



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

**BEATRIZ MONFERRARI MARTINS**

**Análise comportamental de ratos em modelo farmacológico de esquizofrenia**

**BRASÍLIA  
2023**

**BEATRIZ MONFERRARI MARTINS**

**Análise comportamental de ratos em modelo farmacológico de esquizofrenia**

Orientador: Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto  
Maior

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)  
apresentado ao Departamento de  
Farmácia da Faculdade de Ciências da  
Saúde como requisito parcial para  
obtenção do título de Bacharel em  
Farmácia da Universidade de Brasília.

**BRASÍLIA**

**2023**

**ANÁLISE COMPORTAMENTAL DE RATOS EM MODELO FARMACOLÓGICO DE  
ESQUIZOFRENIA**

BEATRIZ MONFERRARI MARTINS

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior (Orientador)

CFS/IB/UnB

---

Prof. Dr. Maurício Homem de Mello (Membro Titular da Banca)

FAR/FS/UnB

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família que vibra a cada notícia que eu mando! Especialmente agradeço minha mãe e meu padrasto, Fernanda e Jackson, por sempre apoiarem essa vida acadêmica, mesmo antes de eu saber que era o que queria! Obrigada por serem essa fonte de inspiração e por tanto entendimento, acolhimento e orientação. Vocês tornaram essa minha escolha possível e real. Amo vocês!

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Maior, pelo acolhimento, compreensão, escuta e por me inserir assertivamente no seu grupo (ainda gosto de pensar que é o “Projeto Maior”). De Excel a frases motivacionais, obrigada por tanto conhecimento em diversas áreas da vida!

Agradeço ao Prof. Dr. Fabio Caixeta, por ter me apresentado essa área incrível de pesquisa e por ter aberto a porta do laboratório, ambiente no qual eu descobri a área que quero seguir! Mariana Bicalho e Pedro Cordeiro, se vocês adivinharem o que tem no meu olho enquanto eu estou escrevendo isso... Obrigada pelos ensinamentos, pelo acolhimento imediato, pela amizade, por serem guias nesse mundo da pesquisa e pela presença (não importa o fuso horário) – eu realmente só tenho a agradecer e, claro, são lágrimas! E Mari, obrigada especial pelo projeto e parceria. Juliana Lis, obrigada por partilhar seu espaço e pela companhia sensacional. Camila Acero e Aline Caron obrigada pelo apoio, pela presença e pelos comentários maravilhosos!

À Dra. Carina Krewer, que em momentos delicados da pesquisa com animais colaborou ativamente no protocolo cirúrgico e me ajudou nas tomadas de decisão. Aos estagiários envolvidos no projeto, particularmente ao André Teixeira por estar em todas as sessões experimentais (exitosas ou desafiadoras) e por me permitir passar o conhecimento que eu ainda estava construindo naquele momento.

Ao laboratório Neuropharma da Profa. Dra. Márcia Mortari, que disponibilizou equipamentos e uma equipe incrível: obrigada Letícia Veras pelas inúmeras conversas e Valéria Marques por ajudar com o transmissor. Ao laboratório de Micologia da Universidade de Brasília, por disponibilizarem o uso de equipamentos e materiais indispensáveis para as análises histológicas.

Às amigadas que foram próximas, continuam sendo ou se reaproximaram nesse percurso. Obrigada pelo suporte e por serem fonte de muito aprendizado e ensinamento nesse período do curso!

À Yallen, minha psicóloga, que realmente ouviu e me guiou em muitas coisas! Se vocês me viram chorando, saibam que poderia ter sido em volumes muito maiores.

Agradeço a FAP-DF pelo apoio financeiro, à Universidade de Brasília e a todos os professores que, semestre a semestre, me ensinaram essa incrível, interdisciplinar e gigante área que é a Farmácia.

## RESUMO

A esquizofrenia é um distúrbio mental que atinge cerca de 0,4% da população mundial, que abrange sintomas positivos, como episódios psicóticos, alucinações e delírio; sintomas negativos, como apatia e anedonia e sintomas cognitivos, que afetam memória, linguagem e controle executivo. A apresentação da doença se dá de forma individual entre os pacientes, ou seja, não há uma demonstração uniforme da condição, o que dificulta tanto o diagnóstico quanto o tratamento. Para tal, é importante que se tenha formas de identificar os padrões fisiológicos e suas respectivas circuitarias envolvidas com intuito de propor novas abordagens de tratamento, a fim de proporcionar qualidade de vida aos pacientes. A hipótese glutamatérgica sugere um desequilíbrio cerebral do neurotransmissor glutamato, com achados de que fármacos anestésicos dissociativos, como cetamina (CET), que são antagonistas do receptor NMDA (N-metil-D-aspartato), um tipo de receptor glutamatérgico, induzem sintomas variados característicos da esquizofrenia. A presente pesquisa se propõe a identificar e analisar os comportamentos espontâneos em campo aberto, mediante efeitos de CET (20 mg/Kg) e dizocilpina (MK-801) (0,1 mg/Kg), administrados via intraperitoneal, como modelo farmacológico animal, em roedores, segundo a hipótese glutamatérgica da esquizofrenia. Foi observado um aumento da exploração, locomoção e ataxia após insulto químico com CET e uma diminuição da elevação, diferentemente de MK-801, no qual foi observado que a dose não foi suficiente para estabelecer correlações. Os dados encontrados reforçam a validade por construto do modelo murinho proposto para CET.

**Palavras-chave:** esquizofrenia; cetamina; dizocilpina; glutamato; comportamento.

## ABSTRACT

Schizophrenia is a mental disorder that affects about 0.4% of the world's population, involving positive symptoms such as psychotic episodes, hallucinations and delirium; negative symptoms such as apathy and anhedonia and cognitive symptoms, which involve memory, language and executive control. The presentation of the disease occurs individually in patients, so that there is no consistent demonstration of the condition, making diagnosis and treatment complicated. To this end, it is important to have ways of identifying the physiological patterns and their respective circuits involved in order to propose new treatment approaches with a view to provide better quality of life for patients. The glutamatergic hypothesis suggest a glutamate disbalance in the brain, as there are findings that ketamine (KET), a dissociative anesthetic that act as a NMDAr (N-metil-D-aspartato receptor) antagonist induces characteristics schizophrenic symptoms. This research proposes to identify and to analyze spontaneous behaviors in open field through the effects of KET (20 mg/Kg) and dizocilpine (MK-801) (0,1 mg/Kg), administered intraperitoneally, as an animal pharmacological model, in rodents, according to the glutamatergic hypothesis of schizophrenia. It was observed a sniffing, locomotor and ataxia improve after the chemical insult with KET and also a decrease in climbing, despite the results with MK-801, for which the dose used was not enough to established any correlation. The data found reinforced the construct validity of the proposed murine model with KET.

**Keywords:** schizophrenia; ketamine; dizocilpine; glutamate; behavior.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Hipótese proposta para explicar sintomas positivos via hipofunção de receptores NMDA no córtex pré-frontal. (A) sinalização do circuito em condições normais. (B) hiperdopaminergia mesolímbica consequente da hiperativação glutamatérgica em projeções cortiço-talâmicas ..... 16
- Figura 2** - Hipótese proposta para explicar sintomas positivos via hipofunção de receptores NMDA no hipocampo. (A) sinalização do circuito em condições normais. (B) hiperdopaminergia mesolímbica consequente da hiperativação glutamatérgica no núcleo pálido ..... 17
- Figura 3** - Hipótese proposta para explicar sintomas negativos via hipofunção de receptores NMDA no córtex pré-frontal. (A) sinalização do circuito em condições normais. (B) hipodopaminergia mesocortical consequente da hiperativação glutamatérgica em projeções cortico-talâmicas ..... 18
- Figura 4** - Estrutura química de (A) MK-801 e (B) CET..... 19
- Figura 5** - (A) Rato Wistar macho com implante craniano crônico e transmissor conectado para início do teste experimental. (B) vista superior do animal no CA ..... 25
- Figura 6** - Modelo esquemático da sessão de teste ..... 25
- Figura 7** - Resultados comportamentais sobre efeito de CET e MK-801. (A) Média da duração de exploração em minutos. (B) Média de distância percorrida em metros. (C) Média da duração de ataxia em minutos. (D) Média da frequência de entradas na zona central. (E) Média da duração de elevação em minutos. (F) Média da duração de autolimpeza em minutos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ..... 29



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Etograma do comportamento do rato no CA .....	26
---	----

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>AMPA</b>	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolpropiónico
<b>AP</b>	ântero-posterior
<b>ATV</b>	área tegmentar ventral
<b>CA</b>	campo aberto
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso Animal
<b>CET</b>	cetamina
<b>CPF</b>	córtex pré-frontal
<b>DV</b>	dorso-ventral
<b>GABA</b>	ácido gama-aminobutírico
<b>HFO</b>	<i>high frequency oscilation</i> (oscilação de alta frequência)
<b>Hipp</b>	hipocampo
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<b>LCR</b>	líquido cefalorraquidiano
<b>MK-801</b>	dizocilpina
<b>ML</b>	médio-lateral
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>PCP</b>	fenciclidina
<b>PPI</b>	teste de inibição por pré-pulso
<b>s.c.</b>	subcutâneo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1.1 Aspectos gerais da esquizofrenia.....	12
1.2 Hipóteses fisiopatológicas da esquizofrenia.....	14
1.3 Papel da análise comportamental no modelo animal.....	19
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>23</b>
3.1 Sujeitos experimentais.....	23
3.2 Procedimento cirúrgico.....	23
3.3 Procedimento experimental.....	24
3.4 Análise dos dados comportamentais.....	26
3.5 Análise estatística.....	27
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
5.1 Efeitos na locomoção.....	30
5.2 Autolimpeza e frequência de entrada no centro do aparato.....	31
5.3 <i>Sniffing</i> .....	32
5.4 Elevação.....	33
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>34</b>

<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>
<b>ANEXO 1: Certificado de Aprovação pela Comissão de Ética no Uso Animal e adendo.....</b>	<b>40</b>
<b>ANEXO 2: Protocolo de análise experimental <i>Any-Maze</i>.....</b>	<b>42</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais da esquizofrenia

A esquizofrenia é uma síndrome clínica heterogênea que acomete 0,32% da população mundial, mais especificamente, 0,45% da população adulta. Observa-se que os sintomas e, conseqüentemente, o diagnóstico, são mais comuns ao final da adolescência e início da vida adulta, aproximadamente a partir dos 20 anos (WHO, 2022; PERÄLÄ et al., 2007).

Atualmente, uma das discussões que mais cerca o assunto é com relação à etiologia. Essa desordem não possui fator etiológico único, e está relacionada a fatores genéticos e ambientais. Há cerca de 270 variações genéticas sabidamente correlacionadas e que estão envolvidas com sinalização dopaminérgica, glutamatérgica, resposta imune e funcionamento de canais iônicos (WAHBEH; AVRAMOPOULOS, 2021). Embora a genética seja um fator contribuinte para o desenvolvimento da desordem, não é determinante e isso é mostrado por estudos com gêmeos monozigóticos e dizigóticos, com porcentagens de concordância de 33% e 7%, respectivamente, estimando-se então que 79% do desenvolvimento é de ordem hereditária (HILKER et al., 2018).

Os fatores ambientais, por outro lado, representam os efeitos do meio no qual o indivíduo está inserido na etiopatogênese do distúrbio. Brown (2011) ressalta fatores de risco para o desenvolvimento da esquizofrenia, como (1) a diferença entre ambiente urbano ou rural, sendo o primeiro mais propício ao desenvolvimento; (2) período do ano do nascimento, no qual o inverno e início da primavera apresentam maior fator de risco; (3) status socioeconômico e migração, com incidência maior de casos em grupos de minorias; (4) riscos ao longo da gravidez e próximo ao nascimento, e.g. estresse materno, idade paterna, infecções como rubéola, influenza, *Toxoplasma gondii*, herpes tipo 2 e deficiências nutricionais como ácido fólico, ferro e vitamina D. Novos estudos para correlacionar genes e influência ambiental, como o aumento do risco de interromper o neurodesenvolvimento pela resposta imune materna a infecções, genes como antecedentes para exposição ambiental de risco e efeitos da epigenética, são ideias promissoras para esclarecer os existentes etiopatogenia (WAHBEH; AVRAMOPOULOS, 2021).

Os sintomas que caracterizam clinicamente a esquizofrenia são divididos em positivos, negativos e cognitivos. Os primeiros englobam alucinações — sendo as auditivas as mais reportadas — delírios, comportamento motor anormal (incluindo catatonia), desorganização de pensamento e discurso, e episódios de psicose; os segundos englobam avolição, alogia, anedonia e expressão emocional diminuída. Por fim, os sintomas cognitivos incluem déficit na memória de trabalho, nas funções executivas e na velocidade de processamento (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

Por não possuir sintomas patognomônicos, ou seja, exclusivos da desordem, a esquizofrenia, atualmente, é determinada como parte de um espectro que envolve outros transtornos, como o esquizofreniforme, o da personalidade esquizotípica, o delirante e outros. Para fim diagnóstico, por vezes feito de forma diferencial, é necessário que sintomas do critério A (positivos) estejam presentes durante parte significativa do tempo de um mês ou mais e, ainda, que o conjunto de sinais e sintomas seja reconhecidamente associado a um funcionamento profissional e/ou social prejudicados (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

A esquizofrenia é fortemente associada a um risco elevado de suicídio. Situações como alta hospitalar, período após episódio psicótico, presença de sintomas depressivos ou sentimento de desesperança e ainda o risco das próprias alucinações, faz com que as ideações e tentativas de suicídio sejam mais comuns nesse grupo. É um grupo que também apresenta expectativa de vida diminuída, pelo risco anteriormente citado e por doenças cardiovasculares, metabólicas e infecciosas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; LEWIS; LIEBERMAN, 2000).

Além disso, há uma elevada correlação entre o desenvolvimento de esquizofrenia e transtorno de uso de substâncias, ao passo que o transtorno de ansiedade também tem sido reconhecido como comorbidade. Os transtornos obsessivo-compulsivo e do pânico, por sua vez, possuem uma maior ocorrência entre pacientes com esquizofrenia em comparação à população geral (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

Por ser uma desordem crônica, um ponto a se ressaltar é que os sintomas psicóticos podem diminuir com o passar do tempo, o que sugere uma associação com o declínio da atividade dopaminérgica natural do envelhecimento, sendo a hipótese

fisiopatológica dopaminérgica da esquizofrenia primordial para a discussão de sua etiologia (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

## 1.2 Hipóteses fisiopatológicas da esquizofrenia

A hipótese dopaminérgica é central no estudo da desordem e é considerada uma das mais duradouras na área. Inicialmente sugerida por Carlsson e Lindqvist (1963) em um estudo com os antipsicóticos haloperidol e clorpromazina, os autores demonstraram um aumento dos metabólitos de dopamina após sua administração em camundongos. Os resultados obtidos foram explicados alguns anos depois pelo mecanismo de ação dos fármacos utilizados, que se ligam aos receptores dopaminérgicos do tipo D2. A partir disso, sugeriu-se que a psicose se dá pelo excesso na transmissão dopaminérgica e que os efeitos dos antipsicóticos testados é oriundo do bloqueio desses receptores (HOWES; KAPUR, 2009).

Em 1991, Davis *et al.* sugeriram uma alteração nesta hipótese. No cenário então corrente, era sabido que o aumento de metabólitos discutidos não era uniforme no líquido cefalorraquidiano (LCR) ou plasma dos pacientes, o que findou na descoberta de que os receptores dopaminérgicos D1 são predominantemente distribuídos na região cortical, e D2, na região subcortical. Somado a essa distribuição não-uniforme, foi observado um menor fluxo sanguíneo na região cortical, o que levou à nova versão da hipótese, com especificação de regiões cerebrais atribuídas à disfunção dopaminérgica: hipofunção cortical e hiperfunção subcortical (estriado). Essa dicotomia foi atribuída como explicação para os sintomas negativos e positivos, respectivamente, embora tais conclusões não estivessem esclarecidas criticamente (HOWES; KAPUR, 2009).

As limitações identificadas nos estudos até então foram, e continuam sendo, pesquisadas, resultando em uma terceira versão da hipótese. Nessa terceira versão de Howes et al. (2009), a sugestão é que diferentes vias que interagem entre si resultam em uma desregulação dopaminérgica, vista como o “caminho comum” para psicose na esquizofrenia, e considera essa desregulação advinda do nível pré-sináptico da via, ao invés de ter o receptor D2 como chave central. A hipótese considera também que o prejuízo na avaliação de estímulos pode ser consequência da psicose resultante dessa desregulação, chamada de “saliência aberrante”. Essa

nova alteração na hipótese foi decorrente de novas descobertas como o aumento da síntese e liberação de dopamina no estriado pelo aumento da atividade pré-sináptica, as variações genéticas fortemente associadas à esquizofrenia, o respectivo envolvimento com vias dopaminérgicas (avanço na pesquisa pelo Projeto Genoma Humano) e, ainda, o envolvimento de outros neurotransmissores, como, por exemplo, o glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA) e serotonina (HOWES; KAPUR, 2009; STAHL, 2018).

A partir desses pontos, novas propostas surgiram, como a hipótese glutamatérgica, que condiciona a disfunção dopaminérgica encontrada na esquizofrenia a uma desregulação a priori na transmissão de glutamato. A hipótese do envolvimento do glutamato na esquizofrenia possui respaldo em evidências farmacológicas, estudos *post mortem*, imageamento cerebral e estudos genéticos, além de resultados promissores em estudos clínicos randomizados (revisado por (UNO; COYLE, 2019). Na década de 70, anestésicos dissociativos como cetamina (CET) e fenilciclidina (PCP) ficaram conhecidos por induzir sintomas característicos da esquizofrenia, tanto os sintomas positivos quanto os negativos e cognitivos. Ambos fármacos são antagonistas não competitivos do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), um tipo de receptor glutamatérgico (UNO; COYLE, 2019). A hipótese obteve respaldo clínico de Kim et al. (1980), que demonstraram que as concentrações de glutamato no LCR estavam diminuídas pela metade em pacientes diagnosticados com esquizofrenia, em comparação com participantes controle.

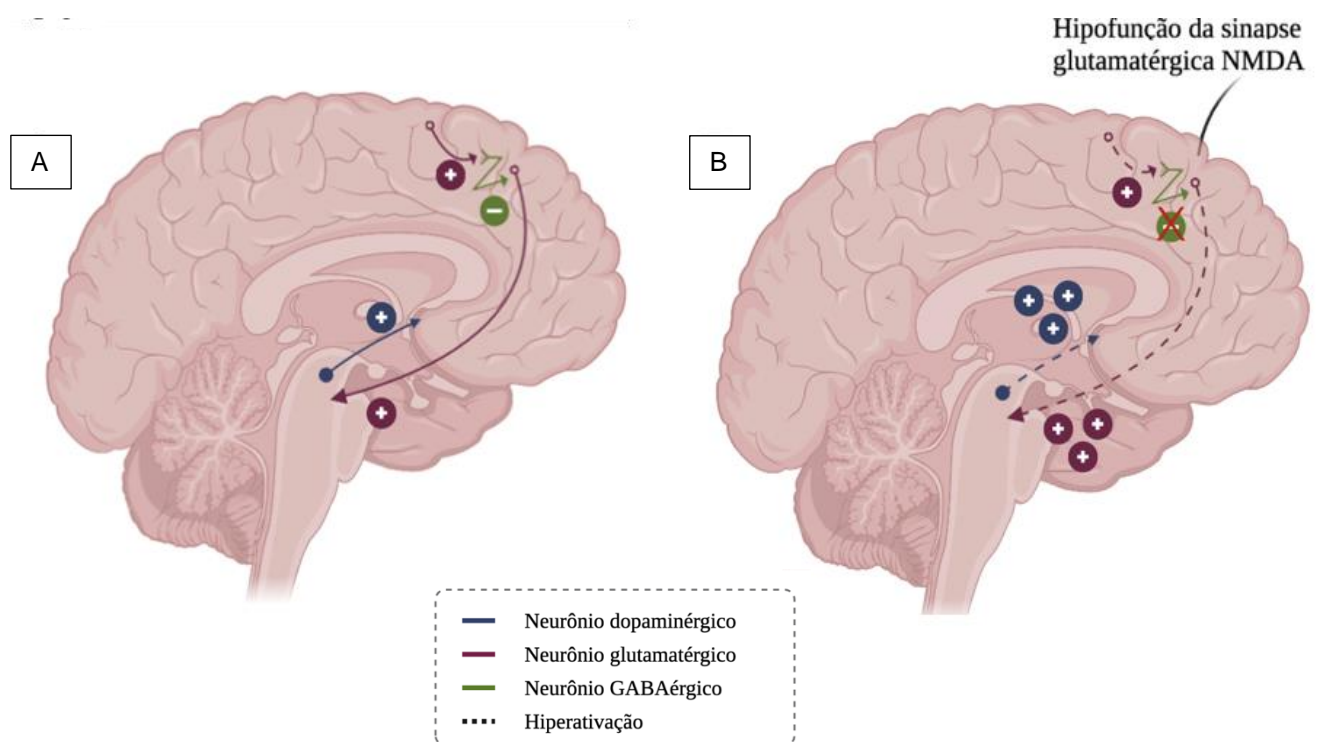
O glutamato é considerado, de maneira geral, o neurotransmissor com ação excitatória mais abundante no sistema nervoso, levando ao aumento da liberação dos neurotransmissores na via em questão. A desregulação glutamatérgica proposta na hipótese se baseia particularmente na hipofunção de receptores NMDA em interneurônios gabaérgicos de diferentes regiões. Assumindo a função inibitória desses interneurônios, há um consequente aumento na sinalização nos circuitos seguintes (STAHL, 2021).

A hipótese da hiperdopaminergia subcortical como base biológica dos sintomas positivos sugere que a hipofunção dos receptores NMDA nos interneurônios gabaérgicos no córtex pré-frontal aumenta a liberação de glutamato na área tegmentar ventral (ATV), culminando em uma hiperativação da via mesolímbica dopaminérgica



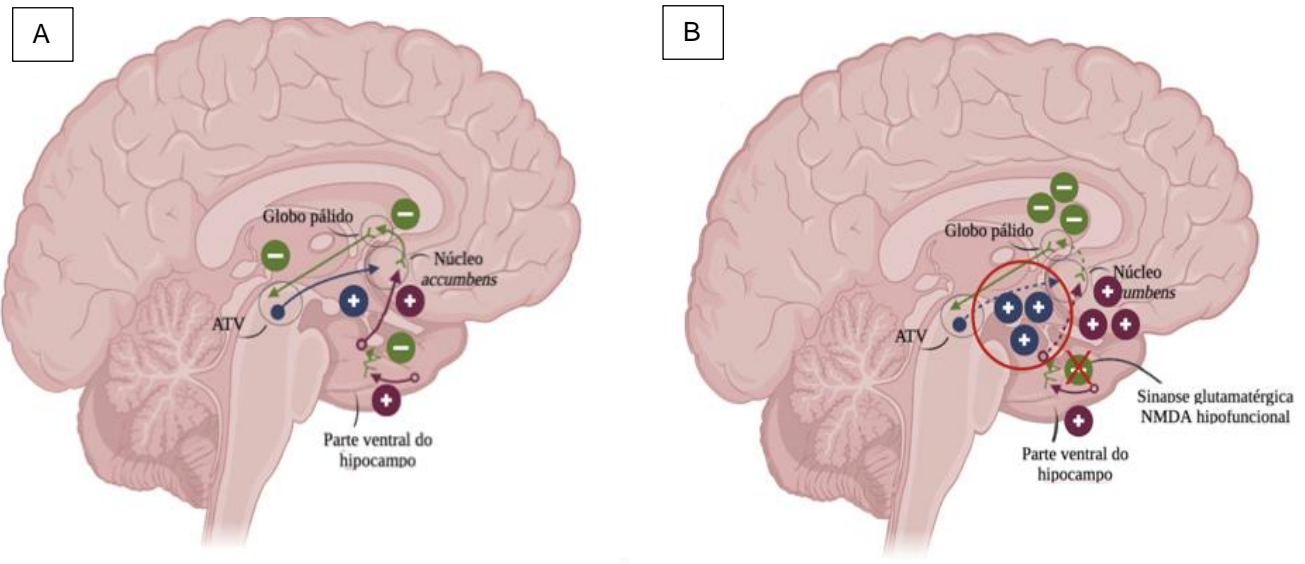
e, por fim, a liberação excessiva de dopamina no núcleo *accumbens* (**Figura 1**). Da mesma forma, a hipoativação de receptores NMDA no hipocampo ventral permite que haja uma grande liberação de glutamato no núcleo *accumbens*, hiperestimulando a inervação gabérgica no globo pálido. Assim, há uma desinibição, *i.e.* uma “inibição da inibição”, da projeção gabaérgica do globo pálido para a ATV, resultando no aumento de dopamina na via mesolímbica, e, novamente, há liberação excessiva de dopamina no núcleo *accumbens* (**Figura 2**; STAHL, 2021).

**Figura 1** – Hipótese proposta para explicar sintomas positivos via hipofunção de receptores NMDA no córtex pré-frontal. (A) sinalização do circuito em condições normais. (B) hiperdopaminergia mesolímbica consequente da hiperativação glutamatérgica em projeções cortico-talâmicas.



**Fonte:** Stahl (2021), adaptado por María Camila Acero Castillo e Mariana B. M. Correia.

**Figura 2** – Hipótese proposta para explicar sintomas positivos via hipofunção de receptores NMDA no hipocampo. (A) sinalização do circuito em condições normais. (B) hiperdopaminergia mesolímbica consequente de hiperativação glutamatérgica no núcleo accumbens.

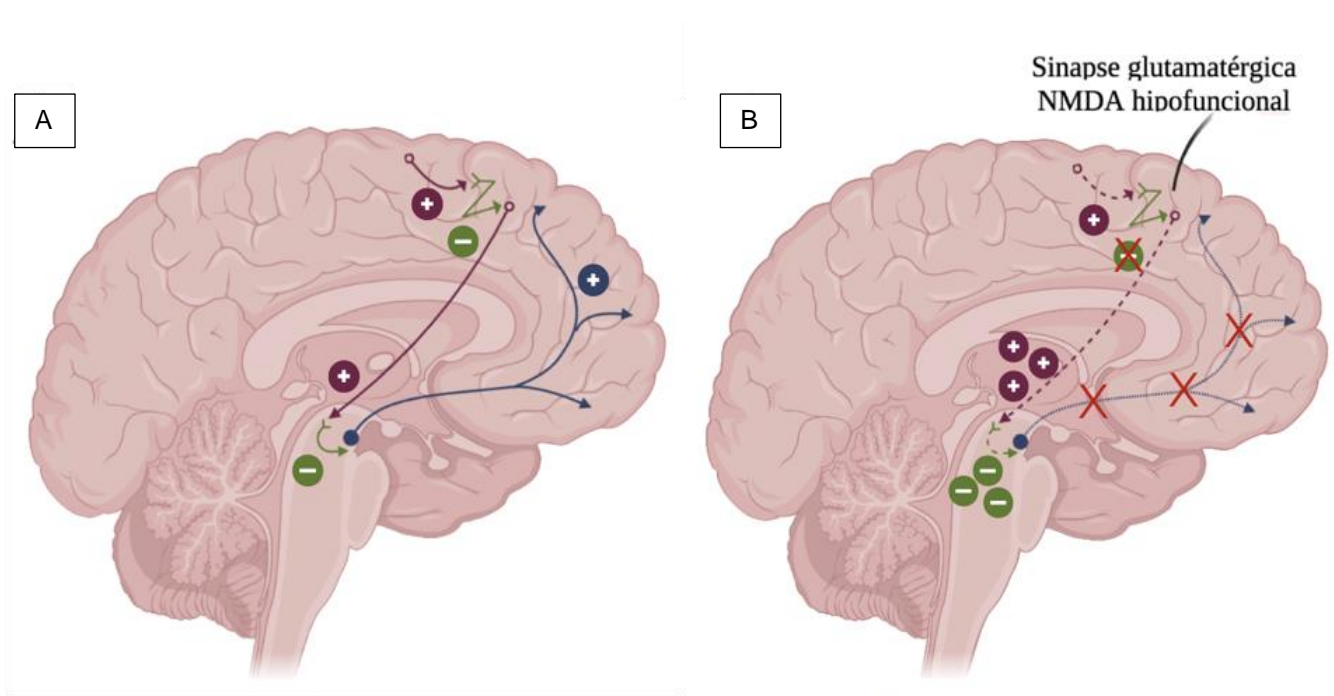


**Fonte:** Stahl (2021), adaptado por María Camila Acero Castillo e Mariana B. M. Correia.

Já na via responsável pelos sintomas negativos, a partir da hipodopaminergia cortical, sugere-se que a hipofunção dos receptores NMDA dos interneurônios gabaérgicos no córtex pré-frontal aumenta a liberação de glutamato na ATV. Entretanto, nesta via, há uma hiperestimulação de interneurônios gabaérgicos, o que inibe a via dopaminérgica mesocortical e se traduz em uma redução na liberação de dopamina no córtex pré-frontal (CPF; **Figura 3**; STAHL, 2021).

Com base nas hipóteses apresentadas, foram propostos modelos animais de esquizofrenia pela administração de antagonistas glutamatérgicos. Fármacos como fenciclidina (PCP) ou dizocilpina (MK-801), antagonistas não-competitivos do receptor NMDA pela ligação no sítio iônico do receptor, induzem alterações nos mecanismos e no comportamento relacionado à esquizofrenia (GUERRIN et al., 2021). Diferentes estudos com PCP em roedores demonstraram comportamentos como hiperlocomoção, retraimento social e comprometimentos na cognição e no teste de inibição por pré-pulso (PPI, do inglês, *prepulse inhibition of the acoustic startle*; JONES et al., 2011).

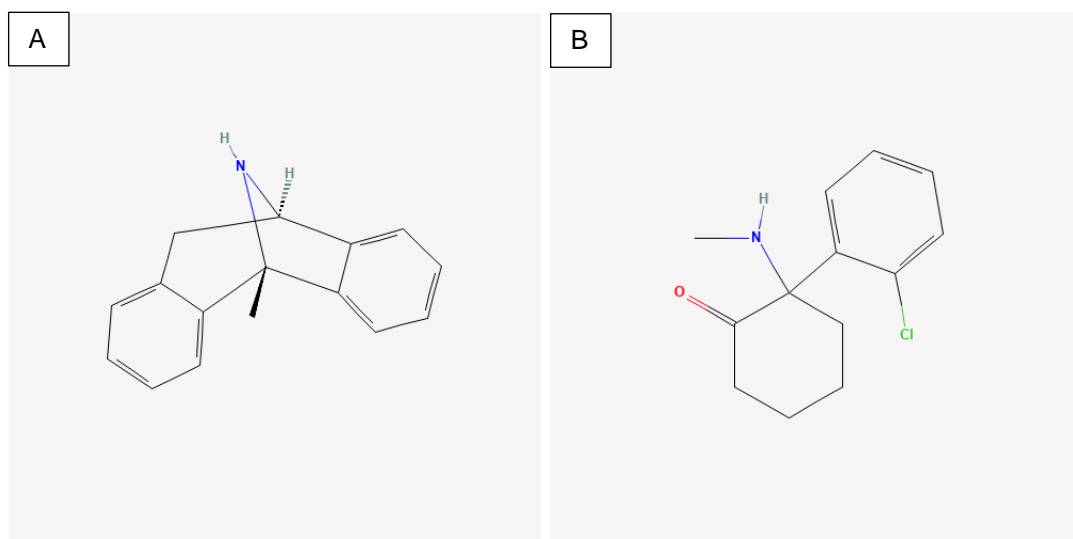
**Figura 3** – Hipótese proposta para explicar sintomas negativos via hipofunção de receptores NMDA no córtex pré-frontal. (A) sinalização do circuito em condições normais. (B) hipodopaminergia mesocortical consequente da hiperativação glutamatérgica em projeções cortiço-talâmicas.



**Fonte:** Stahl (2021), adaptado por María Camila Acero Castillo e Mariana B. M. Correia.

Embora MK-801 mimetize os sintomas da esquizofrenia, não é um fármaco aprovado para uso em seres humanos. Outro fármaco, a CET, também antagonista não-competitivo do receptor NMDA, com efeitos similares e com uso aprovado surge como via promissora para os estudos do distúrbio. CET possui efeito dissociativo mais rápido, meia-vida que varia de minutos a duas horas aproximadamente e baixa afinidade com o canal de cálcio e, portanto, melhor índice terapêutico (WARNER; DOMINO, 2010). Isto posto, a comparação entre o modelo animal com os dois fármacos se torna relevante (**Figura 4**, UPTODATE, 2023; JELEN; YOUNG; STONE, 2021), principalmente pelo caráter translacional aos estudos que CET possibilita.

**Figura 4** – Estrutura química de (A) MK-801 e (B) CET



Fonte: PubChem compostos 180081 e 3821, 2023.

### 1.3 Papel da análise comportamental no modelo animal

A análise comportamental é uma ferramenta usada para responder questionamentos sobre uma pessoa ou animal e pode ser dividida em quatro categorias: ontogenia, mecanismo, significado adaptativo e evolução. São feitos ensaios comportamentais, para obtenção de dados qualitativos e quantitativos, que possa detectar indicadores de mudança interna, tanto fisiológicos como psicológicos (BROWN; BOLIVAR, 2018).

Bons modelos animais, apesar de todas as limitações, devem apresentar uma validade e essa pode ser demonstrada por três pontos: validade por construto – replicação da fundamentação neurobiológica teórica e patológica; validade por predição – demonstrar resposta farmacológica aos tratamentos conhecidos e para potenciais novas terapias e validade fenomenológica – homologia de sintomas. Na validade por construto, considerando o modelo animal da esquizofrenia proposto pelo uso de antagonistas de receptores NMDA, o que se espera é a mimetização das disfunções hipotetizadas nas vias neuroquímicas previamente descritas, que finda em uma hiperfunção dopaminérgica mesolímbica e hipofunção dopaminérgica mesocortical (JONES et al., 2011).

Uma das formas de analisar o comportamento animal é pelo teste de campo aberto (CA), aplicado a diferentes espécies. O teste consiste na utilização de uma arena que pode variar em cor, forma, tamanho e iluminação, na qual o animal é posicionado no centro e é observado, por um período previamente determinado, os comportamentos apresentados, tais como locomoção, autolimpeza, exploração horizontal e vertical e ainda comportamentos específicos, a depender da metodologia escolhida. Esse teste é usado, por exemplo, para mensurar efeitos de diferentes drogas, com possíveis inferências, como o tempo no centro do aparato como indicador de ansiedade, ou o aumento da locomoção por efeito estimulante da substância em pesquisa (PRUT; BELZUNG, 2003). Em roedores, por exemplo, a hiperlocomoção é um comportamento relacionado a alterações dopaminérgicas e a análise de tais comportamentos robustece a validação por construto do modelo proposto para sintomas positivos da esquizofrenia (VAN DEN BUUSE, 2010).

O dado uma vez analisado, com parâmetros descritivos claros, pode ser caracterizado quantitativamente por latência, duração, distribuição percentual e outras formas que mostram padrões específicos da espécie, sendo uma informação útil, principalmente quando há alteração específica em um parâmetro conhecido. É importante, entretanto, considerar que o comportamento depende de fatores que uma simplificação em números pode não ser capaz de revelar. Os demais componentes no contexto do teste realizado, portanto, devem ser levados em consideração, desde o alojamento dos animais, horários de realização dos procedimentos, manipulação do pesquisador entre outros. Em roedores, nos testes de campo aberto, os elementos comportamentais mais representados são: *immobile sniffing* (quando o animal está parado, mas cheirando o aparato, como forma de exploração), caminhada, imobilidade, escalada e o ato de se lambar, principalmente a pata dianteira (considerado autolimