do paciente para participar da pesquisa; (b) ter idade entre 16 e 64 anos e (c) não apresentar histórico de sintomas psicóticos ao longo da vida. A inclusão dos irmãos permitiu investigar os fatores de risco ambientais e genéticos, que muitas vezes são compartilhados com os pacientes, o que caracteriza esse grupo como de risco.

Os controles da comunidade (n=166) constituíram uma amostra de voluntários saudáveis para a psicose, de base populacional, os quais tiveram um recrutamento planejado considerando

as características demográficas referentes à idade e sexo da população de Ribeirão Preto, assim como a dos demais municípios da região. O número de controles para compor a amostra representativa da população de Ribeirão Preto foi calculado a partir dos dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (www.ibge.gov.br) relativos ao eleitorado (municípios acima de 16 anos de idade) do censo de 2010. Considerou-se inicialmente o número total de habitantes definido pelo último censo do IBGE 2010 de acordo com o local de moradia (ou seja, cidade principal com 501.063 e outros 25 municípios com 596.207 habitantes). Pela proporção, a distribuição foi de 137 controles de Ribeirão Preto e 163 dos demais municípios. Em seguida, foi realizada uma estratificação por sexo, três faixas etárias (16 a 24, 25 a 34 e mais de 34 anos) e o perfil da economia, considerando a maior incidência de transtornos psicóticos em jovens.

A amostragem final foi obtida a partir do sorteio de setores censitários do IBGE para a mesma área de captação dos pacientes, estratificados por tamanho populacional e pareados por frequência de sexo e faixa etária. Além de Ribeirão Preto, foram selecionados mais oito municípios, a saber, Sertãozinho, Jaboticabal, Cravinhos, Barrinha, Brodowski, Pradópolis, Guataporã e Santo Antônio da Alegria. Os controles foram contatados em suas residências e convidados a participar, sendo elegível o indivíduo disponível no momento da captação e que não tivesse apresentado sintomas psicóticos ao longo da vida.

4.2.4. Instrumentos de avaliação

Os mesmos instrumentos de avaliação dos pacientes foram aplicados aos irmãos e aos controles, tendo a média de três horas de duração cada sessão de coleta de dados, com até três sessões para a completa avaliação dos dados. Os participantes realizaram suas avaliações individualmente, priorizando sempre um local adequado aos mesmos e ao pesquisador e que contemplassem as condições de privacidade e segurança.

4.2.4.1. Diagnóstico e gravidade de sintomas e psicopatologia

Entrevista semi-estruturada para o diagnóstico de transtornos mentais de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, 4ª Edição Revisada (DSM-IV-TR), avaliada pela Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV (SCID do inglês, *Structured Clinical Interview for DSM-IV*) (FIRST *et al.*, 1997), traduzida e adaptada ao português (DELBEN *et al.*, 2001). Aplicado por profissionais de saúde mental treinados e supervisionados por psiquiatras seniores.

Cronograma de Início de Sintomas de Nottingham (NOS do inglês, *Nottingham Onset Schedule*) (SINGH *et al.*, 2005), o qual investiga o início dos sintomas psicóticos, o início de tratamento para a psicose e a DUP, medida em semanas (ANEXO 1).

Escala Breve de Avaliação Psiquiátrica (BPRS do inglês, *Brief Psychiatric Rating Scale*,) (OVERALL; GORHAM, 1962), traduzida e adaptada para o português (CRIPPA *et al.*, 2001), que avalia a gravidade de sintomas psicóticos referentes aos três dias anteriores à entrevista (ANEXO 2).

Lista de Medicamentos (do inglês, *Medication List*) identifica os medicamentos presente e/ou passado referidos pelos próprios pacientes, seus familiares ou em consulta a prontuário médico. O instrumento possui um código correspondente para cada medicação psicotrópica, assim como o avaliador pode preencher as informações sobre as dosagens, indicações, horários e tempo de uso (ANEXO 3).

4.2.4.2. Avaliação de fatores de risco ambientais

Questionário sobre Tabaco e Álcool (do inglês, *Tabacco and Alcohol List*). Ele aborda o padrão de uso de tabaco e álcool dos participantes do estudo. Composto por perguntas a respeito do tipo, quantidade e frequência de uso do tabaco e de álcool consumidos (ANEXO 4).

Questionário de Experiência de Cannabis - Versão Modificada (CEQ do inglês, *Cannabis Experiences Questionnaire-mv*) (DI FORTI *et al.*, 2009) e o Módulo E da SCID-CV. Este instrumento permite identificar o padrão do uso da maconha e das demais drogas (data de início, frequência, gastos e sintomas associados ao seu consumo) para confirmar ou excluir o diagnóstico de abuso/dependência de cannabis e outras nove substâncias psicoativas (ANEXO 5).

Os instrumentos foram traduzidos e adaptados para o português pelos autores do projeto temático e submetidos à retro-tradução, com exceção do Questionário de Trauma na Infância (CTQ) descrito na seção 7.2.1.1, página 142 (**Capítulo 7**). Ao final da coleta de dados, todas as informações foram armazenadas na plataforma online do consórcio internacional EU-GEI inseridos por estudantes de graduação em Informática Biomédica. Por fim, realizou-se uma auditoria do banco de dados, com revisão da digitação e encontrada pouca inconsistência, o que conferiu maior fidedignidade dos dados coletados e digitados.

4.2.5. Material biológico

As amostras de sangue foram coletadas o mais próximo da data de inclusão dos participantes no estudo. Ressalva-se que as coletas de material biológico iniciaram em Janeiro

de 2013 com a minha admissão como enfermeira de pesquisa, nove meses depois do início da coleta de dados proposta pelo temático STREAM (01/abril/2012). Por essa razão, alguns pacientes incluídos no estudo já estavam em tratamento com psicotrópicos e apresentaram maiores durações, em semanas, do período do início da psicose e/ou tratamento até a coleta de sangue periférico.

Para todos, foi coletada uma amostra de, aproximadamente, 10 mL de sangue periférico em tubos de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Todos os tubos foram mantidos no gelo e a centrifugação das amostras dos humanos para a separação do plasma foi realizada em até duas horas após a coleta, a 3.500 rpm, durante 10 minutos (min), em temperatura de 4°C.

4.2.5.1. Quantificação plasmática dos aminoácidos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

As quantificações das concentrações plasmáticas dos aminoácidos foram medidas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS, do inglês *Gas chromatography by mass-spectrometry*) (GCMS-QP2010 SE, SHIMADZU®, KYOTO, JAPÃO). A determinação dos níveis plasmáticos dos aminoácidos envolveu um pré-tratamento inicial das amostras com ditioneitol 100 µmol/L para a liberação das proteínas ligadas a estas moléculas e, posteriormente, derivatizadas com o kit EZ: Análise de Aminoácidos Faast comercialmente disponível (EZ:FAAST: PHENOMENEX®, CA, EUA). O kit forneceu quantificação confiável e precisa em, aproximadamente, 60 aminoácidos livres e compostos relacionados e o procedimento de análise de aminoácidos consistiu na extração em fase sólida seguida por uma derivação e uma extração líquida, com limite inferior de detecção de 1 nmol/mL e precisão na quantificação de <10% para a maioria dos aminoácidos.

Para a análise do perfil de aminoácidos, foi utilizado 100 µL das amostras de plasma, como padronizado pelo protocolo (GELPI *et al.*, 1969). O GABA precisou de um kit separado com elevado grau de pureza disponível para as suas primeiras detecções no GC-MS (SIGMA-ALDRICH, DENMARK A/S, DK) e a solução padrão foi preparada separadamente para se obter uma curva nos valores entre 5-260 nmol/mL para um volume apropriado de água milliQ. As amostras de plasma com concentrações elevadas dos aminoácidos foram diluídas até que estas concentrações atingissem uma curva de calibração.

O Hélio foi usado como gás de transporte a uma taxa de fluxo de 1 mL/min. O injetor e a temperatura do detector foram mantidos a 280°C e 250°C, respectivamente. O programa de temperatura da coluna foi inicializado a 80°C e mantida durante 2 min e depois aumentada para 320°C a uma taxa de gradiente de 20°C/min. O espectrômetro de massa foi operado em modo

de ionização de elétrons e o modo SIM (do inglês *System Ion Monitor*) foi aplicado para detectar e quantificar estes aminoácidos (**Figura 2**). O tempo total de execução foi de 15 min para até 11 amostras a cada ciclo. Também foi elaborada uma curva de calibração, em concentrações de 25, 50, 100 e 200 ng/ml e a linearidade do método foi investigada por meio da avaliação do coeficiente de determinação, a qual foi alcançada com um mínimo de 0.99. As análises dos aminoácidos foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Metabolismo da FMRP-USP, coordenado pelo Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão e o Prof. Dr. Rafael Deminice e sob supervisão da técnica de laboratório Lívia.

Figura 2. Cromatograma da análise quantitativa de detecção dos aminoácidos baseada na razão massa-carga de cada aminoácido por GC-MS. A figura ilustra o pico do aminoácido glutamato com os seus íons correspondentes (SIM, detector de massas no modo de monitoramento dos íons selecionados nos picos 170 e 230 para o ácido glutâmico).

4.2.6. Análise estatística

As estatísticas foram realizadas utilizando o programa *Statistical Package for Social Sciences*, versão 26.0 (SPSS Inc; IBM Corp: Armonk, NY, EUA) e SAS/STAT software de versão 9.4 (SAS 9.4 OUTPUT DELIVERY SYSTEM: USER'S GUIDE, 2013). As características das amostras foram apresentadas pela média, erro padrão da média (EPM) ou desvio padrão (DP), mediana, frequências e porcentagens, quando apropriados. Os dados sociodemográficos, clínicos e biológicos foram submetidos à estatística descritiva a depender da distribuição dos mesmos (paramétrica e não paramétrica). Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade usando os testes de *Kolmogorov-Smirnov* e *Shapiro-Wilk* como referências.

Para a análise estatística dos níveis de aminoácidos, devido a sua distribuição não normal, os seus valores brutos foram transformados numa escala logarítmica (Log de base e) para reduzir a heterogeneidade da variância. As variáveis sociodemográficas e clínicas entre os grupos (pacientes em PEP, irmãos e controles) foram analisadas utilizando o χ^2 de Pearson e ANOVA de uma via com correção de Bonferroni. Em primeiro lugar, nós investigamos as diferenças entre os níveis plasmáticos dos aminoácidos entre os três grupos, utilizando o Modelo Linear Geral (MLG) (MCCULLAGH; NELDER, 1989), incluindo os valores de cada um dos aminoácidos como variáveis dependentes e os grupos como fator fixo, enquanto ajustamos os efeitos da idade, sexo e o índice de massa corporal (IMC) como variáveis confundidoras. Em seguida, usando o MLG, Hotteling's Trace, analisamos as diferenças entre os níveis plasmáticos dos aminoácidos dentro do grupo dos pacientes em PEP e a sua associação com as variáveis clínicas, ajustando novamente para os efeitos da idade, sexo e IMC. As comparações múltiplas foram realizadas por contrastes ortogonais e para cada um dos MLGs; a normalidade dos resíduos foi verificada usando gráficos de probabilidade normal.

Calculamos o tamanho do efeito entre os três grupos com base na ANOVA e usamos o índice de tamanho do efeito η^2 para modelos de regressão e análise de variância (valores de η^2 , pequeno: 0,01-0,05; médio: 0,06-0,13 e grande: $\geq 0,14$) (COHEN, 2013; LAKENS, 2013).

Além disso, realizamos uma análise adicional em uma subamostra de pares correspondentes entre pacientes em PEP e irmãos em relação aos níveis plasmáticos de aminoácidos usando o teste t de Student pareado e consideramos sexo, idade e IMC como covariáveis. O cálculo do tamanho do efeito foi baseado nas diferenças entre as médias para amostras pareadas de pacientes em PEP e irmãos, usando o tamanho do efeito do d de Cohen (valores d, pequeno: 0,20-0,49; médio: 0,50-0,79; grande: $\geq 0,80$) (COHEN, 2013; LAKENS, 2013). Como linguagem comum para as estatísticas do tamanho do efeito (variância η^2 ; três grupos) e médias (d; pares pacientes em PEP-irmãos), usamos uma equivalência baseada em probabilidades de escore z (MCGRAW, 2015).

Para todas as análises, os valores de IMC foram registrados como uma variável categórica de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000). Já para a DUP e a duração do tratamento utilizou-se a mesma classificação em categorias baseadas em semanas (nenhuma, até 11 semanas e maior ou igual a 12 semanas) (DAMA *et al.*, 2019; NORMAN; MALLA, 2001). Finalmente, no grupo dos pacientes em PEP foi testada a correlação entre os aminoácidos analisados utilizando a matriz de correlação no software R (R CORE TEAM, 2018). Além disso, testamos as possíveis associações entre os aminoácidos analisados e algumas características clínicas dos pacientes

em PEP usando MLG. Consideramos Glx como uma combinação de GLU e GLN, bem como a razão GLN/GLU.

Neste estudo, não foram encontrados dados ausentes para nenhum participante em relação a cada variável de interesse. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos para todas as análises.

4.2.7. Aspectos éticos

O projeto temático ao qual este trabalho se vincula foi aprovado pela Comissão de Normas Éticas Regulamentares do HCFMRP-USP (Processo nº 12606/2012), em sua 378ª reunião ordinária realizada em 18/11/2013 (ANEXO 8). Todos os participantes assinaram duas cópias do Termo de Coleta de Material Biológico (ANEXO 9), bem como duas cópias do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido elaborados separadamente para os pacientes e para os controles (ANEXOS 10 e 11). Em relação aos pacientes, recolheu-se também a assinatura do acompanhante, caso este estivesse presente. Para os menores de 18 anos, também foi solicitado a assinatura do responsável.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Características sociodemográficas e clínicas da amostra

Neste estudo, 166 pacientes em PEP, 76 irmãos biológicos e 166 controles pareados por sexo e idade aceitaram o convite para a coleta de sangue periférico. Os resultados (**Tabela 1**) mostraram que o grupo dos irmãos foi composto por uma porcentagem mais elevada de mulheres quando comparados a ambos os pacientes em PEP e controles ($p < 0,001$ para ambos). Além disso, os pacientes em PEP apresentaram nível de escolaridade inferior (menor que nove anos de escolaridade) e relataram menor relação afetiva comparados aos irmãos e controles ($p < 0,001$ para ambos). A porcentagem de pacientes em PEP que não estavam funcionalmente ativos foi maior do que em irmãos e controles ($p = 0,015$).

Em relação a etnia, tomando como referência a cor de pele auto-declarada, a porcentagem de indivíduos brancos foi superior nos controles em relação aos pacientes em PEP e aos irmãos ($p = 0,002$). Os controles apresentaram IMC superior aos pacientes em PEP ($p = 0,013$) e circunferência abdominal maior que os irmãos ($p = 0,016$). Para o tempo de uso de substâncias psicoativas ao longo da vida, os pacientes em PEP relataram maior uso de cannabis em combinação com outras substâncias psicoativas e maior uso de tabaco do que irmãos e controles ($p < 0,001$ para ambos).

Em relação às variáveis clínicas dos pacientes em PEP, a mediana do tempo de psicose até à coleta de sangue foi de 35,5 semanas, enquanto a mediana do tratamento farmacológico em relação à coleta de sangue foi de 12,5 semanas. A maioria dos pacientes foi acompanhada em serviço de intervenção precoce, com boa resposta ao tratamento inicial (mediana de BPRS=9,1).

Tabela 1. Variáveis clínicas e sóciodemográficas dos pacientes em PEP, irmãos não psicóticos e controles de base populacional

	Controles (n=166)	Irmãos (n=76)	Pacientes em PEP (n=166)	Teste	p^{1,2}
Variáveis sóciodemográficas: n (%), Média (DP)					
Idade, em anos	31,4 (12,0)	31,5 (11,0)	30,3 (12,2)	$F_{(2,407)}=0,395$	0,674
Sexo, masculino	106 (63,9) ^b	23 (30,3) ^a	106 (64,0) ^b	$\chi^2=28,574$	<0,001
Escolaridade, até 9 anos	40 (24,1) ^b	23 (30,3) ^b	95 (57,2) ^a	$\chi^2=41,217$	<0,001
Etnia, branca	113 (68,1) ^a	39 (51,3) ^b	81 (50,0) ^b	$\chi^2=12,519$	0,002
Vínculo afetivo, solteiro	83 (50,0) ^b	32 (42,1) ^b	123 (74,1) ^a	$\chi^2=29,947$	<0,001
Ocupação, atualmente não trabalha	67 (40,4) ^b	24 (31,6) ^b	84 (50,6) ^a	$\chi^2=8,434$	0,015
Variáveis clínicas: Média (DP)					
Índice de Massa Corporal, Kg/m ²	26,5 (5,5) ^a	24,9 (4,9) ^{a,b}	24,7 (5,0) ^b	$F_{(2,407)}=4,825$	0,013
Circunferência abdominal, cm	89,1 (15,1) ^a	82,9 (14,4) ^b	86,1 (13,3) ^{a,b}	$F_{(2,331)}=4,286$	0,016
Uso de substâncias psicoativas: n (%)³				$\chi^2=87,107$	<0,001
Cannabis apenas	15 (9,0)	4 (5,3)	9 (5,4)		
Cannabis combinada com outras	20 (12,0) ^b	2 (2,6) ^b	76 (45,8) ^a		
Outras substâncias	11 (6,6)	0 (0,0)	12 (7,2)		
Nenhuma	120 (72,4)	70 (92,1)	69 (41,6)		
Tabaco	31 (18,7) ^b	13 (17,1) ^b	65 (39,2) ^a	$\chi^2=22,191$	<0,001

PEP: primeiro episódio psicótico; DP: desvio padrão;

¹ ANOVA de uma via com correção de Bonferroni; ² Teste Qui-quadrado; ³ Uso de substâncias psicoativas (atual ou ao longo da vida): Cannabis; álcool; cocaína/crack; inalantes; anfetamina.^{a,b} As médias seguidas pela mesma letra não diferiram estatisticamente de cada grupo na tabela. Letras diferentes subscritas representam as diferenças significativas entre os grupos [tabela adaptada do artigo (LOUREIRO *et al.*, 2020a)]. Negrito: $p \leq 0,05$.

4.3.2. Níveis plasmáticos dos aminoácidos - Comparação dos grupos

As **Figuras 3A–J e a Tabela 2** descrevem as diferenças entre os pacientes em PEP, irmãos e controles em relação aos níveis plasmáticos dos aminoácidos (A) GLU, (B) GLN, (C) Glx, (D) GLN/GLU, (E) GLY, (F) PRO, (G) SER, (H) TRP, (I) TYR e (J) GABA. Os pacientes em PEP mostraram níveis plasmáticos de GABA reduzidos em comparação com os irmãos ($p=0,006$) e controles ($p=0,048$). Além disso, os irmãos apresentaram menores níveis plasmáticos de GLU ($p=0,006$), Glx ($p=0,005$) e PRO ($p=0,021$) e aumento dos níveis plasmáticos de TRP em comparação aos pacientes ($p=0,021$) e controles ($p<0,001$).

Por fim, não encontramos diferenças significativas entre os grupos em relação ao GLN ($p=0,062$), razão GLN/GLU ($p=0,953$), GLY ($p=0,198$), SER ($p=0,317$) e TYR ($p=0,214$).

Na análise secundária da comparação dos pares de pacientes em PEP e irmãos, não encontramos diferenças estatisticamente significativas em nenhum perfil de aminoácidos (GLU: $p=0,852$; GLN: $p=0,556$; GLY: $p=0,773$; Glx: $p=0,388$; GLN/GLU: $p=0,607$; PRO: $p=0,619$; SER: $p=0,561$; TRP: $p=0,091$; TYR: $p=0,384$; GABA: $p=0,124$). As informações detalhadas estão descritas na **Tabela 3**.

Figura 3. Beanplot dos níveis plasmáticos dos aminoácidos. Estão demonstrados os valores brutos em $\mu\text{mol/L}$ de pacientes em PEP, irmãos e controles ($n=408$) [figura adaptada do artigo (LOUREIRO *et al.*, 2020a)]. *Representa a comparação dos grupos com valores de $p<0,05$. Os dados foram analisados pelo MLG ajustados por sexo, idade e IMC.

Tabela 2. Tamanhos de efeito e a estatística de tamanho de efeito de linguagem comum correspondente entre pacientes em PEP-irmãos-controles em relação ao perfil plasmático dos aminoácidos

Aminoácidos	Pacientes em PEP	Irmãos	Controles	Pacientes em PEP-Irmãos-Controles			
	Média (DP)			F ¹	p	η ² (IC 95%)	LC*
GLU	178,03 (110,80)	149,20 (104,74)	200,83 (123,05)	3,43	0,002	0,06 (0,01-0,12)	60,0%
GLN	349,22 (228,50)	310,74 (268,68)	360,99 (210,81)	1,45	0,062	0,03 (0,01-0,06)	51,0%
GLY	331,99 (141,39)	298,61 (165,95)	316,68 (143,92)	2,64	0,198	0,05 (0,01-0,09)	59,0%
Glx	527,25 (253,65)	459,94 (275,84)	561,83 (249,79)	2,36	0,004	0,05 (0,01-0,08)	59,0%
GLN/GLU	3,10 (4,38)	3,97 (5,82)	3,04 (4,54)	0,34	0,953	0,01 (0,00-0,01)	54,0%
PRO	365,29 (298,61)	255,47 (170,42)	324,93 (158,56)	3,20	0,005	0,06 (0,02-0,10)	60,0%
SER	150,30 (76,33)	145,20 (72,28)	152,05 (62,42)	3,03	0,317	0,06 (0,02-0,10)	60,0%
TRP	57,70 (23,75)	61,42 (23,54)	52,81 (17,11)	3,18	0,022	0,06 (0,02-0,10)	60,0%
TYR	86,41 (45,81)	74,80 (36,05)	85,09 (33,72)	2,62	0,214	0,05 (0,02-0,08)	59,0%
GABA	79,29 (28,30)	90,15 (32,78)	86,23 (29,84)	1,70	0,023	0,04 (0,01-0,06)	57,0%

GLU: ácido glutâmico; GLN: glutamina; Glx: GLN + GLU; GLY: glicina; PRO: Proline; TRP: triptofano; TYR: tirosina; SER: serina; GABA: γ-aminobutírico; DP: desvio padrão; IC: Intervalo de Confiança; *LC: Linguagem Comum da estatística do tamanho do efeito;

¹ ANOVA de uma via; η²: Eta-quadrado (pequeno: 0,01-0,05; médio: 0,06-0,13; grande: ≥0,14); Negrito: p≤0,05 [tabela adaptada do artigo (LOUREIRO *et al.*, 2020a)].

Tabela 3. Comparações entre os pares correspondentes de pacientes em PEP-irmãos em relação ao perfil de aminoácidos no plasma e os tamanhos de efeito e a estatística de tamanho de efeito na linguagem comum correspondente

Amino acids	Pacientes em PEP	Irmãos	Pacientes em PEP-Irmãos			
	Média (DP)		t ¹	p	d (IC 95%)	LC*
GLU	198,50 (128,22)	170,11 (102,04)	0,19	0,852	0,70 (0,51-0,89)	76,0%
GLN	339,46 (205,81)	334,74 (280,07)	-0,59	0,556	0,67 (0,46-0,88)	75,0%
GLY	326,93 (131,41)	330,60 (165,77)	-0,29	0,773	0,60 (0,36-0,84)	73,0%
Glx	537,96 (238,40)	504,85 (276,83)	-0,87	0,388	0,76 (0,61-0,91)	78,0%
GLN/GLU	2,66 (3,03)	3,41 (4,95)	-0,52	0,607	0,61 (0,38-0,84)	73,0%
PRO	347,14 (280,65)	292,07 (170,35)	-0,50	0,619	0,70 (0,51-0,89)	76,0%
SER	153,94 (65,28)	161,52 (69,99)	-0,58	0,561	0,68 (0,48-0,88)	75,0%
TRP	58,32 (21,49)	62,78 (24,44)	-1,72	0,091	0,66 (0,45-0,87)	75,0%
TYR	82,30 (37,03)	82,84 (35,51)	-0,88	0,384	0,77 (0,62-0,92)	78,0%
GABA	83,64 (29,82)	90,58 (32,93)	-1,56	0,124	0,58 (0,34-0,82)	72,0%

GLU: ácido glutâmico; GLN: glutamina; Glx: GLN + GLU; GLY: glicina; PRO: Proline; TRP: triptofano; TYR: tirosina; SER: serina; GABA: y-aminobutírico; DP: desvio padrão; IC: Intervalo de Confiança; *LC: Linguagem Comum da estatística do tamanho do efeito;

¹ Teste t de Student; Cohen's d: Índice de tamanho de efeito para médias (pequeno: 0,20-0,49; médio: 0,50-0,79; grande: $\geq 0,80$); [tabela adaptada do artigo (LOUREIRO *et al.*, 2020a)].

4.3.3. Associações entre níveis plasmáticos de aminoácidos e características sócio-demográficas e clínicas nos pacientes em PEP

Na amostra dos pacientes em PEP, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis plasmáticos de em nenhum aminoácido em relação ao sexo, idade, uso de substâncias psicoativas e tabaco. No entanto, pacientes em PEP com IMC entre 25,0 a 35,9 Kg/m² tiveram níveis plasmáticos de Glx mais elevados em comparação com pacientes em PEP com IMC entre 18,5 a 24,9 Kg/m² ($p=0,010$) e IMC maior que 31,0 Kg/m² ($p=0,006$). Nenhuma outra associação significativa foi observada.

Os pacientes em PEP com até 12 semanas de DUP tiveram níveis plasmáticos de GLU ($p=0,005$) e TYR ($p=0,002$) mais baixos em comparação com aqueles com mais de 13 semanas de DUP [13 a 24 semanas, GLU ($p=0,032$) e TYR ($p=0,044$); e com DUP maior que 53 ou mais semanas, TYR ($p=0,009$)]. Além disso, apenas os níveis plasmáticos de GLU estavam alterados em relação às diferentes durações de tratamento. Pacientes em PEP com até 11 semanas de tratamento farmacológico apresentaram níveis plasmáticos diminuídos de GLU em relação aos pacientes em PEP com 12 ou mais semanas ($p=0,009$). Os pacientes em PEP tratados com antipsicóticos apresentaram apenas aumento significativo dos níveis plasmáticos de GLU em relação aos pacientes em PEP tratados com uma combinação de medicamentos ($p=0,010$). Pacientes em PEP tratados apenas com antipsicóticos apresentaram níveis plasmáticos de Glx mais elevados quando comparados aos pacientes em PEP com antipsicótico associado a outros medicamentos ($p=0,026$).

Foram também analisadas as diferenças entre os níveis plasmáticos dos aminoácidos nos pacientes em PEP segundo três categorias de tratamento com antipsicóticos: nenhum ($n=9$), atípico ($n=74$) e típico ($n=83$) e o tipo de antipsicóticos não alterou as concentrações plasmáticas dos aminoácidos em qualquer grupo (**Tabela 4**).

Tabela 4. Diferenças entre os níveis plasmáticos de aminoácidos em relação às variáveis clínicas em pacientes em PEP

Variáveis clínicas	Níveis plasmáticos de aminoácidos (μmol/L) ¹									
	GLU	GLN	Glx	GLY	GLN/GLU	PRO	TRP	TYR	SER	GABA
	Média (DP)									
Sexo	p=0,387	p=0,436	p=0,387	p=0,652	p=0,735	p=0,693	p=0,984	p=0,464	p=0,794	p=0,467
Feminino (n=60)	164,0 (101,9)	335,0 (228,6)	499,0 (263,6)	318,1 (148,7)	3,0 (3,2)	368,4 (348,8)	57,1 (22,5)	78,9 (33,8)	139,8 (59,6)	75,9 (26,3)
Masculino (n=106)	186,0 (115,3)	357,3 (229,1)	543,2 (247,7)	339,8 (137,2)	3,1 (4,9)	363,6 (267,8)	58,1 (24,5)	90,7 (51,1)	156,2 (84,0)	81,2 (29,3)
Idade	p=0,967	p=0,386	p=0,844	p=0,072	p=0,838	p=0,410	p=0,766	p=0,726	p=0,057	p=0,896
16 a 24 (n=66)	176,9 (96,2)	369,4 (226,5)	546,3 (249,8)	362,4 (122,6)	2,9 (2,6)	412,3 (324,6)	56,9 (24,2)	88,6 (37,1)	163,4 (57,5)	79,5 (25,0)
25 a 34 (n=47)	177,3 (117,4)	355,3 (218,6)	532,7 (243,0)	315,0 (140,8)	3,2 (3,4)	309,3 (207,2)	58,5 (22,8)	85,9 (59,4)	135,0 (50,6)	79,0 (25,7)
35 ou mais (n=53)	180,1 (123,2)	318,7 (240,3)	498,8 (269,4)	309,2 (158,5)	3,3 (6,5)	356,4 (327,9)	58,1 (24,4)	84,1 (42,6)	147,5 (107,9)	79,3 (34,3)
IMC (Kg/m²)	p=0,233	p=0,264	p=0,001	p=0,078	p=0,437	p=0,597	p=0,919	p=0,942	p=0,210	p=0,223
Até 18,4 (n=11)	155,1 (66,5)	435,3 (227,4)	548,1 (213,2)	366,2 (153,8)	3,4 (2,9)	303,6 (123,8)	59,4 (22,5)	86,0 (33,1)	153,1 (59,4)	74,7 (23,8)
18,5 a 24,9 (n=101)	194,9 (119,5)	339,2 (242,1)	594,6 (289,5) ^b	349,8 (143,6)	3,5 (6,4)	385,9 (246,5)	58,1 (21,7)	83,7 (32,7)	151,6 (60,9)	78,3 (24,8)
25,0 a 30,9 (n=42)	158,4 (91,2)	334,3 (197,8)	451,0 (217,4) ^a	296,9 (130,5)	2,5 (2,2)	382,4 (365,8)	57,4 (26,4)	88,5 (54,5)	156,4 (90,6)	83,7 (31,9)
31 ou mais (n=12)	228,0 (159,5)	407,3 (210,8)	648,0 (214,1) ^b	273,5 (122,4)	4,1 (4,6)	262,2 (116,1)	56,7 (19,2)	85,8 (47,5)	117,2 (50,0)	65,2 (18,1)
DUP (semanas)	p=0,032	p=0,673	p=0,169	p=0,624	p=0,404	p=0,658	p=0,164	p=0,002	p=0,356	p=0,806
Até 12 (n=89)	148,7 (92,6) ^a	345,1 (245,7)	493,8 (260,0)	319,7 (141,3)	3,7 (5,6)	342,1 (250,3)	53,9 (21,7)	74,8 (34,3) ^a	141,3 (63,4)	78,0 (30,0)
13 to 24 (n=28)	223,3 (137,3) ^b	322,0 (187,8)	545,2 (222,2)	351,6 (165,6)	2,2 (2,2)	367,9 (307,1)	62,4 (24,5)	95,1 (34,9) ^b	156,0 (57,1)	78,4 (24,7)
25 to 52 (n=24)	217,4 (114,4) ^b	401,8 (232,6)	619,2 (268,6)	344,0 (130,7)	2,7 (2,6)	413,9 (412,3)	63,0 (28,4)	95,8 (40,6)	152,1 (57,9)	80,1 (24,1)
53 or more (n=25)	194,0 (108,7)	343,8 (206,0)	537,8 (237,9)	342,4 (125,2)	2,2 (1,8)	398,3 (329,8)	60,9 (24,3)	109,0 (77,0) ^b	174,1 (132,2)	84,0 (30,4)
Duração do tratamento (semanas)	p=0,009	p=0,801	p=0,213	p=0,433	p=0,599	p=0,379	p=0,432	p=0,191	p=0,380	p=0,636
Nenhuma (n=9)	171,1 (109,5)	358,4 (165,1)	529,5 (191,9)	367,9 (131,4)	3,0 (2,0)	486,7 (389,0)	59,1 (22,3)	85,7 (44,3)	188,2 (83,6)	89,2 (37,0)
Até 11 (n=71)	153,6 (105,6) ^a	338,8 (217,9)	492,4 (260,4)	348,6 (148,8)	3,5 (5,6)	356,0 (304,9)	56,2 (26,0)	79,5 (37,2)	147,8 (56,3)	80,6 (29,6)
12 ou mais (n=86)	198,9 (112,1) ^b	356,9 (244,0)	555,8 (252,5)	314,6 (137,8)	2,7 (3,2)	360,2 (284,0)	58,8 (22,1)	92,2 (51,7)	148,4 (88,8)	77,2 (26,2)
Tipo de antipsicótico	p=0,141	p=0,100	p=0,900	p=0,781	p=0,990	p=0,375	p=0,676	p=0,161	p=0,050	p=0,661
Nenhum (n=9)	172,4 (109,5)	352,7 (165,1)	529,5 (191,9)	354,7 (131,4)	3,0 (2,0)	472,9 (389,0)	58,7 (22,3)	85,7 (44,3)	184,4 (83,6)	89,0 (37,0)
Atípico (n=74)	199,3 (119,4)	312,1 (232,9)	540,7 (272,0)	337,2 (142,4)	3,1 (2,7)	362,2 (228,5)	59,8 (25,5)	93,8 (53,2)	162,4 (91,4)	80,5 (28,8)
Típico (n=83)	159,7 (100,5)	381,9 (227,8)	511,9 (240,4)	324,8 (142,5)	3,1 (5,9)	356,4 (341,2)	55,8 (22,4)	79,9 (37,5)	135,8 (55,7)	77,1 (26,9)

(Continua)

(Conclusão)

Variáveis clínicas	Níveis plasmáticos de aminoácidos (μmol/L) ¹									
	GLU	GLN	Glx	GLY	GLN/GLU	PRO	TRP	TYR	SER	GABA
	Média (DP)									
Tratamento atual	p=0,010	p=0,257	p=0,031	p=0,500	p=0,440	p=0,428	p=0,979	p=0,489	p=0,371	p=0,644
Nenhum (n=9)	171,1 (109,5)	358,4 (165,1)	529,5 (191,9)	367,9 (131,4)	3,0 (2,0)	486,7 (389,0)	59,1 (22,3)	85,7 (44,3)	188,2 (83,6)	89,2 (37,0)
Apenas antipsicóticos (n=66)	206,4 (111,3) ^a	378,9 (238,7)	585,3 (264,6) ^a	315,6 (111,1)	2,5 (2,5)	365,6 (253,4)	56,3 (19,1)	92,0 (52,3)	143,9 (52,7)	77,6 (25,7)
Antipsicóticos e/ou outros (n=91)	158,1 (107,2) ^b	326,8 (225,8)	484,9 (244,6) ^b	340,3 (160,6)	3,5 (5,5)	353,1 (319,4)	58,6 (26,9)	82,4 (40,7)	151,2 (88,8)	79,5 (29,3)
Substâncias psicoativas	p=0,606	p=0,677	p=0,940	p=0,381	p=0,668	p=0,438	p=0,502	p=0,269	p=0,770	p=0,522
Nenhuma (n=100)	173,9 (111,6)	347,5 (242,2)	521,4 (261,0)	309,1 (138,9)	3,4 (5,3)	384,1 (348,9)	59,0 (24,4)	80,3 (38,5)	140,0 (65,3)	79,4 (30,1)
Apenas cannabis (n=27)	167,6 (107,0)	368,3 (193,6)	535,9 (239,7)	361,0 (124,2)	3,2 (2,4)	388,4 (219,4)	54,1 (21,2)	86,5 (38,0)	166,9 (57,6)	79,5 (27,6)
Cannabis e outras* (n=20)	205,8 (138,0)	322,7 (208,7)	528,5 (237,4)	355,9 (93,4)	2,3 (2,2)	347,1 (192,5)	56,4 (24,7)	93,4 (38,0)	161,8 (52,2)	84,9 (25,9)
* Apenas outras (n=19)	185,3 (78,9)	359,0 (233,1)	544,3 (268,4)	385,9 (194,2)	2,4 (2,6)	252,7 (150,4)	57,7 (23,9)	110,9 (81,1)	168,9 (144,1)	72,4 (21,7)
Uso de nicotina	p=0,746	p=0,377	p=0,701	p=0,710	p=0,907	p=0,148	p=0,515	p=0,380	p=0,382	p=0,570
Sim (n=65)	173,0 (96,1)	370,0 (215,8)	543,0 (248,5)	341,7 (128,1)	3,0 (2,5)	317,6 (211,4)	56,9 (23,7)	81,9 (32,9)	147,1 (63,6)	80,9 (25,8)
Não (n=101)	181,3 (119,6)	335,8 (236,4)	517,1 (257,6)	325,8 (149,6)	3,2 (5,3)	396,0 (340,7)	58,2 (23,9)	89,3 (52,4)	152,4 (83,7)	78,3 (29,9)

GLU: ácido glutâmico; GLN: glutamina; Glx: GLN + GLU; GLY: glicina; PRO: Proline; TRP: triptofano; TYR: tirosina; SER: serina; GABA: γ-aminobutírico; DP: desvio padrão; IMC: Índice de Massa Corporal; DUP: Duração da psicose não tratada;

¹ Modelo Linear Generalizado ajustado por sexo, idade e IMC analisados em base transformada em log e;

* Álcool, cocaína/crack e inalantes;

^{a,b} As letras diferentes representam que os grupos diferem estatisticamente um do outro. Comparações múltiplas e contrastes ortogonais realizados no GLM com 5% de probabilidade. Utilizou-se letras em sobrescrito para os valores médios nas colunas, em que a médias seguidas pela mesma letra não mostram diferenças significativas e diferentes letras mostram diferenças estatisticamente significativas [tabela adaptada do artigo (LOUREIRO *et al.*, 2020a)]. Negrito: p≤0,05.

4.4. DISCUSSÃO

Nosso objetivo foi caracterizar o perfil plasmático de aminoácidos relacionados aos sistemas dopaminérgico, glutamatérgico, serotoninérgico e GABAérgico nos estágios iniciais da psicose. Os pacientes em PEP não diferiram dos controles da comunidade, exceto pela diminuição dos níveis plasmáticos de GABA, que também foi observada em relação aos seus irmãos não afetados. Por outro lado, os irmãos não afetados apresentaram diferenças significativas dos controles nos níveis plasmáticos de aminoácidos, especificamente relacionados aos sistemas glutamatérgico e serotoninérgico. O perfil plasmático de aminoácidos alterado em irmãos não afetados pela doença pode estar relacionado ao risco familiar de psicose, uma vez que compartilham o genótipo e fatores ambientais semelhantes com os pacientes em PEP.

4.4.1. Perfil plasmático de aminoácidos em pacientes em PEP em relação a irmãos não psicóticos e controles de base populacional

Os níveis plasmáticos reduzidos de GABA em pacientes em PEP em comparação com seus irmãos não-psicóticos e controles são consistentes com a literatura que sugere diminuição de GABA em tecidos cerebrais pós-morte (İLHAN ATAGÜN *et al.*, 2018; THAKKAR *et al.*, 2017) e no plasma de pacientes com esquizofrenia crônica (ARRÚE *et al.*, 2010; CAI *et al.*, 2010). No entanto, um estudo recente encontrou níveis plasmáticos elevados de GABA em pacientes com esquizofrenia não tratados em comparação aos controles (CAO *et al.*, 2018). Considerando que, em nossa amostra, a diminuição do GABA foi independente do tratamento farmacológico, os resultados discrepantes podem ser justificados com base na técnica utilizada para a quantificação de aminoácidos. Cao e seus colegas (CAO *et al.*, 2018) utilizaram a cromatografia líquida de interação hidrofílica, método este que pode ter algumas desvantagens, especialmente devido ao maior tempo de retenção dos derivados e extensas execuções de re-equilíbrio. Para superar esta limitação, utilizamos o sistema de GC-MS, que mostrou maior capacidade de separação, sensibilidade e seletividade de aminoácidos. Esta metodologia tem sido referida como útil para estudos metabolômicos por proporcionar abordagens de rastreamento rápido (WANG *et al.*, 2015). Do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que investigou os níveis plasmáticos do aminoácido GABA usando o sistema de GC-MS em pacientes em PEP.

O sistema GABAérgico desempenha um papel central na neurobiologia da esquizofrenia e outras psicoses e alterações neste sistema parecem contribuir para alguns dos sintomas destas doenças (GASKIN *et al.*, 2016; LEWIS; HASHIMOTO; VOLK, 2005). A

diminuição dos níveis de GABA nos pacientes em PEP pode ser uma disfunção secundária a partir da bem conhecida hipofunção do NMDAR em interneurônios inibitórios na esquizofrenia (WANG *et al.*, 2016), ou também pode ser resultado da interação entre este neurotransmissor com outros sistemas, como aqueles relacionados aos sistemas glutamatérgico e dopaminérgico (DE LA FUENTE-SANDOVAL *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2016). Embora especulativo, os níveis de GABA reduzidos no sangue periférico podem refletir a baixa concentração de GABA observada no cérebro de pacientes em PEP (COHEN *et al.*, 2015; KOSHIYAMA *et al.*, 2018), potencialmente sugerindo que as alterações concomitantes de GABA no sangue podem ser um biomarcador para a psicose (CAI *et al.*, 2010; CHIAPPONI *et al.*, 2016).

Contrastando a nossa hipótese, não foram encontradas diferenças em pacientes em PEP em relação aos níveis plasmáticos de GLU, GLN, GLY, Glx, GLN/GLU, SER, TRP e TYR. No entanto, os achados da literatura em relação aos níveis plasmáticos de aminoácidos ainda são contraditórios. Enquanto alguns estudos não mostraram diferenças nos níveis séricos de GLU entre pacientes com esquizofrenia e controles saudáveis (ALFREDSSON; WIESEL, 1989), outras investigações encontraram elevação (NAGAI *et al.*, 2017; OREŠIČ *et al.*, 2011) ou diminuição dos níveis de GLU (PALOMINO *et al.*, 2007) em soro ou plasma de pacientes psicóticos.

Além disso, os aminoácidos GLY e SER têm sido investigados como possíveis marcadores clínicos para a esquizofrenia, no entanto, alguns estudos são ainda contraditórios. Algumas evidências demonstraram níveis plasmáticos aumentados de GLY e SER em pacientes após o tratamento com antipsicóticos (OHNUMA *et al.*, 2008; YAMAMORI *et al.*, 2014); outras não encontraram diferenças em pacientes com esquizofrenia medicados com diferentes antipsicóticos (DOMINGUES *et al.*, 2015); e, por fim, alguns estudos demonstraram diminuição dos níveis plasmáticos de GLY e SER em pacientes com esquizofrenia em comparação aos controles (NEEMAN *et al.*, 2005; SUMIYOSHI *et al.*, 2004). Um estudo recente demonstrou níveis elevados de GLN no plasma em pacientes em PEP sem tratamento prévio, o que foi negativamente correlacionado com sintomas negativos; no entanto, nenhuma diferença nos níveis plasmáticos de GLN foi encontrada após o tratamento desses pacientes (GARIP; KAYIR, 2019).

Os achados discrepantes podem ser justificados pelas distintas metodologias utilizadas para a medição de aminoácidos, bem como por especificidades das amostras, como a duração da doença, gravidade dos sintomas, duração do tratamento e tipo de antipsicóticos, hábitos alimentares e a medição dos aminoácidos no sangue periférico (MADEIRA *et al.*, 2018). Em nossa amostra, podemos justificar a ausência de diferenças entre pacientes em PEP e controles

por algumas características de nosso estudo (o desenho caso-irmão-controle, a inclusão de psicose afetiva e não afetiva, amostra de plasma em jejum e a heterogeneidade em relação a duração do tratamento e da psicose).

Particularmente, em nosso estudo, o tratamento com antipsicóticos pode ter aproximado os níveis plasmáticos de aminoácidos da normalidade e pode ser um dos motivos pelos quais não encontramos diferenças entre pacientes em PEP, irmãos e controles (MADEIRA *et al.*, 2018). Corroborando com essa explicação, verificamos que curta DUP, curta duração do tratamento com antipsicótico e uso de antipsicóticos combinados com outros medicamentos foram associados a baixos níveis plasmáticos de GLU. A curta DUP também foi associada a níveis plasmáticos reduzidos de TYR.

4.4.2. Perfil plasmático de aminoácidos em irmãos não psicóticos em comparação com controles de base populacional

Os nossos dados mostraram diminuição dos níveis plasmáticos de GLU, Glx e PRO, mas níveis plasmáticos elevados de TRP em irmãos não psicóticos quando comparados com os controles.

Foram identificados três estudos que investigaram o perfil metabólico nas regiões do cérebro de irmãos de pacientes utilizando a ressonância magnética de prótons. Um deles, de acordo com os nossos resultados, encontraram menores níveis de GLU no CPF de gêmeos não afetados de pacientes com esquizofrenia quando comparados com os controles (LUTKENHOFF *et al.*, 2010). No mesmo sentido, um estudo recente mostrou níveis corticais reduzidos de GLU em parentes de primeiro grau, elevados em comparação aos controles saudáveis, mas sem diferenças significativas entre os parentes e os pacientes com esquizofrenia (THAKKAR *et al.*, 2017). No entanto, um terceiro estudo, não encontrou diferenças significativas nos níveis de GLU em irmãos adultos de pacientes com esquizofrenia em comparação com voluntários saudáveis que pode ser justificado pelo pequeno tamanho amostral e a utilização de valores de metabólitos não padronizados (SCOT E PURDON, 2008). Diferente de nosso estudo, esses estudos anteriores não investigaram os níveis plasmáticos de TRP e PRO em irmãos não afetados. Em conjunto, a redução dos níveis periféricos de GLU, Glx e PRO e o aumento dos níveis de TRP podem estar refletindo desequilíbrios no perfil de aminoácidos plasmáticos relacionados ao risco familiar de psicose, o que pode ser potencialmente considerado um indicador de vulnerabilidade biológica associada à psicose, uma vez que os irmãos não afetados compartilham um genótipo semelhante e fatores ambientais na infância e adolescência com pacientes em PEP.

4.4.3. Limitações e pontos fortes

Nossos resultados devem ser interpretados com alguma cautela. Primeiro, nós realizamos uma única medida dos aminoácidos e não controlamos os hábitos dietéticos ou de atividades físicas dos participantes. Não podemos excluir a influência da condição do jejum nos níveis plasmáticos de aminoácidos no momento da coleta de sangue, dado o fato de que alguns aminoácidos podem ser adquiridos por meio de dieta e algumas evidências anteriores demonstraram associações positivas entre o consumo de alimentos e o perfil alterado de aminoácidos (BRÖER; BRÖER, 2017; WŁODARCZYK; WIGLUSZ; CUBAŁA, 2018). Além disso, não temos dados sobre a atividade física dos participantes, o que também pode impactar no perfil de aminoácidos (GRACIA-MARCO *et al.*, 2017; MORRIS *et al.*, 2013) semelhante a informações sobre doenças metabólicas, como a dislipidemia e o diabetes mellitus. Em terceiro lugar, os pacientes não eram virgens de tratamento e apresentavam heterogêneos tipos e duração de tratamento farmacológico. Em quarto lugar, não fomos capazes de investigar uma correspondência do perfil de aminoácidos entre cérebro-sangue, usando métodos como a espectroscopia de ressonância magnética. É importante ressaltar que nossos dados estão relacionados aos níveis de aminoácidos plasmáticos, que podem não se correlacionar com os níveis de aminoácidos cerebrais. Curiosamente, evidências têm demonstrado que alguns aminoácidos do cérebro humano, como o GLU, estão correlacionados à via periférica em pacientes com esquizofrenia (DE LUCA *et al.*, 2008). Além disso, as descobertas têm sugerido que as alterações periféricas do TRP e TYR podem refletir alterações cerebrais devido ao seu acesso pelo sistema transportador de aminoácidos neutros (RUDDICK *et al.*, 2006; ZARAGOZÁ, 2020). Assim, embora especulativos, os perfis de aminoácidos alterados no sangue periférico podem, em certa medida, refletir aquelas alterações observadas no cérebro (ZARAGOZÁ, 2020). No entanto, estudos futuros medindo as atividades de aminoácidos no sangue e no cérebro são necessários para concluir sua correlação e papel potencial como biomarcadores na psicose. Em quinto lugar, não realizamos uma análise de aminoácidos de acordo com a heterogeneidade dos pacientes em PEP. Estudos futuros são necessários para avaliar os níveis plasmáticos de aminoácidos considerando os pacientes em PEP em diferentes categorias diagnósticas (psicoses afetivas e não afetivas), uma vez que a estabilidade diagnóstica no PEP é baixa, considerando outros diagnósticos clínicos e em comparação aos controles. Em sexto lugar, medimos apenas a serina racêmica (DL-serina) usando GC-MS no sangue periférico, visto que o kit de laboratório Phenomenex não separa suas formas quirais. A D-serina que se liga ao aminoácido GLY, um co-agonista do NMDAR, tem um papel importante na função do NMDAR como a plasticidade sináptica (CHO *et al.*, 2016). Por fim, a

avaliação das doenças metabólicas baseou-se apenas na coleta de dados autorreferidos, o que pode subestimar os diagnósticos clínicos formais.

Apesar dessas limitações importantes, nosso artigo tem vários pontos fortes. Incluímos pacientes em PEP com uma caracterização clínica detalhada permitindo explorar a associação entre o tratamento psicotrópico e outras variáveis clínicas com os níveis plasmáticos de aminoácidos. Além disso, incluímos seus irmãos biológicos, considerados um grupo de risco que compartilha o mesmo ambiente e possui perfil genético semelhante ao dos pacientes, ao invés do tradicional desenho caso-controle; também incluímos controles da comunidade representativos da população geral. Por fim, nosso estudo utilizou o GC-MS, uma técnica que fornece um perfil robusto de aminoácidos em seu nível molecular. Esta abordagem tem sido frequentemente considerada uma ferramenta padrão ouro para explorar o perfil de aminoácidos em estudos metabolômicos (FIEHN, 2016; NAIR; CLARKE, 2016), que ainda não havia sido empregada por outros estudos de psicose. Também podemos considerar a generalização de nossos resultados como satisfatória. Nossa abordagem de metabólito oferece uma baixa complexidade de aquisição de dados de aminoácidos, com alta sensibilidade, rapidez e baixo custo para rastrear as características de metabólito envolvidos em vias predefinidas implicadas na fisiopatologia da esquizofrenia e outras psicoses.

4.5. CONCLUSÃO

O nosso estudo sugere que os pacientes em PEP possam ser caracterizados por uma redução do perfil plasmático de GABA em comparação com o perfil dos irmãos não-psicóticos e controles de base populacional. Além disso, fomos capazes de mostrar a influência do tratamento farmacológico dos pacientes no perfil plasmático de GLU. Nossos resultados também sugerem que anormalidades metabólicas, especialmente aquelas associadas com os níveis plasmáticos de GLU, Glx e de PRO não se restringem apenas à psicose, tornando os irmãos um possível grupo de maior risco para as alterações metabólicas. Finalmente, a técnica do GC-MS deve ser considerada uma ferramenta útil para o rastreamento dos níveis periféricos de aminoácidos, contribuindo para a compreensão dos processos fisiopatológicos em psicose e em seus parentes de primeiro grau saudáveis. Ao todo, as alterações no sangue periférico demonstradas neste estudo podem refletir um desequilíbrio de aminoácidos na esquizofrenia e outras psicoses. Mais estudos, especialmente metabolômicos, são necessários para confirmar os nossos achados e melhorar a compreensão da patogênese da psicose.

5. INVESTIGAÇÃO DAS VARIANTES DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO RELACIONADOS AOS GENES *GRIN1*, *GRIN2A* E *GRIN2B*

Artigo em preparação: **Loureiro CM**, Fachim HA, Corsi-Zuelli F, Shuhama R, Coeli-Lacchini FB, Lacchini R, Menezes PR, Del-Ben CM, Dalton CF, Louzada-Junior P, Reynolds GP. *Frontiers in Genetics*.

5.1. OBJETIVOS E HIPÓTESES

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a comparar variantes associadas aos genes do NMDAR na população brasileira composta por pacientes em PEP, irmãos e controles da comunidade. Visto que uma das hipóteses da esquizofrenia e outras psicoses é a hipofunção do NMDAR e que esses transtornos possuem uma importante influência genética, sugerimos que variações genéticas associadas aos genes do NMDAR poderiam estar envolvidas na patogênese dos transtornos psicóticos. Nosso objetivo foi comparar a frequência das variantes dos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* em pacientes em PEP, irmãos não psicóticos e controles de base populacional.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

Descritos no item 4.2. do **Capítulo 4**, página 87 (contextualização e delineamento do estudo humano, coleta de dados, participantes, instrumentos de avaliação e aspectos éticos).

5.2.1. Genes candidatos e seleção das variantes genéticas

Identificamos relevantes genes candidatos que previamente foram associados significativamente com esquizofrenia e outras psicoses publicados em revisões e metanálises (CHERLYN *et al.*, 2010; RIPKE *et al.*, 2014; WINCHESTER; PRATT; MORRIS, 2014; GOUVÊA *et al.*, 2017), selecionando três genes de interesse: *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B*. Um total de nove SNVs (*GRIN1*: rs4880213, rs11146020 e rs10747050; *GRIN2A*: rs1420040 e *GRIN2B*: rs890, rs2098469, rs7298664, rs1805502 e rs1806194) foram selecionados das regiões dos três genes candidatos (abrangendo locais alvo, a montante e a jusante) considerando uma das três estratégias a seguir: (a) marcação (*Haploview* 4.2) em um limiar de r^2 de 0,6 para capturar 98% das variantes mais comuns da fase II do HapMap,; (b) suspeita de funcionalidade da SNV de acordo com dados publicados no *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org>) e (c) uma associação anterior relatada na literatura com pacientes em PEP.

5.2.2. Análises moleculares

5.2.2.1. Genotipagem dos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* por RT-PCR

As análises de genotipagem com a discriminação alélica foram obtidas seguindo as etapas dos programas de termociclagem (StepOnePlus™) e o programa Taqman®Genotype (Software Real Time PCR Systems Versão 2.0 – Applied Biosystems®, 2007). As reações de genotipagem foram feitas em placas de reação MicroAmp® Fast Optical de 96 poços (REF: 4346906), cada um contendo: 5 µL de TaqMan® GTpress™ Master Mix 2X (APPLIED BIOSYSTEMS, CA, USA), 0,5 µL de mistura de ensaio de genotipagem TaqMan®Assay 20X, 2 µL de DNA genômico (30 ng/µL) e 2,5 µL de água UltraPure™ Distilled Water (DNase, RNase Free - Gibco®). A reação foi otimizada para volume final de 10µL, como demonstrado na **Tabela 5**. Em todas as placas foram incluídos controles positivos para cada um dos genótipos e um controle sem DNA, para excluir-se a possibilidade de contaminações cruzadas com DNA de outra origem, em algum dos reagentes e no transcorrer da manipulação dos experimentos. As reações foram feitas segundo o seguinte programa de termociclagem: (i) leitura pré-PCR à 60°C durante 1 min; (ii) aquecimento 95°C por 10 min; (iii) 40 ciclos subsequentes de desnaturação à 95°C por 15 segundos (seg) e anelamento à 60°C durante 1 minuto e (iv) leitura pós-PCR à 60°C durante 1 min. Depois de padronizadas, as reações de genotipagem foram feitas para cada uma das amostras humanas para cada um das nove variantes.

Tabela 5. Volume de reagentes utilizados na reação de PCR-TR

<i>Assay</i> SNV ¹ (20X, µL)	MasterMix (2X, µL)	Água (µL)	DNA (µL)	Volume final (µL)
0,5	5,0	2,5	2	10

¹ Ensaio para genotipagem já confeccionado pela Applied Biosystems.

As reações foram realizadas de acordo com o seguinte programa de termociclagem (StepOnePlus™), estágio 1: leitura pré-PCR a 60 °C por 1 min; estágio 2: manutenção da ativação da DNA polimerase a 95 °C por 20 seg; estágio 3: 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 3 seg e recozimento a 60 °C por 20 seg; estágio 4: 10 ciclos de leitura de desnaturação pós-PCR a 95 °C por 3 seg e recozimento a 60 °C por 20 seg. As análises de discriminação alélica foram realizadas utilizando o programa Taqman® Genotype (Software Real Time PCR Systems Versão 2.0 - Applied Biosystems®, 2007), com o algoritmo específico compatível com os resultados gerados pelo equipamento para as nove variantes descritas na **Tabela 6**. As análises das variantes foram realizadas no *Biomolecular Research Centre* da *Sheffield Hallam University*, no Reino Unido.

Tabela 6. Sequência contextual para as SNVs associadas aos genes do NMDAR

Gene	Contexto de sequência [VIC/FAM]
GRIN1	
rs4880213	TCCTCCTCTCAAGCAGGCTTCCTCT[C/T]GACAGAAATGTGTCTGCAGGTGGCT
rs11146020	CTCCCTATTCTCTTAGCCCCGAGGA[G/C]GGGGGTCCCAAGTTACATGGCCACG
rs10747050	TTCGGCACACAGGAGCGGGTAGGCT[A/G]GACGGCGGGGGTGGGGACCAGCGTG
GRIN2A	
rs1420040	CCCTGGAGGAGACCAGGCACTTTGA [A/G] AATATGTCTAACGTTAGGGATTTAC
GRIN2B	
rs890	GCTTCCTCACCTAAATGAAAAGATC[A/C]GTTTGGGAAAAGCTACCTTTGTGCT
rs2098469	TAGGGCAGCACTGTGAAAAAAGCCC[G/T]GGACTTGGCATCAGACATCCATCAG
rs7298664	TCTAGTTGGGGAGATCAAGCAAGAC[C/T]TCATGGTGGAGCCTGCCTTTGAGAT
rs1805502	ATCTGAGAGGGAAACAAGGTGTTGC[A/G]GGAAGGTAGAAGGGCTTCTACCAAG
rs1806194	AGCCTAAATCCCAGGCTGTTCTTTA[C/T]GTGCTTTTGGGTTGAAAGGAGGAGT

O primeiro alelo é a variante ancestral e o segundo alelo é de menor frequência.

O resultado da genotipagem foi visualizado pelo *software* Applied Biosystems® para análise na forma de um gráfico discriminação alélica, como exemplificado na **Figura 4**. Esse gráfico, também conhecido como gráfico de *cluster* ou gráfico de dispersão, representa cada amostra como um ponto individual no gráfico. O eixo X representa o alelo 1 (emissão de fluorescência VIC) versus o eixo Y (alelo 2, emissão de fluorescência FAM). Dessa forma, os três possíveis genótipos são agrupados em *clusters* homozigotos e um *cluster* heterozigoto, a depender da emissão de fluorescência dada em cada amostra.

Figura 4. Gráfico de discriminação alélica. A legenda representa os alelos homozigoto dominante (●), heterozigoto (●) e homozigoto recessivo (●) para determinada SNV.

5.2.3. Análise estatística

As diferenças das frequências das variantes foram comparadas entre os pacientes em PEP, seus irmãos e controles usando a regressão logística multinomial e o teste exato de Fisher. Consideramos a razão de chances (Beta, β) e seus intervalos de confiança de 95% (IC95%) para medir os efeitos das variantes na psicose, considerando a covariável sexo. Foi considerado o grupo controle como referência para comparações com pacientes em PEP e seus irmãos, e, posteriormente, o grupo dos irmãos como referência para as comparações com os pacientes em PEP. O teste de *post-hoc* de Bonferroni foi utilizado para corrigir o número de variantes.

Para examinar os efeitos conjuntos das variantes, assumimos que a menor frequência alélica (MAF) do genótipo contribuía para o alto risco de psicose, a partir de dados do Genoma Mundial no *Ensembl Genome Browser*. As associações entre as variantes e os grupos também foram avaliadas nos modelos dominante (homozigoto dominante versus heterozigoto mais homozigoto recessivo), aditivo (homozigoto dominante versus heterozigoto versus homozigoto recessivo) e recessivo (homozigoto dominante versus homozigoto recessivo), ajustados para

sexo, com resultados semelhantes. No entanto, optamos aqui por demonstrar apenas um dos três modelos (dominante). As diferenças entre as variantes dos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* no grupo dos pacientes em PEP e a escala BPRS foram examinadas usando o teste de t de Student, considerando dois grupos de variantes (modelo dominante).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Variáveis sociodemográficas e clínicas dos participantes

As variáveis sociodemográficas e clínicas dos pacientes em PEP, seus irmãos e controles foram descritas na **Tabela 1, Capítulo 4**, página 95.

5.3.2. Distribuições dos genótipos das SNVs *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B*

As frequências genotípicas das SNVs dos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* estavam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para (i) **pacientes em PEP** [*GRIN1*: rs4880213: ($\chi^2=9,61$; $p=0,002$), rs11146020: ($\chi^2=1,05$; $p=0,305$), rs10747050: ($\chi^2=0,28$; $p=0,597$); *GRIN2A*: rs1420040 ($\chi^2=0,02$, $p=0,892$); *GRIN2B*: rs890: ($\chi^2=0,01$; $p=0,958$), rs2098469: ($\chi^2=6,69$; $p=0,010$), rs7298664: ($\chi^2=2,84$; $p=0,09$), rs1805502: ($\chi^2=0,84$; $p=0,359$) e rs1806194: ($\chi^2=0,84$; $p=0,358$); (ii) **irmãos** [*GRIN1*: rs4880213: ($\chi^2=0,48$; $p=0,488$), rs11146020: ($\chi^2=0,78$; $p=0,376$), rs10747050: ($\chi^2=7,11$; $p=0,008$); *GRIN2A*: rs1420040 ($\chi^2=0,16$, $p=0,686$); *GRIN2B*: rs890: ($\chi^2=3,82$; $p=0,051$), rs2098469: ($\chi^2=12,54$; $p<0,001$), rs7298664: ($\chi^2=16,68$; $p<0,001$), rs1805502: ($\chi^2=3,08$; $p=0,079$) e rs1806194: ($\chi^2=1,16$; $p=0,281$)] e (iii) **controles** [*GRIN1*: rs4880213: ($\chi^2=0,45$; $p=0,503$), rs11146020: ($\chi^2=0,69$; $p=0,405$), rs10747050: ($\chi^2=1,72$; $p=0,190$); *GRIN2A*: rs1420040 ($\chi^2=1,31$, $p=0,253$); *GRIN2B*: rs890: ($\chi^2=0,08$; $p=0,772$), rs2098469: ($\chi^2=0,01$; $p=0,919$), rs7298664: ($\chi^2=0,40$; $p=0,529$), rs1805502: ($\chi^2=1,26$; $p=0,262$) e rs1806194: ($\chi^2=0,12$; $p=0,729$)], com exceção de uma SNV [*GRIN2B*: rs2098469: ($\chi^2=10,82$; $p=0,029$)].

Dessa maneira, as SNVs rs4880213, rs10747050, rs2098469 e rs7298664 foram excluídas das análises por não estarem em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($p<0,05$). Dois pacientes em PEP tiveram o DNA evaporado durante o transporte do Brasil-Reino Unido (cumprimento das normas de transporte de material biológico internacional) e, por isso, a amostra final dos pacientes foi de 164. Já os irmãos ($n=76$) e controles ($n=166$), não apresentaram perdas. A **Tabela 7** demonstra a frequência dos genótipos e alelos para todas SNVs associadas aos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* entre os grupos.

Tabela 7. Distribuição das frequências genotípicas e alélicas para as SNVs dos genes dos NMDAR nos pacientes em PEP, irmãos e controles

SNVs	Posição	Frequência do genótipo				χ^2 ; p ¹	Alelos	Frequência do alelo		
		n (%)						n (%)		
		Pacientes (n=164)	Irmãos (n=76)	Controles (n=166)	Total (n=406)			Pacientes (n=164)	Irmãos (n=76)	Controles (n=166)
GRIN1										
rs11146020 (G>C)	Chr9:137138632									
GG		127 (77,4)	62 (81,6)	130 (78,3)	319 (78,6)	3,711;0,598	G	287 (0,9)	138 (0,9)	295 (0,9)
GC		33 (20,1)	14 (18,4)	35 (21,1)	82 (20,2)		C	41 (0,1)	14 (0,1)	37 (0,1)
CC		4 (2,4)	0 (0,0)	1 (0,6)	5 (1,2)					
GRIN2A										
rs1420040 (A>G)	Chr16:9756540									
AA		62 (37,8)	27 (35,5)	62 (37,3)	151 (37,2)	1,329;0,868	A	201 (0,6)	92 (0,6)	197 (0,6)
AG		77 (47,0)	38 (50,0)	73 (44,0)	188 (46,3)		G	127 (0,4)	60 (0,4)	135 (0,4)
GG		25 (15,2)	11 (14,5)	31 (18,7)	67 (16,5)					
GRIN2B										
rs890 (A>C)	Chr12:13562374									
AA		59 (32,0)	19 (25,0)	52 (31,3)	130 (32,0)	6,827;0,160	A	197 (0,6)	84 (0,6)	181 (0,5)
AC		79 (48,2)	46 (60,5)	77 (46,4)	202 (49,8)		C	131 (0,4)	68 (0,4)	151 (0,5)
CC		26 (15,9)	11 (14,5)	37 (22,3)	74 (18,2)					

(Continua)

(Conclusão)										
SNVs	Posição	Frequência do genótipo				χ ; p ¹	Alelos	Frequência do alelo		
		n (%)						n (%)		
		Pacientes (n=164)	Irmãos (n=76)	Controles (n=166)	Total (n=406)			Pacientes (n=164)	Irmãos (n=76)	Controles (n=166)
rs1805502 (A>G)	Chr12:13561247									
AA		87 (53,0)	33 (43,4)	102 (61,4)	222 (54,7)	8,746;0,066	A	242 (0,7)	105 (0,7)	257 (0,8)
AG		68 (41,5)	39 (51,3)	53 (31,9)	160 (39,4)		G	86 (0,3)	47 (0,3)	75 (0,2)
GG		9 (5,5)	4 (5,3)	11 (6,6)	24 (5,9)					
rs1806194 (T>C)	Chr12:13570193									
TT		70 (42,7)	24 (31,6)	61 (36,7)	155 (38,2)	3,464;0,480	T	221 (0,7)	90 (0,6)	203 (0,6)
CT		81 (48,8)	42 (53,8)	81 (48,8)	200 (49,0)		C	115 (0,3)	64 (0,4)	129 (0,4)
CC		17 (10,4)	11 (14,1)	24 (14,5)	52 (12,7)					

¹ Qui-quadrado de Pearson e valor de p pelo teste exato de Fisher para comparações entre as frequências dos genótipos dos grupos;
O alelo em negrito representa o alelo de menor frequência nas populações da Europa e África (MAF = 0,39); Negrito: p<0,05.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas das frequências dos genótipos (modelo dominante) entre pacientes em PEP versus irmãos, pacientes em PEP versus controles, bem como entre irmãos e controles (**Tabela 8**).

Tabela 8. Comparação das frequências das variantes genéticas entre pacientes em PEP, irmãos e controles de base populacional

SNVs	Pacientes & irmãos: p ^a	Pacientes & controles: p ^b	Irmãos & controles: p ^c
β (95% IC) ¹			
GRIN1			
rs11146020 (G>C)			
GG	1,00	1,00	1,00
GC ou CC	0,784 (0,382-1,608); p=0,506	0,950 (0,565-1,599); p=0,848	1,218 (0,600-2,471); p=0,585
GRIN2A			
rs1420040 (A>G)			
AA	1,00	1,00	1,00
AG ou GG	1,088 (0,600-1,973); p=0,780	1,020 (0,653-1,592); p=0,932	0,923 (0,515-1,653); p=0,788
GRIN2B			
rs890 (A>C)			
AA	1,00	1,00	1,00
AC ou CC	1,647 (0,870-3,116); p=0,125	1,234 (0,781-1,952); p=0,368	0,803 (0,427-1,512); p=0,497
rs1805502 (A>G)			
AA	1,00	1,00	1,00
AG ou GG	1,341 (0,754-2,384); p=0,317	0,709 (0,457-1,099); p=0,124	0,508 (0,288-0,896); p=0,019*
rs1806194 (T>C)			
TT	1,00	1,00	1,00
CT ou CC	1,481 (0,811-2,704); p=0,201	1,284 (0,825-1,998); p=0,269	0,850 (0,469-1,542); p=0,594

Beta: Razão de Chance; IC: Intervalo de confiança; ^a Irmãos versus pacientes em PEP; ^b Controles versus pacientes em PEP; ^c Controles versus irmãos;

¹Regressão logística multinomial: genótipo ajustado por sexo.

*Correção por Bonferroni (valor de p significativo quando $p \leq 0,01$ (considerado o número de SNVs, $p=0,05/5=0,01$);

O alelo em negrito representa o alelo de menor frequência nas populações da Europa e África (MAF = 0,39).

5.3.3. Comparações entre os genótipos dos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* com a gravidade de sintomas nos pacientes em PEP

Não foram encontradas diferenças entre as SNVs dos genes do NMDAR a a escala BPRS [*GRIN1*: rs4880213 ($t=-0,178$, $p=0,859$); rs11146020 ($t=-0,471$, $p=0,639$); rs10747050 ($t=0,900$, $p=0,790$); *GRIN2A*: rs1420040 ($t=-0,593$, $p=0,554$); *GRIN2B*: rs890 ($t=-1,587$, $p=0,114$); rs7298664 ($t=-0,114$, $p=0,910$); rs1805502 ($t=0,347$, $p=0,729$); rs1806194 ($t=1,128$, $p=0,261$)].

5.4. DISCUSSÃO

Neste estudo analisamos as variantes dos genes associados ao NMDAR (*GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B*) em indivíduos com primeiro episódio de esquizofrenia e outras psicoses comparados aos seus irmãos não psicóticos e controles da comunidade na região de Ribeirão Preto, Brasil. Nossos achados não corroboram com a hipótese inicial de que as variantes genéticas dos genes associados ao NMDAR são preditores genéticos para os pacientes em PEP. No entanto, das SNVs investigadas, embora sem diferenças estatisticamente significativas após a correção por Bonferroni, observamos que os irmãos apresentaram maior frequência da variante de risco rs1805502 do gene *GRIN2B* comparados aos controles.

Essa SNV está localizada no cromossomo 12p12 na região 3' não traduzida (3'-UTR) e como já mencionado anteriormente, o *GRIN2B* está envolvido na plasticidade neural e na função cognitiva (AKASHI *et al.*, 2009; MASCHERETTI *et al.*, 2015), tendo um papel importante no aparecimento de déficits cognitivos presentes na esquizofrenia e outras psicoses. Mais especificamente, evidências demonstraram alterações das habilidades cognitivas no modelo de camundongos com expressão anormal de *Grin2b*, bem como camundongos transgênicos com superexpressão da proteína NR2b no CPF associados a um desempenho cognitivo aprimorado (CUI *et al.*, 2011; TANG *et al.*, 1999). Além disso, camundongos *knockdown* para *Grin2b* apresentaram déficits tanto na aprendizagem de escolha quanto na mudança de escolha (BRIGMAN *et al.*, 2013). Também foi demonstrado que a estimulação de baixa frequência do NR2b no hipocampo de camundongos levou à depressão a longo prazo (DALTON *et al.*, 2012) e à plasticidade sináptica prejudicada (BERG *et al.*, 2013; MONACO; GULCHINA; GAO, 2015), reforçando o papel do *Grin2b* na esquizofrenia e outras psicoses. Evidências recentes também confirmaram a associação entre as SNVs do *GRIN2B* e a sua suscetibilidade à esquizofrenia (GUO *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2015). Em nosso estudo, os irmãos não afetados pela doença apresentaram maior frequência da SNV rs1805502, porém sem diferença significativa após a correção por múltiplas comparações. Um estudo demonstrou

que o alelo recessivo do rs1805502 foi associado a uma capacidade de raciocínio reduzida numa coorte *ante mortem* de pacientes com esquizofrenia, enquanto nas análises de cérebro *post mortem*, o alelo recessivo foi associado às expressões gênica e proteica reduzidas de NR1 na esquizofrenia em comparação aos controles (WEICKERT *et al.*, 2013), reforçando evidências de uma hipofunção do NMDAR na esquizofrenia e sugerindo um novo mecanismo pelo qual a SNV do gene *GRIN2B* pode influenciar negativamente a expressão de outra subunidade do NMDAR e impactar no déficit cognitivo dos pacientes com esquizofrenia. No entanto, os resultados mostram-se controversos, visto que um outro estudo não encontrou associação significativa entre a SNV rs1805502 e esquizofrenia (DEMONTIS *et al.*, 2011). Embora o efeito exato da SNV rs1805502 na expressão do gene *GRIN2B* não seja bem conhecido, um estudo de ressonância magnética demonstrou que a SNV rs1805502 diminuiu a concentração glutamatérgica no córtex cingulado anterior (ARNOLD *et al.*, 2009) de pacientes pediátricos com transtorno obsessivo compulsivo. Dessa maneira, sugerimos a investigação da SNV rs1805502 em tamanhos amostrais maiores de familiares de primeiro grau para a investigação de sua contribuição na regulação da expressão do gene *GRIN2B* e, consequentemente, influência genética para grupos de maior risco para o desenvolvimento de psicose.

Contrário aos nossos achados, um estudo encontrou diferenças significativas da SNV rs1806194 associada à pacientes com esquizofrenia na população dinamarquesa comparados aos controles (DEMONTIS *et al.*, 2011). Em relação à rs890, um estudo encontrou associações com a esquizofrenia (GUO *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2015) e os autores sugeriram seu envolvimento na regulação do microRNA do *GRIN2B* (LIU *et al.*, 2012). Foi demonstrado também que o alelo de risco da SNV rs890 pode potencialmente conferir uma suscetibilidade aos sintomas obsessivo-compulsivos nos pacientes com esquizofrenia em tratamento com a clozapina (CAI *et al.*, 2013), enquanto os nossos achados não demonstraram associação significativa desta SNV com os sintomas psicóticos nos pacientes em PEP. Esses estudos foram realizados em amostras maiores do que a utilizada neste estudo, portanto, nossos resultados podem apresentar baixo poder.

Neste estudo não encontramos associação entre as outras SNVs dos genes do NMDAR e a esquizofrenia e outras psicoses. Em relação às variantes do *GRIN1*, similar aos nossos resultados, uma investigação das SNVs deste gene na psicose induzida por metanfetamina também não identificou alguma associação entre a SNV rs11146020 e a vulnerabilidade genética à psicose (CHANASONG *et al.*, 2013), assim como outro estudo não encontrou risco significativo de esquizofrenia e a SNV rs11146020 (PAI *et al.*, 2015). Entretanto, diferentemente do nosso estudo, achados anteriores encontraram associação entre a SNV

rs11146020 e transtornos afetivos (GEORGI *et al.*, 2004; MUNDO *et al.*, 2003), bem como sua importância na responsabilidade pela esquizofrenia (BEGNI *et al.*, 2003; QIN *et al.*, 2005; ZHAO *et al.*, 2006).

Evidências recentes sugerem que pacientes com esquizofrenia podem apresentar sinais de processos autoimunes típicos associados ao comprometimento do funcionamento dos microRNAs (ERMAKOV *et al.*, 2018). Neste estudo, selecionamos a SNV rs1420040 do *GRIN2A* que está localizado em uma região de ligação de microRNA-RNA_m e está em desequilíbrio de ligação com outras SNVs regulados por microRNAs (ALACAM *et al.*, 2016; LOZADA *et al.*, 2012). A SNV rs1420040 está localizado na região 3'-UTR de codificação de proteínas na posição 10800 do *GRIN2A* e está incluído em um grupo representativo regulado pelo microRNA que pode aumentar o risco de desenvolvimento da esquizofrenia (NIU *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2015), além de ter sido associado como uma SNV candidata para comportamento suicida e transtorno depressivo maior (YIN *et al.*, 2016) e em sujeitos com dependência de heroína (ZHAO *et al.*, 2013a; ZHONG *et al.*, 2014). No entanto, um estudo de caso-controle na população chinesa não mostrou associação significativa entre essa variante e a esquizofrenia (ZHAO *et al.*, 2013a) – semelhante ao nosso estudo, que também não encontrou associações entre a SNV rs1420040 do *GRIN2A* e pacientes em PEP. Nós sugerimos que a variante rara do *GRIN2A* pode estar relacionada à perda de função sendo insuficiente para induzir um fenótipo semelhante à esquizofrenia e outras psicoses. Além disso, os resultados demonstraram que a presença de SNVs nos locais de ligação ao microRNA pode atrapalhar a regulação dos genes (WILK; BRAUN, 2018). Especialmente, foi demonstrado que o miR-137 suprime a expressão da proteína *GRIN2A* através da ligação ao 3'UTR do RNA_m de *GRIN2A* (ZHAO *et al.*, 2013b), onde a SNV rs1420040 está incluída. Portanto, sugerimos que o miR-137 possa estar subjacente a um dos mecanismos que contribuem para regular negativamente a proteína NR2 nos pacientes em PEP, como descobrimos anteriormente (LOUREIRO *et al.*, 2018).

5.4.1. Limitações e pontos fortes

Dentre as limitações do nosso estudo, a não associação das variantes genéticas dos genes *GRIN1* e *GRIN2A* com a esquizofrenia e outras psicoses pode ser explicado por alguns fatores. Primeiro, pelo pequeno tamanho amostral, principalmente no grupo dos irmãos e a alta heterogeneidade fenotípica para análises de variantes que podem ter comprometido o poder estatístico (MARTUCCI *et al.*, 2006). Poucos indivíduos nos grupos de genótipos podem indicar um poder estatístico limitado na detecção de diferenças entre os mesmos; portanto, há

uma necessidade premente de conduzir estudos prospectivos maiores para validar os nossos achados. Segundo, a não diferenciação dos pacientes em PEP em grupos diagnósticos (esquizofrenia, transtorno depressivo maior e transtorno afetivo bipolar) pode ter suprimido a complexidade individual de cada transtorno e suas especificidades genéticas. Terceiro, a composição de diferentes grupos étnicos em nossa amostra e a estratificação da população podem configurar a alta heterogeneidade genética. Já é bem esclarecido que o risco de desenvolver psicose aumenta com o acúmulo de diferentes variantes genéticas e a exposição a múltiplos fatores ambientais adversos (ZWICKER; DENOVAR-WRIGHT; UHER, 2018). Em diferentes grupos étnicos, os efeitos de fatores ambientais e genéticos e suas interações no risco de distúrbios também podem variar (SAADAT, 2010), o que poderia explicar as não associações entre as variantes dos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* com a psicose em nosso estudo. Por isso, neste estudo reconhecemos como limitação a não correção das análises das SNVs para ancestralidade, própria da etnia e não da psicose. Devido à natureza inerentemente de multi-ancestralidade do conjunto de dados, os efeitos da população do Brasil deveriam ser corrigidos por influências genéticas tri-continetais (genomas africano, europeu e indígena). Por fim, os estudos de GWAS revelam que múltiplos genes de susceptibilidade podem contribuir para a patogênese da esquizofrenia e outras psicoses (MARANVILLE; COX, 2016; RIPKE *et al.*, 2014; VASSOS *et al.*, 2017; YUE *et al.*, 2011), dessa maneira, cada gene selecionado para o nosso estudo pode exercer efeitos fracos a moderados que não predisõem geneticamente os indivíduos ao desenvolvimento da esquizofrenia e outras psicoses.

5.5. CONCLUSÃO

Realizamos um estudo exploratório das SNVs relacionadas aos genes do NMDAR sem associação significativa entre as variantes genéticas do NMDAR e a esquizofrenia e outras psicoses em uma população de Ribeirão Preto e região.

6. INVESTIGAÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA NOS GENES *LINE-1*, *GRIN1*, *GRIN2A* E *GRIN2B*

Dados parciais publicados: Fachim HA, **Loureiro CM**, Corsi-Zuelli F, Shuhama R, Louzada-Junior P, Menezes PR, Dalton CF, Del-Ben CM, Reynolds GP. GRIN2B promoter methylation deficits in early-onset schizophrenia and its association with cognitive function. *Epigenomics*. 2019 Feb;11(4):401-410. DOI: 10.2217/epi-2018-0127.

6.1. OBJETIVOS E HIPÓTESES

Anteriormente, foi relatado um maior nível de metilação global no cérebro pós-morte de pacientes com esquizofrenia (FACHIM *et al.*, 2018), fornecendo evidências adicionais de que essa disfunção epigenética pode estar envolvida na psicose (BANERJEE *et al.*, 2018; SANANBENESI; FISCHER, 2009). Além disso, em nosso recente estudo sobre biomarcadores periféricos para a esquizofrenia e outras psicoses, encontramos redução das concentrações plasmáticas das proteínas NR1 e NR2 nos pacientes em PEP quando comparados com seus irmãos não psicóticos e controles de base populacional (LOUREIRO *et al.*, 2018). Supomos agora que a metilação do DNA nos genes *LINE-1*, *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* possa atuar como um mecanismo possível de redução das concentrações das subunidades NR1 e NR2 do NMDAR no sangue periférico. Portanto, testamos essa hipótese determinando a metilação do DNA nesses genes de pacientes em PEP, seus irmãos e controles da comunidade, assim como investigamos alterações correlatas com as variáveis clínicas relacionadas à gravidade dos sintomas e tratamento farmacológico.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

Descritos no item 4.2. do **Capítulo 4**, página 87 (contextualização e delineamento do estudo humano, coleta de dados, participantes, instrumentos de avaliação complementares e aspectos éticos).

Neste estudo, seguimos os mesmos critérios de inclusão e exclusão descritos no **Capítulo 4**. No entanto, incluímos somente 35 pacientes em PEP com diagnósticos de transtorno esquizofreniforme ou esquizofrenia, 35 controles pareados por idade, sexo e escolaridade e 21 irmãos não afetados pela doença.

6.2.1. *Instrumentos de avaliação*

6.2.1.1. **Avaliação Neurocognitiva**

Teste de Inteligência Geral Não-Verbal (TIG-NV) (TOSI SMVD, 2008) é um teste validado no Brasil e a estimativa do desempenho é obtida por uma pontuação global classificada de acordo com o nível de escolaridade do participante, com a vantagem de menor dependência de habilidades verbais formais. Neste estudo, para garantir a validade de todas as informações coletadas, incluindo o quociente de inteligência (QI), os pacientes foram entrevistados e testados apenas quando estavam minimamente orientados auto e alopsiquicamente (ANEXO 6).

6.2.2. *Análises moleculares*

6.2.2.1. **Protocolo de extração de DNA e RNA e conversão em cDNA**

Para a extração de DNA das amostras de sangue humano foi utilizado FlexiGene DNA Kit (250) (QIAGEN, CA, USA), conforme as instruções do fabricante, sendo uma porção das amostras enviadas para a Universidade de Cardiff (Reino Unido), como parte do estudo multicêntrico para ser utilizada a técnica de GWAS.

6.2.2.2. **Tratamento do DNA com bissulfito de sódio, sequenciamento de PCR e pirosequenciamento**

Para as análises de metilação do DNA, usamos o DNA extraído, conforme descrito acima. Após a extração do DNA, cada amostra foi submetida ao tratamento de bissulfito de sódio, o qual promove a identificação de citosinas não-metiladas, convertendo-as em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas. A conversão do DNA por bissulfito de sódio foi feita usando o EpiTec Fast DNA Bisulfite Kit (QIAGEN, SAMPLE & ASSAY TECHNOLOGIES) de acordo com o protocolo do fabricante. Este ensaio tem uma eficiência de conversão superior a 99%. Após o tratamento com bissulfito, foi realizada a reação de PCR para amplificação do DNA para cada gene com seus respectivos primers, o qual utilizamos o kit PyroMark PCR (QIAGEN, SAMPLE & ASSAY TECHNOLOGIES, VALENCIA, CA, REF. 978703). Todos os primers dos humanos estão listados na **Tabela 9**.

Tabela 9. Lista dos primers projetados para cada gene e os iniciadores biotinilados utilizados nas reações de PCR e pirosequenciamento dos humanos

Gene	Primers dos humanos
<i>LINE-1</i>	F 5'TTGAGTTAGGTGTGGGATATAGTT3'
	R[BIO] 5'AAACCCAAAAAATCAAAAAATTCCCTTTCC3'
	Seq 5'GGTGTGGGATATAGTTT3'
<i>GRIN1</i>	F 5'TGAAGGAGGTGGTATTGAGTTGA3'
	R[BIO] 5'ACCCCAACCCATAAACACC3'
	Seq 5'GTAGGAGAATAGTAGGG3'
<i>GRIN2A</i>	F 5'TTTTTGTGTTTTGTGGTGTATAGAT3'
	R[BIO] 5'CTACACCCCCTTACCTAAACATAAACCTCT3'
	Seq 5'GTATGATTTATTTTTTTGTGGTAG3'
<i>GRIN2B</i>	F 5'AGGGGAGAGTTAGAAAAATGGGTATT3'
	R[BIO] 5'TCTCCTCCCCCCCCAAATCAAAATATAC3'
	Seq 5'GGAGAGTTAGAAAAATGGGTATTAA3'

O programa de PCR foi iniciado com a ativação da polimerase (95°C) por 15 min e seguido por desnaturação a 95°C por 30 seg extensão a 72°C por 30 seg, seguido pela extensão final (4 min; 72°C) e resfriamento a 4°C para todos os primers. As reações de PCR foram realizadas com 20 ng de DNA bissulfito convertido usando o PyroMark PCR Kit em um volume final de 25 µl contendo 12,5 µl 1x PyroMark PCR Master Mix, 2,5 µl 1x CoralLoad Concentrate, 1 µl de cada primer em uma concentração final de 0,05 µM, 8 µl de água livre de RNase. As condições de amplificação foram as seguintes: 95 °C por 15 min, 45 ciclos de 94 °C por 30 seg, 56 °C por 30 s (exceto *LINE-1*: 52 °C por 30s) e 72 °C por 30 s, finalmente, 72 °C por 10 min.

Os produtos de PCR foram corridos em gel de agarose 1% com tampão 1x TAE para checagem da presença de banda e confirmação de amplificação do produto (**Figura 5**). Posteriormente, distribuídos na placa de 24 poços e levados ao Pirosequenciador PyroMark Q24 (QIAGEN, REINO UNIDO) para sequenciamento de acordo com as instruções do fabricante. O status de metilação na sequência promotora dos genes alvo foi determinado com um PyroMark Q24 pirosequenciador (QIAGEN, REINO UNIDO) usando 15–20 µl de produto de PCR e um iniciador de sequenciamento. A configuração de pirosequenciamento e a leitura dos dados foi realizada pelo *software* PyroMark Q24 2.0.6.20. As amostras foram submetidas

ao PCR e pirosequenciamento em duplicata e quaisquer inconsistências entre as amostras foram resolvidas por repetição adicional.

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 1% com brometo de etídio, PCR para o gene *GRIN2B* em humanos. A primeira banda corresponde ao corante fluorescente marcador de DNA (DNA Ladder) e a última coluna demonstra o controle negativo (sem a presença de banda).

Os primers específicos para o sequenciamento após o tratamento do DNA com bissulfito de sódio foram desenhados utilizando o Qiagen Pyromark Q24.exe (**Figura 6**).

Figura 6. Ferramenta *BLAST* que demonstra a região promotora do *GRIN2B* (Cromossomo 12, NG_031854.1) mostrando os CpGs escolhidos para serem analisados (numerados de 1 a 5 e sublinhados) e a localização de cada sequência escolhida para análise (ensaios para humanos, caixas vermelhas) no pirosequenciamento nesses alvos de CpG.

```

BLAST
Homo sapiens glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B
GRIN2B. RefSeqGene on chromosome 12
Sequence ID: NG_031854.1; Length: 425613; Number of Matches: 2
Related Information
Map Viewer-aligned genomic context
Range 1: 3209 to 4827; GenBankGraphics Next Match Previous Match

Score          Expect          Identities          Gaps
1101 bits(596)  0.0                1342/1682 (80%)    131/1682 (7%)

Sbjct 3209 Human GGCACGTTTTTGTGAGTGTGAGACCCAAATCCAGACCAGGCAACCTCGCG-T-TCCCCGCGGCC 3266
                                     1                2 3

Sbjct 3267 Human TCCCCCGTCCCCCGGTGAATAATACCCATTTTCTGACGCTCCCC-TCCCTCCCTCCTGC 3325
               4                5

```

A metilação do *LINE-1*, uma medida da metilação global, também foi determinada usando o conjunto de primers PyroMark Q24 CpG *LINE-1* (humanos) e *Line-1* (animais) (Número de Catálogo 970012, QIAGEN, MANCHESTER, REINO UNIDO). O *software* PyroMark Q24 2.0 analisou a porcentagem de metilação em cada amostra de humanos dos sítios de CpG selecionados nos genes *GRIN1*, *GRIN2A*, *GRIN2B* e *LINE-1*, como demonstrado na **Figura 7**. As sequências de DNA para cada gene foram identificadas na região 5' que contém prováveis sequências de ligação aos fatores de transcrição identificamos os sítios de ligação aos fatores de transcrição usando a ferramenta ALLGEN-PROMO: http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3. Esta etapa epigenética do estudo foi desenvolvida em colaboração com o Prof. Dr. Gavin P. Reynolds, a Dra. Caroline F Dalton, a pós-doutoranda Helene A. Fachim e a equipe de pesquisa do *Biomolecular Research Centre* da *Sheffield Hallam University*, Reino Unido. A configuração do pirosequenciamento e a leitura dos dados foram realizadas pelo software PyroMark Q24 2.0.6.20.

Figura 7. Picograma das regiões específicas de metilação do *GRIN2A* da amostra de controle analisadas por pirosequenciamento no sistema Pyromark Q24. O rótulo de qualidade de um CpG afetado pode mudar de azul para amarelo, indicando menor qualidade da verificação, mas que o teste ainda pode ser aceitável, ou para vermelho, indicando falha na qualidade. Nesta figura, em específico, podemos notar os dois CpGs com qualidade azul indicando excelente qualidade do experimento.

6.2.2.3. Concentrações plasmáticas das subunidades NR1 e NR2 do NMDAR

Detecções quantitativas das concentrações plasmáticas das subunidades NR1 e NR2 foram realizadas por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (My BioSource, San Diego, CA, EUA) e descritas previamente em nosso estudo (LOUREIRO *et al.*, 2018).

6.2.3. Análise estatística

Na avaliação das alterações na metilação dos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B*, as variáveis nominais foram avaliadas usando os testes χ^2 de Pearson ou exato de Fisher e as variáveis contínuas por ANOVA de uma via. As diferenças entre os grupos quanto à metilação dos genes *LINE-1* e *GRIN2B* foram examinadas pelo teste ANCOVA de uma via, considerando os grupos (pacientes em PEP, irmãos e controles) como fator fixo e o sexo e a idade como covariáveis. Enquanto que para os genes *GRIN1* e *GRIN2A*, as diferenças entre os grupos foram analisadas pela análise multivariada [Modelo Linear Generalizado (MLGz, Wald χ^2)], considerando também a idade e o sexo como covariáveis. Também analisamos a metilação dos genes pelo teste ANOVA apenas em pacientes em PEP, de acordo com as variáveis clínicas (sexo, DUP, duração do tratamento farmacológico, tratamento com antipsicótico, substâncias psicoativas e escore da BPRS). Para testar as correlações entre a metilação dos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B*, concentrações plasmáticas de NR1 e NR2 e as variáveis clínicas como DUP, BPRS e duração do tratamento foram utilizadas as correlações de Pearson (r) e considerados valores relevantes de $r > 0,35$ e $p < 0,05$. Com relação à estimativa de QI, realizamos um teste de correlação parcial, combinando os grupos de pacientes em PEP e irmãos (pacientes e grupo de alto risco) e controlando o efeito da metilação do *LINE-1*.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Características demográficas e clínicas dos participantes

Para as análises de metilação do DNA, nós selecionamos apenas os pacientes em primeiro episódio de esquizofrenia com menor tempo de psicose, tratamento e uso de substâncias psicoativas ($n=35$), bem como seus irmãos não psicóticos ($n=21$) e controles pareados por idade, sexo e escolaridade ($n=35$). Houve uma proporção menor de homens entre os irmãos em comparação com os demais grupos ($\chi^2=5,88$; $p=0,054$), provavelmente pelas mulheres serem as cuidadoras dos pacientes e aceitarem participar do estudo. No entanto, não houve diferenças significativas entre os grupos quanto à idade [$F_{(2)}=0,03$; $p=0,972$] e anos de escolaridade ($\chi^2=1,83$; $p=0,413$).

Em relação à gravidade dos sintomas psicóticos avaliada pela BPRS no momento da coleta de sangue, os pacientes em primeiro episódio de esquizofrenia mostraram pontuações mais altas que os controles e irmãos [$F_{(2)}=41,45$; $p<0,001$], como esperado. O uso de substâncias psicoativas foi significativamente maior nos pacientes (65,6%) do que nos controles (18,8%) e irmãos (15,6%; $\chi^2=12,60$; $p=0,002$). As características sócio-demográficas e clínicas estão descritas na **Tabela 10**.

Tabela 10. Variáveis sociodemográficas e clínicas de pacientes em primeiro episódio de esquizofrenia, irmãos e controles

	Controles (n=35)	Irmãos (n=21)	Pacientes em PEP (n=35)	p^{1,2}
Características sócio-demográficas: n (%), Média (DP)				
Masculino	21 (60,0)	6 (28,6)	20 (57,1)	0,054
Idade	29,9 (11,7)	30,0 (9,1)	30,5 (12,5)	0,972
≥ 9 anos de escolaridade	21 (60,0)	16 (76,2)	21 (60,0)	0,413
Características clínicas: n (%), Média (DP)				
BPRS (Escore total)	0,7 (2,0)	0,9 (1,6)	10,3 (7,4)	<0,001
Quociente de inteligência: mediana	95,0 (68-136)	91,0 (71-103)	84,0 (68-98)	0,002
Idade de início da psicose			28,9 (13,0)	
DUP (em semanas): mediana			19,0 (4 - 509)	
Tratamento (em semanas): mediana			7,0 (0 - 149)	
Duração de psicose (em semanas): n (%)				
Até 12			10 (28,6)	
13 a 24			9 (25,7)	
25 a 52			10 (28,6)	
53 ou mais			6 (17,1)	
Uso de substância psicoativa: n (%)				
				<0,001
Cannabis apenas	2 (5,7)	3 (14,3)	3 (8,6)	
Cannabis e outros	1 (2,9)	2 (9,5)	16 (45,7)	
Others apenas	3 (8,6)	0 (0,0)	2 (5,7)	
Nenhum	29 (82,9)	16 (76,2)	14 (40,0)	
Tratamento com antipsicótico: n (%)				
Nenhum			5 (14,3)	
Típico			11 (31,4)	
Atípico			19 (54,3)	

BPRS: escala breve de avaliação psiquiátrica; DP: desvio padrão; IC: intervalo de confiança DUP: duração de psicose não tratada

¹ Teste Exato de Fisher; ² ANOVA de uma via seguida por correção de Bonferroni [tabela adaptada do artigo (FACHIM *et al.*, 2019)].

Negro: p<0.05.

Além disso, avaliamos o QI pelo teste TIG em todos os participantes do estudo. Os pacientes tiveram pontuação menor no teste de QI quando comparados aos controles [$F_{(2)}=6,82$; $p=0,001$], como demonstrado na **Figura 8**.

Figura 8. Desempenho do QI entre os pacientes com primeiro episódio de esquizofrenia, irmãos e controles. Os valores são mostrados como média $\pm$ EPM [figura adaptada do artigo (FACHIM *et al.*, 2019)].

6.3.2. Metilação global do DNA (*LINE-1*)

Além do objetivo de avaliar a metilação do DNA nos genes específicos relacionados ao NMDAR, nós também avaliamos a metilação do *LINE-1* como uma medida de avaliação da metilação global. Todas as amostras de sangue demonstraram bandas únicas de PCR sem evidência de degradação do DNA com um aumento geral significativo na metilação do *LINE-1* nos pacientes e irmãos quando comparados ao grupo controle [$F_{(2)}=7,07$; $p=0,001$ para ambos], como mostrado na **Figura 9**.

Figura 9. Metilação do *LINE-1* no sangue de pacientes em primeiro episódio de esquizofrenia, irmãos e controles. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM [figura adaptada do artigo (FACHIM *et al.*, 2019)].

6.3.3. Metilação dos genes do NMDAR

Em relação à metilação do *GRIN1*, nossos resultados não demonstraram diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos diagnósticos em nenhum CpG analisado [CpG1: Wald $\chi^2_{(2)}=1,521$; $p=0,468$; CpG2: Wald $\chi^2_{(2)}=0,754$; $p=0,686$; CpG3: Wald $\chi^2_{(2)}=0,203$; $p=0,903$]. Esses resultados foram independentes da metilação do *LINE-1* (**Figura 10**).

Figura 10. Sem alteração da metilação do *GRIN1* nos pacientes e irmãos comparados aos controles. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM [figura adaptada do artigo (FACHIM *et al.*, 2019)].

No entanto, em relação à metilação no corpo do gene *GRIN2A* também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tanto no CpG1 [Wald $\chi^2_{(2)}=5,003$, $p=0,082$], quanto no CpG2 [Wald $\chi^2_{(2)}=3,599$, $p=0,165$] e esses resultados foram independentes da metilação do *LINE-1* (**Figura 11**).

Figura 11. Sem alteração da metilação do *GRIN2A* no sangue de pacientes e irmãos, comparados aos controles. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM.

No entanto, uma redução global na metilação em todos os cinco CpGs analisados no promotor do gene *GRIN2B* foi encontrada em pacientes comparados aos irmãos e controles [$F_{(10,154)}=1,93$; $p=0,045$]. Houve diminuições significativas da metilação no CpG1 dos pacientes em relação aos controles ($p<0,001$) e entre irmãos e controles ($p=0,046$). Em relação ao CpG2 ($p=0,039$), CpG4 ($p=0,016$) e CpG5 ($p=0,049$) as diferenças foram observadas apenas entre os pacientes e controles (**Figura 12**).

Figura 12. Metilação do promotor do gene *GRIN2B* no sangue de pacientes em primeiro episódio de esquizofrenia, irmãos e controles. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ [figura adaptada do artigo (FACHIM *et al.*, 2019)].

6.3.4. Correlações entre as variáveis clínicas e a metilação do *LINE-1*

Como encontramos um aumento na metilação do *LINE-1* em pacientes e irmãos, também testamos correlações entre a metilação do *LINE-1* e os genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* em cada CpG. Testamos as correlações em todos os participantes (**A**), bem como em pacientes e irmãos (**B**) e, por fim, somente em pacientes (**C**). No entanto, não encontramos associação entre a metilação de *LINE-1* e *GRIN1* em nenhum CpG [**A**: (CpG1: $r=0,049$, $p=0,625$; CpG2: $r=-0,142$, $p=0,154$; CpG3: $r=-0,265$, $p=0,007$); **B**: (CpG1: $r=0,072$, $p=0,576$; CpG2: $r=-0,102$, $p=0,428$; CpG3: $r=-0,061$, $p=0,635$); **C**: (CpG1: $r=0,067$, $p=0,686$; CpG2: $r=-0,034$, $p=0,838$; CpG3: $r=-0,079$, $p=0,631$)]. Também não observamos associação significativa entre a metilação de *GRIN2A* e *LINE-1* em todos os participantes [**A**: (CpG1: $r=-0,093$, $p=0,392$; CpG2: $r=-0,196$, $p=0,070$); pacientes e irmãos **B**: (CpG1: $r=0,100$, $p=0,466$; CpG2: $r=-0,207$, $p=0,133$); bem como somente em pacientes **C**: (CpG1: $r=0,082$, $p=0,646$; CpG2: $r=-0,187$, $p=0,298$)]. Em relação à correlação entre *LINE-1* e *GRIN2B*, encontramos apenas uma correlação negativa fraca entre o *LINE-1* e o CpG5 do *GRIN2B* nos pacientes ($r=-0,351$, $p=0,049$). Os demais CpGs não foram correlacionados [**A**: (CpG1: $r=-0,143$, $p=0,190$; CpG2: $r=-0,116$, $p=0,286$; CpG3: $r=-0,175$, $p=0,107$; CpG4: $r=-0,179$, $p=0,101$; CpG5: $r=-0,125$, $p=0,253$); **B**: (CpG1: $r=0,086$, $p=0,534$; CpG2: $r=-0,038$, $p=0,785$; CpG3: $r=0,027$, $p=0,847$; CpG4: $r=-0,059$, $p=0,674$; CpG5: $r=0,013$, $p=0,929$); **C**: (CpG1: $r=-0,216$, $p=0,227$; CpG2: $r=-0,080$, $p=0,658$; CpG3: $r=-0,234$, $p=0,190$; CpG4: $r=-0,213$, $p=0,242$)].

Como anteriormente encontramos baixas concentrações plasmáticas das subunidades NR1 e NR2 na mesma amostra de pacientes em PEP (LOUREIRO *et al.*, 2018) comparados aos irmãos e controles, correlacionamos esses marcadores moleculares apenas em pacientes e não encontramos associações [**A**: (*LINE-1* e NR1, $r=-0,160$, $p=0,131$; *LINE-1* e NR2, $r=-0,239$; $p=0,035$); **B**: (*LINE-1* e NR1, $r=-0,180$, $p=0,207$; *LINE-1* e NR2, $r=-0,304$; $p=0,016$); **C**: (*LINE-1* e NR1, $r=-0,176$, $p=0,370$; *LINE-1* e NR2, $r=-0,077$; $p=0,641$)]. Consideramos apenas as correlações significativas com valores acima de $r>0,35$ e $p<0,05$, utilizando os valores de NR1 e NR2 transformados em raiz quadrada, os quais apresentaram distribuição normal nesta transformação.

Não foram encontradas diferenças significativas da metilação do *LINE-1* em todos os participantes em relação ao **A**: sexo ($p=0,929$). No entanto, em relação ao uso de substâncias psicoativas, eles apresentaram diferenças significativas ($p=0,042$), mas a significância se perdeu nas comparações múltiplas); nos pacientes e irmãos **B**: sexo ($p=0,333$) e uso de substâncias psicoativas ($p=0,483$); e apenas nos pacientes **C**: sexo ($p=0,302$); duração da psicose ($p=0,590$); duração de tratamento farmacológico ($p=0,882$); tipo de tratamento com antipsicótico ($p=0,738$); e uso de substâncias psicoativas ($p=0,424$).

6.3.5. Correlações entre as variáveis clínicas e a metilação dos genes do NMDAR

Além disso, visto que achamos diferenças na metilação apenas do *GRIN2B* entre os pacientes e controles, correlacionamos os respectivos CpGs significativos com as variáveis sócio-demográficas e clínicas apenas nos pacientes. Não houve diferenças significativas na metilação do *GRIN2B* nos CpGs 1, 4 e 5 dos pacientes em relação ao sexo (CpG1: $p=0,406$; CpG4: $p=0,895$; CpG5: $p=0,515$), duração do tratamento farmacológico (CpG1: $p=0,889$; CpG4: $p=0,959$; CpG5: $p=0,191$), tipo de tratamento com antipsicótico (CpG1: $p=0,271$; CpG4: $p=0,943$; CpG5: $p=0,859$) e uso de substâncias psicoativas (CpG1: $p=0,725$; CpG4: $p=0,626$; CpG5: $p=0,593$). A respeito da duração da psicose, encontramos uma diferença significativa na metilação do CpG4 ($p=0,045$); os pacientes que apresentaram um intervalo de 4 a 12 semanas de psicose mostraram uma redução da metilação do *GRIN2B* em comparação com aqueles que possuíam 25 ou mais semanas ($p=0,049$). Não houve diferenças significativas observadas em outros CpGs (1: $p=0,785$ e 5: $p=0,436$) (**Tabela 11**).

Tabela 11. Metilação do gene *GRIN2B* (CpGs 1, 4 e 5) dos pacientes em relação às variáveis sócio-demográficas e clínicas

Variáveis sócio-demográficas			GRIN2B: média (EPM)						
e clínicas	n	CpG1	p	n	CpG4	p	n	CpG5	p
Sexo ¹			0,406			0,895			0,515
Masculino	18	3,34 (0,15)		17	1,82 (0,13)		17	1,88 (0,13)	
Feminino	15	3,53 (0,16)		15	1,84 (0,17)		15	1,73 (0,19)	
Duração de psicose ^{*2}			0,785			0,045			0,436
Até 4	2	3,50 (0,37)		2	1,65 (0,17)		2	1,12 (0,24)	
5 a 12	8	3,24 (0,27)		8	1,46 (0,16)		8	1,75 (0,16)	
13 a 24	7	3,49 (0,12)		7	1,68 (0,23)		7	1,94 (0,22)	
25 ou mais	16	3,53 (0,18)		15	2,12 (0,14)		15	1,87 (0,20)	
Duração de tratamento ^{*,2}			0,889			0,959			0,191
Nenhuma	5	3,42 (0,19)		5	1,86 (0,14)		5	1,74 (0,09)	
Até 4	8	3,42 (0,16)		8	1,84 (0,22)		8	2,02 (0,24)	
5 a 12	4	3,28 (0,25)		4	1,80 (0,39)		4	1,11 (0,38)	
13 a 24	5	3,70 (0,51)		5	2,00 (0,36)		5	1,97 (0,39)	
25 ou mais	11	3,36 (0,20)		10	1,74 (0,18)		10	1,87 (0,16)	
Tratamento antipsicótico ²			0,276			0,936			0,897
Nenhum	5	3,21 (0,29)		5	1,74 (0,19)		5	1,70 (0,11)	
Típico	9	3,22 (0,22)		9	1,83 (0,29)		9	1,80 (0,34)	
Atípico	19	3,58 (0,14)		18	1,86 (0,11)		18	1,85 (0,11)	
Substância psicoativas ²			0,725			0,626			0,593
Nenhuma	14	3,50 (0,17)		14	1,83 (0,16)		14	1,81 (0,18)	
Cannabis apenas	3	3,19 (0,27)		3	1,50 (0,21)		3	1,40 (0,13)	
Cannabis e outras ³	14	3,47 (0,19)		13	1,94 (0,18)		13	1,94 (0,19)	
Outras substâncias apenas ³	2	3,03 (0,26)		2	1,56 (0,02)		2	1,58 (0,26)	

EPM: erro padrão da média;

¹ Teste t de Student; ² ANOVA de uma via com correção de Bonferroni; ³ Álcool, crack/cocaína e inalantes;* Duração em semanas [tabela adaptada do artigo (FACHIM *et al.*, 2019)].

Analizamos também as correlações entre a metilação do gene *GRIN2B* do NMDAR e a estimativa do QI somente nos pacientes (**A**) e nos pacientes e irmãos (**B**). Não foram encontradas diferenças significativas entre os CpGs do *GRIN2B* e QI quando avaliamos somente os pacientes (**A**) (CpG1: $r=0,078$; $p=0,767$; CpG2: $r=-0,121$; $p=0,645$; CpG4: $r=0,318$, $p=0,214$ e CpG5: $r=-0,026$; $p=0,921$). No entanto, encontramos correlações positivas entre a metilação do *GRIN2B* no CpG1 ($r=0,364$, $p=0,037$), CpG4 ($r=0,450$; $p=0,009$) e CpG5 ($r=0,368$, $p=0,035$) e a estimativa do QI em pacientes e irmãos (**B**). Quando se controlou o efeito da metilação do *LINE-1*, essa correlação permaneceu significativa nos pacientes e irmãos no CpG1 ($r=0,369$, $p=0,038$), CpG4 ($r=0,358$; $p=0,045$) e CpG5 ($r=0,363$, $p=0,041$) (**Figuras 13A-C**). Apenas não encontramos correlação entre o CpG2 e a estimativa do QI ($r=0,269$; $p=0,137$). Os irmãos foram incluídos na análise, pois consideramos ser um grupo intermediário. O CpG3 do *GRIN2B* não foi analisado por não apresentar alteração de metilação entre os grupos.

Figura 13. Correlação entre as alterações de metilação nos CpGs 1 (A), 4 (B) e 5 (C) do *GRIN2B* e o desempenho de QI em pacientes e irmãos [figura adaptada do artigo (FACHIM *et al.*, 2019)].

(A)

(B)

(C)

Por fim, também foram realizadas correlações entre a metilação dos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* do NMDAR e as concentrações plasmáticas de NR1 e NR2 e testamos as correlações em todos os participantes (**A**), bem como em pacientes e irmãos (**B**) e, por fim, somente em pacientes (**C**). No entanto, não foram encontradas correlações entre a metilação de qualquer gene do NMDAR e as subunidades protéicas deste receptor, com exceção da correlação entre as concentrações plasmáticas do NR2 e a metilação do *GRIN2B* em CpG1, $r=0,411$, $p=0,019$ em pacientes (**Figura 14**) [**A**: todos os participantes [(NR1 e *GRIN1* em CpG1, $r=0,017$, $p=0,872$; CpG2, $r=-0,041$, $p=0,699$; CpG3, $r=-0,013$, $p=0,905$; NR2 e *GRIN2A* em CpG1, $r=-0,072$, $p=0,468$; CpG2, $r=-0,033$, $p=0,740$; NR2 e *GRIN2B* em CpG1, $r=0,219$, $p=0,046$; CpG2, $r=0,194$, $p=0,077$; CpG3, $r=0,203$, $p=0,065$; CpG4, $r=0,110$, $p=0,322$; e CpG5, $r=0,080$, $p=0,474$); **B**: pacientes e irmãos (NR1 e *GRIN1* em CpG1, $r=0,137$, $p=0,0,331$; CpG2, $r=0,257$, $p=0,066$; CpG3, $r=0,099$, $p=0,484$; NR2 e *GRIN2A* em CpG1, $r=0,043$, $p=0,738$; CpG2, $r=0,154$, $p=0,233$; NR2 e *GRIN2B* em CpG1, $r=0,157$, $p=0,260$; CpG2, $r=0,140$, $p=0,318$; CpG3, $r=0,204$, $p=0,143$; CpG4, $r=0,242$, $p=0,083$; e CpG5, $r=0,100$, $p=0,483$); **C**: somente pacientes (NR1 e *GRIN1* em CpG1, $r=-0,203$, $p=0,292$; CpG2, $r=-0,113$, $p=0,560$; CpG3, $r=-0,182$, $p=0,344$; NR2 e *GRIN2A* em CpG1, $r=0,254$, $p=0,118$; CpG2, $r=0,090$, $p=0,588$; NR2 e *GRIN2B* em CpG2, $r=0,216$, $p=0,236$; CpG3, $r=0,177$, $p=0,332$; CpG4, $r=0,021$, $p=0,909$; e CpG5, $r=-0,024$, $p=0,898$)].

Figura 14. Correlação entre as concentrações plasmáticas de NR2 e a metilação do *GRIN2B* em CpG1 nos pacientes.

6.4. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra, pela primeira vez, que pacientes em primeiro episódio de esquizofrenia apresentaram anormalidades na metilação global do DNA e na metilação do gene *GRIN2B* relacionados ao sistema glutamatérgico que pode ser subjacente às diferenças nas expressões gênica e proteica vistas na esquizofrenia. Como está bem estabelecido, a metilação do DNA é um processo regulatório que pode inibir ou facilitar a transcrição de genes modificando os sítios de ligação aos fatores de transcrição na região promotora do gene (RAO *et al.*, 2018).

Foi encontrado um aumento na metilação do *LINE-1* em pacientes em primeiro episódio de esquizofrenia e irmãos em comparação com os controles. O *LINE-1* é uma sequência de elementos repetitivos que controlam uma variedade de processos biológicos (WANICHNOPPARAT *et al.*, 2013) e constitui 17% do DNA humano (LANDER *et al.*, 2001). Foi proposto que disfunções epigenéticas nesses elementos no cérebro estão presentes em doenças neurodegenerativas e psiquiátricas (SANANBENESI; FISCHER, 2009). Em nosso estudo, como essa alteração foi observada tanto em pacientes quanto em seus irmãos não psicóticos, sugerimos que a alteração possa refletir as mesmas adversidades a que esses indivíduos tenham sido expostos no início da vida, já que compartilharam do mesmo ambiente durante a infância. Visto que o epigenoma é mais lábil nas fases iniciais da vida (NAGY; TURECKI, 2012), é provável que o efeito ocorrido na metilação na infância tenha sido carregados até a idade adulta (WATERLAND; MICHELS, 2007). O aumento da metilação do *LINE-1* em nosso estudo corrobora com a investigação recentemente identificada de hipermetilação desses elementos em cérebros pós-morte de indivíduos com esquizofrenia (FACHIM *et al.*, 2018). Como descobrimos que os indivíduos nos estágios iniciais da psicose e seus irmãos apresentam a alteração semelhante, o aumento da metilação dos elementos do *LINE-1* pode ser interpretado como um indicador de suscetibilidade. No entanto, podemos também inferir que o tratamento com antipsicóticos nos pacientes em PEP possa ter proporcionado uma maior instabilidade genômica levando à hipermetilação do *LINE-1*, visto que recentemente observou-se hipometilação do *LINE-1* em pacientes em PEP sem tratamento com antipsicóticos comparados aos controles e associados a piores respostas à risperidona (MARQUES *et al.*, 2020).

Também foi encontrada uma redução geral na metilação da região promotora do *GRIN2B*, particularmente reduzida nos CpGs 1, 2, 4 e 5. Essa região possui sítios de ligação para o fator de transcrição II-I que está envolvido em uma variedade de processos reguladores de genes (ROY, 2017). Sabe-se que esse fator de transcrição exerce efeitos negativos na

transcrição gênica (FAN *et al.*, 2014), interagindo física e funcionalmente com a histona desacetilase 3 impedindo a acessibilidade ao DNA (TUSSIÉ-LUNA *et al.*, 2002; WEN *et al.*, 2003). Como encontramos expressão reduzida de proteína NR2 nas amostras de plasma dos mesmos pacientes (LOUREIRO *et al.*, 2018), sugerimos que a redução na metilação desses CpGs poderia permitir que a ligação do fator de transcrição II-I exerça uma atividade repressora da transcrição, resultando em regulação negativa da expressão proteica, reforçando a correlação positiva encontrada entre a metilação do *GRIN2B* no CpG1 e as concentrações plasmáticas de NR2 nos pacientes.

Curiosamente, identificamos uma correlação positiva entre a hipometilação do *GRIN2B* e as medidas de desempenho cognitivo, especificamente entre os CpGs 1, 4 e 5 e o QI, ressaltando que o fator de transcrição II-I repressor se liga apenas nos CpGs 1 e 4. Está bem estabelecido que as adversidades ao longo da vida e o *GRIN2B* estão independentemente associadas a prejuízos comportamentais e cognitivos na infância (RIVA *et al.*, 2015). Variantes no gene *GRIN2B* foram descobertas e associadas significativamente com a memória de trabalho em uma amostra de pacientes alemães (MASCHERETTI *et al.*, 2015). Essa subunidade desempenha um papel crítico na plasticidade sináptica dependente de experiência associada ao aprendizado e à memória. Além disso, estudos em animais mostraram que a subunidade *GRIN2B* é necessária para a formação de padrões neuronais em geral e para a função enquanto canal iônico e formação de espinhas dendríticas em células piramidais do hipocampo (AKASHI *et al.*, 2009; CULL-CANDY; KELLY; FARRANT, 2006). Os baixos escores de QI observados nos pacientes e irmãos comparados aos controles podem estar relacionados à variação na metilação do DNA observada na região promotora do *GRIN2B*. Somado a isso, é importante destacar que a alteração do *GRIN2B* é independente da alteração do *LINE-1*. Apesar dos irmãos apresentarem a mesma alteração na metilação do *LINE-1* que os pacientes, sugerindo vulnerabilidade ao desenvolvimento de esquizofrenia, a anormalidade na metilação do *GRIN2B* foi específica apenas aos pacientes, o que demonstra que essa alteração na metilação do DNA não está simplesmente relacionada a um efeito da metilação global, mas que é uma associação específica provavelmente relacionada, ou refletindo, a neurotransmissão aberrante do glutamato na esquizofrenia.

Além disso, nossas hipóteses sobre a alteração da metilação nos genes *GRIN1* e *GRIN2A* nos pacientes em PEP não foram corroboradas nesse estudo, podendo sugerir que o gene *GRIN2B* esteja relacionado à neurotransmissão anormal do glutamato como um risco potencial de déficits em processos reguladores envolvidos na plasticidade sináptica, memória de trabalho e funções cognitivas na esquizofrenia e outras psicoses (BALU, 2016; CULL-CANDY;

BRICKLEY; FARRANT, 2001; NAKAZAWA; SAPKOTA, 2020). Essa falta de associação do gene *GRIN2A* também pode ser explicada pelas diferentes propriedades funcionais e papéis entre as subunidades NR2A e NR2B durante o neurodesenvolvimento, que podem influenciar a expressão gênica resultando em fenótipos distintos. Até o momento, do nosso conhecimento, apenas um achado anterior mostrou alterações de metilação de *GRIN2A* em amostras cerebrais pós-morte de participantes com transtorno depressivo maior quando comparados com controles (KAUT *et al.*, 2015).

Este estudo também explorou se a metilação do *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* foram afetados ou não pelo tratamento com antipsicóticos nos pacientes. No entanto, não demonstramos associação entre o tratamento farmacológico com antipsicóticos (primeira e segunda gerações) e a metilação do *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B*. Apesar dos resultados incongruentes sobre a identificação uniforme de maior ou menor metilação do DNA de genes específicos associados ao tratamento antipsicótico (MELAS *et al.*, 2012; NOUR EL HUDA *et al.*, 2018; OVENDEN *et al.*, 2018; VENUGOPAL *et al.*, 2018), escolhemos pacientes em sua primeira manifestação de esquizofrenia em uso de antipsicóticos que nos permitiu identificar possíveis associações entre tratamento farmacológico e metilação do DNA (BURGHARDT *et al.*, 2020). Portanto, em nosso estudo, os níveis de hipometilação do gene *GRIN2B* nos pacientes em PEP não estão associados ao tratamento antipsicótico, sugerindo que as alterações sejam específicas do curso da doença e não por efeitos de medicação.

Nossos achados reforçam que as alterações na metilação do DNA podem ser encontradas no sangue periférico, como descrito anteriormente (GUIDOTTI *et al.*, 2014). Além disso, a presença de subunidades do NMDAR nas células sanguíneas periféricas fornece evidências para apoiar a interação entre os sistemas periférico e central (BOLDYREV; BRYUSHKOVA; VLADYCHENSKAYA, 2012; STEINMAN, 2004). No geral, este estudo oferece um maior conhecimento sobre o envolvimento dos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* na disfunção do NMDAR. Especificamente, a hipometilação do *GRIN2B* pode sugerir uma disfunção do NMDAR e seus processos regulatórios (potenciação de longa duração e plasticidade sináptica), resultando em aumento da suscetibilidade de desenvolver psicose, o que o torna um possível marcador para a esquizofrenia.

6.4.1. Limitações e pontos fortes

Nosso estudo tem várias limitações. Primeiro, refere-se ao pequeno tamanho amostral; no entanto, é comparável ao tamanho da amostra de outros estudos de metilação nessa área (BANI-FATEMI *et al.*, 2016, 2018; FACHIM *et al.*, 2018; HU *et al.*, 2017; NISHIOKA *et al.*,

2013; ZHOU *et al.*, 2018). Segundo, o estudo foi realizado apenas em amostras de sangue ao invés de tecidos cerebrais ou leucócitos isolados e sabe-se que a metilação pode ser tecido-específica. No entanto, esse acesso é a única maneira de estudar alterações no primeiro episódio de esquizofrenia e pode ser usada para desenvolver outros métodos válidos de investigação, por esse motivo investigamos a metilação do DNA no sangue periférico como uma possibilidade de refletir as alterações no SNC. Além disso, não temos dados sobre a expressão gênica dos genes estudados, a fim de analisar possíveis correlações entre a expressão gênica e a metilação do DNA e avaliar como as alterações na metilação podem afetar a expressão, bem como não consideramos o tipo celular para comparar as diferenças da metilação do DNA dos genes propostos. Não há uma evidente indicação de como as alterações na metilação de genes relatadas aqui podem influenciar a expressão e, eventualmente, a função do receptor; no entanto, as mudanças que vemos são semelhantes em magnitude às encontradas em outros genes associados à esquizofrenia em estudos com humanos (RYAN; SAFFERY, 2014). É possível que as diferenças entre os pacientes e controles possam contribuir para os achados. Uma dessas diferenças é a maior extensão do abuso de substâncias no grupo da esquizofrenia; no entanto, não observamos uma relação significativa entre a extensão do uso da substância e a metilação dos genes do NMDAR, nem houve um efeito do tratamento medicamentoso com antipsicótico na metilação. No entanto, também não analisamos as diferenças na metilação do DNA dos genes propostos em relação ao tabagismo. Por fim, em nosso estudo avaliamos apenas o QI dos indivíduos, ressaltando que a cognição e os processos de memória relacionados vão além de uma avaliação individual do QI (STANOVICH, 2009; MEDAGLIA *et al.*, 2015; HARVEY, 2019; GANUTHULA & SINHA, 2019).

No entanto, nosso estudo tem forças consideráveis. Primeiro, analisamos os padrões de metilação do DNA no sangue periférico que podem ser um biomarcador potencial fácil de obter e viável para a esquizofrenia e outras psicoses. Segundo, utilizamos amostras de pacientes em PEP, a fim de evitarmos possíveis fatores confundidores, bem como seus irmãos, considerados um grupo de alto risco e controles representativos da população. Por fim, analisamos a metilação do DNA pela técnica de pirosequenciamento que é considerada padrão ouro para essa avaliação.

6.5. CONCLUSÃO

Nosso estudo é o primeiro a mostrar que pacientes com primeiro episódio de esquizofrenia apresentam deficiências na metilação do DNA na sequência promotora do gene *GRIN2B* e essas alterações estão associadas a aspectos do desempenho cognitivo. Além disso,

os pacientes e seus irmãos apresentaram maior metilação global, destacando a importância da influência ambiental durante o desenvolvimento e/ou curso da esquizofrenia. Nossos resultados apresentam algumas evidências de alterações na metilação do DNA no promotor do *GRIN2B* associado ao desempenho cognitivo; novos estudos com maiores números de amostras são necessários para apoiar esses achados. Além disso, futuras investigações também podem examinar a metilação do *GRIN2B*, bem como dos demais genes do NMDAR no tecido cerebral pós-morte e investigar como as alterações observadas na metilação do DNA estão relacionadas à expressão do RNAm. A realização de mais estudos nessa área se faz de grande importância já que as modificações epigenéticas podem ser consideradas um mecanismo chave que exercem a regulação da transcrição gênica e com a qual os fatores podem interagir com a constituição genética do indivíduo aumentando o risco para o desenvolvimento de psicose ao longo da vida (CARIAGA-MARTINEZ; SAIZ-RUIZ; ALELÚ-PAZ, 2016).

7. AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO DOS GENES *LINE-1* E DO NMDAR EM RELAÇÃO AO TRAUMA NA INFÂNCIA

Dados publicados: **Loureiro CM**, Fachim HA, Corsi-Zuelli F, Shuhama R, Menezes PR, Dalton CF, Del-Ben CM, Reynolds GP, Louzada-Junior P. The relationship of childhood trauma and methylation of NMDA receptor genes in first-episode schizophrenia. *Epigenomics*. 2021 Jun;13(12):927-937. DOI: 10.2217/epi-2020-0451.

7.1. OBJETIVOS E HIPÓTESES

No presente estudo, exploramos se a história de trauma na infância poderia ser um fator de risco ambiental que contribuiria para a disfunção biológica do NMDAR na esquizofrenia. Nosso objetivo foi investigar a metilação dos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* entre os grupos diagnósticos considerando a ocorrência ou não de trauma na infância. Esperávamos encontrar associações entre o trauma na infância e alterações na metilação do *GRIN2B* relatadas nos pacientes em PEP, como mencionado acima. Em mais detalhes, exploramos as associações entre o trauma na infância e a metilação do DNA do sangue periférico dos genes do NMDAR (*GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B*) entre os grupos (pacientes em PEP, irmãos não afetados e controles pareados por idade e sexo). Dentro de cada grupo, exploramos as correlações entre as pontuações de trauma na infância e as mudanças na metilação do DNA. Hipotetizamos que o trauma na infância estaria associado à metilação alterada de *GRIN2B* em pacientes em PEP em comparação com os outros grupos e que haveria correlações específicas de grupo entre o trauma na infância e a metilação dos genes *GRIN1* e *GRIN2A*.

7.2. MATERIAL E MÉTODOS

Descritos no 4.2. do **Capítulo 4**, página 87 (contextualização e delineamento do estudo humano, coleta de dados, participantes, instrumentos de avaliação complementares e aspectos éticos).

Neste estudo, nossa amostra é parcialmente igual à do achado anterior (**Capítulo 6**). Foram incluídos cinco indivíduos em cada grupo (pacientes em PEP e controles) e dois irmãos, todos com história de trauma na infância.

7.2.1. Instrumentos de avaliação

7.2.1.1. Avaliação de fatores de risco ambientais

Questionário de trauma na infância (CTQ, do inglês *Childhood Trauma Questionnaire*) (BERNSTEIN *et al.*, 2003; GRASSI-OLIVEIRA; STEIN; PEZZI, 2006). Utilizamos uma

versão do CTQ que consiste em 25 itens do tipo *Likert* e inclui cinco subescalas: abuso emocional, abuso físico, abuso sexual, negligência emocional e negligência física. Aplicamos uma pontuação de corte de 51 pontos para classificar indivíduos com ou sem histórico geral de trauma na infância (MACDONALD *et al.*, 2016). Consideramos os escores de corte como a soma do escore máximo da subescala de cada trauma, como um estudo brasileiro demonstrou (TUCCI; KERR-CORRÊA; SOUZA-FORMIGONI, 2010) (ANEXO 7).

7.2.2. *Análise estatística*

As estatísticas foram conduzidas usando SPSS versão 26.0 (SPSS Inc; IBM Corp: Armonk, NY, EUA). Variáveis sociodemográficas foram analisadas usando o teste exato de Fisher e ANOVA de uma via com correção de Bonferroni. A metilação dos genes *GRIN1*, *GRIN2A*, *GRIN2B* e *LINE-1* foram apresentadas como médias e EPM. Os dados foram verificados quanto à normalidade usando o teste de *Kolmogorov-Smirnov*.

Para investigar a interação entre os grupos diagnósticos e a história de trauma na infância, foi utilizado o MGLz com distribuição linear e correções de Bonferroni e teste de significância (Qui quadrado de Wald, χ^2), considerando os valores brutos do teste χ^2 . Além disso, realizamos a correção de Bonferroni para comparações múltiplas que foram relatadas como os valores de p corrigidos por Bonferroni. Inicialmente foram consideradas a metilação do *LINE-1* como variável dependente e o trauma na infância (sim ou não), grupos diagnósticos (pacientes em PEP, irmãos e controles) e sexo como fatores fixos, controlando por idade. Em uma análise subsequente, consideramos a metilação dos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* em seus respectivos sítios CpGs como variáveis dependentes, enquanto que o trauma na infância (sim ou não), grupos diagnósticos (pacientes em PEP, irmãos e controles) e sexo foram considerados como fatores fixos e a idade e o *LINE-1* como covariadas. Realizamos cada análise MGLz separadamente para cada gene e seus CpGs correspondentes.

Realizamos também correlações de Pearson entre a metilação dos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* e os escores totais da escala CTQ para cada grupo separadamente, considerando intervalos de correlações e valores superiores a $r \geq 0,35$ e $p < 0,05$ como resultados qualitativamente significativos (TAYLOR, 1990). Especificamente na amostra da metilação do *GRIN2A*, um indivíduo (do grupo controle) apresentou o mesmo valor extremo em ambas as CpGs ($z > 5$) e um irmão com valor externo na CpG2; a remoção desses pontos discrepantes normalizou as distribuições (para controles, CpG1: $p = 0,149$; CpG2: $p = 0,200$ e para irmãos, CpG2: $p = 0,087$, teste de *Kolmogorov-Smirnov*). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos para todos os testes bicaudais realizados.

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Participantes

No presente estudo, incluímos 103 participantes: 40 pacientes em primeiro episódio do espectro da esquizofrenia [transtorno psicótico breve (n=3); transtorno esquizofreniforme (n=13); esquizofrenia (n=20) e transtorno delirante (n=3)] com curtos períodos de DUP e tratamento farmacológico (mediana = 8 semanas), além de 40 controles de base populacional pareados por sexo e idade e 23 irmãos não psicóticos. Dos 40 pacientes incluídos, 14 (35,0%) possuíam trauma, dos 23 irmãos, 6 (25,1%) tinham trauma e dos 40 controles, sete (17,5%) apresentaram trauma, totalizando 27 indivíduos com histórico de trauma na infância.

Em relação aos dados sociodemográficos, 60,0% dos pacientes eram homens quando comparados aos irmãos ($p=0,046$), possuíam menor vínculo afetivo ($p=0,001$) e menores anos de escolaridade ($p=0,014$) em comparação com irmãos e controles. Embora não encontramos diferenças significativas, a maioria dos irmãos referiu ser da cor da pele não branca ($p=0,074$) e com status de emprego ativo quando comparados aos pacientes e controles ($p=0,055$). Não houve diferença significativa para a idade entre os grupos ($p=0,796$).

Em relação ao tratamento com antipsicótico, apenas três pacientes não estavam em uso de antipsicóticos no momento da coleta de sangue, enquanto 14 pacientes foram tratados com antipsicóticos de primeira geração (13 com haloperidol e um com clorpromazina) e 23 pacientes receberam antipsicóticos de segunda geração (14 risperidona, dois quetiapina, seis olanzapina e um clozapina). Outras variáveis sociodemográficas e clínicas estão apresentadas na **Tabela 12**.

Tabela 12. Variáveis sociodemográficas e clínicas dos grupos de diagnóstico associados ao trauma (n=103)

	Pacientes (n=40)	Irmãos (n=23)	Controles (n=40)	p^{1,2}
Variáveis sócio-demográficas: n (%)¹; Média (DP)²				
Sexo, masculino ¹	24 (60,0) ^b	7 (30,4) ^a	24 (60,0) ^b	0,046
Escolaridade, ≤9 anos ¹	22 (55,0) ^a	5 (21,7) ^b	12 (30,0) ^b	0,014
Etnia, branco ¹	24 (60,0)	8 (34,8)	25 (55,3)	0,074
Relacionamento afetivo, solteiro ¹	34 (85,0) ^a	10 (43,5) ^b	20 (50,0) ^b	0,001
Situação financeira, inativo ¹	20 (50,0)	5 (21,7)	20 (50,0)	0,055
Idade, anos ²	31,3 (1,8)	29,4 (2,4)	31,0 (1,8)	0,796
Variáveis clínicas: Média (DP)^b; (Mediana, IC) ³				
IMC (Kg/m ²) ²	24,9 (0,7)	26,1 (1,0)	26,1 (0,7)	0,384
BPRS, escore total ³	9,0 (0,0-24,0)			
Tratamento, em semanas ³	8,0 (0,0-149,0)			
Duração da doença, em semanas ³	45,0 (4,0-513,0)			
DUP, em semanas ³	19,0 (1,0-509,0)			
Tratamento farmacológico: n (%)¹				
Nenhum	3 (7,5)			
Primeira geração de antipsicóticos	14 (35,0)			
Segunda geração de antipsicóticos	23 (57,5)			

BPRS: Escala Breve de Avaliação Psiquiátrica; DP: desvio padrão; DUP: duração de psicose não tratada; IC: intervalo de confiança; IMC: índice de massa corporal;

¹ Teste exato de Fisher; ² Modelo linear generalizado ajustado por sexo e idade; ³ Mediana com intervalo de confiança;

^{a,b} Diferenças de significância estatística post-hoc entre os grupos;

Negrito: p<0,05 [tabela adaptada do artigo (LOUREIRO *et al.*, 2021)].

7.3.2. Metilação do *LINE-1* em relação ao trauma

O nosso estudo não mostrou diferença significativa na metilação do *LINE-1* em relação ao trauma na infância [Wald $\chi^2_{(1)}=0,097$; $p=0,756$], nem na interação entre grupos diagnósticos e trauma na infância [Wald $\chi^2_{(2)}=5,500$; $p=0,064$] (**Figura 15**).

Figura 15. Indivíduos com ou sem trauma na infância em relação à metilação do *LINE-1*. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM [figura adaptada do artigo (LOUREIRO *et al.*, 2021)].

7.3.3. Metilação do *GRIN1* em relação ao trauma

Observamos um aumento significativo da metilação do *GRIN1* no CpG1 dos participantes com histórico de trauma na infância, independentemente do grupo diagnóstico [Wald $\chi^2_{(1)}=9,750$; $p=0,002$]. No entanto, o impacto da ocorrência de trauma na infância na metilação do CpG1 diferiu entre os grupos [interação grupo & trauma na infância, Wald $\chi^2_{(2)}=9,846$, $p=0,007$]. As comparações múltiplas demonstraram que os irmãos com trauma na infância apresentaram níveis aumentados de metilação do *GRIN1* em CpG1 quando comparados aos irmãos sem trauma ($p=0,001$). Não houve outras diferenças significativas entre os pacientes e controles com ou sem trauma ($p>0,2$ para todas as associações) (**Figura 16A**).

Em relação à metilação do *GRIN1* no CpG2, não observamos diferenças significativas no trauma na infância [Wald $\chi^2_{(1)}=0,126$, $p=0,722$] ou interação entre os grupos diagnósticos e trauma [Wald $\chi^2_{(2)}=0,628$, $p=0,731$]. O trauma na infância também foi associado a níveis mais altos de metilação do *GRIN1* no CpG3 nos irmãos infância [Wald $\chi^2_{(1)}=7,760$; $p=0,006$].

Também observamos uma tendência à significância estatística nos grupos de diagnóstico e interação de trauma na infância na metilação do *GRIN1* em CpG3 (Wald $\chi^2_{(2)}=5,895$, $p=0,052$). No entanto, essa diferença não atingiu significância estatística nos testes de comparações múltiplas ($p>0,05$ para todas as comparações).

7.3.4. Metilação do *GRIN2A* em relação ao trauma

Em relação à metilação do *GRIN2A*, também não encontramos uma diferença significativa entre os grupos de trauma em ambos os CpGs [CpG1: fator de grupo Wald $\chi^2_{(1)}=0,124$, $p=0,724$; CpG2: Wald $\chi^2_{(2)}=0,038$, $p=0,844$] ou interação entre os grupos de diagnóstico e trauma [CpG1: Wald $\chi^2_{(2)}=0,013$, $p=0,994$; CpG2: Wald $\chi^2_{(2)}=0,180$, $p=0,914$] e esses resultados foram independentes da metilação do *LINE-1* (**Figura 16B**).

7.3.5. Metilação do *GRIN2B* em relação ao trauma

Quanto à metilação do *GRIN2B*, também não observamos diferenças significativas no trauma na infância nos CpG1 [Wald $\chi^2_{(1)}=0,152$, $p=0,697$], CpG2 [Wald $\chi^2_{(1)}=0,023$, $p=0,880$], CpG3 [Wald $\chi^2_{(1)}=0,876$, $p=0,349$], CpG4 [Wald $\chi^2_{(1)}=3,506$, $p=0,061$] e CpG5 [Wald $\chi^2_{(1)}=0,751$, $p=0,386$] ou interação entre os grupos diagnósticos e trauma [CpG1: Wald $\chi^2_{(2)}=0,277$, $p=0,871$; CpG2: Wald $\chi^2_{(2)}=2,737$, $p=0,254$; CpG3: Wald $\chi^2_{(2)}=0,814$, $p=0,666$; CpG4: Wald $\chi^2_{(2)}=1,465$, $p=0,481$ e CpG5: Wald $\chi^2_{(2)}=2,061$, $p=0,357$] (**Figura 16C**). Também encontramos níveis reduzidos de metilação de *GRIN2B* nos pacientes em comparação com os controles (CpG1: $p<0,001$; CpG2: $p=0,011$; CpG4: $p=0,005$ e CpG5: $p=0,013$, valores de p após as correções de Bonferroni). Além disso, encontramos metilação reduzida de *GRIN2B* no CpG1 em irmãos comparados aos controles ($p=0,002$), como demonstramos anteriormente (**Capítulo 6**).

Figura 16. (A) Irmãos com trauma na infância apresentaram hipermetilação do *GRIN1* no CpG1 em relação aos irmãos sem trauma. (B) Nenhuma diferença significativa na metilação do *GRIN2A* entre os grupos diagnóstico, trauma na infância ou interação entre os grupos de diagnóstico e trauma. (C) Sem alterações de metilação do *GRIN2B* entre os grupos em relação ao trauma na infância ou interação entre os grupos de diagnóstico e trauma. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. * $p < 0,001$ [figura adaptada do artigo (LOUREIRO *et al.*, 2021)].

(A)

(B)

Trauma na infância

(C)

Trauma na infância

Descrevemos os fatores de transcrição cujos locais de ligação se sobrepõem aos CpGs do gene *GRIN1* na **Figura 17**.

Figura 17. Sequência analisada do gene *GRIN1* em humanos. Os três CpGs e seus respectivos fatores de transcrição estão destacados em negrito e agrupados na caixa vermelha [figura adaptada do artigo (LOUREIRO *et al.*, 2021)].

Fonte: Acervo próprio (Figura elaborada pela própria autora dessa tese com as informações cedidas pela Allgen-Promo, versão 8.3).

7.3.6. Correlação entre a metilação dos genes do NMDAR e a pontuação total de CTQ

Nenhuma correlação significativa foi encontrada entre os escores totais do CTQ e a metilação dos genes do NMDAR nos pacientes em PEP. No entanto, como demonstramos que os irmãos com trauma na infância apresentaram níveis mais altos de metilação de *GRIN1* no CpG1, testamos correlações entre a metilação nesse CpG com o escore total de CTQ e encontramos uma correlação positiva moderada nos irmãos ($r=0,440$, $p=0,036$), bem como uma correlação negativa moderada entre os escores totais de CTQ e *GRIN2B* em CpG4 ($r=-0,363$, $p=0,021$) e CpG5 ($r=-0,384$, $p=0,014$) nos controles (**Tabela 13**).

Tabela 13. Correlações entre a metilação do DNA dos genes do NMDAR em relação aos escores do CTQ em controles, irmãos e pacientes em PEP

Metilação do DNA		Controles (n=40)			Irmãos (n=23)			Pacientes (n=40)		
		r	p	95% IC	r	p	95% IC	r	p	95% IC
GRIN1	CpG1	-0,16	0,314	-0,442–0,114	0,44*	0,036	0,114–0,675	0,04	0,812	-0,238–0,312
	CpG2	-0,08	0,627	-0,376–0,188	-0,01	0,953	-0,367–0,378	-0,09	0,598	-0,308–0,167
	CpG3	0,15	0,360	-0,184–0,486	0,32	0,139	-0,050–0,626	0,07	0,669	-0,283–0,397
GRIN2A	CpG1	0,07	0,663	-0,045–0,381	0,04	0,868	-0,389–0,484	-0,12	0,468	-0,366–0,141
	CpG2	-0,01	0,997	-0,196–0,270	-0,03	0,883	-0,354–0,467	-0,12	0,470	-0,426–0,178
GRIN2B	CpG1	-0,01	0,966	-0,457–0,426	-0,15	0,502	-0,489–0,282	0,07	0,658	-0,265–0,350
	CpG2	0,03	0,847	-0,504–0,430	-0,15	0,505	-0,433–0,264	-0,04	0,819	-0,259–0,200
	CpG3	-0,21	0,196	-0,518–0,128	-0,13	0,571	-0,404–0,256	0,10	0,539	-0,099–0,330
	CpG4	-0,36*	0,021	-0,571– -0,091	-0,12	0,578	-0,380–0,222	-0,02	0,920	-0,305–0,248
	CpG5	-0,38*	0,014	-0,566– -0,200	-0,02	0,945	-0,248–0,289	0,14	0,393	-0,181–0,460

CTQ: *Childhood Trauma Questionnaire*;Os valores representam a correlação de Pearson (r) e os valores de p; IC: Intervalo de Confiança; Negrito: $p \leq 0,05$ [tabela adaptada do artigo (LOUREIRO *et al.*, 2021)].

7.4. DISCUSSÃO

Do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que investiga associações de trauma na infância e metilação do DNA dos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* do NMDAR em pacientes no primeiro episódio de esquizofrenia, em comparação com seus irmãos não psicóticos e controles de base populacional. Nossos resultados não confirmaram nossa hipótese inicial de que uma história de trauma na infância poderia ser um fator ambiental desencadeador da disfunção epigenética dos genes do NMDAR na esquizofrenia. No entanto, o trauma na infância pode influenciar a metilação do *GRIN1*.

Nosso achado anterior sobre as alterações na metilação do *GRIN2B* associadas a um QI mais baixo em pacientes em PEP (FACHIM *et al.*, 2019) não foi aparentemente relacionada ao trauma infantil como um possível fator causal. Isso sugere que as alterações na metilação do *GRIN2B* em pacientes podem estar relacionadas a outros aspectos do transtorno, em detrimento da influência de um estressor ambiental no início da vida, embora isso seja contrário à nossa hipótese baseada em parte nos achados em um modelo animal de estresse no início da vida (LOUREIRO *et al.*, 2020b). Essa hipótese é ainda apoiada por nosso próximo achado, no qual observamos uma correlação negativa entre a metilação do *GRIN2B* nos sítios CpG4 e CpG5 e os escores totais de CTQ em controles. Esses CpGs têm ligação localizada para um fator de transcrição nomeado TFII-I que atua como um fator multifuncional de transcrição (repressor ou ativador) (ROY, 2007) e tem um papel essencial na resposta ao estresse do retículo endoplasmático (HONG *et al.*, 2005). Sugerimos que a metilação reduzida em controles com trauma na infância permitiu que o TFII-I atue como um fator de transcrição ativador aumentando a expressão da proteína NR2 em controles, potencialmente como um mecanismo de resiliência, o que corrobora o nosso achado anterior de níveis protéicos de NR2 diminuídos no sangue periférico de pacientes em PEP em comparação com controles (LOUREIRO *et al.*, 2018).

Nosso estudo mostrou que as associações entre a metilação do *GRIN1* e o trauma na infância foram determinadas pelos sítios CpG1 e CpG3. Identificamos um efeito geral do trauma na metilação no CpG3 e um efeito mais específico das experiências de trauma na metilação do *GRIN1* no CpG1 em irmãos não afetados de pacientes em PEP. Este último achado pode sugerir um impacto de adversidades iniciais na metilação do DNA de genes relacionados ao NMDAR, relevantes para indivíduos com risco de psicose. Pelo que sabemos, apenas um estudo anterior relatou o trauma infantil como um fator social que contribui para a metilação do gene *GRIN1*, que foi associado ao aumento do risco de depressão em crianças (WEDER *et al.*, 2014). Uma revisão recente demonstrou que o trauma na infância pode alterar a resposta

neural, bem como os circuitos cerebrais, conferindo vulnerabilidade em indivíduos expostos ao estresse da infância (MCCRORY; GERIN; VIDING, 2017). Assim, nossos resultados sugerem que as experiências de trauma na infância podem aumentar a metilação do *GRIN1*, particularmente naqueles biologicamente predispostos à psicose, uma vez que os irmãos não afetados compartilham uma proporção do genótipo com pacientes em PEP e supostamente compartilharam o mesmo ambiente durante a infância. Nossos dados também reforçam nossos achados recentes, nos quais a hipermetilação do *Grin1* foi observada em ratos criados em isolamento social após o desmame quando comparados a controles (LOUREIRO *et al.*, 2020b). Esses resultados juntos podem representar que a alteração na metilação do DNA pode corroborar para a suscetibilidade de surgimento de transtornos psiquiátricos por meio de estressores no início da vida.

Além disso, considerando a hipermetilação de *GRIN1* em irmãos não afetados, devemos destacar que podem existir outros fatores que os protegem do desenvolvimento de psicose. Em nosso estudo, os irmãos são jovens, produtivos, com relacionamento conjugal e apresentam maior nível de escolaridade, fatores sociais importantes que podem melhorar seu funcionamento e desenvolvimento (SIN *et al.*, 2016) e reduzir a carga ambiental (BARONET *et al.*, 1999), servindo como estratégias de melhor enfrentamento de eventos traumáticos (FRIEDRICH *et al.*, 2008). Assim, também sugerimos que o aumento dos níveis de metilação de *GRIN1* em irmãos expostos a traumas na infância pode ser um possível fator biológico que contribui para sua resiliência. Embora os irmãos sejam potencialmente um grupo mais vulnerável, eles não desenvolveram psicose, o que pode ser explicado pela influência epigenética de outros fatores que podem afetar sua resiliência.

O aumento da metilação do DNA do gene *GRIN1* em CpG1 em irmãos não afetados expostos a traumas na infância contribui para a compreensão dos mecanismos epigenéticos pelos quais o estresse precoce pode afetar o sistema glutamatérgico (NASCAA *et al.*, 2015). Existem dois fatores de transcrição em CpG1 que atuam como fatores ativadores da expressão gênica, o X-Box Binding Protein 1 (XBP-1) e o CCAAT/enhancer-binding protein β (C/EBP β), ambos relatados como modulados pela metilação do DNA (BLATTLER; FARNHAM, 2013; MANN *et al.*, 2013; ZHU; WANG; QIAN, 2016). Essa modulação pode ter um papel no fenótipo do indivíduo. Especificamente, o XBP-1 está envolvido na diferenciação terminal de linfócitos B em células plasmáticas e na produção de imunoglobulinas (KAKIUCHI *et al.*, 2006) e está intimamente associado à função alterada do retículo endoplasmático em resposta ao estresse (DONATI; IMBRIANO; MANTOVANI, 2006). O C/EBP β tem uma função importante na regulação da expressão de genes que desempenham um papel nas respostas

imunológicas e inflamatórias (PLESS *et al.*, 2008). Recentemente, foi demonstrado que o XBP-1 ativa a longevidade e diminui a neurodegeneração por meio da eliminação de proteínas tóxicas em neurônios de *Caenorhabditis elegans* (IMANIKIA *et al.*, 2019). Além disso, existem dois fatores de transcrição que se ligam ao CpG3 denominados p53 e Pax-5, sendo o primeiro um importante regulador na expressão de genes de resposta ao estresse (RILEY *et al.*, 2008) e o segundo um fator de transcrição essencial no desenvolvimento neural e diferenciação de células B (COBALEDA *et al.*, 2007). Extrapolando os limites de nossos resultados, podemos especular que o trauma da infância desencadeia mudanças na metilação do DNA e pode modular os efeitos protetores desses fatores de transcrição que têm um papel importante na proteção neuronal.

Nós relatamos anteriormente uma hipermetilação do *LINE-1* em pacientes em PEP e irmãos quando comparados aos controles (FACHIM *et al.*, 2019). No entanto, não encontramos diferenças na metilação global do *LINE-1* em indivíduos com ou sem trauma, sugerindo que tais alterações ocorrem independentemente dos efeitos do trauma na infância. Essas linhas de evidência podem sugerir que as mudanças no *LINE-1* estão relacionadas ao transtorno mental e não à exposição a traumas na infância. Alternativamente, a metilação global inalterada em relação ao trauma na infância poderia sugerir que apenas um tipo de adversidade pode ser insuficiente para provocar mudanças significativas no nível estatístico e que adversidades ambientais cumulativas, incluindo trauma na infância combinado à exposição a complicações maternas, adversidades sociais, uso de substâncias psicoativas, urbanidade e outros fatores podem ser um modelo melhor para analisar tais alterações. A hipótese precisa ser testada em estudos futuros com amostras maiores (ALVARADO-CRUZ *et al.*, 2018).

Embora contrário ao nosso achado, um estudo recente demonstrou a hipometilação do *LINE-1* em pacientes psicóticos com trauma na infância quando comparados a pacientes sem trauma e controles (MISIAK *et al.*, 2015). No entanto, os autores investigaram a metilação do *LINE-1* em leucócitos do sangue periférico usando diferentes primers e um método para avaliar a metilação geral do DNA denominado COBRA (do inglês, *Combined Bisulfite Restriction Analysis*), que é menos específico do que a análise de pirosequenciamento altamente sensível e precisa usada por nosso grupo envolvendo um sistema altamente sensível e análises precisas de pirosequenciamento, dificultando as comparações (GOEDECKE *et al.*, 2009).

7.4.1. Limitações e pontos fortes

Algumas limitações devem ser observadas. Nosso tamanho amostral é pequeno, particularmente no que diz respeito à análise de subgrupo e fornecemos dados de metilação de

DNA usando apenas amostras de sangue total, o que pode não ser completamente evidente para a generalização de nossos achados. No entanto, os estudos com sangue periférico constituem uma técnica útil, não invasiva e clinicamente acessível que pode ser essencial para o diagnóstico no futuro, além do crescente interesse clínico da avaliação da metilação no sangue periférico. Somado a isto, o sangue periférico é viável para a triagem de indivíduos suscetíveis e as pesquisas têm demonstrado alta correspondência ($r=0,9$) entre a metilação alterada do DNA no cérebro e no sangue (HORVATH *et al.*, 2012). No entanto, outros estudos também mostraram uma correlação fraca entre os tecidos cerebrais pós-morte e o sangue periférico (WALTON *et al.*, 2016; JIA *et al.*, 2019), enfatizando que a correspondência entre os perfis de metilação do DNA do tecido sanguíneo cerebral deve ser interpretada com cautela. Também não investigamos se a metilação nos CpGs é influenciada por variantes genéticas (locus de traço quantitativo de metilação, mQTL). Estudos futuros são necessários para expandir a compreensão de nossas descobertas usando bancos de dados em grande escala e modelagem por computador. Por fim, entendemos que o viés de recordações ainda pode ser um problema, dada a avaliação retrospectiva da história de maus-tratos na infância. Independentemente disso, a viabilidade de dados de autorrelato com pacientes e controles (GRASSI-OLIVEIRA *et al.*, 2006) bem como informações coletadas sobre irmãos, podem reforçar a validade dos relatórios dos pacientes. Ainda assim, nossos resultados devem ser vistos como uma avaliação retrospectiva. Apesar do nosso pequeno tamanho amostral, este é o primeiro estudo a demonstrar a influência do trauma na infância em irmãos não afetados de pacientes com esquizofrenia. Nossos achados trazem uma possível estratégia epigenética para identificar indivíduos vulneráveis.

7.5. CONCLUSÃO

Nosso estudo não identificou associações entre o trauma na infância e a metilação do DNA dos genes do NMDAR nos pacientes com esquizofrenia avaliados nos estágios iniciais do transtorno. Curiosamente, no entanto, o trauma na infância foi associado à hipermetilação de *GRIN1* em irmãos não afetados de pacientes em PEP e à hipometilação de *GRIN2B* em controles. Os efeitos opostos do trauma na infância na metilação dos genes do NMDAR em irmãos e controles dos pacientes podem refletir mecanismos biológicos de vulnerabilidade e resiliência ao estresse no início da vida, respectivamente. Nossos resultados acrescentam evidências que implicam na disfunção do NMDAR na esquizofrenia e o envolvimento das influências ambientais na metilação do DNA. Sugerimos que outros genes envolvidos na esquizofrenia devam ser investigados para explicar melhor a hipótese sobre a interação entre

fatores epigenéticos e ambientais que levam ao aumento do risco de esquizofrenia. Esses resultados devem ser avaliados e replicados em amostras maiores e longitudinais.

A hipótese de que as mudanças na metilação do DNA no sangue podem ser estendidas ao cérebro é fundamental e desafiadora para a pesquisa. Esperamos que os marcadores epigenéticos, como a metilação do DNA no sangue periférico, sejam preditores confiáveis das alterações na metilação do cérebro, refletindo os fatores de risco ambientais em transtornos psiquiátricos.

8. INTERAÇÕES ENTRE AMINOÁCIDOS, VARIANTES E METILAÇÃO RELACIONADOS AOS GENES DO NMDAR

8.1. OBJETIVOS E HIPÓTESES

Objetivamos investigar as possíveis interações entre os mecanismos moleculares associados ao NMDAR propostos neste estudo nos pacientes em PEP comparados aos irmãos não psicóticos e controles de base populacional. Esperávamos associações entre os níveis de aminoácidos relacionados ao glutamato, variantes e metilação dos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* do NMDAR que pudessem estar relacionadas à esquizofrenia e outras psicoses.

8.2. MATERIAL E MÉTODOS

Descritos no item 4.2. do **Capítulo 4**, página 87 (contextualização e delineamento do estudo humano, coleta de dados, participantes, instrumentos de avaliação e aspectos éticos).

8.2.1. Análise estatística

Testamos as diferenças entre os genótipos dos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B*, a metilação desses mesmos genes e dos aminoácidos relacionados ao sistema glutamatérgico entre os grupos usando MLG. No primeiro modelo, consideramos os níveis de aminoácidos como variáveis dependentes e os genótipos e os grupos diagnósticos como fatores fixos ajustados por sexo e idade. Os genótipos dos pacientes em PEP, irmãos e controles foram divididos em dois grupos (homozigotos dominantes versus heterozigotos e homozigotos recessivos). Já no segundo modelo, consideramos a metilação dos genes do DNA como variáveis dependentes e inserimos as mesmas variáveis independentes descritas acima, controlando também pela metilação do *LINE-1*.

Em ambos os modelos, também consideramos as interações grupos diagnósticos & genótipos. Analisamos as variantes e a metilação dos genes do NMDAR associados apenas aos aminoácidos que previamente estavam alterados nos participantes (GLU, PRO, TRP e GABA), assim como correlacionamos as variantes somente nos CpGs alterados dos genes *GRIN1* e *GRIN2B*. Utilizamos os valores de Log de base e nos aminoácidos para as análises, devido à falta de normalidade, como já demonstrado anteriormente. No entanto, demonstramos os valores brutos nas tabelas e figuras. Consideramos correlações de Pearson significativas como $r > 0,35$ e $p < 0,05$.

8.3. RESULTADOS

8.3.1. *Associações com as concentrações plasmáticas de aminoácidos*

8.3.1.1. **Aminoácidos e variantes**

Em relação à SNV rs1806194 do *GRIN2B*, encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa na interação grupo diagnóstico & genótipo em relação aos níveis plasmáticos de GLU ($p=0,013$) e TRP ($p=0,048$), porém esse efeito não alcançou significância nas comparações múltiplas.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação ao genótipo e/ou interação grupo diagnóstico & genótipo associados às SNVs rs11146020 do *GRIN1*, rs1420040 do *GRIN2A* e rs890 e rs1805502 do *GRIN2B*. Todas as comparações estão descritas na **Tabela 14**.

Tabela 14. Níveis plasmáticos dos aminoácidos em relação aos genótipos dos genes do NMDAR e interação grupo diagnóstico & genótipo

Grupos	Genótipos	GLU		PRO		TRP		GABA	
		Média (EPM)	p ¹ ; p ²	Média (EPM)	p ¹ ; p ²	Média (EPM)	p ¹ ; p ²	Média (EPM)	p ¹ ; p ²
GRIN1	rs11146020		0,464; 0,740		0,667; 0,682		0,926; 0,649		0,081; 0,664
Controles	GG	195,3 (10,0)		316,5 (20,1)		52,2 (1,9)		82,8 (2,6)	
	GC ou CC	197,1 (18,9)		336,5 (37,7)		50,7 (3,5)		94,3 (4,9)	
Irmãos	GG	159,5 (14,5)		269,0 (28,9)		63,0 (2,7)		90,7 (3,8)	
	GC ou CC	146,1 (30,4)		238,1 (60,8)		61,9 (5,6)		94,4 (7,9)	
Pacientes	GG	176,7 (10,1)		365,9 (20,2)		55,9 (1,9)		77,2 (2,6)	
	GC ou CC	155,4 (18,7)		337,7 (37,3)		59,3 (3,5)		82,7 (4,9)	
GRIN2A	rs1420040		0,585; 0,162		0,880; 0,740		0,496; 0,593		0,836; 0,462
Controles	AA	206,3 (14,4)		322,1 (28,8)		50,8 (2,7)		86,3 (3,8)	
	AG ou GG	189,5 (11,2)		319,9 (22,4)		52,6 (2,0)		84,8 (2,9)	
Irmãos	AA	153,5 (21,8)		250,8 (43,6)		63,8 (4,0)		92,9 (5,7)	
	AG ou GG	158,9 (16,3)		270,4 (32,6)		62,2 (3,0)		90,5 (4,3)	
Pacientes	AA	152,1 (14,4)		377,4 (28,8)		53,8 (2,7)		74,6 (3,8)	
	AG ou GG	184,0 (11,2)		348,6 (22,6)		58,4 (2,1)		80,7 (3,0)	
GRIN2B	rs890		0,299; 0,120		0,967; 0,472		0,174; 0,785		0,256; 0,880
Controles	AA	204,0 (15,8)		334,8 (31,7)		49,8 (2,9)		82,8 (4,2)	
	AC ou CC	192,1 (10,6)		314,6 (21,2)		52,8 (2,0)		86,4 (2,8)	
Irmãos	AA	194,2 (25,9)		276,0 (51,8)		61,7 (4,8)		86,5 (6,8)	
	AC ou CC	144,4 (15,1)		258,9 (30,2)		63,2 (2,8)		93,0 (4,0)	
Pacientes	AA	159,4 (14,7)		333,5 (29,5)		53,0 (2,8)		77,2 (3,9)	
	AC ou CC	179,1 (11,1)		374,3 (22,2)		58,6 (2,1)		79,1 (2,9)	
	rs1805502		0,417; 0,797		0,598; 0,930		0,828; 0,825		0,123; 0,794
Controles	AA	196,6 (11,3)		330,6 (22,6)		51,9 (2,1)		88,1 (2,9)	
	AG ou GG	194,5 (14,2)		305,4 (28,4)		51,8 (2,6)		81,0 (3,7)	
Irmãos	AA	161,6 (19,7)		265,6 (39,4)		61,3 (3,7)		92,2 (5,2)	
	AG ou GG	153,2 (17,4)		261,5 (34,8)		63,9 (3,2)		90,7 (4,5)	
Pacientes	AA	180,9 (12,2)		364,0 (24,5)		57,1 (2,3)		81,4 (3,2)	
	AG ou GG	162,0 (12,9)		354,6 (25,8)		56,1 (2,4)		75,2 (3,4)	

(Continua)

						(Conclusão)
rs1806194		0,666; 0,012		0,739; 0,057	0,571; 0,048	0,662; 0,304
Controles	TT	203,6 (14,4)	339,0 (28,9)	51,7 (2,7)	85,8 (3,8)	
	TC ou CC	191,2 (11,0)	310,0 (22,0)	52,0 (2,0)	85,0 (2,9)	
Irmãos	TT	188,6 (22,9)	283,6 (45,8)	66,3 (4,2)	93,3 (6,0)	
	TC ou CC	142,3 (15,7)	254,2 (31,5)	61,2 (2,9)	90,5 (4,2)	
Pacientes	TT	147,6 (13,5)	311,5 (27,0)	51,6 (2,5)	73,8 (3,6)	
	TC ou CC	190,1 (11,6)	395,2 (23,3)	60,4 (2,2)	81,9 (3,1)	

GLU: ácido glutâmico; PRO: prolina; TRP: triptofano; GABA: γ -aminobutírico; EPM: erro padrão da média;

Modelo Linear Generalizado considerando os aminoácidos como variáveis dependentes, os genótipos (homozigotos dominantes versus heterozigotos e homozigotos recessivos) e os grupos diagnósticos (pacientes, irmãos e controles) como fatores fixos, ajustados por idade e sexo;

¹ valor de p em relação ao genótipo; ² valor de p em relação à interação grupo diagnóstico & genótipo. Negrito: $p \leq 0,05$.

8.3.1.2. Aminoácidos e metilação dos genes do NMDAR

Realizamos correlações parciais, controlando para a variável *LINE-1*, entre os níveis plasmáticos dos aminoácidos GLU, PRO, TRP e GABA e a metilação dos genes *GRIN1* (CpG1) e *GRIN2B* (CpGs 1, 2, 4 e 5) nos pacientes em PEP, irmãos e controles, os quais previamente demonstraram significância estatística entre os grupos. No entanto, não foi encontrada nenhuma correlação significativa qualitativamente relevante ($r \geq 0,35$ e $p \leq 0,05$) (**Tabela 15**).

Tabela 15. Correlação parcial entre os níveis plasmáticos dos aminoácidos e a metilação do DNA dos genes do NMDAR em controles (C), irmãos (I) e pacientes em PEP (P).

	GLU			PRO			TRP			GABA		
	C	I	P	C	I	P	C	I	P	C	I	P
Valores de r e p												
GRIN1												
CpG1	0,133	0,279	0,159	0,113	0-,112	-0,013	0,124	-0,025	0,053	-0,137	-0,209	0,066
	0,419	0,209	0,340	0,494	0,619	0,936	0,452	0,913	0,751	0,406	0,352	0,696
GRIN2B												
CpG1	-0,074	-0,144	0,037	-0,183	0,032	0,250	-0,075	0,056	-0,303	-0,073	-0,047	-0,299
	0,655	0,522	0,825	0,265	0,888	0,129	0,650	0,803	0,064	0,659	0,837	0,068
CpG2	-0,017	0,203	0,082	-0,234	0,292	-0,023	-0,118	0,108	0,113	-0,330	-,294	-0,115
	0,919	0,364	0,626	0,151	0,187	0,890	0,473	0,631	0,500	0,040	,185	0,491
CpG4	0,147	0,032	0,129	-0,111	0,091	0,108	0,241	-0,069	,024	0,100	-0,288	0,081
	0,373	0,888	0,442	0,500	0,688	0,519	0,139	0,761	0,884	0,543	0,194	0,629
CpG5	0,143	0,078	0,178	-0,226	0,006	0,033	-0,096	-0,107	0,262	-0,100	-0,291	0,028
	0,386	0,730	0,285	0,166	0,979	0,842	0,559	0,637	0,112	0,546	0,189	0,870

GLU: ácido glutâmico; PRO: prolina; TRP: triptofano; GABA: y-aminobutírico; C: controles; I: irmãos; P: pacientes em PEP;
 Correlações parciais de Pearson entre níveis plasmáticos de aminoácidos e metilação dos genes do NMDAR, controlando para *LINE-1*.

8.3.2. *Associações com os variantes*

8.3.2.1. **Variantes e metilação dos genes do NMDAR**

Além disso, realizamos comparações entre as variantes e a metilação do DNA apenas entre os genes *GRIN1* (CpG1) e *GRIN2B* (CpGs 1, 2, 4 e 5) que apresentaram alterações prévias tanto em pacientes em PEP como em irmãos, comparados aos controles.

Observou-se que indivíduos que possuíam a variante C do rs890 do gene *GRIN2B* apresentaram hipermetilação do gene *GRIN2B* no CpG5 em comparação aos indivíduos com a variante A ($p=0,052$). Por fim, os indivíduos que possuíam a variante G do rs1805502 apresentaram hipometilação do gene *GRIN1* no CpG1 em relação aos indivíduos que possuíam a variante A ($p=0,021$).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação a interação grupo diagnóstico & genótipo em nenhuma das SNVs analisadas em comparação a metilação dos genes do NMDAR, bem como nenhuma outra diferença significativa de metilação dos genes do NMDAR foi observada em relação ao genótipo nas demais SNVs (**Tabela 16**).

Tabela 16. Associações entre os genótipos das SNVs e a interação grupo diagnóstico & genótipo em relação a metilação dos genes do NMDAR

Grupos	Genótipos	<i>GRIN1</i> CpG1		<i>GRIN2B</i> CpG1		<i>GRIN2B</i> CpG2		<i>GRIN2B</i> CpG4		<i>GRIN2B</i> CpG5	
		Média (EPM)	p ¹ ; p ²	Média (EPM)	p ¹ ; p ²	Média (EPM)	p ¹ ; p ²	Média (EPM)	p ¹ ; p ²	Média (EPM)	p ¹ ; p ²
<i>GRIN1</i>	rs11146020		0,764; 0,290		0,827; 0,590		0,620; 0,488		0,341; 0,324		0,209; 0,337
Controles	GG	8,7 (0,4)		5,1 (0,2)		2,2 (0,1)		2,7 (0,2)		2,4 (0,1)	
	GC ou CC	8,6 (0,9)		5,1 (0,5)		2,3 (0,3)		2,9 (0,4)		2,7 (0,3)	
Irmãos	GG	9,7 (0,5)		4,0 (0,3)		1,9 (0,2)		2,5 (0,2)		2,2 (0,2)	
	GC ou CC	8,0 (1,6)		3,1 (1,0)		1,6 (0,5)		1,4 (0,7)		1,2 (0,6)	
Pacientes	GG	9,1 (0,4)		3,5 (0,2)		1,8 (0,1)		1,8 (0,2)		1,9 (0,1)	
	GC ou CC	8,4 (0,8)		3,5 (0,5)		1,5 (0,3)		1,8 (0,4)		1,8 (0,3)	
<i>GRIN2A</i>	rs1420040		0,264; 0,913		0,264; 0,315		0,069; 0,762		0,113; 0,096		0,473; 0,150
Controles	AA	8,8 (0,6)		4,7 (0,4)		2,2 (0,2)		2,8 (0,3)		2,6 (0,2)	
	AG ou GG	8,6 (0,5)		5,4 (0,3)		2,3 (0,1)		2,7 (0,2)		2,3 (0,2)	
Irmãos	AA	9,9 (0,8)		3,6 (0,5)		1,6 (0,2)		1,8 (0,3)		1,8 (0,3)	
	AG ou GG	9,3 (0,6)		4,1 (0,4)		2,1 (0,2)		2,9 (0,3)		2,5 (0,2)	
Pacientes	AA	8,9 (0,6)		3,6 (0,4)		1,5 (0,2)		1,8 (0,3)		1,8 (0,2)	
	AG ou GG	9,0 (0,4)		3,4 (0,3)		1,8 (0,1)		1,8 (0,2)		1,9 (0,2)	
<i>GRIN2B</i>	rs890		0,549; 0,856		0,714; 0,826		0,121; 0,374		0,366; 0,245		0,052; 0,675
Controles	AA	8,7 (0,7)		4,8 (0,4)		1,9 (0,2)		2,2 (0,3)		2,2 (0,3)	
	AC ou CC	8,7 (0,4)		5,2 (0,3)		2,4 (0,1)		2,9 (0,2)		2,5 (0,2)	
Irmãos	AA	10,0 (0,8)		3,9 (0,5)		1,9 (0,2)		2,6 (0,3)		1,8 (0,2)	
	AC ou CC	9,2 (0,6)		4,0 (0,4)		1,9 (0,2)		2,3 (0,3)		2,5 (0,2)	
Pacientes	AA	9,1 (0,7)		3,5 (0,4)		1,5 (0,2)		1,8 (0,3)		1,7 (0,2)	
	AC ou CC	8,9 (0,4)		3,5 (0,3)		1,8 (0,1)		1,9 (0,2)		1,9 (0,2)	
	rs1805502		0,021; 0,079		0,521; 0,480		0,745; 0,291		0,422; 0,971		0,108; 0,933
Controles	AA	8,7 (0,4)		5,0 (0,3)		2,2 (0,1)		2,8 (0,2)		2,5 (0,2)	
	AG ou GG	8,7 (0,6)		5,4 (0,4)		2,4 (0,2)		2,6 (0,3)		2,3 (0,2)	
Irmãos	AA	11,6 (0,8)		4,3 (0,5)		1,8 (0,3)		2,5 (0,4)		2,5 (0,3)	
	AG ou GG	8,7 (0,5)		3,8 (0,3)		1,9 (0,2)		2,4 (0,3)		2,1 (0,2)	
Pacientes	AA	9,1 (0,5)		3,7 (0,3)		1,9 (0,2)		1,9 (0,2)		2,0 (0,2)	
	AG ou GG	8,7 (0,5)		3,3 (0,3)		1,5 (0,2)		1,8 (0,2)		1,7 (0,2)	

(Continua)

								(Conclusão)
rs1806194			0,689; 0,837	0,826; 0,969	0,509; 0,134	0,699; 0,271	0,098; 0,549	
Controles	TT	8,8 (0,6)	5,0 (0,4)	2,0 (0,2)	2,4 (0,3)	2,4 (0,2)		
	TC ou CC	8,6 (0,4)	5,2 (0,3)	2,4 (0,1)	2,9 (0,2)	2,4 (0,2)		
Irmãos	TT	9,2 (0,8)	3,9 (0,5)	2,1 (0,2)	2,7 (0,3)	1,9 (0,3)		
	TC ou CC	9,8 (0,6)	3,9 (0,4)	1,7 (0,2)	2,2 (0,3)	2,4 (0,2)		
Pacientes	TT	8,9 (0,6)	3,4 (0,4)	1,5 (0,2)	1,7 (0,3)	1,7 (0,2)		
	TC ou CC	8,9 (0,4)	3,5 (0,3)	1,8 (0,1)	1,9 (0,2)	1,9 (0,2)		

SNVs: single nucleotide variants; EPM: erro padrão da média; ¹Modelo Linear Generalizado considerando os aminoácidos como variáveis dependentes, os genótipos (homozigotos dominantes versus heterozigotos e homozigotos recessivos) e os grupos diagnósticos (pacientes, irmãos e controles) como fatores fixos, ajustados por idade e sexo; ¹ valor de p em relação ao genótipo; ² valor de p em relação à interação grupo diagnóstico & genótipo. Negrito: $p \leq 0,05$.

8.4. DISCUSSÃO

Este estudo complementa os achados já descritos anteriormente em relação às investigações moleculares relacionadas ao NMDAR nos pacientes em PEP. Trata-se de análises adicionais exploratórias integrando os mecanismos epigenéticos e genéticos e suas associações nas expressões de aminoácidos e proteínas.

Evidências anteriores têm enfatizado os papéis dos genes *GRIN1* e *GRIN2B* na disfunção do NMDAR associados à esquizofrenia e outras psicoses (FACHIM *et al.*, 2019; GULCHINA *et al.*, 2017; HU *et al.*, 2016; IWAYAMA *et al.*, 2006; MARTUCCI *et al.*, 2006), sendo exaustivamente investigado a associação entre variantes genéticas e a esquizofrenia e outras psicoses (GUO *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2015; RIPKE *et al.*, 2014).

Observou-se que indivíduos que possuíam o alelo de risco para a SNV rs890 apresentaram hipermetilação do gene *GRIN2B* no CpG5 em comparação aos indivíduos com o alelo dominante. No entanto, os indivíduos que possuíam o alelo de risco para a SNV rs1805502 do gene *GRIN2B* apresentaram hipometilação do gene *GRIN1* no CpG1 em relação aos indivíduos que possuíam o alelo dominante. Esse estudo também demonstrou que indivíduos com variantes genéticas de risco para os genes *GRIN1* e *GRIN2B* podem estar associadas às alterações na metilação desses genes. No entanto, as SNVs que investigamos não apresentam associação com modificações por metilação do DNA (<http://awesome-hust.com>; <https://www.ensembl.org>), por isso, não podemos afirmar que as SNVs tenham um valor preditivo sobre as alterações na metilação.

8.5. CONCLUSÃO

Esse estudo apresenta resultados preliminares, sugerindo que os indivíduos portadores das variantes genéticas para os genes *GRIN1* e *GRIN2B* podem apresentar maior probabilidade de alterações na metilação desses genes e também para concentrações de alguns aminoácidos, como TRP e GLU.

Modelos experimentais

9. ALTERAÇÕES DO NMDAR EM RATOS SUBMETIDOS AO ISOLAMENTO SOCIAL A PARTIR DO DESMAME

Dados publicados: **Loureiro CM**, Fachim HA, Corsi-Zuelli F, Shuhama R, Joca S, Menezes PR, Dalton CF, Del-Ben CM, Louzada-Junior P, Reynolds GP. Epigenetic-mediated *N*-methyl-D-aspartate receptor changes in the brain of isolated reared rats. *Epigenomics*. 2020 Nov;12(22):1983-1997. DOI: 10.2217/epi-2020-0151.

9.1. OBJETIVOS E HIPÓTESES

Embora estudos anteriores tenham mostrado anormalidades no sistema glutamatérgico em modelos animais de esquizofrenia, não se sabe se existem alterações equivalentes de RNAm/proteína associadas a alterações de metilação do DNA no cérebro de ratos criados em isolamento. Portanto, avaliamos a expressão de RNAm dos genes do NMDAR (*Grin1*, *Grin2a* e *Grin2b*), expressões de proteínas NR1 e NR2 e a metilação do DNA do *Grin1* e *Grin2b* em duas áreas do cérebro (CPF e hipocampo), bem como no sangue periférico de ratos submetidos à criação de isolamento social. Nossa hipótese foi que a criação em isolamento reduziria a expressão de subunidades do NMDAR nos níveis de RNAm e de proteínas devido a alterações na metilação do DNA.

9.2. MATERIAL E MÉTODOS

9.2.1. Isolamento social a partir do desmame

Filhotes de ratos machos da linhagem *Wistar* (± 40 g), logo após o desmame (21 dias de idade) e provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo, Campos de Ribeirão Preto, Brasil, foram levados ao viveiro do Laboratório de Farmacologia. Eles foram alocados aleatoriamente para uma das duas condições durante 10 semanas: (i) agrupados ($n=10$, alojados em 3/4 por gaiola) ou (ii) isolados ($n=10$, alojados individualmente). Todos os animais permaneceram em gaiolas de plástico de 48,5 cm $\times$ 25,8 cm $\times$ 15,6 cm, com livre acesso a água e ração, sob ciclo normal claro/escuro (12h/12h), temperatura constante ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), sendo permitido ver, ouvir e sentir o cheiro dos outros animais. O bem-estar dos animais foi avaliado diariamente por uma técnica responsável do Laboratório e as gaiolas trocadas a cada dois dias, além da reposição de alimentos e água.

9.2.1.1. Teste do Campo Aberto

Ao término do período de isolamento, os animais agrupados e isolados foram submetidos ao Teste do Campo Aberto (em inglês, *Open Field*) para a análise das alterações da

atividade exploratória induzida pela criação em isolamento. O teste consistiu na exposição individual dos animais a uma arena circular de acrílico transparente (60 cm de diâmetro x 50 cm de altura) colocada sobre um assoalho dividido em 12 quadrantes de mesma área. Os animais de ambos os grupos foram suspensos rapidamente pela cauda e transferidos para uma caixa limpa (5 seg de manipulação) no centro da arena, a fim de evitar que o contato com o manipulador tivesse qualquer interferência nos resultados. A sessão experimental teve duração de 20 min e foram registrados: (i) exploração horizontal/atividade locomotora pelo número de cruzamentos com as quatro patas nos quadrantes da arena; (ii) exploração vertical pelo número de levantamentos das patas dianteiras; e (iii) tempo despendido. Todas essas variáveis foram avaliadas na região central e na periferia da arena, separadamente. A quantificação foi registrada por um equipamento de vídeo a cada minuto durante os 20 min de teste. Logo em seguida, os ratos foram sacrificados por decapitação usando isoflurano como pré-anestésico para a retirada do encéfalo com a remoção das estruturas cerebrais comprometidas na esquizofrenia (CPF e hipocampo) e coleta de sangue a partir do tronco.

9.2.2. *Material biológico*

O sangue periférico dos animais foi coletado a partir do tronco após a sua decapitação, sendo os animais previamente anestesiados com isoflurano. Realizado um gradiente densidade de Ficoll-Paque e centrifugação por 30 min para o isolamento de células monoclueares e também do plasma (HEALTHCARE, 1152). Em seguida, as amostras foram estocadas em alíquotas de 500 µL e os tecidos cerebrais (CPF e hipocampo) dos roedores foram dissecados, sendo todos armazenados a -80°C no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Cristina Marta Del-Ben. Todas as amostras para os respectivos ensaios moleculares foram descongeladas no dia correspondente à análise, sendo os ensaios realizados num único dia.

9.2.2.1. **Concentrações protéicas de NR1 e NR2**

Quantificamos as proteínas NR1 e NR2 nesse modelo animal, bem como nos animais submetidos a administração subcrônica de PCP (**Capítulo 10**), pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) de acordo com as instruções do fabricante (MYBIOSOURCE, SAN DIEGO, CA, EUA). Os tecidos foram pesados e homogeneizados em tampão PBS (1 mL de PBS por 100 mg de tecido), centrifugados (1 min, 8000 rpm) e o sobrenadante coletado e congelado a -80 °C para as análises. Os poços foram pré-revestidos com NR1 e NR2 purificados e, 100 µL das amostras dos animais foram

utilizados para a quantificação de cada subunidade, totalizando 200 µL. Para o ensaio NR1, o intervalo de detecção foi de 0,5-10 ng/mL com sensibilidade menor que 0,1 ng/mL e o coeficiente de variação <10% para os ensaios intra e interensaios. Para a análise do NR2, o intervalo de detecção foi de 31,2-2000 pg/mL, a sensibilidade foi menor que 18,75 pg/mL e o coeficiente de variação foi <8% para intra-ensaio e <10% para inter-ensaio. Para cada subunidade calculou-se a curva padrão em relação à intensidade relativa da cor (densidade óptica) para as concentrações padrão e, assim as concentrações de NR1 (**Figura 18A**) e NR2 (**Figura 18B**) em cada amostra foi interpretada.

A determinação das subunidades NR1 e NR2 NMDAR foi avaliada tanto no sangue periférico quanto nos tecidos cerebrais (CPF e hipocampo) dos ratos submetidos ao modelo de isolamento social a partir do desmame e somente nos tecidos cerebrais nas ratas do modelo farmacológico. Em ambos os modelos, a concentração total de proteínas para cada área foi mensurada pelo método de biureto (Teste de Piotrowski) (LABTEST DIAGNÓSTICA, LAGOA SANTA, MG, BRASIL) e as medidas finais de NR1 e NR2 foram dadas em ng/mg e pg/mg, respectivamente. As análises foram realizadas no Laboratório de Imunologia Clínica do HCFMRP-USP, coordenado pelo Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior e sob supervisão das técnicas de laboratório Stella e Paula.

Figura 18. Gráficos das curvas padrão obtidos pelo método ELISA. Método quantitativo para a subunidade NR1 (ng/mL) (A) e sanduíche para a subunidade NR2 (pg/mL) (B) nos ensaios com amostras de animais.

9.2.2.2. Protocolo de extração de DNA e RNA e conversão em cDNA

Para a extração de DNA e RNA dos tecidos cerebrais e sangue dos animais utilizamos o Allprep DNA/RNA mini kit (QIAGEN, VALENCIA, CA, USA), também conforme as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com Dnase (Deoxyri- bonuclease I, Invitrogen) para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico. A seguir, a reação de transcrição reversa foi realizada utilizando 2 ng de RNA total (SUPERSRIPT III, INVITROGEN) e Oligo dT(12-18) primer (INVITROGEN) em presença de inibidores de

Rnase (Rnase OUT, INVITROGEN) em um volume final de 20 uL. A concentração e a qualidade do DNA e RNA foram estimadas por leitura em NanoDrop 1000 Spectrophotometer (THERMOSCIENTIFIC, USA).

9.2.2.3. Protocolo de PCR para expressão gênica (RT-qPCR)

As amplificações por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR, do inglês *polymerase chain reaction quantitative real time*) foram realizadas em triplicatas utilizando 300 ng de cDNA por reação, as quais foram preparadas com reagentes padronizados para PCR (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems). As condições da reação foram de 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min e 50 repetições de 95 °C por 15 seg e 60 °C por 1 min. As leituras foram realizadas pelo equipamento ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisadas pelo Sequence Detection Software (SDS) v1.3 (APPLIED BIOSYSTEMS, USA).

Para a quantificação da expressão do RNAm dos genes referentes ao sistema glutamatérgico nos roedores (*Grin1*, *Grin2a* e *Grin2b*) utilizou-se o Beta-actina (*Actb*) como gene de referência para os tecidos cerebrais e o *PMBS2* como gene de referência para o sangue periférico, além de condições de ciclagem térmica usando as seguintes sondas de hidrólise (ensaios TaqMan): *Grin1 Rat*: Rn01436034_m1, *Grin2a Rat*: Rn00561341_m1, *Grin2b Rat*: Rn00680474_m1, *Actb Rat*: Rn00667869_m1. Foram utilizados 30 mg de tecido e a expressão gênica foi quantificada usando o Método Comparativo de Ct (Método $\Delta\Delta Ct$).

A expressão dos genes do NMDAR no sangue periférico dos animais apresentou baixa amplificação, a qual não foi detectável por esse método, apesar do gene de referência *Actb* ter amplificado normalmente. Os genes não atingiram nem a fase exponencial e o limite de detecção, como demonstrado na **Figura 19**.

Figura 19. Gráfico de não amplificação dos genes do NMDAR por RT-qPCR.

9.2.2.4. Tratamento do DNA com bissulfito de sódio, sequenciamento de PCR e pirosequenciamento

A descrição da análise de metilação foi descrita no item 6.2.2.2 do **Capítulo 6**, página 102. Os primers utilizados nos ratos estão listados na **Tabela 17**.

Tabela 17. Lista dos primers projetados para cada gene e os iniciadores biotinilados utilizados nas reações de PCR e pirosequenciamento dos ratos

Gene	Primers dos ratos
<i>Line-1</i>	F 5'TTGGTTGTAAGAAAGTTGTTTGGTGAGTT3'
	R[BIO] 5'ACCTCAAAAATACCCACCTAACC3'
	Seq 5'GGTGAGTTTGGGATA3'
<i>Grin1</i>	F 5'TTGGGTTTGTGGGTGATAGAAG3'
	R[BIO] 5'ACCTACTAACATTCCCCCTACTTTTTTCCT3'
	Seq 5'ATGTTGAAGATTTTGGGGT3'
<i>Grin2a</i>	F 5'TGGCCTCAGTGACAAGAAGTTC3'
	R[BIO] 5'AGACGGCTGCGTCATAGATGAA3'
	Seq 5'AGAAGAATGGATTTTTTTTA3'
<i>Grin2b</i>	F 5'TTGGGTGTGAGATTTAAATTAAGATTAG3'
	R[BIO] 5'AAAATAAAAAAAACCTTCCTTTCTCAA3'
	Seq 5'AGATTAGGATTTTGTATGTT3'

9.2.3. *Análise estatística*

As análises foram realizadas também pelo SPSS Statistic 26.0 para Windows (IBM Corp: Armonk, NY, EUA). Todos os resultados foram expressos como média e EPM ou DP. A expressão gênica foi quantificada usando o Método $\Delta\Delta Ct$ e, por isso, os resultados foram demonstrados em *fold change*.

A análise dos dados comportamentais do Teste de Campo Aberto foi realizada no *software* EthoLog 2.2 (OTTONI, 2000) e analisada com medidas repetidas ANOVA com teste *post-hoc* de Bonferroni, conforme descrito anteriormente (CORSI-ZUELLI *et al.*, 2018). No entanto, como os dados moleculares não eram normalmente distribuídos, usamos o teste U de Mann-Whitney para investigar expressões de RNAm/proteína e as alterações de metilação do DNA entre os dois grupos (isolados e agrupados), para as duas regiões do cérebro (CPF e hipocampo) e quando consideramos também o sangue utilizamos o teste de Kruskal-Wallis.

As correlações entre as expressões de RNAm/proteína e a metilação do DNA entre os dois grupos (isolado e agrupado), considerando as regiões do cérebro (CPF e hipocampo) e sangue foram analisadas pelo coeficiente de correlação de Spearman (ρ). Qualitativamente, consideramos valores significativos de $\rho < 0,35$ e $p < 0,05$. Além disso, removemos ratos que apresentaram valores claramente fora da maior parte dos dados após a estatística descritiva, usando a análise SPSS que identifica os pontos extremos para cada conjunto de dados (Análise - Estatísticas descritivas - Explorar - Valores extremos). O critério para determinação de *outlier* no SPSS consiste de 1,5 x intervalo interquartil (DENIS, 2019).

Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos para testes bicaudais.

9.2.4. *Aspectos éticos*

Para os animais do modelo animal de isolamento social a partir do desmame, os procedimentos foram desenvolvidos de acordo com o Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA) e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento animal. Os experimentos foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e aprovados no Campus USP, Ribeirão Preto (Processo nº 024/2016) (ANEXO 12).

9.3. RESULTADOS

9.3.1. *Teste de campo aberto: hiperlocomoção*

Os animais criados em isolamento apresentaram hiperlocomoção nos dois primeiros tempos tanto na periferia quanto no centro da arena, quando comparados aos agrupados [0-5 min: $F_{(1,15)}=6,209$, $p=0,025$; 5-10 min: $F_{(1,15)}=14,272$, $p=0,002$], bem como no centro da arena

durante 5-10 min [$F_{(1,15)}=6,452$, $p=0,023$]. Esses dados já foram publicados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (CORSI-ZUELLI *et al.*, 2018) (**Figura 20**).

Figura 20. Efeito da condição de criação (isolado vs. agrupado) no número de cruzamentos na periferia e centro da arena (20 min) após 10 semanas de isolamento social. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. * $p<0,05$ [figura adaptada do artigo (CORSI-ZUELLI *et al.*, 2018)].

9.3.2. Expressão gênica nos tecidos cerebrais

O RT-qPCR mostrou que o gene de referência, *Actb*, foi expresso em um nível estável em todas as amostras para os dois grupos (CPF: $U=22$, $p=0,060$; hipocampo: $U=34$, $p=0,369$) e, portanto, foi utilizado para normalizar os dados. A **Figura 21** mostra a expressão de RNAm diminuída de *Grin1* (0,6 vezes), *Grin2a* (0,7 vezes) e *Grin2b* (1,0 vezes) no CPF de animais isolados quando comparados aos agrupados ($U=22$, $p=0,034$; $U=23$, $p=0,041$; $U=19$, $p=0,019$); enquanto não foram encontradas alterações significativas no hipocampo (*Grin1*: $U=32$, $p=0,174$; *Grin2a*: $U=42$, $p=0,545$ e *Grin2b*: $U=36$, $p=0,290$).

Figura 21. Efeito da condição de criação (isolados versus agrupados) na expressão dos genes do NMDAR no CPF e hipocampo de ratos. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM.

** $p < 0,01$ [figura adaptada do artigo (LOUREIRO *et al.*, 2020b)].

9.3.3. Expressão das proteínas NR1 e NR2 nos tecidos cerebrais e sangue periférico

Ratos criados em isolamento apresentaram concentrações aumentadas de NR1 no hipocampo e sangue periférico quando comparados aos agrupados ($U=8$, $p=0,001$; $U=2$, $p<0,001$), respectivamente. No entanto, as concentrações de NR1 no CPF de ratos criados em isolamento não diferiram dos animais alojados em grupo ($U=39$, $p=0,406$) (**Figura 22A**). Em relação à expressão da proteína NR2, não houve diferenças significativas entre os grupos no CPF, hipocampo ou sangue periférico ($U=36$, $p=0,462$; $U=32$, $p=0,174$; $U=34$, $p=0,226$, respectivamente) (**Figura 22B**).

Figura 22. Efeitos da condição de criação (isolados versus agrupados) sobre a expressão das proteínas NR1 e NR2 no CPF, hipocampo e sangue periférico de ratos. Concentrações aumentadas de NR1 no hipocampo e sangue periféricos dos ratos isolados quando comparados aos agrupados (A); e sem alterações na expressão protéica de NR2 tanto nos tecidos cerebrais como no sangue periférico (B). Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. ** $p < 0,01$ [figura adaptada do artigo (LOUREIRO *et al.*, 2020b)].

9.3.4. Metilação do DNA dos genes do NMDAR nos tecidos cerebrais e sangue periférico

As amostras de DNA de ratos foram submetidas com sucesso à conversão de bisulfito, PCR e pirosequenciamento para determinar a metilação do DNA nas regiões promotoras dos genes glutamatérgicos (*Grin1*, *Grin2a* e *Grin2b*) e *Line-1*. Todas as amostras demonstraram bandas únicas de PCR sem evidência de degradação do DNA. Em relação ao *Line-1*, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos nos níveis médios de metilação dos CpGs (CPF: $U=35$, $p=0,414$; hipocampo: $U=33$, $p=0,199$; sangue: $U=48$, $p=0,880$) (**Figura 23**).

Figura 23. Porcentagem da metilação da média dos CpGs do *Line-1* no CPF, hipocampo e sangue de ratos submetidos ao isolamento social após o desmame (isolados versus agrupados). Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM [figura adaptada do artigo (LOUREIRO *et al.*, 2020b)].

Nos genes glutamatérgicos, os ratos criados isolados mostraram maior metilação do *Grin1* no CPF ($U=18$, $p=0,047$) e no sangue periférico ($U=23,5$, $p=0,045$) ambos no CpG5 quando comparados aos controles, enquanto não foram encontradas diferenças significativas no hipocampo em nenhum CpG, bem como nos demais CpGs do CPF e sangue periférico (**Figura 24A**). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação à metilação do *Grin2a* tanto nos tecidos cerebrais (CPF e hipocampo) como no sangue periférico ($p>0,05$ para todas as comparações) (**Figura 24B**). No entanto, encontramos hipermetilação do *Grin2b* no hipocampo ($U=15$, $p=0,024$) e sangue periférico ($U=18$, $p=0,047$) ambos no CpG4 de ratos isolados em comparação aos agrupados e nenhuma outra diferença significativa foi encontrada nos demais CpGs tanto nos tecidos cerebrais como no sangue periférico, como demonstrado na **Figura 24C**. Neste ensaio, alguns animais foram excluídos por critérios extremos (*outliers*) mencionados anteriormente (um isolado e um agrupado para análises no CPF do *Grin1* no CpG5; um agrupado e um isolado para análises no hipocampo do *Grin2b* no CpG4).

Figura 24. Porcentagem da metilação do DNA dos genes *Grin1*, *Grin2a* e *Grin2b* no CPF, hipocampo e sangue de ratos submetidos ao isolamento social após o desmame (isolados versus agrupados). Hipermetilação do *Grin1* no CPF e no sangue periférico ambos no CpG5 dos ratos isolados comparados aos agrupados (A); sem alterações na metilação do *Grin2a* tanto nos tecidos cerebrais como no sangue periférico entre os grupos (B); e hipermetilação do *Grin2b* no hipocampo e sangue periférico ambos no CpG4 de ratos isolados em comparação aos agrupados (C). Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ [figura adaptada do artigo (LOUREIRO *et al.*, 2020b)].

(A)

(B)

(C)

9.3.5. Correlações entre RNAm, proteína e metilação do DNA em ratos isolados e agrupados

9.3.5.1. Correlações entre a metilação do DNA e os níveis de RNAm/proteína das subunidades NMDAR entre tecidos cerebrais e sangue

Uma correlação negativa entre os níveis de RNAm de *Grin1* e de metilação de *Grin1* em CpG5 no CPF foi encontrada tanto nos animais isolados quanto agrupados ($\rho=-0,488$; $p=0,040$; **Figura 25A**). Além disso, nos ratos isolados verificamos a ocorrência de uma correlação negativa entre a metilação de *Grin2b* no CpG4 e os níveis de proteína NR2 no hipocampo ($\rho=-0,800$; $p=0,010$; **Figura 25B**). Também encontramos uma correlação negativa entre a metilação do *Grin2b* no CpG4 no hipocampo e sangue periférico de ratos isolados ($\rho=0,750$; $p=0,02$; **Figura 25C**). Por fim, houve uma correlação positiva entre os níveis protéicos de NR1 no hipocampo e sangue periférico dos ratos isolados e agrupados ($\rho=0,532$; $p=0,016$; **Figura 25D**). Não encontramos associações significativas entre as alterações comportamentais e moleculares.

Figura 25. Correlações entre a metilação do DNA e as expressões gênica/protéica dos tecidos cerebrais e sangue de animais isolados e agrupados. Correlação negativa entre os níveis de RNAm de *Grin1* e de metilação de *Grin1* em CpG5 no CPF em ambos os ratos (**A**); correlação negativa entre a metilação de *Grin2b* no CpG4 e os níveis de proteína NR2 no hipocampo nos ratos isolados (**B**) [figuras A e B adaptadas do artigo (LOUREIRO *et al.*, 2020b)]; correlação positiva entre a metilação do *Grin2b* no CpG4 no sangue periférico e hipocampo de ratos isolados (**C**) e correlação positiva entre os níveis protéicos de NR1 no hipocampo e sangue periférico em ambos os ratos (**D**).

(C)

(D)

9.4. DISCUSSÃO

9.4.1. Alterações nas subunidades do NMDAR em ratos submetidos à criação em isolamento

Verificamos que ratos submetidos ao isolamento social a partir do desmame apresentaram alterações de NR1 e NR2 no RNAm e nas proteínas, bem como no nível de metilação do DNA. Os resultados indicam que a hipermetilação do DNA pode ser um mecanismo potencial subjacente às alterações observadas tanto na expressão de proteínas como dos genes do NMDAR. Além disso, demonstramos que os animais criados em isolamento apresentaram alterações robustas em múltiplos indicadores da função neuronal glutamatérgica no hipocampo, CPF e sangue periférico, de acordo com as evidências que descrevem a sinalização disfuncional do NMDAR na esquizofrenia.

Em primeiro lugar, os ratos isolados tiveram uma redução geral da expressão de RNAm no CPF para todas as subunidades do NMDARs analisadas, semelhante a estudos anteriores

que mostraram diminuição da expressão de RNAm de NR1 no estriado e no CPF (HALL *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2017a). Também foi relatada uma regulação negativa do RNAm de NR2A no CPF de ratos após a criação de isolamento (ZHAO *et al.*, 2009), embora resultados opostos tenham sido encontrados na mesma área cerebral por outro grupo (TURNOCK-JONES *et al.*, 2009).

Como o glutamato é um mediador chave da plasticidade sináptica, esses resultados indicam uma disfunção glutamatérgica que provavelmente afeta a plasticidade sináptica no CPF como consequência do regime de criação do isolamento social. Isso pode estar associado à disfunção do NMDAR e a um desequilíbrio entre os circuitos excitatório e inibitório, notadamente no CPF (DU BOIS *et al.*, 2009). De fato, estudos anteriores indicaram que as subunidades do NMDAR, principalmente NR1 e NR2A-B, estão envolvidas nos estágios iniciais do desenvolvimento cerebral (AIDA *et al.*, 2012; WANG; GAO, 2009). É relevante que uma anormalidade do sistema glutamatérgico no CPF possa estar subjacente às deficiências cognitivas e déficits de memória presentes na esquizofrenia (KANTROWITZ; JAVITT, 2012; SNYDER; GAO, 2013) que também está de acordo com a hipofrontalidade já descrita neste modelo animal (MURPHY *et al.*, 2010), baseado no comprometimento da transmissão neuronal e na conectividade sináptica (KRZYSTANEK; PAŁASZ, 2019; PRATT *et al.*, 2008).

Em segundo lugar, os nossos achados mostraram níveis aumentados de proteína NR1 no hipocampo e sangue periférico de ratos isolados, semelhante a um estudo anterior que mostrou aumento de NR1 após cinco semanas de isolamento social, embora não atingisse significância estatística (LI *et al.*, 2017a). Por outro lado, foi relatado que os níveis de proteína NR1 foram significativamente reduzidos no CPF em ratos criados em isolamento por um período de sete e cinco semanas, respectivamente (HERMES *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2017a) e consistentes com esses achados, nós também demonstramos concentrações mais baixas de NR1 no CPF, mas sem alcançar diferenças significativas. O aumento da proteína NR1 no hipocampo encontrado em nosso estudo pode refletir a disfunção no CPF, bem como a ativação do NMDAR em resposta ao estresse crônico da criação do isolamento social (MARTIN; WELLMAN, 2011). Além disso, várias vias anatômicas diretas e indiretas ligam o hipocampo e o CPF (LIU *et al.*, 2015a; SIGURDSSON; DUVARCI, 2015; TSENG *et al.*, 2008) e as interações entre o hipocampo e as regiões corticais são conhecidas há muito tempo, com um papel central nas funções comportamentais e cognitivas (SPELLMAN *et al.*, 2015; WANG; CAI, 2006) como já demonstrado anteriormente no córtex temporal pós-morte de pacientes com esquizofrenia (NUDMAMUD E REYNOLDS, 2001).

Em relação aos marcadores epigenéticos, os animais isolados não apresentaram diferença significativa na metilação global do *Line-1*. No entanto, foi demonstrado uma metilação significativamente maior de *Grin1* e *Grin2b*, fornecendo um mecanismo potencial subjacente às deficiências de NMDAR discutidas anteriormente. Assim, a hipermetilação dos genes *Grin1* e *Grin2b* não reflete efeitos da metilação global, mas, ao invés disso, pode representar resultados específicos nestes genes para a condição de criação de isolamento social, equivalentes às alterações anteriores já mostradas em pacientes com esquizofrenia (BROMBERG *et al.*, 2008).

Identificamos hipermetilação do *Grin1* no CpG5 no CPF e sangue periférico de ratos isolados. No CpG5 estão situados sítios de ligação para dois fatores de transcrição com atividade promotora, o fator de transcrição de proteína 1 de especificidade (Sp1) e a proteína C/EBP β . No entanto, a atividade de C/EBP β nos ratos não é completamente alterada pela metilação de CpG (KRIBELBAUER *et al.*, 2017). Já o Sp1 é um importante fator de transcrição promotor que pode ativar ou reprimir a transcrição em resposta a estímulos fisiológicos e patológicos (CRESPO-FACORRO *et al.*, 2008; DENIAUD *et al.*, 2009; MARIN *et al.*, 1997). O Sp1 tem um papel direto na ativação transcricional e está envolvido no início da expressão gênica (O'CONNOR; GILMOUR; BONIFER, 2016) e se liga com alta afinidade nos sítios ricos em CG para regular a expressão de um grande número de genes envolvidos em uma variedade de processos como crescimento celular, apoptose, diferenciação e respostas imunes (HAGEN *et al.*, 1992; MARIN *et al.*, 1997; PHILIPSEN; SUSKE, 1999). Portanto, os nossos resultados sugerem que a hipermetilação do DNA do *Grin1* após o estresse precoce pode interferir na ligação do Sp1 e, assim, provocar uma redução da expressão do RNAm do *Grin1*.

Em relação ao *Grin2b*, os ratos isolados apresentaram hipermetilação do gene promotor *Grin2b* no CpG4 no hipocampo e sangue periférico. O CpG4 é encontrado em uma sequência com locais de ligação para vários fatores de transcrição, entre eles a família Pax (Pax 5, 6 e 9a-b) que é importante durante o desenvolvimento inicial dos animais para a diferenciação de tecidos (BOUCHARD *et al.*, 2010; OHTSUKA *et al.*, 2013) por meio de uma função reguladora da expressão gênica (BLAKE; ZIMAN, 2014). Considerando que a criação de isolamento é um estressor da vida precoce, parece provável que a metilação do DNA possa contribuir para as perturbações observadas na vida adulta desses ratos, já que o neurodesenvolvimento de roedores continua acontecendo após o nascimento (PRESSLER; AUVIN, 2013; SEMPLE *et al.*, 2013).

Finalmente, foram encontradas correlações negativas entre a metilação do *Grin1* e *Grin2b* e os níveis de RNAm do *Grin1* e da proteína NR2, respectivamente, bem como

correlações positivas entre o hipocampo e o sangue periférico (alterações da metilação do *Grin2b* no CpG4 e níveis protéicos de NR1). Os resultados indicam que os níveis alterados de metilação estão associados à expressão reduzida de gene/proteína, apoiando nossa hipótese de que a variação na metilação do DNA é um potencial mecanismo que influencia a expressão da proteína e do gene associados ao NMDAR. Além de reforçar a nossa hipótese de que as alterações no sangue periférico podem ser uma medida indireta e refletir as mudanças que acontecem nos tecidos cerebrais.

Em conclusão, o nosso estudo mostrou que a metilação do DNA está associada às alterações das expressões de genes/proteínas do NMDAR em ratos criados em isolamento. Dado que o isolamento social a partir do desmame caracteriza um modelo de estresse crônico no início da vida, as alterações observadas na metilação podem resultar desse período de estresse, levando a interrupções na neurotransmissão glutamatérgica que podem resultar em um desequilíbrio no tônus excitatório equivalente ao visto na esquizofrenia.

9.4.2. Limitações e pontos fortes

Neste estudo, não medimos todos os quatro subtipos distintos de NR2 (NR2a-d); isso pode estar subjacente à falta de resultados significativos em relação à expressão da proteína NR2 entre os grupos. No entanto, investigamos apenas a subunidade NR2 neste modelo animal de esquizofrenia, já que em nosso achado anterior, encontramos baixas concentrações plasmáticas de NR2 em pacientes em PEP comparados aos irmãos e controles (LOUREIRO *et al.*, 2018). No presente estudo, encontramos níveis aumentados de metilação no gene *Grin2b* e, consistentemente, baixa expressão dessa subunidade no nível do gene. No entanto, contrariamente às nossas expectativas, não foram encontradas diferenças no nível de proteína para esta subunidade, em nenhum dos tecidos cerebrais investigados. Isso pode refletir o fato de que só fomos capazes de avaliar a expressão total da proteína NR2 em vez das quatro subunidades específicas. A discriminação entre as subunidades NR2 é essencial para determinar a atividade diminuída do NMDAR, considerando que as duas subunidades NR2a-b têm propriedades diferentes em relação à função NMDAR (LOFTIS; JANOWSKY, 2003; MONYER *et al.*, 1994). Foi demonstrado que a maturação dos circuitos cerebrais ocorre após a troca de NR2b para NR2a durante períodos críticos do desenvolvimento (MONACO; GULCHINA; GAO, 2015; SNYDER; GAO, 2013). Assim, a falta de diferenças significativas nos níveis de proteína NR2 em nosso estudo deve ser interpretada com cautela e é importante que estudos futuros considerem as análises das subunidades NR2a e NR2b separadamente. Utilizamos a hiperlocomoção como uma medida representativa comportamental para a

validação do modelo, uma vez que essa alteração é a mudança comportamental mais consistente observada (FONE; PORKESS, 2008); no entanto, não incluímos experimentos adicionais relacionados a outros distúrbios nos domínios comportamentais associados ao modelo de criação de isolamento e relevantes para os sintomas da esquizofrenia. Além disso, nossos dados não demonstraram uma distribuição normal e por isso usamos os testes não paramétricos; no entanto, o nosso tamanho amostral possui pequena variação que reduz as chances de reproduzirmos resultados falsos positivos.

O aspecto mais importante deste estudo foi integrar e correlacionar observações de metilação, expressão de genes e proteínas em vários marcadores relevantes da função do NMDAR em um modelo animal válido para a esquizofrenia. A fim de melhorar o papel do sistema glutamatérgico no início da esquizofrenia, testamos a hipótese específica (para correlações proteína-metilação/RNA_m) que podem correlacionar essas mudanças com a esquizofrenia.

9.5. CONCLUSÃO

O nosso estudo reforça a validade da criação em isolamento social após o desmame na modelagem de aspectos da esquizofrenia, destacando a disfunção glutamatérgica na doença. Também fornecemos evidências para apoiar a hipótese de que a hipermetilação do NMDAR encontrada nos tecidos cerebrais pode estar subjacente às alterações na expressão do RNA_m/proteína do NMDAR causadas pelo isolamento precoce. Esses resultados destacam a importância do ambiente durante o desenvolvimento como um contribuinte para as mudanças comportamentais e neuroquímicas durante a vida adulta. Em conclusão, o nosso estudo contribui para a identificação de mecanismos epigenéticos envolvidos na neuropatofisiologia da esquizofrenia que podem fornecer novas abordagens para a farmacoterapia, bem como identificar os fatores biológicos que podem melhorar o diagnóstico e a intervenção precoces.

Embora os NMDARs sejam bem caracterizados e muito se saiba sobre a sua implicação na patogênese da esquizofrenia, o papel dos mecanismos epigenéticos em sua desregulação ainda é incerto. Os resultados apresentados neste estudo abrem caminho para novos estudos e destacam um possível mecanismo epigenético pelo qual as adversidades do início da vida contribuem para a desregulação no sistema glutamatérgico, mais especificamente na hipofunção de NMDARs, seu possível impacto na função GABAérgica e subsequente desinibição de neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo. A desregulação epigenética do sistema glutamatérgico observado neste estudo tem um importante valor de tradução não apenas para a esquizofrenia, mas também para uma série de distúrbios psiquiátricos associados à

exposição das adversidades ambientais. Pesquisas futuras devem investigar a associação entre a metilação do DNA e o estresse precoce em modelos farmacológicos de esquizofrenia e testar correlações entre marcadores biológicos sanguíneos e cerebrais. Finalmente, os resultados observados oferecem caminhos mecanísticos para a tradução em contextos clínicos, incluindo a identificação de populações mais vulneráveis expostas a adversidades no início da vida e a triagem de ferramentas farmacológicas mais específicas para esses subgrupos.

10. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SUBCRÔNICA DE FENCICLIDINA NAS SUBUNIDADES DO NMDAR EM RATAS

Artigo em preparo para submissão: **Loureiro CM**, Fachim HA, Harte MK, Neil JC, Dalton CF, Reynolds GP. Subchronic phencyclidine administration enhances NMDAR subunits in rat brain. *European Neuropsychopharmacology*.

10.1. OBJETIVOS E HIPÓTESES

Como encontramos anteriormente o aumento da metilação do promotor dos genes *Grin1* e *Grin2b* do NMDAR nos cérebros de ratos criados em isolamento e diminuição da metilação do *GRIN2B* em pacientes em primeiro episódio de esquizofrenia em comparação com os controles, objetivamos estender nossos achados anteriores para investigar o envolvimento da hipofunção do NMDAR regulada pela metilação do DNA dos genes do NMDAR (*Grin1*, *Grin2a* e *Grin2b*), bem como, a expressão gênica e proteica das subunidades NR1 e NR2 no CPF e hipocampo em um modelo animal farmacológico de esquizofrenia. Esperávamos que os animais submetidos ao PCP subcrônico induzissem déficits comportamentais representados pelas expressões alteradas de RNAm e/ou proteína das subunidades do NMDAR. Além disso, formulamos a hipótese de que as ratas tratadas com PCP apresentariam alterações na metilação do DNA em ambos os tecidos cerebrais e essas alterações estariam correlacionadas com a expressão de genes e proteínas.

10.2. MATERIAIS E MÉTODOS

10.2.1. Injeção subcrônica de PCP

Ratas fêmeas da linhagem *Lister Hooded* (± 200 – 230 g) provenientes de Harlan (Reino Unido) foram alojadas em grupos de quatro a cinco ratas em condições laboratoriais padrão sob um ciclo claro-escuro de 12 horas. As ratas foram divididas aleatoriamente em dois grupos: ratas que receberam PCP ($n=10$, 2 mg/kg) em um volume de 1 ml/kg ou veículo ($n=10$, solução salina a 0,9%), duas vezes ao dia por sete dias. O PCP foi dissolvido em solução salina a 0,9%. Foi realizado um período de lavagem necessário para evitar que o comportamento fosse influenciado pelos efeitos diretos da droga ou pelos efeitos da retirada da mesma (GRAYSON *et al.*, 2014). A comida, proveniente da *Special Diet Services, Essex* (Reino Unido) e água estavam disponíveis à vontade nas gaiolas. A temperatura ambiente de 21 ± 2 °C e a umidade de 45–55% foram mantidas constantes o tempo todo.

10.2.1.1. Reconhecimento de novos objetos e atividade locomotora

Os testes comportamentais foram realizados na fase clara em que as ratas foram testadas para o reconhecimento de novos objetos (NOR, do inglês *Novel Object Recognition*) e atividade locomotora seis semanas após a última dose de PCP. Uma caixa aberta de acrílico (52 cm x 52 cm x 31 cm) foi posicionada 27 cm acima do chão em um carrinho móvel. As paredes da caixa eram pretas e os objetos a serem discriminados (em triplicatas) eram feitos de acrílico, metal, vidro ou madeira. A altura dos objetos era aproximadamente a mesma (10 ± 2 cm) e eles eram pesados o suficiente para não serem deslocados pelos animais. Os objetos foram posicionados a 6 cm das paredes da caixa, em cantos opostos. Após cada tentativa, 10% de álcool foi usado para limpar os objetos, na tentativa de remover quaisquer sinais olfativos remanescentes nos objetos e na caixa. Os objetos familiares e novos foram contrabalançados nas posições esquerda e direita para evitar desvios para um local específico. Durante a semana anterior ao primeiro procedimento de teste comportamental, todas as ratas foram tratadas diariamente. Durante três dias antes dos testes comportamentais, as ratas receberam períodos de exploração diários de uma hora na caixa NOR para garantir a habituação à caixa vazia e ao ambiente da sala de teste.

Resumidamente, após a habituação à caixa de teste, as ratas foram submetidas a um teste de aquisição inicial, durante o qual os animais podiam explorar dois objetos idênticos por 3 min. Após um intervalo de um minuto quando os animais foram removidos, um objeto foi substituído por um novo objeto e os animais puderam explorar os objetos novamente por 3 min. Os tempos de exploração de cada objeto em cada tentativa foram gravados em vídeo para posterior pontuação às cegas. O reconhecimento de novos objetos foi determinado pelo índice de discriminação no ensaio de retenção, calculado como: $(t_n - t_f) / (t_n + t_f)$, onde t_n e t_f são os tempos gastos explorando os objetos novos e familiares, respectivamente.

A atividade locomotora foi registrada contando o número total de linhas (total de nove) cruzadas pelos ratos durante os testes de aquisição e retenção, em uma caixa medindo 17,3 cm x 17,3 cm. Após os testes comportamentais, os cérebros foram removidos, congelados rapidamente em isopentano e armazenados a -70% no Laboratório *Biomolecular Research Centre da Sheffield Hallam University*, no Reino Unido. Posteriormente, foram obtidos o RNA e DNA do CPF e hipocampo de ambos os grupos de ratas. Todos os experimentos comportamentais foram descritos anteriormente (FACHIM *et al.*, 2016; GRAYSON; IDRIS; NEILL, 2007; JENKINS; HARTE; REYNOLDS, 2010).

10.2.1.2. Expressão proteica e gênica, tratamento do DNA com bissulfito de sódio, sequenciamento de PCR e pirosequenciamento

Os primers utilizados nos ratos e a descrição das análises de metilação, expressão gênica e proteica foram descritos nos itens da seção 9.2.2, página 170 do **Capítulo 9**.

O *software* PyroMark Q24 2.0 analisou a porcentagem de metilação em cada amostra de humanos e ratos dos sítios de CpG selecionados nos genes *GRIN1*, *GRIN2A*, *GRIN2B* e *LINE-1* (humanos) e *Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b* e *Line-1* (ratos), como demonstrado na **Figura 26**.

Figura 26. Picograma das regiões específicas de metilação do *Grin1* da amostra de CPF da rata que recebeu veículo analisadas por pirosequenciamento no sistema Pyromark Q24. O rótulo de qualidade de um CpG afetado pode mudar de azul para amarelo, indicando menor qualidade da verificação, mas que o teste ainda pode ser aceitável, ou para vermelho, indicando falha na qualidade. Nesta figura em específico, podemos notar dois CpGs com qualidade azul e os três últimos em amarelo. Também podemos notar que todas as amostras estão marcadas em azul indicando excelente qualidade do experimento.

Well: B5
Assay: Grin1 rats 85%
Sample ID: VHC PFC 22
Note:
Analysis version: 2.0.7

Sequence to analyze:

GTAGGCGGCGGGAAGGAGTAGGAAAAAGTAGGG

Position	1	2	3	4	5
Quality	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Meth (%)	3	6	5	5	5

10.2.2. Análise estatística

A análise estatística considerando as análises as expressões de RNAm/proteína e a metilação do DNA entre os dois grupos (PCP e veículo) foi descrita anteriormente (item 9.2.3, página 173, **Capítulo 9**). No entanto, como os animais do modelo farmacológico (PCP e veículo) apresentaram distribuição normal, investigamos as alterações moleculares e suas associações pelo teste t de Student e correlação de Pearson. As análises foram realizadas no *Biomolecular Research Centre* da *Sheffield Hallam University* no Reino Unido, coordenada pela Dra. Caroline F. Dalton e Professor Gavin P. Reynolds.

10.2.3. Aspectos éticos

Os experimentos do modelo farmacológico foram realizados de acordo com a Lei de Procedimentos Científicos em Animais (1986) e foram aprovados pelo processo de revisão ética da Universidade de Manchester no Reino Unido.

10.3. RESULTADOS

10.3.1. Reconhecimento de novos objetos e atividade de locomoção

As ratas submetidas à administração subcrônica de PCP apresentaram comprometimento no reconhecimento de novos objetos quando comparadas às ratas que receberam veículo ($p < 0,001$). Durante a fase de aquisição, as ratas de ambos os grupos passaram a mesma quantidade de tempo explorando os objetos esquerdo e direito, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Já na fase de retenção, os animais tratados com veículo passaram um tempo maior explorando o objeto novo versus o objeto familiar ($20,1 \pm 1,8$ vs $9,9 \pm 1,4$), o que não aconteceu com as ratas que receberam tratamento subcrônico de PCP ($24,7 \pm 2,2$ vs $22 \pm 2,8$, $p < 0,01$) (**Figura 27**). Dessa maneira, foi demonstrado um déficit cognitivo no índice de discriminação na fase de retenção da tarefa, induzido por um regime subcrônico de dosagem de PCP no paradigma de reconhecimento de novos objetos (veículo: $0,35 \pm 0,04$ versus PCP: $0,08 \pm 0,04$, $p < 0,01$). Não houve diferenças significativas na atividade locomotora entre os grupos (dados não mostrados). Os resultados do reconhecimento de novos objetos para este modelo animal foi descrito anteriormente (FACHIM *et al.*, 2016; GRAYSON; IDRIS; NEILL, 2007).

Figura 27. Comprometimento no reconhecimento de novos objetos nas ratas submetidas à administração de PCP subcrônica [figura adaptada do artigo (GRAYSON; IDRIS; NEILL, 2007)].

10.3.2. Expressões de RNAm e proteicas nos tecidos cerebrais

As ratas submetidas à administração subcrônica de PCP apresentaram níveis aumentados de RNAm de *Grin2a* (1,2 vezes) e *Grin2b* (5,8 vezes) no CPF ($p=0,045$; $p=0,029$, respectivamente) quando comparadas ao veículo. Não foram observadas diferenças em relação ao *Grin1* no CPF ($p=0,141$) ou no hipocampo ($p=0,191$), assim como no *Grin2a* ($p=0,872$) e *Grin2b* ($p=0,105$) no hipocampo (**Figura 28**). Todas as ratas foram incluídas nesta análise.

Figura 28. Efeitos do tratamento subcrônico com PCP (PCP versus veículo) na expressão gênica das subunidades do NMDAR no CPF e hipocampo de ratas. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$. Considerado o gene *Actb* como referência.

Além disso, as ratas que receberam PCP apresentaram baixos níveis de proteína NR1 no CPF ($p=0,008$) e no hipocampo ($p=0,010$) em relação ao veículo. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas na proteína NR2 entre as ratas submetidas ao PCP e veículo em ambos os tecidos cerebrais (CPF: $p=0,156$; hipocampo: $p=0,099$) (**Figura 29**). Todas as ratas foram incluídas nestes ensaios.

Figura 29. Efeitos do tratamento com PCP (PCP versus veículo) na expressão de proteínas para subunidades NMDAR no CPF e hipocampo de ratas. Concentrações protéicas de NR1 (ng/mg) (A); concentrações protéicas de NR2 (pg/mg) (B). Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. ** $p < 0,01$.

10.3.3. Metilação dos genes *Line-1*, *Grin1*, *Grin2a* e *Grin2b* dos tecidos cerebrais

As amostras de DNA foram submetidas com sucesso à conversão de bisulfito, PCR e pirosequenciamento para determinar a metilação nas sequências de glutamato (*Grin1*, *Grin2a* e *Grin2b*) e *Line-1*. Todas as amostras demonstraram bandas únicas de PCR sem evidência de degradação do DNA. Em relação à metilação do *Line-1*, não foram encontradas alterações em nenhum CpG analisado entre os grupos tanto no CPF (média dos CpGs, PCP: $73,59 \pm 5,01\%$; veículo: $77,06 \pm 7,91\%$) (**Figura 30A**) quanto no hipocampo (média dos CpGs, PCP: $77,90 \pm 2,86\%$; veículo: $77,45 \pm 4,81\%$) (**Figura 30B**), como demonstrado no estudo anterior (FACHIM *et al.*, 2016).

Figura 30. Porcentagem da metilação do *Line-1* no CPF (A) e hipocampo (B) de ratas submetidas ao tratamento subcrônico de PCP (PCP versus veículo). Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM [figura adaptada do artigo (FACHIM *et al.*, 2016)].

(A)

(B)

Nos genes glutamatérgicos, o grupo de ratas submetidas ao PCP apresentou aumento da metilação do *Grin1* no CpG3 no CPF ($p=0,05$) e nos CpG3 e CpG4 no hipocampo em relação ao grupo controle ($p=0,023$; $p=0,041$, respectivamente) (**Figura 31A**). Os demais CpGs não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação à metilação do *Grin2a* ($p>0,02$ para todas as comparações) (**Figura 31B**). No entanto, ratas com tratamento de PCP também demonstraram maior metilação do *Grin2b* no CpG3 e CpG4 no CPF ($p=0,006$; $p=0,036$, respectivamente) e no CpG4 no hipocampo ($p=0,031$) quando comparados ao grupo controle (**Figura 31C**). Aqui, excluímos um valor extremo de uma rata submetida ao PCP no CPF do *Grin2b* no CpG4.

Figura 31. Porcentagem média da metilação do DNA dos genes *Grin1* (A), *Grin2a* (B) e *Grin2b* (C) no CPF e hipocampo de ratas submetidas ao tratamento subcrônico de PCP (PCP versus veículo). Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.

(A)

(B)

(C)

10.3.4. Correlações entre RNAm, proteína e metilação do DNA em ratas tratadas com PCP versus veículo

10.3.4.1. Correlações entre a metilação do DNA, RNAm e proteína do NMDAR

Encontramos uma correlação negativa entre a média da metilação do *Grin2b* e a proteína NR2 no hipocampo de ambos os grupos (PCP e veículo) ($r=-0,448$, $p=0,048$). Todas as correlações no CPF e hipocampo das ratas tratadas com PCP e veículo estão representadas na **Tabela 18**. Além disso, uma correlação negativa foi encontrada entre a média da metilação do *Grin2b* e a proteína NR2 no hipocampo apenas de ratas submetidas ao PCP ($r=-0,648$, $p=0,043$) (**Figura 32**).

Tabela 18. Correlações entre a metilação do DNA e as expressões de mRNA e proteína das subunidades do NMDAR nos tecidos cerebrais de ratas submetidas ao PCP e veículo

Metilação do DNA (total)	CPF										Hipocampo									
	RNAm					Proteína					RNAm					Proteína				
	<i>Grin1</i>	<i>Grin2a</i>	<i>Grin2b</i>	NR1	NR2	<i>Grin1</i>	<i>Grin2a</i>	<i>Grin2b</i>	NR1	NR2	<i>Grin1</i>	<i>Grin2a</i>	<i>Grin2b</i>	NR1	NR2	<i>Grin1</i>	<i>Grin2a</i>	<i>Grin2b</i>	NR1	NR2
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
<i>Grin1</i>	-0,01	0,98	0,13	0,58	-0,27	0,26	0,06	0,81	-0,05	0,82	0,24	0,30	0,12	0,61	0,23	0,33	-0,22	0,40	0,16	0,49
<i>Grin2a</i>	0,09	0,71	-0,04	0,86	-0,13	0,58	0,09	0,73	-0,04	0,88	0,42	0,06	0,35	0,13	0,08	0,75	-0,20	0,43	-0,21	0,38
<i>Grin2b</i>	0,13	0,57	-0,09	0,70	-0,09	0,72	-0,13	0,60	-0,04	0,88	-0,12	0,60	0,04	0,87	-0,21	0,37	-0,43	0,09	-0,45	0,05

CPF: córtex pré-frontal; RNAm: RNA mensageiro; r: correlação de Pearson.

Negrito: $p<0,05$.

Figura 32. Correlação negativa entre a metilação do DNA do *Grin2b* e os níveis de proteína NR2 no hipocampo de ratas submetidas ao PCP.

10.4. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram uma abordagem integrada do papel das subunidades do NMDAR em um modelo animal farmacológico de esquizofrenia envolvendo aumento de RNAm dos genes *Grin2a* e *Grin2b*, diminuição da proteína NR1 e aumento da metilação do DNA em locais promotores dos genes *Grin1* e *Grin2b* do NMDAR em duas áreas do cérebro implicadas na esquizofrenia. Essas descobertas são independentes de qualquer mudança global na metilação do DNA determinada pela metilação do *Line-1*.

O presente estudo reafirma a validade da administração de PCP na modelagem de sintomas semelhantes aos da esquizofrenia, mostrando que ratas sob essa condição apresentaram déficits no reconhecimento de novos objetos, acompanhado por alterações robustas na expressão de genes e proteínas em diferentes marcadores associados à patogênese da esquizofrenia (glutamato) como já demonstrado (AMITAI *et al.*, 2012; CADINU *et al.*, 2018; CASTAÑÉ; SANTANA; ARTIGAS, 2015; GRAYSON *et al.*, 2014; JENTSCH; ROTH, 1999).

Evidências têm demonstrado que a administração de PCP resulta em uma regulação positiva da expressão de RNAm do *Grin1* no córtex frontal de ratos em comparação com controles (ANASTASIO; JOHNSON, 2008; LIU *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2001). Nossos resultados seguiram a mesma direção, embora não tenhamos encontrado diferenças significativas no RNAm do *Grin1*. Além disso, de acordo com o nosso estudo, dados anteriores

também demonstraram um aumento significativo do RNAm do *Grin2a* no córtex frontal do modelo subcrônico de PCP de ratos *Sprague-Dawley* fêmeas e machos quando comparados aos tratados com solução salina (ANASTASIO; JOHNSON, 2008), bem como no córtex cerebral quando comparado ao cerebelo (SIRCAR; FOLLESA; TICKU, 1996). Além disso, esse último estudo também mostrou um nível aumentado de RNAm do *Grin2b* no córtex de ratos machos (SIRCAR; FOLLESA; TICKU, 1996), similarmente aos nossos achados que encontraram aumento do RNAm do *Grin2b* no CPF de ratos tratados com PCP quando comparados ao veículo. Esses resultados corroboram a nossa hipótese de que o PCP, um antagonista do NMDAR, pode produzir uma regulação positiva compensatória das subunidades do NMDAR nos tecidos cerebrais como demonstrado anteriormente (ANASTASIO; JOHNSON, 2008; HABERNY *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2011; LU *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2001).

As ratas tratadas com PCP apresentaram menor expressão da proteína NR1 no CPF e no hipocampo quando comparados ao grupo tratado com veículo. Contrariamente aos nossos resultados, outros achados demonstraram que filhotes de ratos submetidos ao tratamento subcrônico de PCP (10 mg/kg, 3 dias) apresentaram níveis aumentados de proteína NR1 e NR2a no córtex frontal (ANASTASIO; JOHNSON, 2008), bem como da proteína NR1 na prole de mães de ratos tratados com PCP no CPF e hipocampo quando comparados aos controles (LU *et al.*, 2010). Portanto, apesar da diferença entre o nosso estudo e os citados acima, enfatizamos dois fatores: (i) a dose utilizada que foi muito maior nos dois estudos (10 mg/kg e 20 mg/kg, respectivamente) e (ii) a idade dos animais. Além disso, ambos analisaram os efeitos imediatos do medicamento, enquanto permitimos que o período de lavagem de sete dias evitasse a influência no comportamento pelos efeitos diretos do medicamento ou pelos efeitos da abstinência ao mesmo.

Além disso, as ratas submetidas ao tratamento subcrônico do PCP mostraram concentrações reduzidas de proteína NR1 nos tecidos cerebrais, da mesma forma que as baixas concentrações plasmáticas de NR1 que encontramos em pacientes em PEP (LOUREIRO *et al.*, 2018). Considerando esse aspecto, podemos sugerir que esse modelo animal possa representar as alterações moleculares dos estágios iniciais da esquizofrenia. No entanto, a proteína NR2 inalterada em ambos os tecidos cerebrais de ratas submetidas ao PCP pode ser considerada uma limitação de nosso estudo, uma vez que não investigamos separadamente as subunidades NR2a e NR2b nesse modelo.

Em relação a medida global de metilação do DNA, o nosso grupo demonstrou que os animais submetidos ao tratamento subcrônico de PCP não apresentaram diferença significativa em relação a metilação do *Line-1* em relação aos controles (FACHIM *et al.*, 2016). Até o

momento, não há outros estudos demonstrando a associação entre a metilação do *Line-1* e a administração de PCP. No entanto, nosso estudo mostrou que os animais submetidos ao tratamento subcrônico de PCP aumentaram a metilação do DNA nos locais promotores dos genes *Grin1* e *Grin2b* do NMDAR, independentemente de qualquer mudança global na metilação do DNA determinada pela metilação do *Line-1* e são semelhantes às nossas observações no outro modelo animal da esquizofrenia - exposição à criação de isolamento social pós-desmame (LOUREIRO *et al.*, 2020b), demonstrado anteriormente.

A hipermetilação do *Grin1* ocorreu no CpG3 do CPF e nos CpG3 e CpG4 do hipocampo de ratas tratadas com PCP quando comparadas aos controles. Nesses CpGs, existem locais de ligação para fatores de transcrição promotores como o Sp1 e o E2F-1, ambos envolvidos nos processos biológicos (DEGREGORI *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2017) e influenciados pela metilação do DNA (CAO; JEAN; WILLIAMS, 2000; JIANG *et al.*, 2019). Nossos dados sugerem que a hipermetilação do *Grin1* pode afetar os locais de ligação dos fatores de transcrição, reduzindo a expressão da proteína NR1 nas duas áreas do cérebro de ratas submetidas ao tratamento de PCP.

Em relação ao *Grin2b*, encontramos hipermetilação no CpG3 do CPF de ratas tratadas com PCP subcrônico, onde existem locais de ligação para o fator de transcrição promotor E2F-1. Além disso, as ratas submetidas ao PCP apresentaram hipermetilação do *Grin2b* no CpG4 dos tecidos CPF e hipocampo. No CpG4, tem-se locais de ligação para dois fatores de transcrição, entre eles a família Zic1 e Pax (Pax 5, 6 e 9a-b). A família Pax tem um papel fundamental nos estágios iniciais do desenvolvimento animal (BOUCHARD *et al.*, 2010; OHTSUKA *et al.*, 2013), enquanto o Zic1 é essencial para o desenvolvimento adequado e tem alta afinidade com a ligação ao DNA (POUREBRAHIM *et al.*, 2007). Também encontramos uma correlação entre a metilação do *Grin2b* e a proteína NR2 no hipocampo de ratas em tratamento com PCP, sugerindo que o aumento da metilação do *Grin2b* pode interceder negativamente na proteína NR2, apoiando o efeito do antagonismo subcrônico pelo PCP no NMDAR. Esses achados também suportam nossos dados anteriores de ratos submetidos ao isolamento social que mostraram hipermetilação nos genes promotores *Grin1* e *Grin2b* quando comparados aos controles (LOUREIRO *et al.*, 2020b).

Assim, estes dois modelos animais demonstraram mudanças consistentes na metilação do DNA nos genes do NMDAR que provavelmente influenciam a expressão e função do receptor, demonstrando a importância potencial dos mecanismos epigenéticos na fisiopatologia da esquizofrenia. No entanto, devemos mencionar que outros mecanismos moleculares como outros fatores pós-transcricionais (acetilação de histonas, fosforilação ou hidroxilação) ou

microRNAs também podem causar alterações na expressão das subunidades do NMDAR (COYLE, 2009; KOCERH *et al.*, 2009).

Até onde sabemos, nenhum dos estudos anteriores citados acima investigou as expressões de RNAm e/ou proteína do NMDAR e as mudanças epigenéticas no modelo animal PCP de esquizofrenia. Sendo o nosso modelo animal caracterizado por tratamento farmacológico, essas alterações na metilação podem ser decorrentes do efeito do tratamento. Além disso, encontramos mudanças na expressão de RNAm e proteína das subunidades do NMDAR, sugerindo que mudanças na metilação podem estar subjacentes a essas alterações.

10.4.1. Limitações

Limitações devem ser consideradas. Primeiro, incluímos apenas ratas em nosso estudo, em que a maturação hormonal e comportamental ocorre precocemente em relação aos machos, bem como, apresentam diferenças gerais nas concentrações de glutamato nas regiões do cérebro refletindo em diferentes padrões de sinalização do NMDAR quando comparadas aos machos (WICKENS; BANGASSER; BRIAND, 2018). Em segundo lugar, não investigamos as expressões das proteínas NR2a e NR2b separadamente nos tecidos cerebrais, que têm papéis diferentes durante os estágios iniciais de desenvolvimento no sistema glutamatérgico (BARSHIRA; MAOR; CHECHIK, 2015; MYERS *et al.*, 2019a). Outra limitação está relacionada à ausência de investigação da relação entre a expressão cerebral e sanguínea e a metilação do DNA nesse modelo animal.

10.5. CONCLUSÃO

Nossos resultados reforçam a validade do modelo e, adicionalmente, os nossos achados destacam a importância de como o tratamento subcrônico com PCP, um antagonista do NMDAR, resulta em déficits moleculares (alterações na metilação, RNAm e expressão de proteínas) em duas áreas principais do cérebro, de acordo com uma sinalização disfuncional do NMDAR na esquizofrenia.

Considerações Finais

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

11.1. UMA VISÃO INTEGRADA DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ESQUIZOFRENIA E OUTRAS PSICOSES ASSOCIADOS AO NMDAR

A intervenção precoce e a prevenção da progressão dos sintomas da esquizofrenia e outras psicoses são essenciais a fim de evitar uma subsequente deterioração funcional nos indivíduos que desenvolvem esses transtornos. Dessa maneira, tornam-se valiosos os estudos que investigam biomarcadores e mecanismos para aprimorar os conhecimentos da fisiopatologia destes transtornos. Nessa perspectiva, o objetivo principal desta tese foi investigar alterações moleculares associadas às subunidades do NMDAR compreendendo as influências genética, epigenética e ambientais tanto em amostras clínicas quanto em modelos experimentais, a fim de reconhecê-las como candidatas a biomarcadores para esses transtornos.

Os nossos achados reforçam as evidências de que o perfil plasmático reduzido do aminoácido GABA nos pacientes em PEP pode representar uma reação compensatória induzida por prejuízos na neurotransmissão GABAérgica, contribuindo para a fisiopatologia da esquizofrenia e outras psicoses (DE HERT *et al.*, 2009; HARRIS *et al.*, 2013). A investigação das concentrações plasmáticas de aminoácidos também favoreceu a identificação de grupos de alto risco com potencial susceptibilidade à alterações no perfil metabólico, como os irmãos não afetados pela doença, os quais também apresentaram diminuição no perfil plasmático dos aminoácidos GLU, Glx, PRO e aumento do aminoácido TRP, não restritos à psicose.

Por outro lado, os nossos achados não corroboram a hipótese inicial de que as variantes dos genes associadas ao NMDAR são preditores genéticos para esquizofrenia e outras psicoses (DEMONTIS *et al.*, 2011). Os genes do NMDAR podem exercer efeitos mínimos que sozinhos não predispoem geneticamente os indivíduos ao desenvolvimento de psicose, como têm sido sugerido por estudos de GWAS – múltiplos genes de pequeno efeito agem de forma aditiva contribuindo para a patogênese das psicoses (MARANVILLE; COX, 2016; RIPKE *et al.*, 2014; VASSOS *et al.*, 2017; YUE *et al.*, 2011).

O presente estudo também mostrou que pacientes em PEP e seus irmãos não psicóticos apresentaram anormalidades na metilação global do DNA. Sugerimos que a hipermetilação do *LINE-1* pode estar relacionado ao aumento de susceptibilidade nos pacientes e irmãos. Além disso, o trauma na infância induziu hipermetilação do *GRIN1* nos irmãos. No entanto, sugerimos que múltiplos fatores de proteção (os quais não identificamos) podem estar associados com a resiliência dos irmãos ao desenvolvimento de transtornos psicóticos, os quais deveriam ser o foco de estudos futuros.

Além disso, os pacientes em PEP apresentaram redução na metilação do DNA nas sequências promotoras do gene *GRIN2B*, mostrando que este gene pode estar associado à esquizofrenia e à redução de QI nestes pacientes. Assim como o nosso estudo, evidências epigenéticas anteriores tentam correlacionar alterações epigenéticas em níveis globais e em populações comprometidas por algum transtorno psiquiátrico. No entanto, as alterações específicas de genes correlacionados com as mudanças comportamentais permanecem amplamente desconhecidas. Também permanecem obscuros os papéis da metilação do DNA, incluindo as ilhas CpGs, na hipofunção do NMDAR e na composição e função das suas subunidades durante o neurodesenvolvimento. Portanto, neste estudo, tentamos responder a essas perguntas fornecendo novos mecanismos sobre o entendimento da fisiopatologia a fim de possibilitar um direcionamento para futuras intervenções precoces e tratamentos personalizados na esquizofrenia e outras psicoses.

Em relação aos modelos experimentais, este é o primeiro estudo que mostrou uma abordagem integrada do papel das subunidades do NMDAR em dois modelos animais de psicose envolvendo comprometimentos comportamentais, bem como alterações robustas nos genes do NMDAR, como resultado tanto do período de isolamento (estresse precoce) como do efeito do tratamento subcrônico com o PCP. Essas mudanças estão de acordo com nossos achados em humanos que também mostraram alterações moleculares associadas aos genes do NMDAR em pacientes em PEP, comparados aos irmãos e controles, sinalizando uma disfunção do NMDAR na esquizofrenia e outras psicoses. Como os dois modelos animais demonstraram hipermetilação tanto no CPF quanto no hipocampo, tentamos diferenciar os modelos em relação às alterações na expressão protéica das subunidades do NMDAR. Dessa maneira, os nossos resultados permitem inferir que os animais submetidos ao isolamento social podem melhor representar as características de uma psicose de duração longa por apresentar alterações moleculares das subunidades do NMDAR semelhantes às que ocorrem em cérebros de pacientes com esquizofrenia pós-morte (CATTS *et al.*, 2016; KRISTIANSEN *et al.*, 2006). Enquanto que as ratas submetidas ao tratamento subcrônico com PCP mostraram mudanças moleculares similares às encontradas em pacientes em PEP (BALU, 2016; LOUREIRO *et al.*, 2018) ou em modelos de curta duração de estresse (OKADA *et al.*, 2014), sugerindo que esse modelo animal possa representar melhor os estágios iniciais da esquizofrenia.

Dentre todos os nossos achados, a investigação da metilação do DNA foi o mecanismo biológico que nos permitiu uma maior associação entre estudos com humanos e modelos experimentais. Observamos em humanos a hipometilação na região promotora do gene *GRIN2B* em pacientes em primeiro episódio de esquizofrenia e ela é independente do trauma

na infância. Portanto, a redução da metilação do *GRIN2B* foi associado com a psicose. Já nos animais, encontramos aumento na metilação do DNA na região promotora do gene *Grin2b* tanto em ratos submetidos ao isolamento social desde o desmame quanto em ratas tratadas com PCP subcrônico. Esta direção oposta da metilação do DNA entre humanos e animais pode ser explicada pelas diferentes sequências de DNA estudadas. Em humanos, a metilação geral diminuída foi encontrada na região do promotor *GRIN2B*, onde há um fator de transcrição que exerce efeitos negativos na expressão gênica. Por outro lado, nos animais, o aumento na metilação da região do promotor *Grin2b* pode estar associado a locais de ligação para fatores de transcrição que aumentam a expressão gênica. Assim, diferentes padrões de metilação do DNA podem promover deficiências distintas na regulação da expressão e função dos genes do NMDAR. Reforçamos que esta é a primeira evidência que confirma o envolvimento epigenético do gene *GRIN2B* do NMDAR no primeiro episódio de esquizofrenia e em modelos animais de psicose como um fator biológico potencialmente funcional.

11.1.1. Limitações

Neste estudo translacional, tentamos investigar os mecanismos moleculares envolvidos na esquizofrenia e outras psicoses como uma possibilidade de compensar as limitações dos estudos humanos pós-morte. No entanto, devemos ressaltar que existem limitações em ambos os modelos para modelar a hipofuncionalidade do NMDAR. Primeiro, devemos nos questionar se as alterações induzidas farmacologicamente no cérebro são uma representação verdadeira do circuito neural disfuncional em pacientes com esquizofrenia e outras psicoses. Estudos futuros devem abordar os transtornos psicóticos como distúrbios do neurodesenvolvimento, administrando antagonistas do NMDAR no período pré- ou pós-natal e examinar os seus impactos no comportamento e nos circuitos neurais durante o neurodesenvolvimento. Segundo, os fenótipos comportamentais e neurofisiológicos exibidos em modelos animais, não correspondem especificamente aos sintomas presentes na esquizofrenia e outras psicoses, assim como a própria hipofunção do NMDAR pode gerar diferentes condições neurológicas e psiquiátricas que não correspondem necessariamente aos sintomas dos transtornos psicóticos. Em terceiro, ressaltamos que ambos os modelos experimentais cumpriram os critérios para as validades de constructo e preditiva. Quanto a validade de face, os animais demonstram alguns comportamentos, como hiperlocação e déficit cognitivo, que podem se assemelhar aos pacientes em PEP quanto a agitação psicomotora e déficit intelectual. No entanto, os sintomas psicóticos ainda não são reproduzíveis por esses modelos, devido a complexidade da natureza subjetiva dos transtornos psiquiátricos que são sintomas particularmente de experiências

humanas. Em relação ao estudo com humanos, ressaltamos que o estudo foi de delineamento transversal, o que nos impossibilitou de estabelecer relações causais e/ou temporais. Consideramos que o tamanho amostral utilizado para análises de variantes e metilação podem refletir baixa precisão e representatividade. No entanto, a análise de poder com base em estudos anteriores clínicos e pré-clínicos de metilação de DNA indica que o nosso tamanho amostral foi adequado para fornecer um poder de 90% (para detectar uma diferença média de 30% da variância) com um nível de significância bilateral de 0,05 (Stata Corp).

Devemos também considerar que a heterogeneidade da amostra em relação à idade, sexo, duração da psicose, tratamento farmacológico e uso de substâncias psicoativas podem ser consideradas potenciais confundidores. Contudo, em análises secundárias controlando essas covariáveis, nenhuma diferença significativa foi encontrada. Outra limitação está relacionada à ausência de um padrão de coleta nas amostras de sangue periférico, como coletas em jejum que podem influenciar nas concentrações plasmáticas, principalmente, dos aminoácidos associados a fatores metabólicos. Utilizamos ainda dados sócio-demográficos e clínicos provenientes de questionários auto-referidos, os quais podem gerar viés de recordações dada a avaliação retrospectiva, por exemplo, da história de maus-tratos na infância. Não investigamos também o histórico de sintomas psicóticos nos pais dos controles da comunidade, que pode indicar uma maior susceptibilidade genética naqueles cujos pais apresentaram sintomas psicóticos ao longo da vida ou possuem algum diagnóstico de transtorno psicótico atual. Por fim, não exploramos quais possíveis fatores de proteção poderiam estar envolvidos na esquizofrenia e outras psicoses e, principalmente, na amostra de irmãos não afetados pela doença.

11.1.2. Pontos fortes

Primeiramente, a metodologia utilizada em nosso estudo humano merece destaque. Nós recrutamos uma amostra de pacientes baseada na primeira manifestação do episódio psicótico, considerada uma boa estratégia em investigações que envolvem marcadores biológicos, pois ela reduz os riscos para viés de seleção e possíveis fatores de confusão relacionados à longa duração de psicose ou ao tratamento farmacológico prolongado. Em nosso estudo também incluímos os irmãos desses pacientes, considerados um grupo de risco intermediário entre os pacientes e controles, tanto para os fatores ambientais quanto biológicos. Considerando que os irmãos desempenham um papel importante durante o desenvolvimento no início da vida adulta e, na maioria das vezes, são os cuidadores responsáveis pelo processo de ajustamento da família no adoecimento do paciente, devemos destacar que podem existir outros fatores que os protegem do desenvolvimento da psicose. Assim, investigar as marcas epigenéticas foi

essencial para discriminar os fatores de risco ambientais que podem aumentar as chances de desenvolvimento da esquizofrenia. Por fim, a inclusão de uma amostra de controles da comunidade favoreceu a consolidação dos resultados como uma amostra representativa da população.

Em segundo lugar, ao investigar nos modelos animais (ambiental e farmacológico) os mesmos mecanismos moleculares que examinamos nos humanos, podemos verificar se as alterações encontradas nos pacientes em PEP são estendidas aos modelos e também se elas são específicas de tecido ou não, uma vez que a análise do perfil de metilação das proteínas relacionadas ao NMDAR foi feita tanto em amostras de sangue periférico de animais, como em áreas cerebrais específicas envolvidas na esquizofrenia e outras psicoses, permitindo a correlação entre o SNC e a periferia.

O nosso estudo favoreceu a compreensão de alguns fatores de risco que desencadeiam a disfunção do NMDAR e os déficits comportamentais, ampliando a compreensão do papel crucial dos genes do NMDAR nos transtornos psicóticos. Portanto, a originalidade está na investigação translacional cérebro-sangue que permitiu o entendimento de mecanismos genético-epigenético-ambientais relacionados aos genes do NMDAR, úteis na identificação de potenciais biomarcadores da fisiopatologia da esquizofrenia e outras psicoses e desenvolvimento de alvos farmacológicos

Conclusão

12. CONCLUSÃO

Nossos resultados acrescentam evidências que implicam a disfunção de genes do NMDAR na esquizofrenia e outras psicoses, bem como o envolvimento do trauma na infância na metilação do DNA como fatores de risco para desenvolver a psicose.

12.1. ESTUDOS EM HUMANOS

a) Pacientes em PEP podem ser caracterizados por uma redução no perfil plasmático do aminoácido GABA. Irmãos não psicóticos apresentaram concentrações reduzidas dos aminoácidos GLU, Glx e PRO, bem como aumento do aminoácido TRP, sendo um possível grupo de risco para anormalidades metabólicas que não se restringem às psicoses.

b) Apesar da perda de significância estatística após a correção múltipla, a variante G da SNV rs1805502 do gene *GRIN2B* deve ser investigada em estudos com tamanhos amostrais maiores compostos por irmãos não afetados de pacientes em PEP para comparar as frequências das variantes genéticas associadas aos genes do NMDAR.

c) Pacientes em PEP e os irmãos não psicóticos apresentaram hipermetilação do *LINE-1*, indicando aumento da metilação global conferindo maior vulnerabilidade em ambos os grupos. Pacientes em PEP apresentaram diminuição da metilação do DNA no promotor do gene *GRIN2B* e essa redução foi correlacionada com o QI, demonstrando que o gene *GRIN2B* está associado a psicose e pode ser um potencial marcador biológico para os transtornos psicóticos.

d) Trauma na infância não foi associado a alterações de metilação do DNA dos genes *GRIN1*, *GRIN2A* e *GRIN2B* em pacientes em PEP. Trauma na infância foi associado à hipermetilação de *GRIN1* em irmãos e à hipometilação de *GRIN2B* em controles. Os efeitos opostos do trauma na infância sobre a metilação do gene *GRIN2B* em irmãos e controles podem refletir mecanismos biológicos de vulnerabilidade e resiliência ao estresse no início da vida, respectivamente.

e) Os indivíduos portadores das variantes genéticas para os genes *GRIN1* e *GRIN2B* podem apresentar maior probabilidade de alterações na metilação e concentrações dos aminoácidos TRP e GLU.

12.2. ESTUDOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS

a) Os ratos em isolamento social mostraram diminuição dos genes *Grin1*, *Grin2a* e *Grin2b* no CPF, enquanto que as ratas submetidas à administração subcrônica de PCP apresentaram aumento na expressão de mRNA dos genes *Grin2a* e *Grin2b* no CPF. Esses

resultados reforçam que ambos os modelos animais podem causar uma disfunção nos genes do NMDAR que favorecem o desenvolvimento de déficits cognitivos vistos nas psicoses.

b) Nosso estudo mostrou que tanto os animais submetidos ao isolamento social quanto ao tratamento subcrônico com PCP apresentaram aumento na metilação dos genes *Grin1* e *Grin2b* em duas áreas cerebrais implicadas nas psicoses. Essas alterações foram independentes de qualquer mudança na metilação global do DNA determinada pelo *Line-1*.

c) A expressão proteica da subunidade NR1 foi alterada em ambos os modelos animais, porém em direções opostas (aumento de NR1 no hipocampo e sangue de ratos em isolamento social e redução de NR1 no CPF e hipocampo de ratas submetidas ao tratamento com PCP subcrônico). No entanto, apesar dos efeitos distintos dos modelos propostos (ambiental e farmacológico) sobre as subunidades do NMDAR, a alteração na expressão da proteína NR1 em importantes áreas do cérebro pode sinalizar uma disfunção do NMDAR semelhante a que ocorre nas psicoses.

d) Os animais tratados com PCP subcrônico ou em isolamento social apresentaram alterações na metilação do DNA dos genes *Grin1* e *Grin2b*, independentes da metilação do DNA global, que provavelmente influenciaram a expressão e função dos genes do NMDAR, mostrando a importância dos mecanismos epigenéticos na fisiopatologia da esquizofrenia e outras psicoses. Destacamos também a relação cérebro-sangue entre a metilação do DNA e as expressões gênica/proteica nas amostras de ratos isolados.

Diante dos nossos achados, eu ilustro um esquema simplificado do que eu almejei investigar no meu doutorado – a complexidade dos multifatores associados à hipótese glutamatérgica, mais especificamente, às alterações do NMDAR, envolvidos na esquizofrenia e outras psicoses (**Figura 33**).

Figura 33. Fatores genéticos e ambientais relacionados ao NMDAR envolvidos no desenvolvimento da esquizofrenia e outras psicoses

Fonte: Acervo próprio (Figura adaptada do artigo RUTTEN; MILL, 2009).

Referências

REFERÊNCIAS¹

- AAS, M. *et al.* Is cognitive impairment following early life stress in severe mental disorders based on specific or general cognitive functioning? **Psychiatry Research**, v. 198, n. 3, p. 495–500, 2012.
- AAS, M. *et al.* A history of childhood trauma is associated with slower improvement rates: Findings from a one-year follow-up study of patients with a first-episode psychosis. **BMC Psychiatry**, v. 16, n. 1, p. 126, 2016.
- ABDUL-MONIM, Z.; NEILL, J. C.; REYNOLDS, G. P. Sub-chronic psychotomimetic phencyclidine induces deficits in reversal learning and alterations in parvalbumin-immunoreactive expression in the rat. **Journal of Psychopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 198–205, 2007.
- ABDUL-MONIM, Z.; REYNOLDS, G. P.; NEILL, J. C. The effect of atypical and classical antipsychotics on sub-chronic PCP-induced cognitive deficits in a reversal-learning paradigm. **Behavioural Brain Research**, v. 169, n. 2, p. 263–273, 2006.
- AGERBO, E. *et al.* Polygenic risk score, parental socioeconomic status, family history of psychiatric disorders, and the risk for schizophrenia: A Danish population-based study and meta-analysis. **JAMA Psychiatry**, v. 72, n. 7, p. 635–641, 2015.
- AGID, O.; KAPUR, S.; REMINGTON, G. Emerging drugs for schizophrenia. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 13, n. 3, p. 479–495, 2008.
- AHSAN, M. *et al.* The relative contribution of DNA methylation and genetic variants on protein biomarkers for human diseases. **PLoS Genetics**, v. 13, n. 9, p. 1–24, 2017.
- AIDA, T. *et al.* Overstimulation of NMDA receptors impairs early brain development in vivo. **PloS One**, v. 7, n. 5, p. e36853, 2012.
- AKASHI, K. *et al.* NMDA receptor GluN2B (GluR epsilon 2/NR2B) subunit is crucial for channel function, postsynaptic macromolecular organization, and actin cytoskeleton at hippocampal CA3 synapses. **The Journal of neuroscience**, v. 29, n. 35, p. 10869–10882, 2009.
- ALACAM, H. *et al.* miR-181b-5p, miR-195-5p and miR-301a-3p are related with treatment resistance in schizophrenia. **Psychiatry Research**, v. 245, p. 200–206, 2016.
- ALAVIAN-GHAVANINI, A. *et al.* Prenatal Bisphenol A Exposure is Linked to Epigenetic Changes in Glutamate Receptor Subunit Gene Grin2b in Female Rats and Humans. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 11315, 2018.
- ALEMANY, S. *et al.* Childhood adversity and psychosis: Examining whether the association is due to genetic confounding using a monozygotic twin differences approach. **European Psychiatry**, v. 28, n. 4, p. 207–212, 2013.
- ALFIMOVA, M. V. *et al.* The association between the GRIN2B gene and verbal fluency and impairment of abstract thinking in schizophrenia. **Zhurnal Nevrologii i Psihiatrii imeni S.S. Korsakova**, v. 116, n. 4, p. 42–46, 2016.
- ALFIMOVA, M. V. *et al.* A role of interactions between N-methyl-D-aspartate and dopamine receptors in facial emotion recognition impairment in schizophrenia. **Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova**, v. 117, n. 6, p. 47–52, 2017.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023

- ALFREDSSON, G.; WIESEL, F. A. Monoamine metabolites and amino acids in serum from schizophrenic patients before and during sulpiride treatment. **Psychopharmacology**, v. 99, n. 3, p. 322–327, 1989.
- ALLEN, R. M.; YOUNG, S. J. Phencyclidine-induced psychosis. **American Journal of Psychiatry**, v. 135, n. 9, p. 1081–1084, 1978.
- ALLISON, D. B. *et al.* Antipsychotic-induced weight gain: A comprehensive research synthesis. **American Journal of Psychiatry**, v. 156, n. 11, p. 1686–1696, 1999.
- ALVARADO-CRUZ, I. *et al.* Environmental Epigenetic Changes, as Risk Factors for the Development of Diseases in Children: A Systematic Review. **Annals of Global Health**, v. 84, n. 2, p. 212–224, 2018.
- ALVAREZ-JIMENEZ, M. *et al.* Prediction of a single psychotic episode: A 7.5-year, prospective study in first-episode psychosis. **Schizophrenia Research**, v. 125, n. 2–3, p. 236–246, 2011.
- ÁLVAREZ, M. J. *et al.* Prevalence and Clinical Impact of Childhood Trauma in Patients With Severe Mental Disorders. **The Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 199, n. 3, p. 156–161, 2011.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders - DSM-5**. 5th ed. 2013
- AMITAI, N. *et al.* Repeated phencyclidine administration alters glutamate release and decreases GABA markers in the prefrontal cortex of rats. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 3, p. 1422–31, 2012.
- ANASTASIO, N. C.; JOHNSON, K. M. Differential regulation of the NMDA receptor by acute and sub-chronic phencyclidine administration in the developing rat. **Journal of Neurochemistry**, v. 104, n. 5, p. 1210–1218, 2008.
- ANDERZHANOVA, E.; KIRMEIER, T.; WOTJAK, C. T. Animal models in psychiatric research: The RDoC system as a new framework for endophenotype-oriented translational neuroscience. **Neurobiol Stress**, v. 7, p. 47–56, 2017.
- ANDREOU, C.; BORGWARDT, S. Structural and functional imaging markers for susceptibility to psychosis. **Mol Psychiatry**, v. 25, n. 11, p. 2773–2785, 2020.
- ANJUM, S. *et al.* Metabolic syndrome in drug naïve schizophrenic patients. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 12, n. 2, p. 135–140, 2018.
- ARNOLD, P. D. *et al.* Glutamate receptor gene (GRIN2B) associated with reduced anterior cingulate glutamatergic concentration in pediatric obsessive-compulsive disorder. **Psychiatry Res**, v. 172, n. 2, p. 136–139, 2009.
- ARRÚE, A. *et al.* GABA and homovanillic acid in the plasma of schizophrenic and bipolar i patients. **Neurochemical Research**, v. 35, n. 2, p. 247–253, 2010.
- AWADALLA, P. *et al.* Direct measure of the de novo mutation rate in autism and schizophrenia cohorts. **American journal of human genetics**, v. 87, n. 3, p. 316–324, 2010..
- BADANICH, K. A. *et al.* NR2B-deficient mice are more sensitive to the locomotor stimulant and depressant effects of ethanol. **Genes, Brain and Behavior**, v. 10, n. 7, p. 805–816, 2011.
- BADAWY, A. A. B. Modulation of Tryptophan and Serotonin Metabolism as a Biochemical Basis of the Behavioral Effects of Use and Withdrawal of Androgenic-Anabolic Steroids and Other Image- and Performance-Enhancing Agents. **International journal of tryptophan**

research, v. 11, p. 1178646917753422, 2018.

BADING, H. Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 9, p. 593–608, 2013.

BAI, G.; HOFFMAN, P. W. **Transcriptional Regulation of NMDA Receptor Expression**. CRC Press/Taylor & Francis, 2009.

BAIER, P. C. *et al.* Early postnatal depletion of NMDA receptor development affects behaviour and NMDA receptor expression until later adulthood in rats—A possible model for schizophrenia. **Behavioural Brain Research**, v. 205, n. 1, p. 96–101, 2009.

BALU, D. T. The NMDA Receptor and Schizophrenia: From Pathophysiology to Treatment. **Advances in pharmacology**, v. 76, p. 351–382, 2016.

BALU, Darrick T. *et al.* Multiple risk pathways for schizophrenia converge in serine racemase knockout mice, a mouse model of NMDA receptor hypofunction. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 110, n. 26, p. E2400-9, 2013.

BANERJEE, N. *et al.* Recently evolved human-specific methylated regions are enriched in schizophrenia signals. **BMC Evolutionary Biology**, v. 18, n. 1, p. 63, 2018.

BANI-FATEMI, A. *et al.* Interaction between methylation and CpG single-nucleotide polymorphisms in the HTR2A gene: Association analysis with suicide attempt in schizophrenia. **Neuropsychobiology**, v. 73, n. 1, p. 10–15, 2016.

BANI-FATEMI, A. *et al.* Epigenome-wide association study of suicide attempt in schizophrenia. **J Psychiatr Res**, v. 104, p. 192–197, 2018.

BARONET, AM. Factors associated with caregiver burden in mental illness: A critical review of the research literature. **Clin. Psychol. Rev**, v. 19, n. 7, p. 819–841, 1999.

BAR-SHIRA, O.; MAOR, R.; CHECHIK, G. Gene Expression Switching of Receptor Subunits in Human Brain Development. **PLoS computational biology**, v. 11, n. 12, p. e1004559, 2015.

BASU, A. C. *et al.* Targeted disruption of serine racemase affects glutamatergic neurotransmission and behavior. **Molecular psychiatry**, v. 14, n. 7, p. 719–727, 2009.

BAUMEISTER, D. *et al.* Childhood trauma and adulthood inflammation: a meta-analysis of peripheral C-reactive protein, interleukin-6 and tumour necrosis factor- α . **Molecular psychiatry**, v. 21, n. 5, p. 642–649, 2016.

BAYRAKTAR, G.; KREUTZ, M. R. Neuronal DNA Methyltransferases: Epigenetic Mediators between Synaptic Activity and Gene Expression? **Neuroscientist**, v. 24, n. 2, p. 171–185, 2018.

BESSEY, S. *et al.* Colocalization of distinct NMDA receptor subtypes at excitatory synapses in the entorhinal cortex. **Journal of Neurophysiology**, v. 121, n. 1, p. 238–254, 2019.

BEGNI, S. *et al.* Association between the G1001C polymorphism in the GRIN1 gene promoter region and schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 53, n. 7, p. 617–619, 2003.

BELL, J. T. *et al.* DNA methylation patterns associate with genetic and gene expression variation in HapMap cell lines. **Genome Biol**, v. 12, n. 1, p. R10, 2011.

BENTALL, R. P. *et al.* Do Specific Early-Life Adversities Lead to Specific Symptoms of Psychosis? A Study from the 2007 The Adult Psychiatric Morbidity Survey. **Schizophrenia Bulletin**, v. 38, n. 4, p. 734–740, 2012.

BERG, L. K. *et al.* Pre-and postsynaptic localization of NMDA receptor subunits at hippocampal mossy fibre synapses. **Neuroscience**, v. 230, p. 139–150, 2013.

- BERNSTEIN, D. P. *et al.* Development and validation of a brief screening version of the Childhood Trauma Questionnaire. **Child Abuse and Neglect**, v. 27, n. 2, p. 169–190, 2003.
- BERRY, K. *et al.* Trauma in relation to psychosis and hospital experiences: The role of past trauma and attachment. **Psychology and Psychotherapy: Theory, Research and Practice**, v. 88, n. 3, p. 227–239, 2015.
- BERTHELOT, N. *et al.* Childhood abuse and neglect may induce deficits in cognitive precursors of psychosis in high-risk children. **J Psychiatry Neurosci**, v. 40, n. 5, 2015.
- BIAN, Q. *et al.* The effect of atypical antipsychotics, perospirone, ziprasidone and quetiapine on microglial activation induced by interferon-gamma. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, n. 1, p. 42–48, 2008.
- BIOQUE, M. *et al.* Evolution of metabolic risk factors over a two-year period in a cohort of first episodes of psychosis. **Schizophrenia Research**, v. 193, p. 188–196, 2018.
- BITANHIRWE, B. K. Y. *et al.* Glutamatergic deficits and parvalbumin-containing inhibitory neurons in the prefrontal cortex in schizophrenia. **BMC psychiatry**, v. 9, p. 71, 2009.
- BJERKENSTEDT, L. *et al.* Support for limited brain availability of tyrosine in patients with schizophrenia. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 9, n. 2, p. 247–55, 2006.
- BLAKE, J. A.; ZIMAN, M. R. Pax genes: regulators of lineage specification and progenitor cell maintenance. **Development**, v. 141, n. 4, p. 737–751, 2014.
- BLATTLER, A.; FARNHAM, P. J. Cross-talk between site-specific transcription factors and DNA methylation states. **J Biol Chem**, v. 288, n. 48, p. 34287–94, 2013.
- BOLDYREV, A. A.; BRYUSHKOVA, E. A.; VLADYCHENSKAYA, E. A. NMDA receptors in immune competent cells. **Biochemistry**, v. 77, n. 2, p. 128–134, 2012.
- BONOLDI, I. *et al.* Prevalence of self-reported childhood abuse in psychosis: A meta-analysis of retrospective studies. **Psychiatry Research**, v. 210, n. 1, p. 8–15, 2013.
- BOUCHARD, M. *et al.* Pax2 and Pax8 cooperate in mouse inner ear morphogenesis and innervation. **BMC Developmental Biology**, v. 10, n. 1, p. 89, 2010.
- BRENHOUSE, H. C.; SONNTAG, K. C.; ANDERSEN, S. L. Transient D1 dopamine receptor expression on prefrontal cortex projection neurons: Relationship to enhanced motivational salience of drug cues in adolescence. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 10, p. 2375–2382, 2008.
- BRIGMAN, J. L. *et al.* Impaired discrimination learning in mice lacking the NMDA receptor NR2A subunit. **Learning and Memory**, v. 15, n. 2, p. 50–54, 2008.
- BRIGMAN, J. L. *et al.* GluN2B in corticostriatal circuits governs choice learning and choice shifting. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 8, p. 1101–1110, 2013.
- BRIGMAN, J. L.; GRAYBEAL, C.; HOLMES, A. Predictably irrational: Assaying cognitive inflexibility in mouse models of schizophrenia. **Frontiers in Neuroscience**, v. 4, n. MAY, p. 19–28, 2010.
- BRÖER, S.; BRÖER, A. Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 12, p. 1935–1963, 2017.
- BROMBERG, A. *et al.* No association between global leukocyte DNA methylation and homocysteine levels in schizophrenia patients. **Schizophrenia Research**, v. 101, n. 1–3, p. 50–57, 2008.

- BRYOIS, J. *et al.* Evaluation of chromatin accessibility in prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. **Nat Commun.**, v. 9, n. 1, p. 3121, 2018.
- BURGHARDT, K. J. *et al.* Antipsychotic Medications and DNA Methylation in Schizophrenia and Bipolar Disorder: A Systematic Review. **Pharmacotherapy**, v. 40, n. 4, p. 331–342, 2020.
- CADINU, D. *et al.* NMDA receptor antagonist rodent models for cognition in schizophrenia and identification of novel drug treatments, an update. **Neuropharmacology**, v. 142, p. 41–62, 2018.
- CAI, H. L. L. *et al.* Elevated plasma γ -aminobutyrate/glutamate ratio and responses to risperidone antipsychotic treatment in schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 7, p. 1273–1278, 2010.
- CAI, J. *et al.* Influence of polymorphisms in genes SLC1A1, GRIN2B, and GRIK2 on clozapine-induced obsessive-compulsive symptoms. **Psychopharmacology**, v. 230, n. 1, p. 49–55, 2013.
- CAO, B. *et al.* Characterizing amino-acid biosignatures amongst individuals with schizophrenia: a case-control study. **Amino Acids**, v. 50, p. 1013–1023, 2018.
- CAO, Y. X.; JEAN, J. C.; WILLIAMS, M. C. Cytosine methylation of an Sp1 site contributes to organ-specific and cell-specific regulation of expression of the lung epithelial gene T1 α . **Biochem. J.**, v. 350 Pt3, n. Pt 3, p. 883–90, 2000.
- CAPPELLETTI, P. *et al.* Proline oxidase controls proline, glutamate, and glutamine cellular concentrations in a U87 glioblastoma cell line. **PLoS One**, v. 13, n. 4, p. e0196283, 2018.
- CARIAGA-MARTINEZ, A.; SAIZ-RUIZ, J.; ALELÚ-PAZ, R. From Linkage Studies to Epigenetics: What We Know and What We Need to Know in the Neurobiology of Schizophrenia. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, p. 202, 2016.
- CASTAÑÉ, A.; SANTANA, N.; ARTIGAS, F. PCP-based mice models of schizophrenia: Differential behavioral, neurochemical and cellular effects of acute and subchronic treatments. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 21–22, p. 4085–4097, 2015.
- CATTS, S. V. **Psychotomimetic effects of PCP, LSD, and Ecstasy: Pharmacological models of schizophrenia?** Chapter 10. Cambridge University Press, p. 141–168, 2010.
- CATTS, V. S. *et al.* A quantitative review of the postmortem evidence for decreased cortical N-methyl-d-aspartate receptor expression levels in schizophrenia: How can we link molecular abnormalities to mismatch negativity deficits? **Biol Psychol**, v. 116, p. 57–67, 2016.
- CHANASONG, R. *et al.* Genetic variation of GRIN1 confers vulnerability to methamphetamine-dependent psychosis in a Thai population. **Neuroscience Letters**, v. 551, p. 58–61, 2013.
- CHAPMAN, M. R.; VAUSE, H. E. Anti-NMDA receptor encephalitis: diagnosis, psychiatric presentation, and treatment. **Am J Psychiatry**, v. 168, n. 3, p. 245–251, 2011.
- CHIAPPONI, C. *et al.* GABA system in schizophrenia and mood disorders: A mini review on third-generation imaging studies. **Front Psychiatry**, v. 7, p. 61, 2016.
- CHO, S. E. *et al.* Low D-serine levels in schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. **Neuroscience Letters**, v. 634, p. 42–51, 2016.
- CHOI, Y. K.; TARAZI, F. I. Alterations in dopamine and glutamate neurotransmission in tetrahydrobiopterin deficient spr-/mice: Relevance to schizophrenia. **BMB Reports**, v. 43, n. 9, p. 593–598, 2010.

- COBALEDA, C. *et al.* Pax5: The guardian of B cell identity and function. **Nature Immunology**, v. 8, n. 5, p. 463–470, 2007.
- COELHO, R. *et al.* Childhood maltreatment and inflammatory markers: a systematic review. **Acta Psychiatr Scand**, v. 129, n. 3, p. 180–192, 2014.
- COHEN, J. **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences** Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences, 2013.
- COHEN, S. M. *et al.* The impact of NMDA receptor hypofunction on GABAergic neurons in the pathophysiology of schizophrenia. **Schizophrenia Research**, Seção 1–3, p. 98–107, 2015..
- CONUS, P. *et al.* Pretreatment and outcome correlates of past sexual and physical trauma in 118 bipolar I disorder patients with a first episode of psychotic mania. **Bipolar Disorders**, v. 12, n. 3, p. 244–252, 2010.
- CORSI-ZUELLI, F. *et al.* Prolonged Periods of Social Isolation From Weaning Reduce the Anti-inflammatory Cytokine IL-10 in Blood and Brain. **Frontiers in neuroscience**, v. 12, p. 1011, 2018.
- CORSI-ZUELLI, F. *et al.* Cytokine profile in first-episode psychosis, unaffected siblings and community-based controls: The effects of familial liability and childhood maltreatment. **Psychological Medicine**, n. May, p. 1–9, 2020.
- CORSI-ZUELLI, F. M. *et al.* Neuroimmune interactions in schizophrenia: focus on vagus nerve stimulation and activation of the alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 618, 2017.
- COSGROVE, J.; NEWELL, T. G. Recovery of neuropsychological functions during reduction in use of phencyclidine. **Journal of Clinical Psychology**, v. 47, n. 1, p. 159–169, 1991.
- COYLE, J. T. MicroRNAs suggest a new mechanism for altered brain gene expression in schizophrenia. **Proc Natl Acad of Sci USA**, v. 106, n. 9, p. 2975–6, 2009.
- CRESPO-FACORRO, B. *et al.* Interleukin-12 plasma levels in drug-naïve patients with a first episode of psychosis: Effects of antipsychotic drugs. **Psychiatry Research**, v. 158, n. 2, p. 206–216, 2008.
- CRIPPA, J. A. *et al.* A structured interview guide increases Brief Psychiatric Rating Scale reliability in raters with low clinical experience. **Acta Psychiatr Scand**, v. 103, n. 6, p. 465–470, 2001.
- CUI, Y. *et al.* Forebrain NR2B overexpression facilitating the prefrontal cortex long-term potentiation and enhancing working memory function in mice. **PLoS One**, v. 6, n. 5, 2011.
- CULL-CANDY, S.; BRICKLEY, S.; FARRANT, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. **Curr Opin Neurobiol**, v. 11, n. 3, p. 327–335, 2001.
- CULL-CANDY, S.; KELLY, L.; FARRANT, M. Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 16, n. 3, p. 288–297, 2006.
- CULLEN, A. E. *et al.* Associations Between Non-neurological Autoimmune Disorders and Psychosis: A Meta-analysis. **Biological Psychiatry**, v. 85, n. 1, p. 35–48, 2019.
- ĆURČIĆ-BLAKE, B. *et al.* Glutamate in dorsolateral prefrontal cortex and auditory verbal hallucinations in patients with schizophrenia: A 1H MRS study. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 78, p. 132–139, 2017.
- DALMAU, J. *et al.* Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated

with ovarian teratoma. **Ann Neurol**, v. 61, n. 1, p. 25–36, 2007.

DALTON, G. L. *et al.* NMDA GluN2A and GluN2B receptors play separate roles in the induction of LTP and LTD in the amygdala and in the acquisition and extinction of conditioned fear. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 2, p. 797–806, 2012.

DAMA, M. *et al.* Short duration of untreated psychosis enhances negative symptom remission in extended early intervention service for psychosis. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 140, n. 1, p. 65–76, 2019.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol**, v. 65, n. 1, p. 1–105, 2001.

DAVID STURGEON, R.; FESSLER, R. G.; MELTZER, H. Y. Behavioral rating scales for assessing phencyclidine-induced locomotor activity, stereotypes behavior and ataxia in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 59, n. 3–4, p. 169–179, 1979.

DAVIES, C. *et al.* Prenatal and perinatal risk and protective factors for psychosis: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Psychiatry**, v. 7, n. 5, p. 399–410, 2020.

DAVIS, J. *et al.* A review of vulnerability and risks for schizophrenia: Beyond the two hit hypothesis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 65, p. 185–194, 2016.

DAVISON, J. *et al.* A systematic review of metabolite biomarkers of schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 195, p. 32–50, 2018.

DAY, J. J.; SWEATT, J. D. Epigenetic modifications in neurons are essential for formation and storage of behavioral memory. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 1, p. 357–8, 2011.

DE HERT, M. *et al.* Metabolic syndrome in people with schizophrenia: a review. **World psychiatry**, v. 8, n. 1, p. 15–22, 2009.

DE LA FUENTE-SANDOVAL, C. *et al.* Prefrontal and Striatal Gamma-Aminobutyric Acid Levels and the Effect of Antipsychotic Treatment in First-Episode Psychosis Patients. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 6, p. 475–483, 2018.

DE LUCA, V. *et al.* Peripheral Amino Acid Levels in Schizophrenia and Antipsychotic Treatment. **Psychiatry Investigation**, v. 5, n. 4, p. 203, 2008.

DEGREGORI, J. *et al.* Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 14, p. 7245–7250, 1997.

DEL-BEN, C. M. *et al.* Confiabilidade da “Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV - Versão Clínica” traduzida para o português. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. 3, p. 156–159, 2001.

DEL-BEN, C. M. *et al.* Urbanicity and risk of first-episode psychosis: incidence study in Brazil. **The British Journal of Psychiatry**, v. 215, n. 6, p. 726–729, 2019.

DEMONTIS, D. *et al.* Association of GRIN1 and GRIN2A-D with schizophrenia and genetic interaction with maternal herpes simplex virus-2 infection affecting disease risk. **American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics**, v. 156B, n. 8, p. 913–922, 2011.

DENIAUD, E. *et al.* Overexpression of Transcription Factor Sp1 Leads to Gene Expression Perturbations and Cell Cycle Inhibition. **PLoS One**, v. 4, n. 9, p. e7035, 2009.

DENIS, D. J. **SPSS Data Analysis for Univariate, Bivariate, and Multivariate Statistics**. 2019.

- DENT, R. *et al.* Changes in body weight and psychotropic drugs: A systematic synthesis of the literature. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e36889, 2012.
- DEVYLDER, J. E. *et al.* Stress Sensitivity and Psychotic Experiences in 39 Low-and Middle-Income Countries. **Schizophrenia Bulletin**, v. 42, n. 6, p. 1353–1362, 2016.
- DI FORTI, M. *et al.* High-potency cannabis and the risk of psychosis. **Br J Psychiatry**, v. 195, n. 6, p. 488–491, 2009.
- DI FORTI, M. *et al.* The contribution of cannabis use to variation in the incidence of psychotic disorder across Europe (EU-GEI): a multicentre case-control study. **The Lancet Psychiatry**, v. 6, n. 5, p. 427–436, 2019.
- DOMINGUES, D. S. *et al.* Simultaneous determination of amino acids and neurotransmitters in plasma samples from schizophrenic patients by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 5, p. 780–787, 2015.
- DONATI, G.; IMBRIANO, C.; MANTOVANI, R. Dynamic recruitment of transcription factors and epigenetic changes on the ER stress response gene promoters. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. 10, p. 3116–27, 2006.
- DU BOIS, T. M. *et al.* Excitatory and inhibitory neurotransmission is chronically altered following perinatal NMDA receptor blockade. **European neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 4, p. 256–265, 2009.
- DUMAS, T. C. Developmental regulation of cognitive abilities: Modified composition of a molecular switch turns on associative learning. **Prog Neurobiol**, v. 76, n. 3, p. 189–211, 2005.
- EGERTON, A. *et al.* Impairment in perceptual attentional set-shifting following PCP administration: A rodent model of set-shifting deficits in schizophrenia. **Psychopharmacology**, v. 179, n. 1, p. 77–84, 2005.
- ERHARDT, S. *et al.* The kynurenine pathway in schizophrenia and bipolar disorder. **Neuropharmacology**, v. 112, p. 297–306, 2017.
- ERMAKOV, E. A. *et al.* Blood-Derived RNA- and microRNA-Hydrolyzing IgG Antibodies in Schizophrenia Patients. **Biochemistry**, v. 83, n. 5, p. 507–526, 2018.
- FACHIM, H. A. *et al.* Subchronic administration of phencyclidine produces hypermethylation in the parvalbumin gene promoter in rat brain. **Epigenomics**, v. 8, n. 9, p. 1179–1183, 2016.
- FACHIM, H. A. *et al.* Parvalbumin promoter hypermethylation in postmortem brain in schizophrenia. **Epigenomics**, v. 10, n. 5, p. 519–524, 2018.
- FACHIM, H. A. *et al.* GRIN2B promoter methylation deficits in early-onset schizophrenia and its association with cognitive function. **Epigenomics**, p. epi-2018-0127, 2019.
- FAN, A. X. *et al.* Genomic and proteomic analysis of transcription factor TFII-I reveals insight into the response to cellular stress. **Nucleic acids research**, v. 42, n. 12, p. 7625–7641, 2014.
- FIEHN, O. Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 2016, p. 30.4.1, 2016.
- FIRST, M. B. *et al.* **Structured Clinical Interview for DSM-IV-TR Axis I Disorders, Clinical Version (SCID-CV)**. New York: Biometrics Research, New York State Psychiatric Institute, 1997.
- FISCHER, A. Epigenetic memory: the Lamarckian brain. **The EMBO journal**, v. 33, n. 9, p. 945–967, 2014.

- FLEISCHHACKER, W. *et al.* Metabolic risk factors in first-episode schizophrenia: baseline prevalence and course analysed from the European First-Episode Schizophrenia Trial. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 5, p. 987–995, 2013.
- FLORES-BARRERA, E. *et al.* Preferential disruption of prefrontal GABAergic function by nanomolar concentrations of the $\alpha 7$ nACh negative modulator kynurenic acid. **Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 33, p. 7921–7929, 2017.
- FONE, K. C.; PORKESS, M. V. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 32, n. 6, p. 1087–1102, 2008.
- FOSTER, K. A. *et al.* Distinct roles of NR2A and NR2B cytoplasmic tails in long-term potentiation. **The Journal of neuroscience**, v. 30, n. 7, p. 2676–2685, 2010.
- FRAGUAS, D. *et al.* Gene-environment interaction as a predictor of early adjustment in first episode psychosis. **Schizophrenia Research**, v. 189, p. 196–203, 2017.
- FRIEDRICH, R. M.; LIVELY, S.; RUBENSTEIN, L. M. Siblings' coping strategies and mental health services: A national study of siblings of persons with schizophrenia. **Psychiatr. Serv**, v. 59, n. 3, p. 261–267, 2008.
- FROMER, M. *et al.* De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. **Nature**, v. 506, n. 7487, p. 179–184, 2014.
- FULLARD, J. F. *et al.* Open chromatin profiling of human postmortem brain infers functional roles for non-coding schizophrenia loci A correction notice has been posted. **Human Molecular Genetics**, v. 26, n. 10, p. 1942–1951, 2017.
- FUSAR-POLI, P. *et al.* Thalamic glutamate levels as a predictor of cortical response during executive functioning in subjects at high risk for psychosis. **Arch Gen Psychiatry**, v. 68, n. 9, p. 881–890, 2011 a.
- FUSAR-POLI, P. *et al.* Neuroanatomy of vulnerability to psychosis: A voxel-based meta-analysis. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 35, n. 5, p. 1175–85, 2011 b.
- FUSAR-POLI, P. *et al.* Abnormal frontostriatal interactions in people with prodromal signs of psychosis: A multimodal imaging study. **Archives of General Psychiatry**, v. 67, n. 7, p. 683–691, 2010.
- FUSAR-POLI, P. *et al.* At Risk for Schizophrenic or Affective Psychoses? A Meta-Analysis of DSM/ICD Diagnostic Outcomes in Individuals at High Clinical Risk. **Schizophr Bull**, v. 39, n. 4, p. 923–932, 2012 a.
- FUSAR-POLI, P. *et al.* Neuroanatomical Maps of Psychosis Onset: Voxel-wise Meta-Analysis of Antipsychotic-Naive VBM Studies. **Schizophrenia Bulletin**, v. 38, n. 6, p. 1297–1307, 2012 b.
- FUSAR-POLI, P. *et al.* Predicting psychosis: Meta-analysis of transition outcomes in individuals at high clinical risk. **Archives of General Psychiatry**, v. 69, n. 3, p. 220–229, 2012 c.
- FUSAR-POLI, P. *et al.* Cognitive functioning in prodromal psychosis: A meta-analysis. **Archives of General Psychiatry**, v. 69, n. 6, p. 562–571, 2012 d.
- FUSAR-POLI, P. *et al.* The Psychosis High-Risk State: A Comprehensive State-of-the-Art. **JAMA Psychiatry**, v. 70, n. 1, p. 107–120, 2013.
- FUSAR-POLI, P.; MEYER-LINDENBERG, A. Striatal Presynaptic Dopamine in

- Schizophrenia, Part II: Meta-Analysis of [18 F/ 11 C]-DOPA PET Studies. **Schizophrenia Bulletin**, v. 39, n. 1, p. 33–42, 2013.
- GALLEGO, J. A. *et al.* Cytokines in cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia spectrum disorders: New data and an updated meta-analysis. **Schizophrenia Research**, v. 202, p. 64–71, 2018.
- GANUTHULA, V. R. R.; SINHA, S. The Looking Glass for Intelligence Quotient Tests: The Interplay of Motivation, Cognitive Functioning, and Affect. **Front Psychol**, v. 10, p. 2857, 2019.
- GAO, X. M. *et al.* Ionotropic glutamate receptors and expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in subregions of human hippocampus: effects of schizophrenia. **Am J Psychiatry**, v. 157, n. 7, p. 1141–1149, 2000.
- GARDNER-SOOD, P. *et al.* Cardiovascular risk factors and metabolic syndrome in people with established psychotic illnesses: baseline data from the IMPaCT randomized controlled trial. **Psychol Med**, v. 45, n. 12, p. 2619–2629, 2015.
- GARIP, B.; KAYIR, H. Alteration in NMDAR-related amino acids in first episode psychosis. **Synapse**, v. 73, n. 11, 2019.
- GASKIN, P. L. *et al.* Down-Regulation of Hippocampal Genes Regulating Dopaminergic, GABAergic, and Glutamatergic Function Following Combined Neonatal Phencyclidine and Post-Weaning Social Isolation of Rats as a Neurodevelopmental Model for Schizophrenia. **The international journal of neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 11, 2016.
- GEDDES, A. E.; HUANG, X. F.; NEWELL, K. A. Reciprocal signalling between NR2 subunits of the NMDA receptor and neuregulin1 and their role in schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 4, p. 896–904, 2011.
- GEDDES, A. E.; HUANG, X. F.; NEWELL, K. A. GluN2B protein deficits in the left, but not the right, hippocampus in schizophrenia. **BMC Psychiatry**, v. 14, n. 1, 2014.
- GELPI, E. *et al.* Combined Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Amino Acid Derivatives. **Journal of Chromatographic Science**, v. 7, n. 10, p. 604–613, 1969.
- GENOVESE, G. *et al.* Increased burden of ultra-rare protein-altering variants among 4,877 individuals with schizophrenia. **Nature Neuroscience**, v. 19, n. 11, p. 1433–1441, 2016.
- GEORGI, A. *et al.* Possible association between genetic variants at the GRIN1 gene and schizophrenia with lifetime history of depressive symptoms in a German sample Susanne Ho. v. 10747050, p. 308–310, 2004.
- GIANFRANCESCO, O.; BUBB, V. J.; QUINN, J. P. Treating the “E” in “G × E”: Trauma-informed approaches and psychological therapy interventions in psychosis. **Frontiers in Psychiatry**, v. 10, n. January, 2019.
- GOEDECKE, S. *et al.* Determination of DNA methylation by COBRA: A comparative study of CGE with LIF detection and conventional gel electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 30, n. 17, p. 3063–3070, 2009.
- GONG, L. *et al.* Sumoylation differentially regulates Sp1 to control cell differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 15, p. 5574–5579, 2014.
- GOTO, N. *et al.* Comparison of brain N-acetylaspartate levels and serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels between patients with first-episode schizophrenia psychosis and healthy controls. **Eur Psychiatry**, v. 26, n. 1, p. 57–63, 2011.

- GOUD ALLADI, C. *et al.* DNA Methylation as a Biomarker of Treatment Response Variability in Serious Mental Illnesses: A Systematic Review Focused on Bipolar Disorder, Schizophrenia, and Major Depressive Disorder. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 10, 2018.
- GRACE, A. A. Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. **Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 524–532, 2016.
- GRACIA-MARCO, L. *et al.* Amino acids intake and physical fitness among adolescents. **Amino Acids**, v. 49, n. 6, p. 1041–1052, 2017.
- GRASSI-OLIVEIRA, R.; STEIN, L. M.; PEZZI, J. C. Tradução e validação de conteúdo da versão em português do Childhood Trauma Questionnaire. **Revista de Saude Publica**, v. 40, n. 2, p. 249–255, 2006.
- GRAYSON, B.; IDRIS, N. F.; NEILL, J. C. Atypical antipsychotics attenuate a sub-chronic PCP-induced cognitive deficit in the novel object recognition task in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 184, n. 1, p. 31–38, 2007.
- GRAYSON, B. *et al.* The involvement of distraction in memory deficits induced by NMDAR antagonism: Relevance to cognitive deficits in schizophrenia. **Behavioural Brain Research**, v. 266, p. 188–192, 2014.
- GRUNDMANN, M.; KACIROVA, I.; URINOVSKA, R. Therapeutic drug monitoring of atypical antipsychotic drugs. **Acta Pharm**, v. 64, n. 4, p. 387–401, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2478/acph-2014-0036>
- GUIDOTTI, A. *et al.* Epigenetic GABAergic targets in schizophrenia and bipolar disorder. **Neuropharmacology**, v. 60, n.7–8, p. 1007–16, 2011.
- GUIDOTTI, A. *et al.* Toward the identification of peripheral epigenetic biomarkers of schizophrenia. **Journal of neurogenetics**, v. 28, n. 1–2, p. 41–52, 2014.
- GULCHINA, Y. *et al.* Epigenetic mechanisms underlying NMDA receptor hypofunction in the prefrontal cortex of juvenile animals in the MAM model for schizophrenia. **Journal of neurochemistry**, v. 143, n. 3, p. 320–333, 2017.
- GUO, X. *et al.* Duration of untreated psychosis is associated with temporal and occipitotemporal gray matter volume decrease in treatment naïve schizophrenia. **PLoS One**, v. 8, n. 12, 2013.
- GUO, Z. *et al.* A study of single nucleotide polymorphisms of GRIN2B in schizophrenia from Chinese Han population. **Neurosci Lett**, v. 630, p. 132–135, 2016.
- HABERNY, K. A. *et al.* Ontogeny of the N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptor System and Susceptibility to Neurotoxicity. **Toxicological Sciences**, v. 68, n. 1, p. 9–17, 2002.
- HAGEN, G. *et al.* Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: A family of Sp1 related genes. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 21, p. 5519–5525, 1992.
- HAIJMA, S. V. *et al.* Brain Volumes in Schizophrenia: A Meta-Analysis in Over 18 000 Subjects. **Schizophrenia Bulletin**, v. 39, n. 5, p. 1129–1138, 2013.
- HALL, F. S. *et al.* The effects of isolation rearing on glutamate receptor NMDAR1A mRNA expression determined by in situ hybridization in Fawn hooded and Wistar rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 73, n. 1, p. 185–191, 2002.
- HANNON, E. *et al.* An integrated genetic-epigenetic analysis of schizophrenia: evidence for co-localization of genetic associations and differential DNA methylation. **Genome biology**, v.

17, n. 1, p. 176, 2016 a.

HANNON, E. *et al.* Methylation quantitative trait loci in the developing brain and their enrichment in schizophrenia-associated genomic regions. **Nat Neurosci**, v. 19, n. 1, p. 48–54, 2016 b.

HARRIS, L. W. *et al.* Schizophrenia: metabolic aspects of aetiology, diagnosis and future treatment strategies. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 6, p. 752–766, 2013.

HARRISON, P. J. Recent genetic findings in schizophrenia and their therapeutic relevance. **Journal of psychopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 85–96, 2015.

HARVEY, P. D. Domains of cognition and their assessment. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 21, n. 3, p. 227–237, 2019.

HEALTHCARE, GE. **Isolation of mononuclear cells Methodology and applications**. Ficoll-Paque, 18-1152-69, 2010.

HEIM, C.; NEMEROFF, C. B. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. **Biol Psychiatry**, v. 49, n. 12, p. 1023–1039, 2001.

HENSON, M. A. *et al.* Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. **Prog Neurobiol**, v. 91, n. 1, p. 23–37, 2010.

HERMAN, J. P.; MUELLER, N. K.; FIGUEIREDO, H. Role of GABA and glutamate circuitry in hypothalamo-pituitary- adrenocortical stress integration. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1018, p. 35–45, 2004.

HERMES, G. *et al.* Post-weaning chronic social isolation produces profound behavioral dysregulation with decreases in prefrontal cortex synaptic-associated protein expression in female rats. **Physiol Behav**, v. 104, n. 2, p. 354–359, 2011.

HILKER, R. *et al.* Heritability of Schizophrenia and Schizophrenia Spectrum Based on the Nationwide Danish Twin Register. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 6, p. 492–498, 2018.

HJORTHØJ, C. *et al.* Years of potential life lost and life expectancy in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Psychiatry**, v. 4, n. 4, p. 295–301, 2017.

HOFFER, L. J. Human Protein and Amino Acid Requirements. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 40, n. 4, p. 460–474, 2014.

HOFFMANN, A.; ZILLER, M. SPENGLER, D. The Future is The Past: Methylation QTLs in Schizophrenia. **Genes (Basel)**, v. 7, n. 12, p. 104, 2016.

HOLLMANN, M. *et al.* Molecular biology of glutamate receptors. Potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor splice variants by zinc. **Ren Physiol Biochem**, v. 17, n. 3–4, p. 182–183, 1994.

HONG, M. *et al.* Transcriptional regulation of the Grp78 promoter by endoplasmic reticulum stress: Role of TFII-I and its tyrosine phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 17, p. 16821–16828, 2005.

HORVATH, S. *et al.* Aging effects on DNA methylation modules in human brain and blood tissue. **Genome Biology**, v. 13, n. 10, p. R97, 2012.

HOWES, O.; MCCUTCHEON, R.; STONE, J. Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century. **J Psychopharmacol**, v. 29, n. 2, p. 97–115, 2015.

HU, C. *et al.* Human GRIN2B variants in neurodevelopmental disorders. **J Pharmacol Sci**, v.

132, n. 2, p. 115–121, 2016.

HU, T. M. *et al.* DNA methylation analysis of the EGR3 gene in patients of schizophrenia. **Psychiatry Research**, v. 251, p. 115–117, 2017.

HU, W. *et al.* The glutamate hypothesis of schizophrenia: evidence from human brain tissue studies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1338, n. 1, p. 38–57, 2015.

HUDSON, M. R. *et al.* NMDA receptors on parvalbumin-positive interneurons and pyramidal neurons both contribute to MK-801 induced gamma oscillatory disturbances: Complex relationships with behaviour. **Neurobiology of Disease**, v. 134, p. 104625, 2020.

HUNG, C. C.; CHEN, H. Y.; CHEN, C. H. Systematic mutation analysis of the human glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate 1 gene (GRIN1) in schizophrenic patients. **Psychiatric Genetics**, v. 12, n. 4, p. 225–230, 2002.

IBRAHIM, H. M. *et al.* Ionotropic glutamate receptor binding and subunit mRNA expression in thalamic nuclei in schizophrenia. **Am J Psychiatry**, v. 157, n. 11, p. 1811–1823, 2000.

İLHAN ATAGÜN, M. *et al.* Perisylvian GABA levels in schizophrenia and bipolar disorder.

IMANIKIA, S. *et al.* Neuronal XBP-1 Activates Intestinal Lysosomes to Improve Proteostasis in *C. elegans*. **Current Biology**, v. 29, n. 14, p. 2322–2338.e7, 2019.

IWAYAMA, Y. *et al.* Analysis of correlation between serum D-serine levels and functional promoter polymorphisms of GRIN2A and GRIN2B genes. **Neurosci Lett**, v. 394, n. 2, p. 101–104, 2006.

JÄÄSKELÄINEN, E. *et al.* A Systematic Review and Meta-Analysis of Recovery in Schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 39, n. 6, p. 1296–1306, 2013.

JAFFE, A. E. *et al.* Mapping DNA methylation across development, genotype, and schizophrenia in the human frontal cortex. **Nat Neurosci**, v. 19, n. 1, p. 40–47, 2016.

JANG, H. S. *et al.* **CpG and non-CpG methylation in epigenetic gene regulation and brain function.**

JAVITT, D. C.; ZUKIN, S. R. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. **Am J Psychiatry**, v. 148, n. 10, p. 1301–1308, 1991 a.

JAVITT, Daniel C. Glutamate and Schizophrenia: Phencyclidine, N-Methyl-d-Aspartate Receptors, and Dopamine-Glutamate Interactions. **Int Rev Neurobiol**, v. 78, p. 69–108, 2007.

JAVITT, D. C.; ZUKIN, S. R. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. **Am J Psychiatry**, v. 148, n. 10, p. 1301–1308, 1991 b.

JENKINS, T. A. *et al.* Disturbances in social interaction occur along with pathophysiological deficits following sub-chronic phencyclidine administration in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 194, n. 2, p. 230–235, 2008.

JENKINS, T. A.; HARTE, Michael K.; REYNOLDS, Gavin P. Effect of subchronic phencyclidine administration on sucrose preference and hippocampal parvalbumin immunoreactivity in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 471, n. 3, p. 144–147, 2010.

JENTSCH, J. D.; ROTH, R. H. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 3, p. 201–225, 1999.

Jia, T. *et al.* Epigenome-wide meta-analysis of blood DNA methylation and its association with subcortical volumes: findings from the ENIGMA Epigenetics Working Group. **Mol.**

Psychiatry, 2019.

JIANG, D. *et al.* Epigenetic silencing of ZNF132 mediated by methylation-sensitive Sp1 binding promotes cancer progression in esophageal squamous cell carcinoma. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 1, p. 1, 2019.

JOHANSEN, J. P.; FIELDS, Howard L. Glutamatergic activation of anterior cingulate cortex produces an aversive teaching signal. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 398–403, 2004.

JONES, Ca A.; WATSON, Djg J.; FONE, Kcf C. Animal models of schizophrenia. **Br J Pharmacol**, v. 164, n. 4, p. 1162–1194, 2011.

JONGSMA, H. E. *et al.* Treated Incidence of Psychotic Disorders in the Multinational EU-GEI Study. **JAMA Psychiatry**, v. 75, n. 1, p. 36, 2018.

JU, P.; CUI, D. The involvement of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) subunit NR1 in the pathophysiology of schizophrenia. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 48, n. 3, p. 209–219, 2016.

KADDURAH-DAOUK, R. *et al.* Metabolomic mapping of atypical antipsychotic effects in schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 12, p. 934–945, 2007.

KAKIUCHI, C. *et al.* XBP1 induces WFS1 through an endoplasmic reticulum stress response element-like motif in SH-SY5Y cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 2, p. 545–555, 2006.

KANTROWITZ, J; JAVITT, D. C. Glutamatergic transmission in schizophrenia: from basic research to clinical practice. **Current opinion in psychiatry**, v. 25, n. 2, p. 96–102, 2012.

KANTROWITZ, J. T. N-methyl-d-aspartate-type glutamate receptor modulators and related medications for the enhancement of auditory system plasticity in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 207, p. 70–79, 2018.

KAPLAN, B. J.; ISARANUWATCHAI, W.; HOCH, J. S. Hospitalization cost of conventional psychiatric care compared to broad-spectrum micronutrient treatment: literature review and case study of adult psychosis. **International journal of mental health systems**, v. 11, p. 14, 2017.

KARAKAS, E.; FURUKAWA, H. Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. **Science**, v. 344, n. 6187, p. 992–997, 2014.

KATAOKA, M. *et al.* Exome sequencing for bipolar disorder points to roles of de novo loss-of-function and protein-altering mutations. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 7, p. 885–893, 2016.

KAUT, O. *et al.* Aberrant NMDA receptor DNA methylation detected by epigenome-wide analysis of hippocampus and prefrontal cortex in major depression. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 265, n. 4, p. 331–341, 2015.

KELLY, D. L. *et al.* Schizophrenia clinical symptom differences in women vs. men with and without a history of childhood physical abuse. **Child Adolesc Psychiatry Ment Health**, v. 10, p. 5, 2016.

KENNY, E. M. *et al.* Excess of rare novel loss-of-function variants in synaptic genes in schizophrenia and autism spectrum disorders. **Molecular psychiatry**, v. 19, n. 8, p. 872–879, 2014.

KESSLER, R. C. *et al.* Childhood adversities and adult psychopathology in the WHO world mental health surveys. **British Journal of Psychiatry**, v. 197, n. 5, p. 378–385, 2010.

- KEVERNE, E. B.; PFAFF, D. W.; TABANSKY, I. Epigenetic changes in the developing brain: Effects on behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 22, p. 6789–6795, 2015.
- KILIAN, S. *et al.* Factors Moderating the Relationship Between Childhood Trauma and Premorbid Adjustment in First-Episode Schizophrenia. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0170178, 2017.
- KIM, S. Y. *et al.* In Vivo Brain Glycine and Glutamate Concentrations in Patients With First-Episode Psychosis Measured by Echo Time–Averaged Proton Magnetic Resonance Spectroscopy at 4T. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 6, p. 484–491, 2018.
- KIRKBRIDE, J. B. *et al.* Incidence of schizophrenia and other psychoses in England, 1950–2009: a systematic review and meta-analyses. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e31660, 2012.
- KIROV, G. *et al.* De novo CNV analysis implicates specific abnormalities of postsynaptic signalling complexes in the pathogenesis of schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 17, n. 2, p. 142–153, 2012.
- KIYAMA, Y. *et al.* Increased thresholds for long-term potentiation and contextual learning in mice lacking the NMDA-type glutamate receptor $\epsilon 1$ subunit. **Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 17, p. 6704–6712, 1998.
- KLENGEL, T. *et al.* Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions. **Nat Neurosci**, v. 16, n. 1, p. 33–41, 2013.
- KOCERH, J. *et al.* MicroRNA-219 modulates NMDA receptor-mediated neurobehavioral dysfunction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 9, p. 3507–3512, 2009.
- KOIKE, H. *et al.* Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. **Behavioural brain research**, v. 202, n. 1, p. 114–121, 2009.
- KOKKINOU, M.; ASHOK, A. H.; HOWES, O. D. The effects of ketamine on dopaminergic function: Meta-Analysis and review of the implications for neuropsychiatric disorders. **Mol Psychiatry**, v. 23, n. 1, p. 59–69, 2018.
- KONRADI, C.; HECKERS, S. Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. **Pharmacol Ther**, v. 97, n. 2, p. 153–179, 2003.
- KOROSI, A. *et al.* Early-life stress mediated modulation of adult neurogenesis and behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 227, p. 400–409, 2011.
- KOSHIYAMA, D. *et al.* Electrophysiological evidence for abnormal glutamate-GABA association following psychosis onset. **Translational psychiatry**, v. 8, n. 1, p. 211, 2018.
- KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Clinical physiology and mechanism of dizocilpine (MK-801): Electron transfer, radicals, redox metabolites and bioactivity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 1, p. 13–22, 2010.
- KRAAN, T. *et al.* Childhood trauma and clinical outcome in patients at ultra-high risk of transition to psychosis. **Schizophrenia Research**, v. 169, n. 1–3, p. 193–198, 2015.
- KRIBELBAUER, J. F. *et al.* Quantitative Analysis of the DNA Methylation Sensitivity of Transcription Factor Complexes. **Cell Reports**, v. 19, n. 11, p. 2383–2395, 2017.
- KRISTIANSEN, L. V *et al.* Changes in NMDA receptor subunits and interacting PSD proteins in dorsolateral prefrontal and anterior cingulate cortex indicate abnormal regional expression in schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 11, n. 8, p. 737–747, 2006.

- KRISTIANSEN, L. V. *et al.* NMDA receptors and schizophrenia. **Curr Opin Pharmacol**, v. 7, n. 1, p. 48–55, 2007.
- KRYSTAL, J. H. *et al.* Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. **Arch Gen Psychiatry**, v. 51, n. 3, p. 199–214, 1994.
- KRZYSTANEK, M.; PAŁASZ, A. NMDA Receptor Model of Antipsychotic Drug-Induced Hypofrontality. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, p. 1442, 2019.
- LAHTI, A. C. *et al.* Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 13, n. 1, p. 9–19, 1995.
- LAI, C. Y. *et al.* Biomarkers in schizophrenia: A focus on blood based diagnostics and theranostics. **World J Psychiatry**, v. 6, n. 1, p. 102–117, 2016.
- LAKENS, D. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. **Frontiers in Psychology**, v. 4, n. NOV, p. 863, 2013.
- LAKHAN, S. E.; CARO, M.; HADZIMICHALIS, N. NMDA Receptor Activity in Neuropsychiatric Disorders. **Frontiers in Psychiatry**, v. 4, p. 52, 2013.
- LANDER, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860–921, 2001.
- LAU, C. G.; ZUKIN, R. S. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 413–426, 2007.
- LAW, A. J.; DEAKIN, J. F. Asymmetrical reductions of hippocampal NMDAR1 glutamate receptor mRNA in the psychoses. **Neuroreport**, v. 12, n. 13, p. 2971–2974, 2001.
- LAW, A. J. *et al.* Expression of NMDA receptor NR1, NR2A and NR2B subunit mRNAs during development of the human hippocampal formation. **Eur J Neurosci**, v. 18, n. 5, p. 1197–1205, 2003.
- LEE, G.; ZHOU, Y. NMDAR Hypofunction Animal Models of Schizophrenia. **Front Mol Neurosci**, v. 12, p. 185, 2019.
- LEE, L. C. *et al.* Influence of Genetic Variants of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor on Emotion and Social Behavior in Adolescents. **Neural plasticity**, v. 2016, p. 6851592, 2016.
- LEPPIK, L. *et al.* Profiling of Amino Acids and Their Derivatives Biogenic Amines Before and After Antipsychotic Treatment in First-Episode Psychosis. **Frontiers in psychiatry**, v. 9, p. 155, 2018.
- LEUCHT, S. *et al.* Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. **Lancet**, v. 373, n. 9657, p. 31–41, 2009.
- LEWIS, D. A.; HASHIMOTO, Takanori; VOLK, David W. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 4, p. 312–324, 2005.
- LEWIS, D. A.; LEVITT, Pat. Schizophrenia as a Disorder of Neurodevelopment. **Annual Review of Neuroscience**, v. 25, n. 1, p. 409–432, 2002.
- LI, B. J. *et al.* Social isolation induces schizophrenia-like behavior potentially associated with HINT1, NMDA receptor 1, and dopamine receptor 2. **Neuroreport**, v. 28, n. 8, p. 462–469, 2017 a.
- LI, X. B. *et al.* Effect of childhood trauma on cognitive functions in a sample of Chinese patients with schizophrenia. **Comprehensive Psychiatry**, v. 76, p. 147–152, 2017 b.

- LI, C. *et al.* Metabolomics in patients with psychosis: A systematic review. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 177, n. 6, p. 580–588, 2018.
- LI, D.; HE, L. Association study between the NMDA receptor 2B subunit gene (GRIN2B) and schizophrenia: A HuGE review and meta-analysis. **Genetics in Medicine**, v. 9, n. 1, p. 4–8, 2007.
- LIM, J. *et al.* The relationship between negative symptom subdomains and cognition. **Psychol Med**, v. 46, n. 10, p. 2169–77, 2016.
- LINDERHOLM, K. R. *et al.* Inhibition of kynurenine aminotransferase II reduces activity of midbrain dopamine neurons. **Neuropharmacology**, v. 102, p. 42–47, 2016.
- LIU, A. *et al.* Ventromedial prefrontal cortex stimulation enhances memory and hippocampal neurogenesis in the middle-aged rats. **eLife**, v. 4, 2015 a.
- LIU, C. *et al.* MirSNP, a database of polymorphisms altering miRNA target sites, identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, 2012.
- LIU, F. *et al.* Changes in gene expression after phencyclidine administration in developing rats: a potential animal model for schizophrenia. **International journal of developmental neuroscience**, v. 29, n. 3, p. 351–358, 2011.
- LIU, M. L. *et al.* Severe disturbance of glucose metabolism in peripheral blood mononuclear cells of schizophrenia patients: a targeted metabolomic study. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 1, p. 226, 2015 b.
- LIU, R. *et al.* Correlation of functional GRIN2A gene promoter polymorphisms with schizophrenia and serum D-serine levels. **Gene**, v. 568, n. 1, p. 25–30, 2015 c.
- LOFTIS, J. M.; JANOWSKY, A. The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. **Pharmacol Ther**, v. 97, n. 1, p. 55–85, 2003.
- LOH, P. R. *et al.* Contrasting genetic architectures of schizophrenia and other complex diseases using fast variance components analysis. **Nat Genet**, v. 47, n. 12, p. 1385–1392, 2015.
- LOUREIRO, C. M. *et al.* The relationship of childhood trauma and methylation of NMDA receptor genes in first-episode schizophrenia. **Epigenomics**, v. 13, n.12, p. 927–937, 2021.
- LOUREIRO, C. M. *et al.* Low plasma concentrations of N-methyl-D-aspartate receptor subunits as a possible biomarker for psychosis. **Schizophrenia Research**, v. 202, p. 55–63, 2018.
- LOUREIRO, C. M. *et al.* Plasma prevalence of anti-N-methyl-d-aspartate receptor IgG antibodies in early stages of psychosis. **Cien Saude Colet**, Online ahead of print, 2021.
- LOUREIRO, C. M. *et al.* Plasma amino acids profile in first - episode psychosis , unaffected siblings and community-based controls. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 21423, 2020 a.
- LOUREIRO, C. M. *et al.* Epigenetic-mediated N -methyl-D-aspartate receptor changes in the brain of isolated reared rats. **Epigenomics**, Online ahead of print, 2020 b.
- LOZADA, A. F. *et al.* Glutamatergic Synapse Formation is Promoted by 7-Containing Nicotinic Acetylcholine Receptors. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 22, p. 7651–7661, 2012.
- LU, L. *et al.* Prenatal exposure to phencyclidine produces abnormal behaviour and NMDA receptor expression in postpubertal mice. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 13, n. 07, p. 877–889, 2010.
- LUKASZ, B. *et al.* Peripubertal viral-like challenge and social isolation mediate overlapping

but distinct effects on behaviour and brain interferon regulatory factor 7 expression in the adult Wistar rat. **Brain, behavior, and immunity**, v. 27, n. 1, p. 71–79, 2013.

LUTKENHOFF, E. S. *et al.* Proton MRS in twin pairs discordant for schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 15, n. 3, p. 308–318, 2010.

MACDONALD, K. *et al.* Minimization of Childhood Maltreatment Is Common and Consequential: Results from a Large, Multinational Sample Using the Childhood Trauma Questionnaire. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0146058, 2016.

MADEIRA, C. *et al.* Blood Levels of Glutamate and Glutamine in Recent Onset and Chronic Schizophrenia. **Frontiers in Psychiatry**, v. 9, 2018.

MAESHIMA, K. *et al.* Liquid-like behavior of chromatin. **Curr Opin Genet Dev**, v. 37, p. 36–45, 2016.

MAKARA, G. B.; STARK, E. Effect of Intraventricular Glutamate on ACTH Release. **Neuroendocrinology**, v. 18, n. 2, p. 213–216, 1975.

MANN, I. K. *et al.* CG methylated microarrays identify a novel methylated sequence bound by the CEBPB|ATF4 heterodimer that is active in vivo. **Genome Research**, v. 23, n. 6, p. 988–997, 2013.

MARANVILLE, J. C.; COX, N. J. Pharmacogenomic variants have larger effect sizes than genetic variants associated with other dichotomous complex traits. **Pharmacogenomics Journal**, v. 16, n. 4, p. 388–392, 2016.

MARIN, M. *et al.* Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. **Cell**, v. 89, n. 4, p. 619–628, 1997.

MARQUES, D. F. *et al.* LINE-1 hypomethylation is associated with poor risperidone response in a first episode of psychosis cohort. **Epigenomics**, v. 12, n. 12, p. 1041–1051, 2020.

MARTIN, K. P.; WELLMAN, Cara L. NMDA Receptor Blockade Alters Stress-Induced Dendritic Remodeling in Medial Prefrontal Cortex. **Cerebral Cortex**, v. 21, n. 10, p. 2366, 2011.

MARTINEZ, Z. A. *et al.* Effects of sustained phencyclidine exposure on sensorimotor gating of startle in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 1, p. 28–39, 1999.

MARTISOVA, E. *et al.* Long lasting effects of early-life stress on glutamatergic/GABAergic circuitry in the rat hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 5–6, p. 1944–1953, 2012.

MARTUCCI, L. *et al.* N-methyl-d-aspartate receptor NR2B subunit gene GRIN2B in schizophrenia and bipolar disorder: Polymorphisms and mRNA levels. **Schizophrenia Research**, v. 84, n. 2–3, p. 214–221, 2006.

MASCHERETTI, S. *et al.* GRIN2B mediates susceptibility to intelligence quotient and cognitive impairments in developmental dyslexia. **Psychiatric genetics**, v. 25, n. 1, p. 9–20, 2015.

MCCRORY, E. J.; GERIN, M. I.; VIDING, E. Annual Research Review: Childhood maltreatment, latent vulnerability and the shift to preventative psychiatry - the contribution of functional brain imaging. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 58, n. 4, p. 338–357, 2017.

MCCULLAGH, P.; NELDER, J. A. **Generalized Linear Models**. 2nd. ed. Boston, MA: Springer US, 1989.

MCGRATH, J. J. *et al.* The association between childhood adversities and subsequent first

onset of psychotic experiences: a cross-national analysis of 23,998 respondents from 17 countries. **Psychol Med**, v. 47, n. 7, p. 1230–1245, 2017.

MCGRAW, W. CL: The Common Language Effect Size Statistic. **Psychological Bulletin**, v. 111, n. 2, p. 361–365, 1992.

MCKIBBEN, C. E. *et al.* Effect of pretreatment with risperidone on phencyclidine-induced disruptions in object recognition memory and prefrontal cortex parvalbumin immunoreactivity in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 208, n. 1, p. 132–136, 2010.

MEDAGLIA, J. D.; LYNALL, M. E.; BASSETT, D. S. Cognitive network neuroscience. **J Cogn Neurosci**, v. 27, n. 8, p. 1471–91, 2015

MELAS, P. A. *et al.* Epigenetic aberrations in leukocytes of patients with schizophrenia: association of global DNA methylation with antipsychotic drug treatment and disease onset. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 6, p. 2712–2718, 2012.

MICHAELIS, E. K. *et al.* Ethanol-Induced Inhibition of [3H]Thienylcyclohexylpiperidine (TCP) Binding to NMDA Receptors in Brain Synaptic Membranes and to a Purified Protein Complex. **Journal of Neurochemistry**, v. 67, n. 1, p. 201–211, 2002.

MISIAK, B. *et al.* Lower LINE-1 methylation in first-episode schizophrenia patients with the history of childhood trauma. **Epigenomics**, v. 7, n. 8, p. 1275–1285, 2015.

MOGHADDAM, B.; KRYSTAL, J. H. Capturing the Angel in “Angel Dust”: Twenty Years of Translational Neuroscience Studies of NmDA Receptor Antagonists in Animals and Humans. **Schizophrenia Bulletin**, v. 38, n. 5, p. 942–949, 2012.

MOHAN, V. *et al.* Prevalence of diabetes, obesity, and metabolic syndrome in subjects with and without schizophrenia (CURES-104). **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 57, n. 4, p. 272, 2011..

MOHN, A. R. *et al.* Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. **Cell**, v. 98, n. 4, p. 427–436, 1999.

MONACO, S. A.; GULCHINA, Y.; GAO, W. J. NR2B subunit in the prefrontal cortex: A double-edged sword for working memory function and psychiatric disorders. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 56, p. 127–138, 2015.

MONDELLI, V. *et al.* Abnormal cortisol levels during the day and cortisol awakening response in first-episode psychosis: The role of stress and of antipsychotic treatment. **Schizophrenia Research**, v. 116, n. 2–3, p. 234–242, 2010.

MONYER, H. *et al.* Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. **Neuron**, v. 12, n. 3, p. 529–540, 1994.

MONYER, H. *et al.* Heteromeric NMDA Receptors: Molecular and Functional Distinction of Subtypes. **Science**, v. 256, n. 5060, 1992.

MORENO-KÜSTNER, B.; MARTÍN, C.; PASTOR, L. Prevalence of psychotic disorders and its association with methodological issues. A systematic review and meta-analyses. **PLoS One**, v. 13, n. 4, p. e0195687, 2018.

MORI, F. *et al.* Genetic variants of the NMDA receptor influence cortical excitability and plasticity in humans. **J Neurophysiol**, v. 106, p. 1637–1643, 2011.

MORRIS, C. *et al.* The relationship between aerobic fitness level and metabolic profiles in healthy adults. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, n. 7, p. 1246–1254, 2013.

MUNDO, E. *et al.* Evidence that the N-methyl-D-aspartate subunit 1 receptor gene (GRIN1)

- confers susceptibility to bipolar disorder. **Mol Psychiatry**, v. 8, n. 2, p. 241–5., 2003.
- MURPHY, K. J. *et al.* Temporal dysregulation of cortical gene expression in the isolation reared Wistar rat. **Journal of Neurochemistry**, v. 113, n. 3, p. 601–614, 2010.
- MURRAY, R. M.; LEWIS, S. W.; LECTURER, L. Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder? **British Medical Journal (Clinical research ed.)**, v. 295, n. 6600, p. 681–682, 1987.
- MYERS, S. J. *et al.* Distinct roles of GRIN2A and GRIN2B variants in neurological conditions. **F100Res**, v. 8, p. F1000, 2019.
- NAGAI, T. *et al.* Reduced Mismatch Negativity is Associated with Increased Plasma Level of Glutamate in First-episode Psychosis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2258, 2017.
- NAGY, C.; TURECKI, G. Sensitive periods in epigenetics: Bringing us closer to complex behavioral phenotypes. **Epigenomics**, v. 4, n. 4, p. 445–57, 2012.
- NAIR, H.; CLARKE, W. **Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory**. Elsevier, 2017.
- NAKAO, K. *et al.* Schizophrenia-Like Dopamine Release Abnormalities in a Mouse Model of NMDA Receptor Hypofunction. **Schizophrenia Bulletin**, v. 45, n. 1, p. 138–147, 2019.
- NAKAZAWA, K.; JEEVAKUMAR, V.; NAKAO, K. Spatial and temporal boundaries of NMDA receptor hypofunction leading to schizophrenia. **NPJ schizophrenia**, v. 3, p. 7, 2017.
- NAKAZAWA, K.; SAPKOTA, K. The origin of NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. **Pharmacol Ther**, v. 205, p. 107426, 2020.
- NAPOLITANO, A. *et al.* In vivo neurometabolic profiling to characterize the effects of social isolation and ketamine-induced NMDA antagonism: a rodent study at 7.0 T. **Schizophr Bull**, v. 40, n. 3, p. 566–574, 2014.
- NASCAA, C. *et al.* Stress dynamically regulates behavior and glutamatergic gene expression in hippocampus by opening a window of epigenetic plasticity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 48, p. 14960–14965, 2015.
- NEEMAN, G. *et al.* Relation of Plasma Glycine, Serine, and Homocysteine Levels to Schizophrenia Symptoms and Medication Type. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 9, p. 1738–1740, 2005.
- NEILL, J. C. *et al.* Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: Focus on NMDA receptor antagonism. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 128, n. 3, p. 419–432, 2010.
- NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Systems biology: Metabonomics. **Annu Rev Biochem**, v. 86, p. 245–275, 2017.
- NISHIOKA, M. *et al.* DNA methylation in schizophrenia: progress and challenges of epigenetic studies. **Genome Medicine**, v. 4, n. 12, p. 96, 2012.
- NISHIOKA, M. *et al.* Comprehensive DNA methylation analysis of peripheral blood cells derived from patients with first-episode schizophrenia. **Journal of Human Genetics**, v. 58, p. 91–97, 2013.
- NIU, H. M. *et al.* Comprehensive functional annotation of susceptibility SNPs prioritized 10 genes for schizophrenia. **Translational Psychiatry**, v. 9, 2019.
- NODA, Y. *et al.* Enhancement of immobility in a forced swimming test by subacute or repeated treatment with phencyclidine: a new model of schizophrenia. **British Journal of Pharmacology**, v. 116, n. 5, p. 2531–2537, 1995.

- NORMAN, R. M.; MALLA, A. K. Duration of untreated psychosis: a critical examination of the concept and its importance. **Psychol Med**, v. 31, n. 3, p. 381–400, 2001.
- NOUR EL HUDA, A. R. *et al.* DNA methylation of membrane-bound catechol-O-methyltransferase in Malaysian schizophrenia patients. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 72, n. 4, p. 266–279, 2018.
- NUZZO, T. *et al.* Decreased free d-aspartate levels are linked to enhanced d-aspartate oxidase activity in the dorsolateral prefrontal cortex of schizophrenia patients. **NPJ Schizophrenia**, v. 3, p. 16, 2017.
- O’CONNOR, L.; GILMOUR, J.; BONIFER, C. The role of the ubiquitously expressed transcription factor Sp1 in tissue-specific transcriptional regulation and in disease. **Yale J Biol Med**, v. 89, n. 4, p. 513–525, 2016.
- OHNUMA, T. *et al.* Changes in plasma glycine, l-serine, and d-serine levels in patients with schizophrenia as their clinical symptoms improve: Results from the Juntendo University Schizophrenia Projects (JUSP). **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, n. 8, p. 1905–1912, 2008.
- OHTSUKA, N. *et al.* GABAergic neurons regulate lateral ventricular development via transcription factor *Pax5*. **Genesis**, v. 51, n. 4, p. 234–245, 2013.
- OKADA, R. *et al.* Social isolation stress-induced fear memory deficit is mediated by down-regulated neuro-signaling system and Egr-1 expression in the brain. **Neurochemical research**, v. 39, n. 5, p. 875–882, 2014.
- OLNEY, J. W.; NEWCOMER, J. W.; FARBER, N. B. NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. **J Psychiatr Res**, v. 33, n. 6, p. 523–533, 1999.
- OREŠIČ, M. *et al.* Metabolome in schizophrenia and other psychotic disorders: a general population-based study. **Genome medicine**, v. 3, n. 3, p. 19, 2011.
- ORLOVSKA-WAAST, S. *et al.* Cerebrospinal fluid markers of inflammation and infections in schizophrenia and affective disorders: a systematic review and meta-analysis. **Mol psychiatry**, v. 24, n. 6, p. 869–887, 2019.
- OTTONI, E. B. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. **Behavior research methods, instruments, & computers**, v. 32, n. 3, p. 446–449, 2000.
- OVENDEN, E. S. *et al.* DNA methylation and antipsychotic treatment mechanisms in schizophrenia: Progress and future directions. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, p. 38–49, 2018.
- OVERALL, J. E.; GORHAM, D. R. the Brief Psychiatric Rating Scale. **Psychological Reports**, v. 10, n. 3, p. 799–812, 1962.
- PAI, P. *et al.* Association of GRIN1, ABCB1, and DRD4 genes and response to antipsychotic drug treatment in schizophrenia. **Psychiatric Genetics**, v. 25, n. 3, p. 135–136, 2015.
- PALOMINO, A. *et al.* Decreased levels of plasma glutamate in patients with first-episode schizophrenia and bipolar disorder. **Schizophr Res**, v. 95, n. 1–3, p. 174–178, 2007.
- PAOLETTI, P.; BELLONE, C.; ZHOU, Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. **Nature Publishing Group**, v. 14, 2013.
- PERROUD, N. *et al.* Increased methylation of glucocorticoid receptor gene (NR3C1) in adults with a history of childhood maltreatment: a link with the severity and type of trauma.

Translational psychiatry, v. 1, n. 12, p. e59, 2011.

PHILIPSEN, S.; SUSKE, G. A tale of three fingers: The family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 15, p. 2991–3000, 1999.

PILOWSKY, L. S. *et al.* First in vivo evidence of an NMDA receptor deficit in medication-free schizophrenic patients. **Mol Psychiatry**, v. 11, n. 2, p. 118–9, 2006.

PLESS, O. *et al.* G9a-mediated lysine methylation alters the function of CCAAT/Enhancer-binding protein- β . **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 39, p. 26357–26363, 2008.

PLITMAN, E. *et al.* Kynurenic Acid in Schizophrenia: A Systematic Review and Meta-analysis. **Schizophrenia Bulletin**, v. 43, n. 4, p. 764–777, 2017.

POPOLI, M. *et al.* The stressed synapse: The impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 1, p. 22–37, 2011.

POPOVIC, D. *et al.* Childhood Trauma in Schizophrenia: Current Findings and Research Perspectives. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p. 274, 2019.

POUREBRAHIM, R. *et al.* *ZIC1* gene expression is controlled by DNA and histone methylation in mesenchymal proliferations. **FEBS Letters**, v. 581, n. 26, p. 5122–5126, 2007.

PRATT, J. A. *et al.* Modelling prefrontal cortex deficits in schizophrenia: implications for treatment. **British journal of pharmacology**, v. 153 Suppl, p. S465–S470, 2008.

PRESSLER, R.; AUVIN, S. Comparison of Brain Maturation among Species: An Example in Translational Research Suggesting the Possible Use of Bumetanide in Newborn. **Frontiers in Neurology**, v. 4, p. 1, 2013.

QIN, S. *et al.* An association study of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene (*GRIN1*) and NR2B subunit gene (*GRIN2B*) in schizophrenia with universal DNA microarray. **European Journal of Human Genetics**, v. 13, p. 807–814, 2005.

QIU, S. *et al.* Subunit assembly of N-methyl-d-aspartate receptors analyzed by fluorescence resonance energy transfer. **J Biol Chem**, v. 280, n. 26, p. 24923–24930, 2005.

QUINN, J. P.; SAVAGE, A. L.; BUBB, V. J. Non-coding genetic variation shaping mental health. **Curr Opin Psychol**, v. 27, p. 18–24, 2019.

R CORE TEAM. A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing, Vienna**, 2018.

RAINEY, J. M.; CROWDER, M. K. Prolonged psychosis attributed to phencyclidine: report of three cases. **American Journal of Psychiatry**, v. 132, n. 10, p. 1076–1078, 1975.

RAO, S. *et al.* Systematic prediction of DNA shape changes due to CpG methylation explains epigenetic effects on protein-DNA binding. **Epigenetics & chromatin**, v. 11, n. 1, p. 6, 2018.

REININGHAUS, U. *et al.* Stress Sensitivity, Aberrant Salience, and Threat Anticipation in Early Psychosis: An Experience Sampling Study. **Schizophrenia Bulletin**, v. 42, n. 3, p. 712–722, 2016.

REUL HENRY, J. M. H. M. Glutamate and cortisol-a critical confluence in PTSD? **J Psychopharmacol**, v. 22, n. 5, p. 469–72, 2008.

REYNOLDS, G. P.; NEILL, J. C. Modelling the cognitive and neuropathological features of schizophrenia with phencyclidine. **Journal of Psychopharmacology**, v. 30, n. 11, p. 1141–1144, 2016.

RILEY, T. *et al.* Transcriptional control of human p53-regulated genes. **Nature Reviews**

Molecular Cell Biology, v. 9, n. 5, p. 402–412, 2008.

RIPKE, S. *et al.* Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. **Nature**, v. 511, n. 7510, p. 421–427, 2014.

RIVA, V. *et al.* GRIN2B predicts attention problems among disadvantaged children. **European child & adolescent psychiatry**, v. 24, n. 7, p. 827–836, 2015.

ROCERI, M. *et al.* Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. **Molecular Psychiatry**, v. 7, n. 6, p. 609–616, 2002.

RODRIGUEZ-MURILLO, L.; GOGOS, J. A.; KARAYIORGOU, M. The Genetic Architecture of Schizophrenia: New Mutations and Emerging Paradigms. **Annual Review of Medicine**, v. 63, n. 1, p. 63–80, 2012.

ROSA, M. L. N. M. *et al.* Routine post-weaning handling of rats prevents isolation rearing-induced deficit in prepulse inhibition. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 38, n. 11, p. 1691–1696, 2005.

ROY, A. L. Signal-induced functions of the transcription factor TFII-I. 2007.

ROY, A. L. Pathophysiology of TFII-I: Old Guard Wearing New Hats. **Trends in molecular medicine**, v. 23, n. 6, p. 501–511, 2017.

RUDDICK, J. P. *et al.* Tryptophan metabolism in the central nervous system: Medical implications. **Expert Rev Mol Med**, v. 8, n. 20, p. 1, 27, 2006.

RUTTEN, B. P. F.; MILL, J. Epigenetic Mediation of Environmental Influences in Major Psychotic Disorders, **Schizophrenia Bulletin**, v. 35, n. 6, p. 1045–1056, 2009.

RYAN, J.; SAFFERY, R. Crucial timing in schizophrenia: role of DNA methylation in early neurodevelopment. **Genome Biol**, v. 15, n. 10, p. 495, 2014.

SAADAT, M. N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene (GRIN1) G1001C polymorphism and susceptibility to schizophrenia: A meta-analysis. **EXCLI journal**, v. 9, p. 11–16, 2010.

SAKIMURA, K. *et al.* Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor ϵ 1 subunit. **Nature**, 6510, p. 151–5, v. 373, n. 1995.

SALEEM, S. *et al.* Potential role of amino acids in pathogenesis of schizophrenia. **International journal of health sciences**, v. 11, n. 3, p. 63–68, 2017.

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

SANANBENESI, F.; FISCHER, A. The epigenetic bottleneck of neurodegenerative and psychiatric diseases. **Biological chemistry**, v. 390, n. 11, p. 1145–1153, 2009.

SAS INSTITUTE, **Statistical Analysis System Institute** (Cary, & NC). SAS Language: Reference: Version 9.4. SAS Inst. 2013.

SCHULZ, H. *et al.* Genome-wide mapping of genetic determinants influencing DNA methylation and gene expression in human hippocampus. **Nat Commun.**, v. 8, n. 1, p. 1511, 2017.

SCHWARCZ, R. *et al.* Kynurenines in the mammalian brain: When physiology meets pathology. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 7, p. 465–77, 2012.

SCHWIELER, L. *et al.* Increased levels of IL-6 in the cerebrospinal fluid of patients with chronic schizophrenia - Significance for activation of the kynurenine pathway. **Journal of**

Psychiatry and Neuroscience, v. 40, n. 2, p. 126–133, 2015.

SCOT E PURDON, A. V., HANSTOCK, C. C.; SERES, P.; TIBBO, P. Elevated 3T proton MRS glutamate levels associated with poor Continuous Performance Test (CPT-0X) scores and genetic risk for schizophrenia. **Schizophr Res**, v. 1–3, p. 218–224, 2008.

SEMPLE, B. D. *et al.* Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Prog Neurobiol**, v. 106–107, p. 1–16, 2013.

SHACKMAN, A. J. *et al.* The Integration of Negative Affect, Pain, and Cognitive Control in the Cingulate Cortex. **Nat Rev Neurosci**, v. 12, n. 3, p. 154–167, 2011.

SHENG, M. *et al.* Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. **Nature**, v. 368, n. 6467, p. 144–147, 1994.

SHEVLIN, M. *et al.* Cumulative Traumas and Psychosis: an Analysis of the National Comorbidity Survey and the British Psychiatric Morbidity Survey. **Schizophr Bull**, v. 34, n. 1, p. 193–199, 2008.

SHIMOMURA, Y.; KITaura, Y. Physiological and pathological roles of branched-chain amino acids in the regulation of protein and energy metabolism and neurological functions. **Pharmacological Research**, v. 133, p. 215–217, 2018.

SHULMAN, Y. *et al.* The relation between peripheral and central glutamate and glutamine in healthy male volunteers. **J Psychiatry Neurosci**, v. 31, n. 6, p. 406–410, 2006.

SIDELI, L. *et al.* Do child abuse and maltreatment increase risk of schizophrenia? **Psychiatry Investig**, v. 9, n. 2, p. 87–99, 2012.

SIGURDSSON, T.; DUVARCI, S. Hippocampal-Prefrontal Interactions in Cognition, Behavior and Psychiatric Disease. **Frontiers in systems neuroscience**, v. 9, p. 190, 2015.

Sin, J. *et al.* Wellbeing, mental health knowledge and caregiving experiences of siblings of people with psychosis, compared to their peers and parents: an exploratory study. **Soc. Psychiatry Psychiatr. Epidemiol**, v. 5, n. 9, p. 1247–1255, 2016.

SINGH, S. P. *et al.* Determining the chronology and components of psychosis onset: The Nottingham Onset Schedule (NOS). **Schizophr Res**, v. 80, n. 1, p. 117–130, 2005.

SIRCAR, R; FOLLESA, P; TICKU, M. K. Postnatal phencyclidine treatment differentially regulates N-methyl-d-aspartate receptor subunit mRNA expression in developing rat cerebral cortex. **Molecular Brain Research**, v. 40, n. 2, p. 214–220, 1996.

SLIFSTEIN, M. *et al.* Deficits in prefrontal cortical and extrastriatal dopamine release in schizophrenia a positron emission tomographic functional magnetic resonance imaging study. **JAMA Psychiatry**, v. 72, n. 4, p. 316–324, 2015.

SNYDER, M. A.; GAO, W. J. NMDA hypofunction as a convergence point for progression and symptoms of schizophrenia. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, p. 31, 2013.

SNYDER, M. A.; GAO, W. J. NMDA receptor hypofunction for schizophrenia revisited: Perspectives from epigenetic mechanisms. **Schizophr Res**, v. 217, p. 60–70, 2020.

SNYDER, S. H. The dopamine hypothesis of schizophrenia: focus on the dopamine receptor. **American Journal of Psychiatry**, v. 133, n. 2, p. 197–202, 1976.

SONG, J. *et al.* Peripheral glutamate levels in schizophrenia: evidence from a meta-analysis. **Neuropsychobiology**, v. 70, n. 3, p. 133–141, 2014.

- SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 4, p. 417–463, 2000.
- SPELLMAN, T. *et al.* Hippocampal-prefrontal input supports spatial encoding in working memory. **Nature**, v. 522, n. 7556, p. 309–314, 2015.
- SPRENGEL, R. *et al.* Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo. **Cell**, v. 92, n. 2, p. 279–289, 1998.
- STADLER, F. *et al.* Histone methylation at gene promoters is associated with developmental regulation and region-specific expression of ionotropic and metabotropic glutamate receptors in human brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 94, n. 2, p. 324–336, 2005.
- STAHL, S. **Chapter 4: Psychosis and schizophrenia.** Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications, 4th Ed, 2008.
- STAIN, H. J. *et al.* Impact of Interpersonal Trauma on the Social Functioning of Adults With First-Episode Psychosis. **Schizophrenia Bulletin**, v. 40, n. 6, p. 1491–1498, 2014.
- STAN, A. D. A. *et al.* Magnetic resonance spectroscopy and tissue protein concentrations together suggest lower glutamate signaling in dentate gyrus in schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 4, p. 433–439, 2015.
- STANOVICH, K. E. **What Intelligence Tests Miss: The Psychology of Rational Thought.** Yale University Press, 2009
- STEINMAN, L. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. **Nature Immunology**, v. 5, n. 6, p. 575–81, 2004.
- STROEBEL, D.; CASADO, M.; PAOLETTI, P. Triheteromeric NMDA receptors: from structure to synaptic physiology. **Current Opinion in Physiology**, v. 2, p. 1–12, 2018.
- SUMIYOSHI, T. *et al.* Plasma glycine and serine levels in schizophrenia compared to normal controls and major depression: relation to negative symptoms. **Int J Neuropsychopharmacology**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2004.
- TAMMINGA, C. A.; LAHTI, A. C. The new generation of antipsychotic drugs. **International Clinical Psychopharmacology**, v. Suppl 2, p. 73–76, 1996.
- TANG, Y. P. *et al.* Genetic enhancement of learning and memory in mice. **Nature**, v. 401, n. 6748, p. 63–69, 1999.
- TANI, A. *et al.* Polymorphism analysis of the upstream region of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1 gene (GRIN1): implications for schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 58, n. 1, p. 83–86, 2002.
- THAKKAR, K. N. *et al.* 7T Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Gamma-Aminobutyric Acid, Glutamate, and Glutamine Reveals Altered Concentrations in Patients With Schizophrenia and Healthy Siblings. **Biological Psychiatry**, v. 81, n. 6, p. 525–535, 2017.
- TAYLOR R. Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review. **J. Diagnostic Med. Sonogr.** v. 1, p. 35–39, 1990.
- TOMASSI, S.; TOSATO, S. Epigenetics and gene expression profile in first-episode psychosis: The role of childhood trauma. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 83, p. 226–237, 2017.
- TORTORELLA, A. *et al.* Plasma concentrations of amino acids in chronic schizophrenics treated with clozapine. **Neuropsychobiology**, v. 44, n. 4, p. 167–171, 2001.

- TOSI, S. M. V. D. **TIG-NV – Teste de Inteligencia Geral Nao-Verbal**. 3rd ed. São Paulo, Brasil, Brasil: Casa do Psicólogo, 2008.
- TOST, J. DNA Methylation: An Introduction to the Biology and the Disease-Associated Changes of a Promising Biomarker. **Mol Biotechnol**, v. 44, n. 1, p. 71–81, 2010.
- TSENG, K.Y. *et al.* A neonatal ventral hippocampal lesion causes functional deficits in adult prefrontal cortical interneurons. **The Journal of neuroscience**, v. 28, n. 48, p. 12691, 2008.
- TUCCI, A. M.; KERR-CORRÊA, F.; SOUZA-FORMIGONI, M. L. O. Childhood trauma in substance use disorder and depression: An analysis by gender among a Brazilian clinical sample. **Child Abuse and Neglect**, v. 34, n. 2, p. 95–104, 2010.
- TUFVESSON-ALM, M. *et al.* Importance of kynurenine 3-monooxygenase for spontaneous firing and pharmacological responses of midbrain dopamine neurons: Relevance for schizophrenia. **Neuropharmacology**, v. 138, p. 130–139, 2018.
- TURECKI, G.; MEANEY, M. Effects of the social environment and stress on glucocorticoid receptor gene methylation: a systematic review. **Biol Psychiatry**, v. 79, n. 2, p. 87–96, 2016.
- TURNOCK-JONES, J. J. *et al.* Increased expression of the NR2A NMDA receptor subunit in the prefrontal cortex of rats reared in isolation. **Synapse**, v. 63, n. 10, p. 836–846, 2009.
- TUSSIÉ-LUNA, M. I. *et al.* Physical and functional interactions of histone deacetylase 3 with TFII-I family proteins and PIASxbeta. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 20, p. 12807–12812, 2002.
- ÜÇÖK, A.; BIKMAZ, S. The effects of childhood trauma in patients with first-episode schizophrenia. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 116, n. 5, p. 371–377, 2007.
- UNO, Y.; COYLE, J. T. Glutamate Hypothesis in Schizophrenia. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, 2019.
- URATA, Y. *et al.* IL-1 β Increases Expression of Tryptophan 2,3-dioxygenase and Stimulates Tryptophan Catabolism in Endometrioma Stromal Cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 72, n. 5, p. 496–503, 2014.
- URSINI, G. *et al.* Convergence of placenta biology and genetic risk for schizophrenia article. **Nature Medicine**, v. 24, n. 6, p. 792–801, 2018.
- VAN DE RIET, E. H.; SCHIEVELD, J. N. First-onset psychosis, anti-NMDAR encephalitis, schizophrenia and Consultation-Liaison psychiatry. **Gen Hosp Psychiatry**, v. 35, n. 4, p. 442–443, 2013.
- VAN OS, J.; KENIS, G.; RUTTEN, B. P. The environment and schizophrenia. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 203–212, 2010.
- VARESE, F. *et al.* Childhood Adversities Increase the Risk of Psychosis: A Meta-analysis of Patient-Control, Prospective- and Cross-sectional Cohort Studies. **Schizophrenia Bulletin**, v. 38, n. 4, p. 661, 2012.
- VASSOS, E. *et al.* An Examination of Polygenic Score Risk Prediction in Individuals With First-Episode Psychosis. **Biological Psychiatry**, v. 81, n. 6, p. 470–477, 2017.
- VENUGOPAL, D. *et al.* Impact of antipsychotic treatment on methylation status of Interleukin-6 [IL-6] gene in Schizophrenia. **Journal of Psychiatric Research**, v. 104, p. 88–95, 2018.
- VRAJOVÁ, M. *et al.* Expression of the Hippocampal NMDA Receptor GluN1 Subunit and Its Splicing Isoforms in Schizophrenia: Postmortem Study. **Neurochemical Research**, v. 35, n. 7, p. 994–1002, 2010.

- VYTHILINGAM, M. *et al.* Childhood trauma associated with smaller hippocampal volume in women with major depression. **Am J Psychiatry**, v. 159, n. 12, p. 2072–2080, 2002.
- WALKER, E. R.; MCGEE, R. E.; DRUSS, B. G. Mortality in Mental Disorders and Global Disease Burden Implications: A Systematic Review and Meta-analysis HHS Public Access. **JAMA Psychiatry**, v. 72, n. 4, p. 334–341, 2015.
- WALLS, A. B. *et al.* The Glutamine–Glutamate/GABA Cycle: Function, Regional Differences in Glutamate and GABA Production and Effects of Interference with GABA Metabolism. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 2, p. 402–409, 2015.
- WALTON, E. *et al.* Correspondence of DNA methylation between blood and brain tissue and its application to schizophrenia research. **Schizophr. Bull.**, v. 42, n. 2, p. 406–414, 2016.
- WANG, A. K.; MILLER, B. J. Meta-analysis of Cerebrospinal Fluid Cytokine and Tryptophan Catabolite Alterations in Psychiatric Patients: Comparisons Between Schizophrenia, Bipolar Disorder, and Depression. **Schizophrenia Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 75–83, 2018.
- WANG, C. *et al.* Long-term behavioral and neurodegenerative effects of perinatal phencyclidine administration: implications for schizophrenia. **Neuroscience**, v. 107, n. 4, p. 535–550, 2001.
- WANG, G. W.; CAI, J. X.. Disconnection of the hippocampal–prefrontal cortical circuits impairs spatial working memory performance in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 175, n. 2, p. 329–336, 2006.
- WANG, H. X.; GAO, W. J. Cell type-specific development of NMDA receptors in the interneurons of rat prefrontal cortex. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 8, p. 2028–2040, 2009.
- WANG, J. J. *et al.* Reduced γ -Aminobutyric Acid and Glutamate+Glutamine Levels in Drug-Naive Patients with First-Episode Schizophrenia but Not in Those at Ultrahigh Risk. **Neural Plasticity**, v. 2016, p. 3915703, 2016.
- WANG, L. S. *et al.* LC-MS/MS-based quantification of tryptophan metabolites and neurotransmitters in the serum and brain of mice. **Journal of Chromatography B**, v. 1112, p. 24–32, 2019.
- WANG, Y. *et al.* Current state of the art of mass spectrometry-based metabolomics studies-a review focusing on wide coverage, high throughput and easy identification. **RSC Advances**, v.5, n. 96, p. 78728–78737, 2015.
- WANG, Z. Q. *et al.* Long noncoding RNA UCA1 induced by SP1 promotes cell proliferation via recruiting EZH2 and activating AKT pathway in gastric cancer. **Cell death & disease**, v. 8, n. 6, p. e2839, 2017.
- WANICHNOPPARAT, W. *et al.* Genes associated with the cis-regulatory functions of intragenic LINE-1 elements. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 205, 2013.
- WARREN, N.; SISKIND, D.; O’GORMAN, C. Refining the psychiatric syndrome of anti- *N*-methyl-d-aspartate receptor encephalitis. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 138, n. 5, p. 401–408, 2018.
- WATERLAND, R. A.; MICHELS, Karin B. Epigenetic Epidemiology of the Developmental Origins Hypothesis. **Annual Review of Nutrition**, v. 27, n. 1, p. 363–388, 2007.
- WEDER, N. *et al.* Child Abuse, Depression, and Methylation in Genes Involved With Stress, Neural Plasticity, and Brain Circuitry. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 53, n. 4, p. 417–424.e5, 2014.

- WEICKERT, C. S. *et al.* Molecular evidence of N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction in schizophrenia. **Mol Psychiatry**, v. 18, n. 11, p. 1185–1192, 2013.
- WEINSTEIN, J.J. *et al.* Pathway-Specific Dopamine Abnormalities in Schizophrenia. **Biol Psychiatry**, v. 81, n. 1, p. 31–42, 2017.
- WEN, Y. D. *et al.* Histone deacetylase 3 binds to and regulates the multifunctional transcription factor TFII-I. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 3, p. 1841–1847, 2003.
- WESSELING, H. *et al.* Integrative proteomic analysis of the NMDA NR1 knockdown mouse model reveals effects on central and peripheral pathways associated with schizophrenia and autism spectrum disorders. **Mol Autism**, v. 5, p. 38, 2014.
- WHITEFORD, H. A. *et al.* Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 382, n. 9904, p. 1575–1586, 2013.
- WICKENS, M. M.; BANGASSER, D. A.; BRIAND, Lisa A. Sex differences in psychiatric disease: A focus on the glutamate system. **Front Mol Neurosci**, v. 11, p. 197, 2018.
- WILK, G.; BRAUN, R. regQTLs: Single nucleotide polymorphisms that modulate microRNA regulation of gene expression in tumors. **PLoS Genetics**, v. 14, n. 12, 2018.
- WŁODARCZYK, A.; WIGLUSZ, M. S.; CUBAŁA, W. J. Ketogenic diet for schizophrenia: Nutritional approach to antipsychotic treatment. **Medical Hypotheses**, v. 118, p. 74–77, 2018.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation.** v. 94, n. ixii, p. 1–253 (2000).
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International classification of diseases for mortality and morbidity statistics (11th Revision, ICD-11).** 2018.
- WU, G.. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 1–17, 2009.
- YAMAKURA, T.; SHIMOJI, K. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. **Prog Neurobiol**, v. 59, n. 3, p. 279–298, 1999.
- YAMAMORI, H. *et al.* Changes in plasma d-serine, l-serine, and glycine levels in treatment-resistant schizophrenia before and after clozapine treatment. **Neuroscience Letters**, v. 582, p. 93–98, 2014.
- YANG, B. Z. *et al.* Child abuse and epigenetic mechanisms of disease risk. **American journal of preventive medicine**, v. 44, n. 2, p. 101–107, 2013.
- YANG, G. J. *et al.* Functional hierarchy underlies preferential connectivity disturbances in schizophrenia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 2, p. E219–E228, 2016.
- YANG, Y. *et al.* Association Study of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunit 2B (GRIN2B) Polymorphisms and Schizophrenia Symptoms in the Han Chinese Population. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0125925, 2015.
- YI CHONG, H. *et al.* Global economic burden of schizophrenia - a systematic review. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 12, p. 357–73, 2016.
- YIN, H. *et al.* A pilot integrative genomics study of GABA and glutamate neurotransmitter systems in suicide, suicidal behavior, and major depressive disorder. **American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics**, v. 171B, n. 3, p. 414–426, 2016.

- YUE, W. H. *et al.* Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for schizophrenia in Han Chinese at 11p11.2. **Nature Genetics**, v. 43, n. 12, p. 1228–1231, 2011.
- YUNG, A. R. *et al.* Childhood maltreatment and transition to psychotic disorder independently predict long-term functioning in young people at ultra-high risk for psychosis. **Psychol Med**, v. 45, n. 16, p. 3453–65, 2015.
- ZAFRA, F. *et al.* Glycine Transporters and Its Coupling with NMDA Receptors. **Advances in neurobiology**, v. 16, p. 55–83, 2017.
- ZANDI, M. S. *et al.* Disease-relevant autoantibodies in first episode schizophrenia. **J Neurol**, v. 258, n. 4, p. 686–688, 2011.
- ZARAGOZÁ, R. Transport of Amino Acids Across the Blood-Brain Barrier. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 973, 2020.
- ZHANG, R. *et al.* Metabolomic Profiling of Post-Mortem Brain Reveals Changes in Amino Acid and Glucose Metabolism in Mental Illness Compared with Controls. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 14, p. 106–116, 2016.
- ZHANG, Y. *et al.* Polymorphisms in MicroRNA Genes And Genes Involving in NMDAR Signaling and Schizophrenia: A Case-Control Study in Chinese Han Population. **Sci Rep**, v. 5, p. 12984, 2015.
- ZHAO, B. *et al.* Analysis of variations in the glutamate receptor, N-methyl D-aspartate 2A (GRIN2A) gene reveals their relative importance as genetic susceptibility factors for heroin addiction. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e70817, 2013 a.
- ZHAO, L. X. *et al.* miR-137, a new target for post-stroke depression? **Neural Regeneration Research**, v. 8, n. 26, p. 2441–2448, 2013 b.
- ZHAO, X. *et al.* Isolation rearing induces social and emotional function abnormalities and alters glutamate and neurodevelopment-related gene expression in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 7, p. 1173–1177, 2009.
- ZHAO, X. *et al.* Significant association between the genetic variations in the 5' end of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene GRIN1 and schizophrenia. **Biological Psychiatry**, 2006.
- ZHONG, H. J. *et al.* Functional polymorphisms of the glutamate receptor N-methyl D-aspartate 2A gene are associated with heroin addiction. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 8714–8721, 2014.
- ZHONG, J. *et al.* Expression of mRNAs Encoding Subunits of the NMDA Receptor in Developing Rat Brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, n. 2, p. 531–539, 1995.
- ZHOU, C. *et al.* DNA methylation and gene expression of the chemokine (C-X-C motif) ligand 1 in patients with deficit and non-deficit schizophrenia. **Psychiatry Research**, v. 268, p. 82–86, 2018.
- ZHU, H.; WANG, G.; QIAN, J. Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation. **Nature reviews. Genetics**, v. 17, n. 9, p. 551–565, 2016.
- ZHUBI, A. *et al.* An upregulation of DNA-methyltransferase 1 and 3a expressed in telencephalic GABAergic neurons of schizophrenia patients is also detected in peripheral blood lymphocytes. **Schizophrenia Research**, v. 111, n. 1–3, p. 115–122, 2009.
- ZUCCOLI, M. L. *et al.* Paliperidone for the Treatment of Ketamine-Induced Psychosis: A Case Report. **The International Journal of Psychiatry in Medicine**, v. 48, n. 2, p. 103–108, 2014.

ZWICKER, A.; DENOVAN-WRIGHT, E. M.; UHER, R. Gene-environment interplay in the etiology of psychosis. **Psychological Medicine**, v. 48, n. 12, p. 1925–1936, 2018.

Apêndices

APÊNDICE A – Protocolo Para Coleta de Sangue

PROTOCOLO PARA COLETA DE SANGUE

**PROJETO DE PESQUISA: Esquizofrenia e outros transtornos psicóticos:
determinantes sociais e biológicos**

Docentes responsáveis: Prof. Dr. Paulo Louzada Junior e Profa. Dra. Cristina Marta Del-Ben

Pesquisadora responsável: Camila Marcelino Loureiro

- ✓ DATA DA COLETA:
- ✓ NOME – INICIAIS:
- ✓ NOME DA MÃE: NÚMERO STREAM:
- ✓ SEXO: F () M () IDADE:
- ✓ CASO: () CONTROLE: () IRMÃO (Ã): ()
- ✓ RESIDÊNCIA ATUAL:
- ✓ TELEFONES DE CONTATO:
- ✓ DIAGNÓSTICO:

DATA DE INÍCIO DOS SINTOMAS PSICÓTICOS:

DATA DE PRIMEIRO CONTATO COM SERVIÇO DE SAÚDE MENTAL:

SERVIÇO DE SAÚDE MENTAL DE REFERÊNCIA:

COMORBIDADES: SIM () NÃO ()

○ Se sim. descrever: _____

- ✓ FARMACOLOGIA UTILIZADA (TODAS):

Medicamento	Dose diária	Data de início	Regularidade de uso

- ✓ **COLETA DAS SUBUNIDADES:** A primeira amostra será coletada no momento em que o diagnóstico for estabelecido. Para todos os indivíduos será coletado uma amostra de 5 ml de sangue periférico, em tubo com EDTA, para centrifugação e separação do plasma para dosagem das subunidades NR1 e NR2 do NMDAR. Os tubos serão mantidos no gelo e a centrifugação deverá ser realizada em até 2 horas após a coleta das amostras.

REGISTRO DAS COLETAS DE SANGUE

	DNA	Plasma
Data e hora da coleta		
Responsável pela coleta		
Data e hora da centrifugação		
Responsável pela centrifugação		
Data e hora de identificação e armazenamento		
Responsável pela identificação e armazenamento		

Aplicação da BPRS imediatamente antes das coletas de sangue – Escore Total: _____

SEÇÃO TABACO:

SIM () NÃO ()

○ Se sim, descrever: _____

SEÇÃO ÁLCOOL:

SIM () NÃO ()

○ Se sim, descrever: _____

SEÇÃO OUTRAS DROGRAS:

SIM () NÃO ()

○ Se sim, descrever: _____

Anexos

ANEXO 1 – Cronograma de Início de Sintomas de Nottingham

Cronograma de Início de Sintomas de Nottingham:
versão modificada de duração de psicose não tratada (NOS-DUP)

Estudo: EU GEI	Data de nascimento
Número do participante: <input type="text"/> - <input type="text"/> - <input type="text"/> - <input type="text"/>	<input type="text"/> - <input type="text"/> - <input type="text"/> - <input type="text"/> - <input type="text"/> - <input type="text"/>
Intervalo de tempo:	Period – Repeat: <input type="text"/> - <input type="text"/> - <input type="text"/> - <input type="text"/>
Entrevistador:	Data <input type="text"/> - <input type="text"/> - <input type="text"/> - <input type="text"/> - <input type="text"/> - <input type="text"/>

Folha de definição

Por favor, registre a data mais precisa possível!

- No caso da informação sobre o ano de início ser a única disponível, por favor, registre o dia 1 de julho desse ano como data de início.
- No caso da informação sobre o mês de início ser a única disponível, por favor, registre o dia 15 daquele mês como data de início.

Data do início da psicose:

Primeiro dia do episódio psicótico.

Início do episódio psicótico (diagnóstico definitivo) é definido como:

Clara evidência de delírios, alucinações, sintomas de primeira ordem, sintomas catatônicos durante, pelo menos, uma semana (isto é, pontuação ≥ 4 nos itens P1, "delírios", P3 "comportamento alucinatório", P5 "Grandiosidade", P6 "Desconfiança" ou A9 "conteúdo incomum do pensamento" da PANSS).

Data do início do tratamento:

Primeiro dia do início do tratamento.

O início do tratamento é definido como:

Data inicial do tratamento com antipsicóticos mantida durante pelo menos um mês (pelo menos 75% aderente), ou até que tenha sido alcançada uma resposta significativa (isto é, "muito melhor" de acordo com a CGI), independentemente do que acontecer primeiro.

Duração da Psicose Não Tratada:

Data do início do tratamento - (menos) Data do início da Psicose

Cronograma de Início de Sintomas de Nottingham:
versão modificada de duração de psicose não tratada (NOS-DUP)

(Nota para a entrada de dados: NOS_GEN)

Diagnóstico psiquiátrico atual (DSM IV):

 -

Data de contato com serviço de saúde mental
(dia/mês/ano):

 - -

Data de início da psicose:

 - -

Data de tratamento suficiente:

 - -

Paciente usa antipsicóticos?

00 Não 01 Sim

Data do início do tratamento:

 - -

(Nota para a entrada de dados: NOS_MED)

Antipsicóticos	Dose total diária ou dose de depósito (mg)	Data de tomada regular (no mínimo 75% de adesão)	Código (a ser preenchido pelo investigador)*

DURAÇÃO DA PSICOSE NÃO TRATADA (DUP) em semanas: _____

* veja a lista de medicações para incluir os códigos

ANEXO 2 – Escala de Avaliação Psiquiátrica Breve (BPRS)

BPRS	
Item	Escore
01. Preocupações Somáticas	
02. Ansiedade Psíquica	
03. Retraimento Emocional	
04. Desorganização Conceitual	
05. Sentimentos de Culpa	
06. Ansiedade	
07. Distúrbios Motores Específicos	
08. Auto-Estima Exagerada	
09. Humor Deprimido	
10. Hostilidade	
11. Desconfiança	
12. Alucinações	
13. Retardo Psicomotor	
14. Falta de Cooperação	
15. Conteúdo Incomum do Pensamento	
16. Afeto Embotado	
17. Agitação Psicomotora	
18. Desorientação e Confusão	
Escore Total BPRS	

ANEXO 3 – Lista de Medicções (Presente e Passada)

(Note for DATA ENTRY: open MED_PRES)

O Participante usa medicação?

O0 não

O1 sim

ESTUDO: EU GEI		Data de Nascimento	
Número do participante: -		- - 19	
Intervalo de tempo: Atual		Period – Replicat 0 - 0	
Entrevistador:		Data - - 20	

No.	Nome	Código	Dose total diária – ou dose de depósito	Dia	Unidade	O ¹ mg	O ² ml	O ³ mmol/l	O ⁴ microg
0 1		- -	:		Unidade:	O ¹ mg	O ² ml	O ³ mmol/l	O ⁴ microg
	Motivo do uso:				Horário diário:	O ¹ 8	O ² 12	O ³ 18	O ⁴ 22
	Data de início: - -				Depósito:	O ⁰ não	O ¹ sim		
					Se necessário:	O ⁰ não	O ¹ sim		
0 2		- -	:		Unidade:	O ¹ mg	O ² ml	O ³ mmol/l	O ⁴ microg
	Motivo do uso:				Horário diário:	O ¹ 8	O ² 12	O ³ 18	O ⁴ 22
	Data de início: - -				Depósito:	O ⁰ não	O ¹ sim		
					Se necessário:	O ⁰ não	O ¹ sim		
0 3		- -	:		Unidade:	O ¹ mg	O ² ml	O ³ mmol/l	O ⁴ microg
	Motivo do uso:				Horário diário:	O ¹ 8	O ² 12	O ³ 18	O ⁴ 22
	Data de início: - -				Depósito:	O ⁰ não	O ¹ sim		
					Se necessário:	O ⁰ não	O ¹ sim

(Note for DATA ENTRY: open MED_PAST)

O Participante usava medicação? O0 não

O1 sim

ESTUDO: EU GEI	Data de Nascimento
Número do participante: [][][][] - [][][][][]	[][][]-[][][]-[1][9][][][]
Intervalo de tempo: Atual	Period – Replicat[0][][][]-[0][][][]
Entrevistador:	Data[][][]-[][][]-[2][0][][][]

No.	Nome	Código	Dose total diária – ou dose de depósito	Dia	Unidade	O' mg	O' ml	O' mmol/l	O' microg
0 1		[][][] - [][][] - [][][][]	[][][][][] , [][][][]	[][][][]	Horário diário:	O' 8	O' 12	O' 18	O' 22
	Motivo do uso:				Depósito:	O' não	O' sim		
	Data de início:	[][][] - [][][][] - [][][][]			Se necessário:	O' não	O' sim		
	Data de Término:	[][][] - [][][][] - [][][][]			Você achou que foi útil?	O' não	O' sim		
0 2		[][][] - [][][] - [][][][]	[][][][][] , [][][][]	[][][][]	Unidade	O' mg	O' ml	O' mmol/l	O' microg
	Motivo do uso:				Horário diário:	O' 8	O' 12	O' 18	O' 22
	Data de início:	[][][] - [][][][] - [][][][]			Depósito:	O' não	O' sim		
	Data de Término:	[][][] - [][][][] - [][][][]			Se necessário:	O' não	O' sim		
					Você achou que foi útil?	O' não	O' sim		

Instruções e Códigos para a Lista de Medicações

Instruções

Nome: por favor, pergunte o *motivo* do uso da medicação: um produto específico pode ser usado para vários sintomas

Dose: Dose **diária** total ou dose de **depósito** total

Dia: - Uso diário, código = 001

- No caso de medicações de depósito: por ex. depósito a cada 2 semanas, código = 014

Os códigos para medicações são:

A. Hipnóticos	0	1	-	0	1	-	0	0
B. Sedativos	0	1	-	0	2	-	0	0
C. Outros ansiolíticos	0	1	-	0	3	-	1	0
D. Antipsicóticos	0	1	-	0	4	-	0	0
E. Lítio	0	1	-	0	5	-	0	0
F. Antidepressivos	0	1	-	0	6	-	0	0
G. Medicação para TDAH	0	1	-	0	7	-	0	0
H. Antiepiléticos	0	2	-	0	1	-	0	0
I. Anticolinérgicos	0	2	-	0	2	-	1	0
J. Anti-histamínicos	1	8	-	0	1	-	0	0
K. Betabloqueadores	0	5	-	0	2	-	0	0
L. Outros psicotrópicos	2	4	-	0	0	-	0	0

INSTRUÇÕES PARA DOSAGENS

1. Haloperidol

1 ml = 20 gotas

1 gota = 0,1 mg

10 gotas = 1 mg

20 gotas = 2mg

2. Clonazepam

1 gota = 0,1 mg

3 gotas = 0,3 mg

3. Clorpromazina

1 gota = 1 mg

10 gotas = 10 mg

Exemplos de Medicções para Classificação

B. SEDATIVOS (01-02-00):	Alprazolam	Lorazepam
	Clonazepam	Midazolam
	Diazepam	
D. ANTIPSICOTICOS (01-04-00):	Clorpromazina	Paliperidona
	Clozapina	Quetiapina
	Haldol	Risperidona
	Olanzapina	Sulpirida
E. LITIO (01-05-00)		
F. ANTIDEPRESSIVOS (01-06-00):	Amitriptilina	Mirtazapina
	Citalopram	Paroxetina
	Fluoxetina	Sertralina
	Imipramina	Venlafaxina
H. ANTIEPILEPTICOS (02-01-00):	Acido valpróico	Fenobarbital
	Carbamazepina	Topiramato
I. ANTICOLINERGICOS (02-02-10):	Biperideno	
J. ANTI-HISTAMINICOS (18-01-00):	Prometazina	
K. BETABLOQUEADORES (05-02-00):	Propanolol	

ANEXO 4 – Tabaco e Álcool

Tabaco e Álcool

(Nota para a entrada de dados: EU_TAL)

ESTUDO: EU GEI

Data |_|_|·|_|_|·|2|0|_|_|

Intervalo de tempo: 12 meses

Period – Replicat |0|_|·|0|_|

Gostaria de lhe perguntar sobre o uso de tabaco.**Seção Tabaco**

1. Nas últimos 12 meses, você fumou/usou diariamente por pelo menos um mês...

a) Cigarros (comum ou cigarro de palha)?	O1 Sim	O0 Não
b) charutos?	O1 Sim	O0 Não
c) cachimbas?	O1 Sim	O0 Não
d) tabaco cheirado ou mascado?	O1 Sim	O0 Não

2. Nas últimas 12 meses, durante o período em que mais fumou/usou tabaco, quantas..... fumava/mascava por dia?

	número/dia	
a) cigarros (comum ou cigarro de palha)?		
b) charutos?		
c) cachimbas?		
d) tabaco cheirado ou mascado?		

Tabaco e Álcool

Complemento - questionário de tabaco (Esta subseção não constará do banda do EU GEI)

1. Você já fumou tabaco (cigarro ou charuto ou cachimbo) alguma vez na vida?

☐ Sim ☐ Não

2. Quantos anos você tinha quando **experimentou** cigarro (charuto ou cachimbo) pela primeira vez?

..... anos

3. Durante o período em que você mais fumava, você fumava com qual frequência?

D1 Todo dia/diariamente

D2 Mais do que uma vez por semana

D3 Uma vez por semana

D4 Uma ou duas vezes por mês

D5 Algumas vezes por ano

D6 Uma vez por ano

D7 Só fumei cigarro (ou charuto ou cachimbo) uma ou duas vezes na vida

4. Quantos anos você tinha quando começou a **fumar regularmente** (mais do que uma vez por semana, pelo menos)?

..... anos

5. Quanto tempo durou esse período em que você fumava com mais frequência?

..... meses OU anos

6. Quantos cigarros/maços por dia você fumava nesse período de maior frequência?

..... cigarros/dia OU maços/dia

7. Você já tentou parar de fumar?

☐ Sim ☐ Não

Se sim, quantas vezes: (antes de participar do estudo)

Tabaco e Álcool

8. Se você conseguiu parar de fumar atualmente, está há quanto tempo sem fumar?

.....dias OUmeses OUanos

9. Você considera que é ou já foi dependente de cigarro ("viciado")?

☐ Sim ☐ Não

10. Seu pai é ou já foi fumante?

☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe

11. Sua mãe é ou já foi fumante?

☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe

Se sim, sabe se ela fumava quando estava grávida de você?

☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabe

Observações: _____

Tabaco e Álcool

Seção Álcool

As próximas perguntas são sobre o seu uso de bebidas alcoólicas, incluindo cerveja, vinho e destilados.

1a. Bebeu pelo menos 12 ou mais doses de bebida alcoólica nos últimos 12 meses? *Se a resposta for NÃO: Mesmo quando considera bebidas durante o jantar, ocasiões especiais ou feriados?*

Q1 Sim Q0 Não

Se a resposta for NÃO, vá para a questão 2a

1b. Quantas doses bebia em média em cada semana?

--	--

2a. Dentro deste período de 12 meses, houve algum período de pelo menos 2 semanas, em que você bebeu mais?

Q1 Sim Q0 Não

Se a resposta for NÃO, vá para a pergunta 3a

2b. Duração total deste(s) período(s) em semanas?

--	--

semanas

2c. Quantas doses bebia em média em cada semana neste(s) período(s)?

--	--

3a. Já houve, durante os últimos 3 anos, algum período (ou mais períodos) de pelo menos 4 semanas em que você bebia mais do que nos últimos 12 meses?

Q1 Sim Q0 Não

Se a resposta for NÃO, você pode parar aqui.

3b. Duração total deste(s) período(s) em semanas.

--	--

semanas

3c. Quantas doses você bebia, em média, a cada semana durante esse(s) período(s)?

--	--

ANEXO 5 – Questionário de Experiências com Maconha e de Outras Substâncias Psicoativas

Cannabis Experiences Questionnaire

(Nota para a entrada de dados: EU_CEQ)

ESTUDO: EU GEI	Data de Nascimento
Número do participante <input type="text"/> EU <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Intervalo de Tempo:	Period – Replacet <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Entrevistador:	Data <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>

*Instruções para o pesquisador: Por favor, marque nas campos indicados as respostas do paciente.**Por favor, tenha em mente que algumas questões permitem mais do que uma resposta.***15.1 Você já fumou/usou maconha alguma vez na vida?**

O1 Sim O0 Não

*Se a resposta for NÃO, vá para 15.17***15.2 Quantos anos você tinha quando experimentou maconha pela primeira vez?**

<input type="text"/>	<input type="text"/>	Anos
----------------------	----------------------	------

15.3 Por que você experimentou maconha pela primeira vez? (Você pode marcar mais de um item):

a) Os meus amigos usavam.	O1 Sim O0 Não
b) Os meus familiares usavam.	O1 Sim O0 Não
c) Para me sentir melhor (para obter alívio de algum desconforto físico ou psicológico)	O1 Sim O0 Não
d) Outro motivo (por favor, explique) (a explicação não vai constar do banco de dados)	O1 Sim O0 Não

*Instruções para o pesquisador: Por favor, considere como usuário atual todos os participantes que relataram usar/fumar maconha com alguma frequência (incluindo pacientes que não fumaram enquanto estiveram internados ou presos ou pacientes que relataram uso ocasional mesmo que seja apenas uma vez a cada dois anos, etc):***15.4 Você usa maconha atualmente?**

O1 Sim O0 Não

*Se Sim, por favor, responda b, se Não, por favor responda c, e então vá para 15.7***b. Se SIM, por que você continua a usar maconha? (Você pode marcar mais de um item):**

a) Eu gosto do efeito, dá-me um "barato"	O1 Sim O0 Não
b) Faz com que eu me sinta relaxado(a)	O1 Sim O0 Não
c) Faz com que eu me sinta menos nervoso(a) e ansioso(a)	O1 Sim O0 Não
d) Faz com que eu me sinta mais sociável.	O1 Sim O0 Não
e) Outro motivo (por favor, explique)	O1 Sim O0 Não

Cannabis Experiences Questionnaire

- 15.5 Você gostaria de parar de usar maconha algum dia? O1 Sim O0 Não
- b. Se sim, por favor explique *(resposta não vai constar no banco de dados)*:
- 15.6 A maconha afeta ou já afetou a sua saúde de alguma O1 Sim O0 Não
maneira?
- b. Se sim, por favor explique *(resposta não vai constar no banco de dados)*: _____
- 15.7 Se atualmente você não é um usuário, há quanto tempo meses
- b. Por que você parou de usar? *(a resposta não vai constar do banco de dados)*:
- 15.8 Como usa/usava a maconha na maioria das vezes?
- O1 Eu fumo/fumava misturado com cigarro comum com tabaco
 - O2 Eu fumo/fumava um baseado sem tabaco
 - O3 Eu fumo/fumava usando um cachimbo
 - O4 Ingerindo na comida ou bebida
 - O5 Outro (por favor, explique): _____
- 15.9 Com que frequência você usa/usava maconha?
- O1 Diariamente/Todos os dias
 - O2 (Mais da que) uma vez por semana
 - O3 Poucas vezes por mês
 - O4 Poucas vezes por ano
 - O5 Apenas uma ou duas vezes na vida
- 15.10 Em qual período você mais usa/usava maconha?
- O1 Durante o dia
 - O2 Durante a noite
 - O3 Durante o dia e à noite (dia todo)
 - O4 Aos finais de semana
 - O5 Aos finais de semana e dias da semana
- 15.11 Na maioria das vezes, você usa/usava maconha:
- O1 Socialmente (com amigos)
 - O2 Sozinho(a)

Cannabis Experiences Questionnaire

15.12 Em média, quanto você gasta/gastava com maconha por semana?

- O1 Menos de R\$10.00
- O2 R\$10.00 – R\$15.00
- O3 R\$16.00 – R\$30.00
- O4 R\$31 – R\$50.00
- O5 R\$51.00 – R\$70.00
- O6 Acima de R\$70.00

15.13 Qual o tipo de maconha que você mais usa/usava?

- O1 Haxixe (resina da cannabis)
- O2 Erva (maconha comum)
- O3 Sensimila (sem semente, planta fêmea plantada em casa; erva mais forte, com maior teor de THC)
- O4 Skank
- O5 Outro (por favor, especifique): _____

15.14. Por que você escolheu usar o tipo acima _____

Cannabis Experiences Questionnaire

15.15. Com que frequência você teve as seguintes experiências ao fumar maconha? Por favor, assinale se a experiência foi boa, ruim ou neutra. Se você nunca ou raramente teve determinada experiência, ignore as três últimas colunas (boa, ruim ou neutra) e vá para a experiência seguinte.

	Nunca ou raramente	Esporadi- camente	às vezes	Mais vezes sim do que não	Quase sempre	Boa	Ruim	Neutra
a) Sensação de medo	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
b) Sensação de estar ficando louco	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
c) Nervosismo	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
d) Sensação de ficar desconfiado	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
e) Sensação de felicidade	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
f) Sensação de estar cheio de planos/ideias	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
g) Ouvir vozes	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
h) Capaz de entender melhor o mundo	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
i) Ter visões	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Cannabis Experiences Questionnaire

15.16 Questionário sobre história de uso de Maconha ao longo da vida

Instruções para o pesquisador: Por favor, peça ao participante para completar esta seção. Explique-lhe como esta parte deve ser preenchida, usando como exemplo: *Se você fumasse maconha quando tinha 15 anos, você fumava 2-3 baseados por dia em média, fumava geralmente haxixe e você só fumava sozinho.*

a) FAIXA DE IDADE: 0-11

I. Você usou maconha entre os 0 e 11 anos de idade?	O1 Sim	O0 Não
II. Frequência	O1 Todo dia/diariamente
O2 Mais do que uma vez por semana
O3 Uma vez por semana
O4 Uma ou duas vezes por mês
O5 Algumas vezes por ano
O6 Uma vez por ano
O7 Só usou maconha uma ou duas vezes na vida	
III. Quantidade (média de uso por dia)	O1 1 baseado
O2 2 ou 3 baseados
O3 4 ou mais baseados	
iv. Na maioria das vezes, os baseados eram compartilhados/divididos com outras pessoas?	O1 Sim	O0 Não
v. Tipo	O1 Haxixe (resina da cannabis)
O2 Erva (maconha comum)
O3 Sensimila (sem semente, planta fêmea plantada em casa; erva mais forte, com maior teor de THC)
O4 Skank
O5 Outra (por favor, especifique): _____	
vi. Circunstância de uso	O1 Socialmente (com amigos)
O2 Sozinho(a)
O3 Ambos (às vezes socialmente, às vezes sozinho(a))	

Cannabis Experiences Questionnaire

b) FAIXA DE IDADE: 13-16

I.	Você usou maconha entre os 12 e 16 anos de idade?	O1 Sim O0 Não
II.	Frequência	O1 Todo dia/diariamente
O2 Mais do que uma vez
O3 Uma vez por semana
O4 Uma ou duas vezes por
O5 Algumas vezes por ano
O6 Uma vez por ano
O7 Só usou maconha uma
III.	Quantidade (média de uso por dia)	O1 1 baseado
O2 2 ou 3 baseados
O3 4 ou mais baseados
IV.	Na maioria das vezes, os baseados eram compartilhados/divididos com outras pessoas?	O1 Sim O0 Não
V.	Tipo	O1 Haxixe (resina da cannabis)
O2 Erva (maconha comum)
O3 Sensimila (sem semente, planta fêmea plantada em casa; erva mais forte, com maior teor de THC)
O4 Skank
O5 Outra (por favor, especifique): _____
VI.	Circunstância de uso	O1 Socialmente (com amigos)
O2 Sozinho(a)
O3 Ambos (às vezes socialmente, às vezes sozinho(a))

Cannabis Experiences Questionnaire

c) FAIXA DE IDADE: ACIMA DE 17 ANOS

- i. Você usou maconha com 17 anos de idade ou mais? O1 Sim O0 Não
- ii. Frequência
- O1 Todo dia/diariamente
- O2 Mais do que uma vez por semana
- O3 Uma vez por semana
- O4 Uma ou duas vezes por mês
- O5 Algumas vezes por ano
- O6 Uma vez por ano
- O7 Só usei maconha uma ou
- iii. Quantidade (média de uso por dia)
- O1 1 baseado
- O2 2 ou 3 baseados
- O3 4 ou mais baseados
- iv. Na maioria das vezes, os baseados eram compartilhados/divididos com outras pessoas? O1 Sim O0 Não
- v. Tipo
- O1 Haxixe (resina da cannabis)
- O2 Erva (maconha comum)
- O3 Sensimila (sem semente, planta fêmea plantada em casa; erva mais forte, com maior teor de THC)
- O4 Skank
- O5 Outra (por favor, especifique): _____
- vi. Circunstância de uso
- O1 Socialmente (com amigos)
- O2 Sozinho(a)
- O3 Ambos (às vezes socialmente, às vezes sozinho(a))

d) Se o seu padrão de uso de maconha mudou ao longo do tempo, por favor, explique porque.

(a resposta não vai constar do banco de dados)

e) Rastreamento para dependência de maconha

Alguma vez você já teve 3 ou mais dos seguintes sintomas?

Cannabis Experiences Questionnaire

	Durante a vida		Últimos 12 meses	
1. Tolerância, definido por qualquer um dos itens:				
a. Necessidade de aumento significativo da quantidade da substância para ficar intoxicado ou obter os efeitos desejados.	01 Sim	00 Não	01 Sim	00 Não
b. Redução significativa dos efeitos após o uso crônico da mesma quantidade da substância.	01 Sim	00 Não	01 Sim	00 Não
2. Abstinência, manifestada por qualquer um dos itens:				
a. A presença da síndrome de abstinência característica para a substância.	01 Sim	00 Não	01 Sim	00 Não
b. A mesma substância (ou substância semelhante) é utilizada para aliviar ou evitar os sintomas de abstinência.	01 Sim	00 Não	01 Sim	00 Não
3. A substância é geralmente usada em maiores quantidades ou por um período maior do que o planejado.	01 Sim	00 Não	01 Sim	00 Não
4. Existe um desejo persistente ou tentativas fracassadas de parar ou de reduzir o uso da substância.	01 Sim	00 Não	01 Sim	00 Não
5. Muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção e uso da substância, ou para recuperar-se dos seus efeitos.	01 Sim	00 Não	01 Sim	00 Não
6. Importantes atividades sociais, ocupacionais ou de lazer são deixadas de lado ou reduzidas por causa do uso da substância.	01 Sim	00 Não	01 Sim	00 Não
7. O uso da substância é continuado, apesar do conhecimento da existência de problemas físicos ou psicológicos persistentes ou recorrentes que sejam provavelmente causados ou exacerbados pelo uso da substância.	01 Sim	00 Não	01 Sim	00 Não

15.17 Instruções para o pesquisador: Por favor, para cada tipo de droga, pergunte: *Alguma vez você já usou/experimentou? Se SIM, por favor continue com as questões sobre uso atual e passado. "Por favor, também avalie álcool e drogas quando for aplicável. (veja a folha Álcool & Nicotina em separado).*

☞ Rastreamento de dependência para todos os tipos de drogas:

1. Tolerância, definida por qualquer um dos itens:
 - a. Necessidade de aumento significativo da quantidade da substância para ficar intoxicado ou obter os efeitos desejados.
 - b. Redução significativa dos efeitos após o uso crônico da mesma quantidade da substância.
2. Abstinência, manifestada por qualquer um dos itens:
 - a. A presença da síndrome de abstinência característica para a substância.
 - b. A mesma substância (ou substância semelhante) é utilizada para aliviar ou evitar os sintomas de abstinência.

Cannabis Experiences Questionnaire

3. A substância é geralmente usada em maiores quantidades ou por um período maior do que o planejado.
4. Existe um desejo persistente ou tentativas fracassadas de parar ou de reduzir o uso da substância.
5. Muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção e uso da substância, ou para recuperar-se dos seus efeitos.
6. Importantes atividades sociais, ocupacionais ou de lazer são deixadas de lado ou reduzidas por causa do uso da substância.
7. O uso da substância é continuado, apesar da existência de problemas físicos ou psicológicos persistentes ou recorrentes que sejam provavelmente causados ou exacerbados pelo uso da substância.

^bDefinição de 'Abuso'

- A. Um padrão mal adaptativo de uso de substância levando a prejuízo clínico significativo, manifestado por um (ou mais) dos seguintes itens, ocorrendo dentro de um período de 12 meses:
1. Uso recorrente da substância, resultando na falha em desempenhar obrigações importantes no trabalho, escola ou no ambiente doméstico.
 2. Uso recorrente da substância em situações em que existe perigo físico.
 3. Problemas legais recorrentes relacionados com o uso da substância.
 4. Uso continuado da substância apesar de haver problemas interpessoais ou sociais persistentes ou recorrentes causados ou exacerbados pelos efeitos da substância.
- B. Os sintomas nunca preencheram os critérios de Dependência de Substância para esta classe de substância.

Cannabis Experiences Questionnaire

(Nota para a entrada de dados: EU_CEQ_DRUGS, aberta para cada droga separadamente. Seleccione o tipo correto de medicamentos na primeira pergunta!)

Data |__|__|_|-|__|__|_|-|2|0|__|__|

A. INALANTES³, por ex: cola, gasolina, éter, benzina, lança-perfume.....

1. Uso atual (últimos 12 meses)

- i. Usou? Q1 Sim Q0 Não
- ii. Se SIM: Usou durante a última semana? Q1 Sim Q0 Não
- iii. Quantas semanas nos últimos 12 meses?
 Semanas
- iv. Frequência (isto é, uso médio nas semanas em que usou)
 Q1 Diariamente
 Q2 Uma vez por semana
 Q3 Menos que uma vez por semana
 Q0 Não se aplica
- v. Dependência * Q1 Sim Q0 Não
- vi. Abuso * Q1 Sim Q0 Não

2. Ao longo da vida

- i. Quantos anos você tinha quando usou inalantes pela primeira vez?
 Anos
- ii. Houve uma época em que você usava frequentemente? Q1 Sim Q0 Não
- iii. Quantos anos você tinha nesta época?
 Dec: Anos
- iv. Frequência no período de maior uso
 Q1 Diariamente
 Q2 Uma vez por semana
 Q3 Menos que uma vez por semana
- v. Dependência ao longo da vida * Q1 Sim Q0 Não
- vi. Abuso ao longo da vida * Q1 Sim Q0 Não
3. Se você não usa mais inalantes, quantos anos você tinha quando parou de usar?
 Anos

4. Por que você decidiu parar de usar?

Cannabis Experiences Questionnaire

^a Rastreamento de dependência para todos os tipos de drogas:

^a Rastreamento de dependência para todos os tipos de drogas:

	Passado		Presente	
1. Tolerância, definida por qualquer um dos itens:				
a. Necessidade de aumento significativo da quantidade da substância para ficar intoxicado ou obter os efeitos desejados.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
b. Redução significativa dos efeitos após o uso crônico da mesma quantidade da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
2. Abstinência, manifestada por qualquer um dos itens:				
c. A presença da síndrome de abstinência característica para a substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
d. A mesma substância (ou substância semelhante) é utilizada para aliviar ou evitar os sintomas de abstinência.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
3. A substância é geralmente usada em maiores quantidades ou por um período maior do que o planejado.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
4. Existe um desejo persistente ou tentativas fracassadas de parar ou de reduzir o uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
5. Muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção e uso da substância, ou para recuperar-se dos seus efeitos.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
6. Importantes atividades sociais, ocupacionais ou de lazer são deixadas de lado ou reduzidas por causa do uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
7. O uso da substância é continuado, apesar da existência de problemas físicos ou psicológicos persistentes ou recorrentes que sejam provavelmente causados ou exacerbados pelo uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não

^b Definição de 'Abuso'

A. Um padrão mal adaptativo de uso de substância levando a prejuízo clínico significativo, manifestado por um (ou mais) dos seguintes itens, ocorrendo dentro de um período de 12 meses:

1. Uso recorrente da substância, resultando na falha em desempenhar obrigações importantes no trabalho, escola ou no ambiente doméstico.
2. Uso recorrente da substância em situações em que existe perigo físico.
3. Problemas legais recorrentes relacionados com o uso da substância.
4. Uso continuado da substância apesar de haver problemas interpessoais ou sociais persistentes ou recorrentes causados ou exacerbados pelos efeitos da substância.

B. Os sintomas nunca preencheram os critérios de Dependência de Substância para esta classe de substância.

Cannabis Experiences Questionnaire

Data |__|__| - |__|__| - |2|0|__|__|

B. CRACK¹.....1. Uso atual (últimos 12 meses)

- i. Usou? Q1 Sim Q0 Não
- ii. Se SIM: Usou durante a última semana? Q1 Sim Q0 Não
- iii. Quantas semanas durante os últimos 12 meses? Semanas
- iv. Frequência (isto é, usa médio nas semanas em que usou) Q1 Diariamente
Q2 Uma vez por semana
Q3 Menos que uma vez por semana
Q0 Não se aplica
- v. Dependência * Q1 Sim Q0 Não
- vi. Abuso * Q1 Sim Q0 Não

2. Ao longo da vida

- i. Quantos anos você tinha quando usou crack pela primeira vez? Anos
- ii. Houve uma época em que você usava frequentemente? Q1 Sim Q0 Não
- iii. Quantos anos você tinha nesta época? Des: Anos:
- iv. Frequência no período de maior uso Q1 Diariamente
Q2 Uma vez por semana
Q3 Menos que uma vez por semana
- i. Dependência ao longo da vida * Q1 Sim Q0 Não
- ii. Abuso ao longo da vida * Q1 Sim Q0 Não
3. Se você não usa mais crack, quantos anos você tinha quando parou de usar Anos
4. Por que você decidiu parar de usar?

Cannabis Experiences Questionnaire

^a Rastreamento de dependência para todos os tipos de drogas:

^a Rastreamento de dependência para todos os tipos de drogas:

	Passado		Presente	
1. Tolerância, definida por qualquer um dos itens:				
a. Necessidade de aumento significativo da quantidade da substância para ficar intoxicado ou obter os efeitos desejados.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
b. Redução significativa dos efeitos após o uso crônico da mesma quantidade da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
2. Abstinência, manifestada por qualquer um dos itens:				
c. A presença da síndrome de abstinência característica para a substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
d. A mesma substância (ou substância semelhante) é utilizada para aliviar ou evitar os sintomas de abstinência.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
3. A substância é geralmente usada em maiores quantidades ou por um período maior do que o planejado.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
4. Existe um desejo persistente ou tentativas fracassadas de parar ou de reduzir o uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
5. Muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção e uso da substância, ou para recuperar-se dos seus efeitos.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
6. Importantes atividades sociais, ocupacionais ou de lazer são deixadas de lado ou reduzidas por causa do uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
7. O uso da substância é continuado, apesar da existência de problemas físicos ou psicológicos persistentes ou recorrentes que sejam provavelmente causados ou exacerbados pelo uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não

^b Definição de 'Abuso'

A. Um padrão mal adaptativo de uso de substância levando a prejuízo clínico significativo, manifestado por um (ou mais) dos seguintes itens, ocorrendo dentro de um período de 12 meses:

1. Uso recorrente da substância, resultando na falha em desempenhar obrigações importantes no trabalho, escola ou no ambiente doméstico.
2. Uso recorrente da substância em situações em que existe perigo físico.
3. Problemas legais recorrentes relacionados com o uso da substância.
4. Uso continuado da substância apesar de haver problemas interpessoais ou sociais persistentes ou recorrentes causados ou exacerbados pelos efeitos da substância.

B. Os sintomas nunca preencheram os critérios de Dependência de Substância para esta classe de substância.

Cannabis Experiences Questionnaire

Data |__|__|_|-|__|__|_|-|2|0|__|__|

C. COCAÍNA³.....1. Uso atual (últimos 12 meses)

- i. Uso? O1 Sim O0 Não
- ii. Se Sim: Usou durante a última semana? O1 Sim O0 Não
- iii. Quantas semanas durante os últimos 12 meses? Semanas
- iv. Frequência (isto é, uso médio nas semanas em que usou)
 O1 Diariamente
 O2 Uma vez por semana
 O3 Menos que uma vez por semana
 O0 Não se aplica
- v. Dependência * O1 Sim O0 Não
- vi. Abuso * O1 Sim O0 Não

2. Ao longo da vida

- i. Quantos anos você tinha quando usou cocaína pela primeira vez? Anos
- ii. Já houve uma época em que você usava frequentemente? O1 Sim O0 Não
- iii. Quantos anos você tinha nesta época? Dec: Anos
- iv. Frequência no período de maior uso
 O1 Diariamente
 O2 Uma vez por semana
 O3 Menos que uma vez por semana
- v. Dependência ao longo da vida * O1 Sim O0 Não
- vi. Abuso ao longo da vida * O1 Sim O0 Não
3. Se você não usa mais cocaína, quantos anos você tinha quando parou de usar Anos
4. Por que você decidiu parar de usar?

Cannabis Experiences Questionnaire

^aRastreamento de dependência para todos os tipos de drogas:

^a Rastreamento de dependência para todas as tipos de drogas:

	Passado		Presente	
1. Tolerância, definida por qualquer um dos itens:				
a. Necessidade de aumento significativo da quantidade da substância para ficar intoxicado ou obter os efeitos desejados.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
b. Redução significativa dos efeitos após o uso crônico da mesma quantidade da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
2. Abstinência, manifestada por qualquer um dos itens:				
c. A presença da síndrome de abstinência característica para a substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
d. A mesma substância (ou substância semelhante) é utilizada para aliviar ou evitar os sintomas de abstinência.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
3. A substância é geralmente usada em maiores quantidades ou por um período maior do que o planejado.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
4. Existe um desejo persistente ou tentativas fracassadas de parar ou de reduzir o uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
5. Muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção e uso da substância, ou para recuperar-se dos seus efeitos.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
6. Importantes atividades sociais, ocupacionais ou de lazer são deixadas de lado ou reduzidas por causa do uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
7. O uso da substância é continuado, apesar da existência de problemas físicos ou psicológicos persistentes ou recorrentes que sejam provavelmente causados ou exacerbados pelo uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não

^bDefinição de 'Abuso'

A. Um padrão mal adaptativo de uso de substância levando a prejuízo clínico significativo, manifestado por um (ou mais) dos seguintes itens, ocorrendo dentro de um período de 12 meses:

1. Uso recorrente da substância, resultando na falha em desempenhar obrigações importantes no trabalho, escola ou no ambiente doméstico.
2. Uso recorrente da substância em situações em que existe perigo físico.
3. Problemas legais recorrentes relacionados com o uso da substância.
4. Uso continuado da substância apesar de haver problemas interpessoais ou sociais persistentes ou recorrentes causados ou exacerbados pelos efeitos da substância.

B. Os sintomas nunca preencheram os critérios de Dependência de Substância para esta classe de substância.

Cannabis Experiences Questionnaire

Data |__|__| - |__|__| - |2|0|__|__|

D. ANFETAMINAS/ESTIMULANTES¹, por ex: ecstasy, speed (bolinha).....1. Uso atual (últimos 12 meses)

i. Usou?

O1 Sim O0 Não

ii. Se SIM: Usou durante a última semana?

O1 Sim O0 Não

iii. Quantas semanas durante os últimos 12 meses?

 Semanas
iv. Frequência (isto é, uso médio nas semanas em que usou)

O1 Diariamente

O2 Uma vez por semana

O3 Menos que uma vez por semana

O0 Não se aplica

v. Dependência *

O1 Sim O0 Não

vi. Abuso *

O1 Sim O0 Não

2. Ao longo da vida

i. Quantos anos você tinha quando usou anfetaminas/estimulantes pela primeira vez?

 Anos

ii. Houve uma época em que você usava frequentemente?

O1 Sim O0 Não

iii. Quantos anos você tinha nesta época?

 Dos Aos

iv. Frequência no período de maior uso

O1 Diariamente

O2 Uma vez por semana

O3 Menos que uma vez por semana

v. Dependência ao longo da vida *

O1 Sim O0 Não

vi. Abuso ao longo da vida *

O1 Sim O0 Não

3. Se você não usa mais anfetaminas/estimulantes quantos anos você tinha quando parou de usar?

 Anos

4. Por que você decidiu parar de usar?

Cannabis Experiences Questionnaire

^a Rastreamento de dependência para todos os tipos de drogas:

^b Rastreamento de dependência para todos os tipos de drogas:

	Passado		Presente	
1. Tolerância, definida por qualquer um dos itens:				
a. Necessidade de aumento significativo da quantidade da substância para ficar intoxicado ou obter os efeitos desejados.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
b. Redução significativa dos efeitos após o uso crônico da mesma quantidade da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
2. Abstinência, manifestada por qualquer um dos itens:				
c. A presença da síndrome de abstinência característica para a substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
d. A mesma substância (ou substância semelhante) é utilizada para aliviar ou evitar os sintomas de abstinência.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
3. A substância é geralmente usada em maiores quantidades ou por um período maior do que o planejado.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
4. Existe um desejo persistente ou tentativas fracassadas de parar ou de reduzir o uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
5. Muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção e uso da substância, ou para recuperar-se dos seus efeitos.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
6. Importantes atividades sociais, ocupacionais ou de lazer são deixadas de lado ou reduzidas por causa do uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
7. O uso da substância é continuado, apesar da existência de problemas físicos ou psicológicos persistentes ou recorrentes que sejam provavelmente causados ou exacerbados pelo uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não

^b Definição de 'Abuso'

A. Um padrão mal adaptativo de uso de substância levando a prejuízo clínico significativo, manifestado por um (ou mais) dos seguintes itens, ocorrendo dentro de um período de 12 meses:

1. Uso recorrente da substância, resultando na falha em desempenhar obrigações importantes no trabalho, escola ou no ambiente doméstico.
2. Uso recorrente da substância em situações em que existe perigo físico.
3. Problemas legais recorrentes relacionados com o uso da substância.
4. Uso continuado da substância apesar de haver problemas interpessoais ou sociais persistentes ou recorrentes causados ou exacerbados pelos efeitos da substância.

B. Os sintomas nunca preencheram os critérios de Dependência de Substância para esta classe de substância.

Cannabis Experiences Questionnaire

Data | _ | _ | _ | - | _ | _ | _ | - | 2 | 0 | _ | _ | _ |

E. SEDATIVOS¹, por ex. calmantes, remédios para dormir, tarja preta, diazepam (uso sem prescrição médica)1. Uso atual (últimos 12 meses)

- i. Usou? Q1 Sim Q0 Não
- ii. Se SIM: Usou durante a última semana? Q1 Sim Q0 Não
- iii. Quantas semanas durante os últimos 12 meses? Semanas
- iv. Frequência (isto é, uso médio nas semanas em que usou)
- Q1 Diariamente
- Q2 Uma vez por semana
- Q3 Menos que uma vez por semana
- Q0 Não se aplica
- v. Dependência * Q1 Sim Q0 Não
- vi. Abuso * Q1 Sim Q0 Não

2. Ao longo da vida

- i. Quantos anos você tinha quando usou sedativos pela primeira vez? Anos
- ii. Houve uma época em que você usava frequentemente? Q1 Sim Q0 Não
- iii. Quantos anos você tinha nesta época? Deix Aos
- iv. Frequência no período de maior uso
- Q1 Diariamente
- Q2 Uma vez por semana
- Q3 Menos que uma vez por semana
- v. Dependência ao longo da vida * Q1 Sim Q0 Não
- vi. Abuso ao longo da vida * Q1 Sim Q0 Não
3. Se você não usa mais sedativos, quantos anos você tinha quando parou de usar?? Anos
4. Por que você decidiu parar de usar?
- _____

Cannabis Experiences Questionnaire

^a Rastreamento de dependência para todos os tipos de drogas:

^a Rastreamento de dependência para todos os tipos de drogas:

	Passado		Presente	
1. Tolerância, definida por qualquer um dos itens:				
a. Necessidade de aumento significativo da quantidade da substância para ficar intoxicado ou obter os efeitos desejados.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
b. Redução significativa dos efeitos após o uso crônico da mesma quantidade da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
2. Abstinência, manifestada por qualquer um dos itens:				
c. A presença da síndrome de abstinência característica para a substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
d. A mesma substância (ou substância semelhante) é utilizada para aliviar ou evitar os sintomas de abstinência.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
3. A substância é geralmente usada em maiores quantidades ou por um período maior do que o planejado.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
4. Existe um desejo persistente ou tentativas fracassadas de parar ou de reduzir o uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
5. Muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção e uso da substância, ou para recuperar-se dos seus efeitos.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
6. Importantes atividades sociais, ocupacionais ou de lazer são deixadas de lado ou reduzidas por causa do uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
7. O uso da substância é continuado, apesar da existência de problemas físicos ou psicológicos persistentes ou recorrentes que sejam provavelmente causados ou exacerbados pelo uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não

^b Definição de 'Abuso'

A. Um padrão mal adaptativo de uso de substância levando a prejuízo clínico significativo, manifestado por um (ou mais) dos seguintes itens, ocorrendo dentro de um período de 12 meses:

1. Uso recorrente da substância, resultando na falha em desempenhar obrigações importantes no trabalho, escola ou no ambiente doméstico.
2. Uso recorrente da substância em situações em que existe perigo físico.
3. Problemas legais recorrentes relacionados com o uso da substância.
4. Uso continuado da substância apesar de haver problemas interpessoais ou sociais persistentes ou recorrentes causados ou exacerbados pelos efeitos da substância.

B. Os sintomas nunca preencheram os critérios de Dependência de Substância para esta classe de substância.

Cannabis Experiences Questionnaire

Data |__|__| - |__|__| - |2|0|__|__|

F. OPIÓIDES¹, por ex. heroína, morfina, metadona, codeína, dolantina, tramadol1. Uso atual (últimos 12 meses)

- i. Usou? Q1 Sim Q0 Não
- ii. Se Sim: Usou durante a última semana? Q1 Sim Q0 Não
- iii. Quantas semanas durante os últimos 12 meses? Semanas
- iv. *Frequência (isto é, uso médio nas semanas em que usou)*
 Q1 Diariamente
 Q2 Uma vez por semana
 Q3 Menos que uma vez por semana
 Q0 Não se aplica
- v. Dependência * Q1 Sim Q0 Não
- vi. Abuso * Q1 Sim Q0 Não

2. Ao longo da vida

- i. Quantos anos você tinha quando usou opióides pela primeira vez? Anos
- ii. Houve uma época em que você usava frequentemente? Q1 Sim Q0 Não
- iii. Quantos anos você tinha nesta época? Dos Aos
- iv. *Frequência no período de maior uso*
 Q1 Diariamente
 Q2 Uma vez por semana
 Q3 Menos que uma vez por semana
- v. Dependência ao longo da vida * Q1 Sim Q0 Não
- vi. Abuso ao longo da vida * Q1 Sim Q0 Não
3. Se você não usa mais opióides, quantos anos você tinha quando parou de usar? Anos
4. Por que você decidiu parar de usar?

Cannabis Experiences Questionnaire

^a Rastreamento de dependência para todos os tipos de drogas:

^a Rastreamento de dependência para todos os tipos de drogas:

	Passado		Presente	
1. Tolerância, definida por qualquer um dos itens:				
a. Necessidade de aumento significativo da quantidade da substância para ficar intoxicado ou obter os efeitos desejados.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
b. Redução significativa dos efeitos após o uso crônico da mesma quantidade da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
2. Abstinência, manifestada por qualquer um dos itens:				
c. A presença da síndrome de abstinência característica para a substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
d. A mesma substância (ou substância semelhante) é utilizada para aliviar ou evitar os sintomas de abstinência.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
3. A substância é geralmente usada em maiores quantidades ou por um período maior do que o planejado.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
4. Existe um desejo persistente ou tentativas fracassadas de parar ou de reduzir o uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
5. Muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção e uso da substância, ou para recuperar-se dos seus efeitos.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
6. Importantes atividades sociais, ocupacionais ou de lazer são deixadas de lado ou reduzidas por causa do uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
7. O uso da substância é continuado, apesar da existência de problemas físicos ou psicológicos persistentes ou recorrentes que sejam provavelmente causados ou exacerbados pelo uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não

^bDefinição de 'Abuso'

A. Um padrão mal adaptativo de uso de substância levando a prejuízo clínico significativo, manifestado por um (ou mais) dos seguintes itens, ocorrendo dentro de um período de 12 meses:

1. Uso recorrente da substância, resultando na falha em desempenhar obrigações importantes no trabalho, escola ou no ambiente doméstico.
2. Uso recorrente da substância em situações em que existe perigo físico.
3. Problemas legais recorrentes relacionados com o uso da substância.
4. Uso continuado da substância apesar de haver problemas interpessoais ou sociais persistentes ou recorrentes causados ou exacerbados pelos efeitos da substância.

B. Os sintomas nunca preencheram os critérios de Dependência de Substância para esta classe de substância.

Cannabis Experiences Questionnaire

Data |__|__| - |__|__| - |2|0|__|__|

6. ALUCINÓGENOS⁴, por ex. LSD, cogumelos, PCP1. Uso atual (últimos 12 meses)

- i. Usou? Q1 Sim Q0 Não
- ii. Se SIM: Usou durante a última semana? Q1 Sim Q0 Não
- iii. Quantas semanas durante os últimos 12 meses? Semanas
- iv. Frequência (isto é, usa médio nas semanas em que usou)
- Q1 Diariamente
- Q2 Uma vez por semana
- Q3 Menos que uma vez por semana
- Q0 Não se aplica
- v. Dependência * Q1 Sim Q0 Não
- vi. Abuso * Q1 Sim Q0 Não

2. Ao longo da vida

- i. Quantos anos você tinha quando usou alucinógenos pela primeira vez? Anos
- ii. Houve uma época em que você usava frequentemente? Q1 Sim Q0 Não
- iii. Quantos anos você tinha nesta época? Dos: Aos:
- iv. Frequência no período de maior uso
- Q1 Diariamente
- Q2 Uma vez por semana
- Q3 Menos que uma vez por semana
- v. Dependência ao longo da vida * Q1 Sim Q0 Não
- vi. Dependência ao longo da vida * Q1 Sim Q0 Não
3. Se você não usa mais alucinógenos, quantos anos você tinha quando parou de usar? Anos
4. Por que você decidiu parar de usar?
- _____

Cannabis Experiences Questionnaire

^a Rastreamento de dependência para todos os tipos de drogas:

^b Rastreamento de dependência para todos os tipos de drogas:

	Passado		Presente	
1. Tolerância, definida por qualquer um dos itens:				
a. Necessidade de aumento significativo da quantidade da substância para ficar intoxicado ou obter os efeitos desejados.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
b. Redução significativa dos efeitos após o uso crônico da mesma quantidade da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
2. Abstinência, manifestada por qualquer um dos itens:				
c. A presença da síndrome de abstinência característica para a substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
d. A mesma substância (ou substância semelhante) é utilizada para aliviar ou evitar os sintomas de abstinência.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
3. A substância é geralmente usada em maiores quantidades ou por um período maior do que o planejado.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
4. Existe um desejo persistente ou tentativas fracassadas de parar ou de reduzir o uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
5. Muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção e uso da substância, ou para recuperar-se dos seus efeitos.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
6. Importantes atividades sociais, ocupacionais ou de lazer são deixadas de lado ou reduzidas por causa do uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
7. O uso da substância é continuado, apesar da existência de problemas físicos ou psicológicos persistentes ou recorrentes que sejam provavelmente causados ou exacerbados pelo uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não

^bDefinição de 'Abuso'

A. Um padrão mal adaptativo de uso de substância levando a prejuízo clínico significativo, manifestado por um (ou mais) dos seguintes itens, ocorrendo dentro de um período de 12 meses:

1. Uso recorrente da substância, resultando na falha em desempenhar obrigações importantes no trabalho, escola ou no ambiente doméstico.
2. Uso recorrente da substância em situações em que existe perigo físico.
3. Problemas legais recorrentes relacionados com o uso da substância.
4. Uso continuado da substância apesar de haver problemas interpessoais ou sociais persistentes ou recorrentes causados ou exacerbados pelos efeitos da substância.

B. Os sintomas nunca preencheram os critérios de Dependência de Substância para esta classe de substância.

Cannabis Experiences Questionnaire

Data |__|__|_|-|__|__|_|-| 2 | 0 |__|__|H. KETAMINA* (ou cetamina)1. Uso atual (últimos 12 meses)

- i. Usou? Q1 Sim Q0 Não
- ii. Se SIM: Usou durante a última semana? Q1 Sim Q0 Não
- iii. Quantas semanas durante os últimos 12 meses? Semanas
- iv. Frequência (isto é, uso médio nas semanas em que usou) Q1 Diariamente
Q2 Uma vez por semana
Q3 Menos que uma vez por semana
Q0 Não se aplica
- v. Dependência * Q1 Sim Q0 Não
- vi. Abuso * Q1 Sim Q0 Não

2. Ao longo da vida

- i. Quantos anos você tinha quando usou ketaminas pela primeira vez? Anos
- ii. Houve uma época em que você usava frequentemente? Q1 Sim Q0 Não
- iii. Quantos anos você tinha nesta época? Dos: Anos:
- iv. Frequência no período de maior uso Q1 Diariamente
Q2 Uma vez por semana
Q3 Menos que uma vez por semana
- v. Dependência ao longo da vida* Q1 Sim Q0 Não
- vi. Abuso ao longo da vida* Q1 Sim Q0 Não

3. Se você não usa mais ketamina, quantos anos você tinha quando parou de usar? Anos

4. Por que você decidiu parar de usar?

Cannabis Experiences Questionnaire

^aRastreamento de dependência para todos os tipos de drogas:

^a Rastreamento de dependência para todos os tipos de drogas:

	Passado		Presente	
1. Tolerância, definida por qualquer um dos itens:				
a. Necessidade de aumento significativo da quantidade da substância para ficar intoxicado ou obter os efeitos desejados.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
b. Redução significativa dos efeitos após o uso crônico da mesma quantidade da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
2. Abstinência, manifestada por qualquer um dos itens:				
c. A presença da síndrome de abstinência característica para a substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
d. A mesma substância (ou substância semelhante) é utilizada para aliviar ou evitar os sintomas de abstinência.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
3. A substância é geralmente usada em maiores quantidades ou por um período maior do que o planejado.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
4. Existe um desejo persistente ou tentativas fracassadas de parar ou de reduzir o uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
5. Muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção e uso da substância, ou para recuperar-se dos seus efeitos.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
6. Importantes atividades sociais, ocupacionais ou de lazer são deixadas de lado ou reduzidas por causa do uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
7. O uso da substância é continuado, apesar da existência de problemas físicos ou psicológicos persistentes ou recorrentes que sejam provavelmente causados ou exacerbados pelo uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não

^bDefinição de 'Abuso'

A. Um padrão mal adaptativo de uso de substância levando a prejuízo clínico significativo, manifestado por um (ou mais) dos seguintes itens, ocorrendo dentro de um período de 12 meses:

1. Uso recorrente da substância, resultando na falha em desempenhar obrigações importantes no trabalho, escola ou no ambiente doméstico.
2. Uso recorrente da substância em situações em que existe perigo físico.
3. Problemas legais recorrentes relacionados com o uso da substância.
4. Uso continuado da substância apesar de haver problemas interpessoais ou sociais persistentes ou recorrentes causados ou exacerbados pelos efeitos da substância.

B. Os sintomas nunca preencheram os critérios de Dependência de Substância para esta classe de substância.

Cannabis Experiences Questionnaire

Data: |_|_|-|_|_|-|2|0|_|_|

I. OUTRAS DROGAS²: Por favor, especifique: _____1. Uso atual (últimos 12 meses)

- i. Usou? Q1 Sim Q0 Não
- ii. Se Sim: Usou durante a última semana? Q1 Sim Q0 Não
- iii. Quantas semanas durante os últimos 12 meses? semanas
- iv. Frequência (isto é, uso médio nas semanas em que usou)
- Q1 Diariamente
- Q2 Uma vez por semana
- Q3 Menos que uma vez por semana
- Q0 Não se aplica
- v. Dependência * Q1 Sim Q0 Não
- vi. Abuso * Q1 Sim Q0 Não

2. Ao longo da vida

- i. Quantos anos você tinha quando usou.....pela primeira vez? Anos
- ii. Houve uma época em que você usava frequentemente? Q1 Sim Q0 Não
- iii. Quantos anos você tinha nesta época? Dos: Anos:
- iv. Frequência no período de maior uso
- Q1 Diariamente
- Q2 Uma vez por semana
- Q3 Menos que uma vez por semana
- v. Dependência ao longo da vida * Q1 Sim Q0 Não
- vi. Abuso ao longo da vida * Q1 Sim Q0 Não
3. Se você não usa mais..... quantos anos você tinha quando parou de usar? Anos
4. Por que você decidiu parar de usar?
- _____

Cannabis Experiences Questionnaire

^a Rastreamento de dependência para todos os tipos de drogas:

^a Rastreamento de dependência para todos os tipos de drogas:

	Passado		Presente	
1. Tolerância, definida por qualquer um dos itens:				
a. Necessidade de aumento significativo da quantidade da substância para ficar intoxicado ou obter os efeitos desejados.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
b. Redução significativa dos efeitos após o uso crônico da mesma quantidade da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
2. Abstinência, manifestada por qualquer um dos itens:				
c. A presença da síndrome de abstinência característica para a substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
d. A mesma substância (ou substância semelhante) é utilizada para aliviar ou evitar os sintomas de abstinência.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
3. A substância é geralmente usada em maiores quantidades ou por um período maior do que o planejado.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
4. Existe um desejo persistente ou tentativas fracassadas de parar ou de reduzir o uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
5. Muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção e uso da substância, ou para recuperar-se dos seus efeitos.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
6. Importantes atividades sociais, ocupacionais ou de lazer são deixadas de lado ou reduzidas por causa do uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não
7. O uso da substância é continuado, apesar da existência de problemas físicos ou psicológicos persistentes ou recorrentes que sejam provavelmente causados ou exacerbados pelo uso da substância.	Q1 Sim	Q0 Não	Q1 Sim	Q0 Não

^b Definição de 'Abuso'

A. Um padrão mal adaptativo de uso de substância levando a prejuízo clínico significativo, manifestado por um (ou mais) dos seguintes itens, ocorrendo dentro de um período de 12 meses:

1. Uso recorrente da substância, resultando na falha em desempenhar obrigações importantes no trabalho, escola ou no ambiente doméstico.
2. Uso recorrente da substância em situações em que existe perigo físico.
3. Problemas legais recorrentes relacionados com o uso da substância.
4. Uso continuado da substância apesar de haver problemas interpessoais ou sociais persistentes ou recorrentes causados ou exacerbados pelos efeitos da substância.

B. Os sintomas nunca preencheram os critérios de Dependência de Substância para esta classe de substância.

ANEXO 6 – Teste de Inteligência Não Verbal

Exemplo 2

128

TIG-NV – Teste de Inteligência Geral – Não-Verbal

Exemplo 3:

TIG-NV
Teste de Inteligência Geral - Não-Verbal
 Autora: Silvestre M. V. Daquino Tosi

Instrumento para Avaliação Psicológica e Neuropsicológica

Nome: 11/05/11
 Data de Nascimento: 04/01/80 Local de Nascimento: Curitiba Estado: PR
 Idade: 30 Sexo: M F 1 Escolaridade: Ensino Superior Completo
 RG: 9.349.003 CPF: 011.12.123-1234
 Curso/Série: 20 Escola/Instituição: Unifil País: 1
 Função: Psicólogo Data de Aplicação: 12/10/2011
 Aplicador: Silvestre M. V. Daquino Tosi Início: 14:00 Término: 16:00
 Assinatura: Silvestre M. V. Daquino Tosi Assinatura: [Assinatura]

INSTRUÇÕES:
 Neste teste para cada item você tem a possibilidade de escolher, entre as respostas, aquela que considera correta. Marque a letra correspondente nesta Folha de Resposta.

Exemplo:

Item	Resposta
1	B

Item	Resposta	Pontos	Item	Resposta	Pontos	Item	Resposta	Pontos
1	B	1	11	B	1	21	B	1
2	B	1	12	B	1	22	B	1
3	B	1	13	B	1	23	B	1
4	B	1	14	B	1	24	B	1
5	B	1	15	B	1	25	B	1
6	B	1	16	B	1	26	B	1
7	B	1	17	B	1	27	B	1
8	B	1	18	B	1	28	B	1
9	B	1	19	B	1	29	B	1
10	B	1	20	B	1	30	B	1
Total		30						

Grupo	Item	Erros	Desempenho (% Acertos)
III	1, 2, 3, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30	0	100%
II	1, 2, 3, 4, 5, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30	0	100%
I	1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30	0	100%

Pontos Brutos = 30
 Percentil = 100
 Q.I. = 100
 Classificação da Inteligência = Muito Superior

ANEXO 7 – Questionário de Trauma na infância

Questionário de Trauma na Infância

(Nota para a entrada de dados: EU_CTQ)

ESTUDO: EU-GEI	Data de Nascimento
Número do Participante: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Intervalo de tempo: tempo de vida	Período – Replacet: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Entrevistador:	Data: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>

"Para cada questão, marque a resposta que melhor descreve como se sente." [Todos os participante devem completar o questionário por conta própria. Assistência pode ser fornecida se a pessoa tiver dificuldade em ler as questões.]

Antes dos 17 anos:	Nunca	Poucas vezes	Às vezes	Muitas vezes	Sempre
1. Eu não tive o suficiente para comer.	O1	O2	O3	O4	O5
2. Eu sabia que havia alguém para me cuidar e proteger.	O1	O2	O3	O4	O5
3. As pessoas da minha família me chamaram de coisas como do tipo "estúpido(a)", "preguiçoso(a)", ou "feio(a)".	O1	O2	O3	O4	O5
4. Meus pais estiveram muito bêbados ou drogados para poder cuidar da família.	O1	O2	O3	O4	O5
5. Houve alguém na minha família que ajudou a me sentir especial e importante.	O1	O2	O3	O4	O5
6. Eu tive que usar roupas sujas.	O1	O2	O3	O4	O5
7. Eu me senti amado(a).	O1	O2	O3	O4	O5
8. Eu achei que meus pais preferiam que eu nunca tivesse nascido.	O1	O2	O3	O4	O5
9. Eu apanhei tanto de alguém da minha família que tive de ir ao hospital ou consultar um médico.	O1	O2	O3	O4	O5
10. Alguém da minha família me bateu tanto que me deixou com machucados roxos.	O1	O2	O3	O4	O5
11. Eu apanhei com cinto, vara, corda ou outras coisas que machucaram.	O1	O2	O3	O4	O5
12. As pessoas da minha família cuidavam umas das outras.	O1	O2	O3	O4	O5

Questionário de Trauma na Infância

	Nunca	Poucas vezes	Às vezes	Muitas vezes	Sempre
13. Pessoas da minha família disseram coisas que me machucaram ou me ofenderam.	01	02	03	04	05
14. Eu acredito que fui maltratado(a) fisicamente.	01	02	03	04	05
15. Eu apanhei tanto que um professor, vizinho ou médico chegou a notar.	01	02	03	04	05
16. Eu senti que alguém da minha família me odiava.	01	02	03	04	05
17. As pessoas da minha família se sentiam unidas.	01	02	03	04	05
18. Tentaram me tocar ou me fizeram tocar de uma maneira sexual.	01	02	03	04	05
19. Ameaçaram me machucar ou contar mentiras sobre mim se eu não fizesse algo sexual.	01	02	03	04	05
20. Tentaram me forçar a fazer algo sexual ou assistir coisas sobre sexo.	01	02	03	04	05
Antes dos 17 anos:	Nunca	Poucas vezes	Às vezes	Muitas vezes	Sempre
21. Alguém me molestou.	01	02	03	04	05
22. Eu acredito que fui maltratado(a) emocionalmente.	01	02	03	04	05
23. Houve alguém para me levar ao médico quando eu precisei.	01	02	03	04	05
24. Eu acredito que fui abusado(a) sexualmente.	01	02	03	04	05
25. Minha família foi uma fonte de força e apoio.	01	02	03	04	05

ANEXO 8 – Aprovação no Comitê de Ética dos humanos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 22 de novembro de 2013

Ofício nº 4203/2013
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 12606/2012

**“ESQUIZOFRENIA E OUTROS TRANSTORNOS PSICÓTICOS –
DETERMINANTES SOCIAIS E BIOLÓGICOS”**

Prezadas Senhoras,

O Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 378ª Reunião Ordinária, realizada em 18/11/2013, tomou ciência e aprovou as recomendações solicitadas pela CONEP e atendidas por Vossa Senhoria (conforme parecer anexo).

Atenciosamente.

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA

Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

SILVIA HELENA GALLO TENAN

PROFª.DRª. CRISTINA MARTA DEL BEN

Depto. de Neurociências e Ciências do Comportamento

ANEXO 9 – Termo de Consentimento para Guarda de Material Biológico

Eu, Cristina Marta Del-Ben, declaro ser responsável pelo banco de amostras STREAM criado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com o objetivo de guardar amostras de sangue para estudos futuros sobre o papel dos genes e das reações inflamatórias nas causas de transtornos mentais. Este material é coletado logo após a conclusão das entrevistas previstas no projeto de pesquisa Esquizofrenia e outros transtornos psicóticos: determinantes sociais e biológicos, do qual você participa. Nós precisaremos colher amostras de sangue em três ocasiões (20 ml ao todo – equivalente a duas colheres de sopa). É importante lembrar que você poderá sentir dor durante a retirada do sangue e que pode ocorrer o aparecimento de manchas roxas no local. Após coletado, o material será guardado no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular em Neurociências da FMRP-USP.

Desta forma, gostaria de convidar-lo(a) para guardar uma amostra do seu sangue para fins de pesquisa e análise científica. Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O(A) Sr.(a) também tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.

Eu me comprometo a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua amostra de sangue será identificada por meio de códigos criados especificamente para este banco de amostras. O (a) senhor(a) me passará todos os dados de como posso lhe encontrar e garanto fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico.

Declaro que toda nova pesquisa a ser feita com o seu material será buscado novamente seu consentimento específico, bem como será submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Agradeço a colaboração, colocando-me à disposição para os esclarecimentos que se fizerem necessários.

Certificado de Consentimento

Tendo recebido as informações acima, aceito que minha amostra de material biológico seja armazenada no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, sob a responsabilidade de **Cristina Marta Del-Ben**, para fins de pesquisa e análise científica.

Nome e documento de identificação do participante	Assinatura	Data
Nome e documento de identificação da testemunha imparcial	Assinatura	Data
Nome e documento de identificação do responsável legal	Assinatura	Data
Nome do pesquisador	Assinatura	Data

ANEXO 10 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Casos

Projeto de pesquisa
ESQUIZOFRENIA E OUTROS TRANSTORNOS PSICÓTICOS: DETERMINANTES
SOCIAIS E BIOLÓGICOS
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CASOS

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo chamado “Esquizofrenia e outros transtornos psicóticos: determinantes sociais e biológicos”. Antes de você decidir sobre a sua participação é importante que você entenda porque esta pesquisa está sendo realizada e do que ela trata. Por favor, leia as seguintes informações com cuidado e fique à vontade para fazer perguntas, caso haja algo que não esteja claro para você ou se você precisar de mais detalhes.

Obrigado pelo seu interesse em nosso projeto.

Qual o objetivo deste estudo?

Nós estamos interessados em descobrir se o risco de desenvolver um transtorno psicótico, cuja principal característica são alterações do pensamento e da percepção dos estímulos da realidade, caracterizadas pela crença em situações que não existem (delírios) e por ver e/ou ouvir coisas que outras pessoas não estão vendo ou ouvindo (alucinações). É determinado por fatores biológicos (como a organização dos genes, alterações no sistema de proteção de seu organismo e alterações cerebrais) e por fatores ambientais (como pobreza, discriminação, isolamento social, uso de drogas e a ocorrência de eventos negativos durante a infância, como divórcio dos pais, humilhação ou abuso). Particularmente, estamos interessados em compreender se os efeitos destes fatores sociais no risco de psicose são diferentes, de acordo com os diferentes tipos de genes que as pessoas possuem.

Assim, pretendemos investigar a existência de variações nos casos novos de transtornos psicóticos considerando-se

- a) a associação entre fatores de risco da própria pessoa, de seus familiares e das características da região onde o participante vive;
- b) a existência de alterações no cérebro de pessoas com transtornos psicóticos, comparados com pessoas sem o mesmo diagnóstico (controles da comunidade e irmãos), através de um exame de Ressonância Nuclear Magnética;

c) a ocorrência de alterações na organização dos genes e no sistema de proteção do organismo em pessoas com transtornos psicóticos que apresentam alucinações e/ou delírios, comparando-as com pessoas sem o mesmo diagnóstico (controles da comunidade e irmãos).

Por que eu fui convidado?

Você foi convidado para participar do estudo porque você apresentou um primeiro episódio psicótico com a presença de alucinações e/ou delírios que desorganizaram seu comportamento e vive em uma das cidades pertencentes ao Décimo Terceiro Departamento Regional da Secretaria Estadual de Saúde (DRS XIII), cuja sede é Ribeirão Preto, onde nós estamos conduzindo o estudo.

Nós pretendemos convidar, em um período de três anos, 300 pessoas que apresentaram um primeiro episódio psicótico para participar do estudo, assim como 150 irmãos ou irmãs destes participantes e 300 pessoas que nunca tiveram episódio psicótico. O estudo faz parte de um grande estudo europeu que está sendo realizado em 15 centros europeus de 5 países. Você deve ter idade entre 16 e 64 anos para participar. Caso você tenha menos de 18 anos, seus pais ou outro responsável legal deverão concordar com a sua participação no estudo.

Eu sou obrigado a participar?

Esta é uma escolha sua. Antes que você concorde em participar, nós descreveremos o estudo ao longo desse termo de informação. Nós então pediremos que você assine um termo de consentimento para demonstrar que você concordou em participar. Você é livre para se retirar do estudo a qualquer momento, sem dar explicações. Essa escolha não irá afetar os cuidados de saúde que você recebe.

O que me pedirão para fazer?

Inicialmente, nós pediremos que você responda alguns questionários sobre o seu passado, sobre as suas condições de saúde atuais e circunstâncias sociais. Perguntaremos também sobre os seus sintomas e solicitaremos a sua permissão para ler o seu prontuário.

Nós precisaremos colher amostras de sangue em três ocasiões (20 ml ao todo – equivalente a duas colheres de sopa) para que nós possamos estudar a interação de genes e da capacidade de proteção de seu organismo com fatores sociais e experiências durante a vida. O sangue será colhido utilizando material descartável e este procedimento será realizado por profissionais experientes [médico(a) ou enfermeiro(a)]. É importante lembrar que você poderá

sentir dor durante a retirada do sangue e que pode ocorrer o aparecimento de manchas roxas no local.

Você também será convidado a realizar de um exame de Ressonância Magnética. Esse exame será usado para investigarmos se existem diferenças no tamanho e nos níveis de algumas substâncias de algumas áreas do cérebro entre pacientes e controles.

Pediremos também a sua permissão para convidar seus irmãos e irmãs para participar do estudo.

Quanto tempo irá durar a coleta de dados?

Nós estimamos que precisaremos de cerca de 6 horas para completarmos todos os questionários e realizarmos as coletas de sangue. Esperamos completar todas as tarefas em 3 encontros, mas, se você preferir, podemos fazer outros arranjos. Você é livre para fazer pausas em qualquer momento que desejar ou pode escolher outro horário para retornar em outra ocasião para terminar a coleta caso se sinta cansado ou indisposto.

O exame de ressonância magnética será realizado em um dia previamente agendado e deve durar cerca de 40 min.

Eu receberei algum pagamento?

Nós iremos ressarcir seus gastos com transporte e alimentação.

Onde o estudo será realizado?

O estudo será realizado no Ambulatório do Hospital das Clínicas (HCFMRP-USP), nos dias em que você tiver retorno com seu médico. Se você preferir, nós poderemos ir até a sua casa para realizarmos as entrevistas, porém nós teremos que pedir que você vá até o Hospital das Clínicas para coletarmos a amostra de sangue e para a realização do exame de ressonância magnética.

O que acontecerá se eu optar por sair do estudo?

A participação no estudo é absolutamente voluntária. Se você optar por não participar, essa decisão não irá interferir no seu tratamento, ou no seu relacionamento com o seu médico ou outros profissionais de saúde. Você é livre para mudar de ideia a qualquer momento. Todas as informações pessoais serão destruídas. Esta situação também se aplica no caso de você se sentir indisposto para continuar participando do estudo.

Quais são os possíveis riscos e benefícios da participação?

Nós faremos perguntas sobre circunstâncias pessoais e do passado, o que algumas pessoas podem considerar angustiante. Todos os pesquisadores responsáveis pela coleta de dados são psicólogos treinados e experientes e oferecerão suporte se você precisar. Você também poderá achar o dia cansativo e então você poderá fazer uma pausa ou retornar em outra ocasião para completar as tarefas. Você não tem obrigação de responder nenhuma questão e você pode sair do estudo a qualquer momento. Um outro inconveniente pode ser um leve desconforto ao coletar a amostra de sangue e ao realizar o exame de Ressonância Magnética.

As entrevistas, assim como os exames de imagem e a coleta de sangue serão realizadas por profissionais treinados com os procedimentos e com experiência no manejo de problemas emocionais.

O exame de Ressonância Magnética de crânio é um exame seguro, não doloroso, não invasivo, sem emissão de radiação e não será administrada anestesia ou contraste, portanto, não há risco de reações alérgicas. Você ficará deitado acordado enquanto o aparelho faz imagens do seu cérebro. Algumas pessoas podem se sentir desconfortáveis por ficarem deitadas em local estreito ou incomodadas com o barulho forte que a máquina de ressonância faz quando está funcionando. O exame será interrompido imediatamente e você poderá sair do aparelho, se desejar, podendo fazer o exame em outro momento.

Você usará protetores de ouvido durante o exame para diminuir o desconforto do barulho. Terá também à mão uma campainha, que poderá acionar se precisar falar com o técnico que estará operando o aparelho. Um dos pesquisadores deste projeto estará presente durante todo o exame de Ressonância Magnética.

Ao participar do estudo você irá nos ajudar a entender mais sobre as diferenças entre pessoas com e sem psicose (presença de alucinações e delírios), o que pode ajudar a prevenir que outras pessoas venham a desenvolver transtornos psicóticos no futuro.

O que acontecerá com as minhas informações?

Sua confidencialidade será mantida em todos os momentos e as amostras de sangue, papéis e dados eletrônicos seguirão as práticas éticas e legais. Todas as informações sobre você serão manejadas com estrita confidencialidade. Você será identificado por um número, que será utilizado no lugar dos seus dados pessoais. Isso significa que toda informação que você nos der será efetivamente anônima. Informações identificáveis (como o seu nome) serão registradas em uma base de dados separada e protegida por senha, sendo acessível somente pelo coordenador do estudo. Nós só iremos passar informações suas em situações extremas como quando nós

tivermos o dever de informar os seus cuidadores se nós acreditarmos que você está em risco de machucar a si ou a outras pessoas.

No final do estudo suas informações serão mantidas seguras por no mínimo 20 anos de acordo com as boas práticas de pesquisa e não serão utilizados com nenhum outro propósito além dos descritos no estudo. Se você decidir se retirar do estudo nos iremos destruir toda informação pessoal que nós temos de você, mas nós poderemos manter seus dados anonimamente para nossa pesquisa. Os resultados deste estudo serão publicados em jornais científicos em um nível grupal e não individual. Nós não iremos nunca revelar informações pessoais sobre você.

Como a quantidade de indivíduos que serão examinados neste estudo é muito grande, não será possível realizar todos os exames laboratoriais ao mesmo tempo. Para isso o material terá que ser estocado por algum tempo até a realização dos exames. Pedimos a você permissão para que o sangue seja guardado por tempo indeterminado, visto que este estudo e outros que têm sido feitos podem trazer novos conhecimentos sobre o assunto podendo haver necessidade de realização de novos testes com o material guardado. No entanto, novos testes somente serão realizados após aprovação de um novo projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP e você deverá ser novamente consultado para autorizar os novos testes. Você deverá assinar um outro termo de consentimento a respeito do armazenamento de amostras de sangue.

Também pedimos sua autorização para enviar parte do sangue coletado para um laboratório na Inglaterra, para que as informações que estamos colhendo aqui no Brasil possam ser comparadas com as informações colhidas na Europa. É importante lembrar que você poderá solicitar o acesso aos resultados de seus exames de sangue caso tenha interesse. Se seu exame de sangue apresentar alterações que necessitam de intervenção seu médico o orientará sobre o que fazer e em caso de necessidade será feito acompanhamento clínico e/ou aconselhamento genético sem que isto lhe traga qualquer custo.

O que acontecerá se eu tiver algum dano em função do estudo?

Caso você tenha algum dano em relação a sua saúde em função da realização do estudo, lhe será oferecido acompanhamento clínico no Hospital das Clínicas com direito à assistência integral e a indenização, se for o caso.

Onde eu posso conseguir mais informação sobre o estudo?

Você pode entrar em contato com os responsáveis pelo estudo sobre qualquer dúvida que você tiver. Os contatos estão detalhados abaixo.

Onde eu posso fazer reclamações e/ou esclarecimentos sobre o estudo?

Se você está descontente ou precisar de esclarecimentos sobre como este estudo você pode fazer contato, a qualquer momento, com os responsáveis pelo estudo e com o Comitê de Ética em Pesquisa que garante as boas práticas de pesquisa além de zelar pelo cumprimento do é descrito neste termo de consentimento livre e esclarecido.

Caso seja necessário os contatos estão abaixo.

Contatos	Página do estudo: http://www.eu-gei.eu	Comitê de Ética em Pesquisa-HCRP
Coordenadora Profa. Dra. Cristina Marta Del-Ben CREMESP: 63638 Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP Avenida Bandeirantes, 3900. CEP: 14049-900 Fone: 16 3602-2607	Pesquisadora responsável Silvia Helena Gallo Tenan CRP: 06/49802-2 Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP Avenida Bandeirantes, 3900. CEP: 14049-900 Fone: 16 3602-1296 Email: stream@fmrp.usp.br	Avenida dos Bandeirantes, 3900. CEP: 14049-900 Fone: 16 3602-2228 E-mail: cep@hcrp.usp.br Horário de funcionamento: Segunda à sexta das 8h às 17h.

Projeto de pesquisa**ESQUIZOFRENIA E OUTROS TRANSTORNOS PSICÓTICOS: DETERMINANTES
SOCIAIS E BIOLÓGICOS**

Coordenadora: Cristina Marta Del-Ben (CREMESP: 63638)

Pesquisadora responsável: Silvia Helena Gallo Tenan (CRP: 06/49802-2)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CASOS

Antes de você concordar em participar deste estudo, é importante que você tenha lido e entendido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que é elaborado em duas vias sendo uma de propriedade do pesquisador e outra do participante. Todas as páginas, das duas vias do termo de consentimento deverão ser rubricadas pelo participante e pelo coordenador do estudo e estes deverão assiná-lo ao seu término. O termo de consentimento contém informações importantes sobre a pesquisa e sobre o que será pedido para você fazer. Se você se sentir inseguro sobre o projeto ou tiver alguma dúvida, você pode fazer perguntas para qualquer membro da equipe de pesquisa. As declarações abaixo contém informações importantes sobre a sua participação no estudo. Por favor, leia estas declarações e coloque as iniciais do seu nome no espaço apropriado.

	INICIAIS
Eu li e entendi o termo de consentimento livre e esclarecido e todas as minhas dúvidas foram respondidas satisfatoriamente.	
Eu entendo que a minha participação no estudo é voluntária e que eu posso mudar de ideia a qualquer momento, sem motivo ou qualquer prejuízo e que isso não irá afetar meu tratamento atual e futuro ou meus direitos legais.	
Eu entendo que as minhas informações serão armazenadas confidencialmente e anonimamente e que não serão repassadas a terceiros ou usadas de outra forma a não ser para responder questões relevantes para os objetivos do estudo, exceto quando os pesquisadores tiverem obrigação de informar aos meus cuidadores se eu estiver em risco de causar danos a mim ou a outras pessoas.	

Eu entendo que as minhas informações podem ser utilizadas anonimamente, contribuindo para apresentações e artigos científicos.	
Eu entendo que será pedido que eu dê uma amostra de sangue, com a finalidade de análises genéticas e imunológicas.	
Eu entendo que serei convidado para a realização de exame de ressonância nuclear magnética do cérebro	
Eu dei permissão para que os pesquisadores envolvidos neste estudo acessem meu prontuário médico para finalidades da pesquisa.	

Por meio desta, concordo em participar do estudo EU-GEI e entendo que a minha participação é totalmente voluntária e que eu posso retirar o meu consentimento em qualquer momento, sem ter penalidades ou razões.

Nome e documento de identificação do participante	Assinatura	Data
Nome e documento de identificação da testemunha imparcial	Assinatura	Data
Nome e documento de identificação do responsável legal	Assinatura	Data
Nome do pesquisador	Assinatura	Data

ANEXO 11 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Controles

Projeto de pesquisa**ESQUIZOFRENIA E OUTROS TRANSTORNOS PSICÓTICOS: DETERMINANTES
SOCIAIS E BIOLÓGICOS****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - CONTROLES**

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo chamado “Esquizofrenia e outros transtornos psicóticos: determinantes sociais e biológicos”. Antes de você decidir sobre a sua participação é importante que você entenda porque esta pesquisa está sendo realizada e do que ela trata. Por favor, leia as seguintes informações com cuidado e fique à vontade para fazer perguntas, caso haja algo que não esteja claro para você ou se você precisar de mais detalhes.

Obrigado pelo seu interesse em nosso projeto.

Qual o objetivo deste estudo?

Nós estamos interessados em descobrir se o risco de desenvolver um transtorno psicótico, cuja principal característica são alterações do pensamento e da percepção dos estímulos da realidade caracterizadas pela crença em situações que não existem (delírios) e por ver e/ou ouvir coisas que outras pessoas não estão vendo ou ouvindo (alucinações), é determinado por fatores biológicos (como a organização dos genes, alterações no sistema de proteção do seu organismo e alterações cerebrais) e por fatores ambientais (como pobreza, discriminação, isolamento social, uso de drogas e a ocorrência de eventos negativos durante a infância, como divórcio dos pais, humilhação ou abuso). Particularmente, estamos interessados em compreender se os efeitos destes fatores sociais no risco de psicose são diferentes, de acordo com os diferentes tipos de genes que as pessoas possuem.

Assim, pretendemos investigar a existência de variações nos casos novos de transtornos psicóticos considerando-se:

a) a associação entre fatores de risco da própria pessoa, de seus familiares e das características da região onde o participante vive;

b) a existência de alterações no cérebro de pessoas com transtornos psicóticos, comparados com pessoas sem o mesmo diagnóstico (controles da comunidade e irmãos), através de exames de Ressonância Nuclear Magnética

c) a ocorrência de alterações na organização dos genes e no sistema de proteção do organismo em pessoas com transtornos psicóticos, comparando-as com pessoas sem o mesmo diagnóstico (controles da comunidade e irmãos).

Por que eu fui convidado?

Você foi convidado para participar do estudo porque você nunca apresentou um episódio psicótico com a presença de alucinações e/ou delírios que desorganizaram seu comportamento e vive em uma das cidades pertencentes ao Décimo Terceiro Departamento Regional da Secretaria Estadual de Saúde (DRS XIII), cuja sede é Ribeirão Preto, onde nós estamos conduzindo o estudo.

Nós pretendemos convidar, em um período de três anos, 300 pessoas que apresentaram um primeiro episódio psicótico para participar do estudo (casos), assim como 150 irmãos ou irmãs destes participantes e 300 pessoas que como você nunca tiveram episódio psicótico e que chamamos de controles. O estudo faz parte de um grande estudo europeu que está sendo realizado em 15 centros europeus de 5 países. Você deve ter idade entre 16 e 64 anos para participar. Caso você tenha menos de 18 anos, seus pais ou outro responsável legal deverão concordar com a sua participação no estudo.

Eu sou obrigado a participar?

Esta é uma escolha sua. Antes que você concorde em participar, nós descreveremos o estudo ao longo desse termo de informação. Nós então pediremos que você assine um termo de consentimento para demonstrar que você concordou em participar. Você é livre para se retirar do estudo a qualquer momento, sem dar explicações. Essa escolha não irá afetar os cuidados de saúde que poderá vir receber no Hospital das Clínicas FMRP-USP.

O que me pedirão para fazer?

Inicialmente, nós pediremos que você responda alguns questionários sobre o seu passado, sobre as suas condições de saúde atuais e circunstâncias sociais. Perguntaremos também sintomas psiquiátricos para caracterizar se você já experimentou manifestações relacionadas à alguma doença mental.

Nós precisaremos colher amostras de sangue em três ocasiões (20 ml ao todo – equivalente a duas colheres de sopa) para que nós possamos estudar a interação de genes e da capacidade de proteção de seu organismo como fatores sociais e experiências durante a vida. O sangue será colhido utilizando material descartável e este procedimento será realizado por profissionais experientes [médico(a) ou enfermeiro(a)]. É importante lembrar que você poderá sentir dor durante a retirada do sangue e que pode ocorrer o aparecimento de manchas roxas no local.

Você também será convidado a realizar de um exame de Ressonância Magnética. Esse exame será usado para investigarmos se existem diferenças no tamanho e nos níveis de algumas substâncias de algumas áreas do cérebro entre pacientes e controles como você.

Quanto tempo irá durar a coleta de dados?

Nós estimamos que precisaremos de cerca de 6 horas para completarmos todos os questionários e realizarmos as coletas de sangue. Esperamos completar todas as tarefas em 3 encontros, mas, se você preferir, podemos fazer outros arranjos. Você é livre para fazer pausas em qualquer momento que desejar ou pode escolher outro horário para retornar em outra ocasião para terminar a coleta caso se sinta cansado ou indisposto.

O exame de ressonância magnética será realizado em um dia previamente agendado e deve durar cerca de 40 min.

Eu receberei algum pagamento?

Nós iremos ressarcir-lo por gastos com transporte e alimentação.

Onde o estudo será realizado?

O estudo será realizado no Ambulatório do Hospital das Clínicas (HCFMRP-USP), nos dias em que você tiver disponibilidade para comparecer ao hospital. Se você preferir, nós poderemos ir até a sua casa para realizarmos as entrevistas, porém nós teremos que pedir que você vá até o Hospital das Clínicas para coletarmos a amostra de sangue e para a realização do exame de ressonância magnética.

O que acontecerá se eu optar por sair do estudo?

A participação no estudo é absolutamente voluntária. Você é livre para mudar de ideia a qualquer momento. Todas as informações pessoais serão destruídas. Esta situação também se aplica no caso de você se sentir indisposto para continuar participando do estudo.

Quais são os possíveis riscos e benefícios da participação?

Nós faremos perguntas sobre circunstâncias pessoais e do passado, o que algumas pessoas podem considerar angustiante. Todos os pesquisadores responsáveis pela coleta de dados são psicólogos treinados e experientes e oferecerão suporte se você precisar. Você também poderá achar o dia cansativo e então você poderá fazer uma pausa ou retornar em outra ocasião para completar as tarefas. Você não tem obrigação de responder nenhuma questão e você pode sair do estudo a qualquer momento. Um outro inconveniente pode ser um leve desconforto ao coletar a amostra de sangue e ao realizar o exame de Ressonância Magnética.

As entrevistas, assim como os exames de imagem e a coleta de sangue serão realizadas por profissionais treinados com os procedimentos e com experiência no manejo de problemas emocionais.

O exame de Ressonância Magnética de crânio é um exame seguro, não doloroso, não invasivo, sem emissão de radiação e não será administrada anestesia ou contraste, portanto, não há risco de reações alérgicas. Você ficará deitado acordado enquanto o aparelho faz imagens do seu cérebro. Algumas pessoas podem se sentir desconfortáveis por ficarem deitadas em local estreito ou incomodadas com o barulho forte que a máquina de ressonância faz quando está funcionando. O exame será interrompido imediatamente e você poderá sair do aparelho, se desejar, podendo fazer o exame em outro momento.

Você usará protetores de ouvido durante o exame para diminuir o desconforto do barulho. Terá também à mão uma campainha, que poderá acionar se precisar falar com o técnico que estará operando o aparelho. Um dos pesquisadores deste projeto estará presente durante todo o exame de Ressonância Magnética.

Ao participar do estudo você irá nos ajudar a entender mais sobre as diferenças entre pessoas com e sem psicose (presença de alucinações e delírios), o que pode ajudar a prevenir que outras pessoas venham a desenvolver transtornos psicóticos no futuro.

O que acontecerá com as minhas informações?

Sua confidencialidade será mantida em todos os momentos e as amostras de sangue, papéis e dados eletrônicos seguirão as práticas éticas e legais. Todas as informações sobre você serão manejadas com estrita confidencialidade. Você será identificado por um número, que será utilizado no lugar dos seus dados pessoais. Isso significa que toda informação que você nos der será efetivamente anônima. Informações identificáveis (como o seu nome) serão registradas em uma base de dados separada e protegida por senha, sendo acessível somente pelo coordenador do estudo.

No final do estudo suas informações serão mantidas seguras por no mínimo 20 anos de acordo com as boas práticas de pesquisa e não serão utilizados com nenhum outro propósito além dos descritos no estudo. Se você decidir se retirar do estudo nós iremos destruir toda informação pessoal que nós temos de você, mas nós poderemos manter seus dados anonimamente para nossa pesquisa. Os resultados deste estudo serão publicados em jornais científicos em um nível grupal e não individual. Nós não iremos nunca revelar informações pessoais sobre você.

Como a quantidade de indivíduos que serão examinados neste estudo é muito grande, não será possível realizar todos os exames laboratoriais ao mesmo tempo. Para isso o material terá que ser estocado por algum tempo até a realização dos exames. Pedimos a você permissão para que o sangue seja guardado por tempo indeterminado, visto que este estudo e outros que têm sido feitos podem trazer novos conhecimentos sobre o assunto podendo haver necessidade de realização de novos testes com o material guardado. No entanto, novos testes somente serão realizados após aprovação de um novo projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP e você deverá ser novamente consultado para autorizar os novos testes. Você deverá assinar um outro termo de consentimento a respeito do armazenamento de amostras de sangue.

Também pedimos sua autorização para enviar parte do sangue coletado para um laboratório na Inglaterra, para que as informações que estamos colhendo aqui no Brasil possam ser comparadas com as informações colhidas na Europa. É importante lembrar que você poderá solicitar o acesso aos resultados de seus exames de sangue caso tenha interesse. Se seu exame de sangue apresentar alterações que necessitam de intervenção seu médico o orientará sobre o que fazer e em caso de necessidade será feito acompanhamento clínico e/ou aconselhamento genético sem que isto lhe traga qualquer custo.

O que acontecerá se eu tiver algum dano em função do estudo?

Caso você tenha algum dano em relação a sua saúde em função da realização do estudo, lhe será oferecido acompanhamento clínico no Hospital das Clínicas com direito à assistência integral e a indenização, se for o caso.

Onde eu posso conseguir mais informação sobre o estudo?

Você pode entrar em contato com os responsáveis pelo estudo sobre qualquer dúvida que você tiver. Os contatos estão detalhados abaixo.

Onde eu posso fazer reclamações e/ou esclarecimentos sobre o estudo?

Se você está descontente ou precisar de esclarecimentos sobre como este estudo você pode fazer contato, a qualquer momento, com os responsáveis pelo estudo e com o Comitê de Ética em Pesquisa que garante as boas práticas de pesquisa além de zelar pelo cumprimento do é descrito neste termo de consentimento livre e esclarecido.

Caso seja necessário os contatos estão abaixo.

Contatos	Página do estudo: http://www.eu-gei.eu	Comitê de Ética em Pesquisa-HCRP
Coordenadora Profa. Dra. Cristina Marta Del-Ben CREMESP: 63638 Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP Avenida Bandeirantes, 3900 CEP: 14049-900 Fone: 16 3602-2607	Pesquisadora responsável Silvia Helena Gallo Tenan CRP: 06/49802-2 Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP Avenida Bandeirantes, 3900 CEP: 14049-900 Fone: 16 3602-1296 Email: stream@fmrp.usp.br	Avenida dos Bandeirantes, 3900 CEP: 14049-900 Fone: 16 3602-2228 E-mail: cep@hcrp.usp.br Horário de funcionamento: Segunda à sexta das 8h às 17h.

Projeto de pesquisa

ESQUIZOFRENIA E OUTROS TRANSTORNOS PSICÓTICOS: DETERMINANTES SOCIAIS E BIOLÓGICOS

Coordenadora: Cristina Marta Del-Ben (CREMESP: 63638)

Pesquisadora responsável: Silvia Helena Gallo Tenan (CRP: 06/49802-2)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - CONTROLES

Antes de você concordar em participar deste estudo, é importante que você tenha lido e entendido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que é elaborado em duas vias sendo uma de propriedade do pesquisador e outra do participante. Todas as páginas, das duas vias do termo de consentimento deverão ser rubricadas pelo participante e pelo coordenador do estudo e estes deverão assiná-lo ao seu término. O termo de consentimento contém informações importantes sobre a pesquisa e sobre o que será pedido para você fazer. Se você se sentir inseguro sobre o projeto ou tiver alguma dúvida, você pode fazer perguntas para qualquer membro da equipe de pesquisa. As declarações abaixo contém informações importantes sobre a sua participação no estudo. Por favor, leia estas declarações e coloque as iniciais do seu nome no espaço apropriado.

	INICIAIS
Eu li e entendi o termo de consentimento livre e esclarecido e todas as minhas dúvidas foram respondidas satisfatoriamente.	
Eu entendo que a minha participação no estudo é voluntária e que eu posso mudar de ideia a qualquer momento, sem motivo ou qualquer prejuízo e que isso não irá afetar meu tratamento atual e futuro ou meus direitos legais.	
Eu entendo que as minhas informações serão armazenadas confidencialmente e anonimamente e que não serão repassadas a terceiros ou usadas de outra forma a não ser para responder questões relevantes para os objetivos do estudo, exceto quando os pesquisadores tiverem obrigação de informar aos meus cuidadores se eu estiver em risco de causar danos a mim ou a outras pessoas.	
Eu entendo que as minhas informações podem ser utilizadas anonimamente, contribuindo para apresentações e artigos científicos.	
Eu entendo que será pedido que eu dê uma amostra de sangue, com a finalidade de análises genéticas e imunológicas.	
Eu entendo que serei convidado para a realização de exame de ressonância nuclear magnética do cérebro	
Eu dei permissão para que os pesquisadores envolvidos neste estudo acessem meu prontuário médico para finalidades da pesquisa.	

Por meio desta, concordo em participar do estudo EU-GEI e entendo que a minha participação é totalmente voluntária e que eu posso retirar o meu consentimento em qualquer momento, sem ter penalidades ou razões.

_____ Nome e documento de identificação do participante	_____ Assinatura	_____ Data
_____ Nome e documento de identificação da testemunha imparcial	_____ Assinatura	_____ Data
_____ Nome e documento de identificação do responsável legal	_____ Assinatura	_____ Data
_____ Nome do pesquisador	_____ Assinatura	_____ Data

ANEXO 12 – Aprovação do comitê de ética dos animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 024/2016, sobre o projeto intitulado “*Estudo das alterações epigenéticas na neurotransmissão GABAérgica na esquizofrenia e outras psicoses e no modelo animal de isolamento social a partir do desmame*”, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Cristina Marta Del Bem** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 25 de abril de 2016.

We certify that the protocol nº 024/2016, entitled “*Study of epigenetic alterations in GABAergic neurotransmission in schizophrenia and other psychoses and in animals undergoing social isolation from weaning*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 04/25/2016.

Ribeirão Preto, 25 de abril de 2016.

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP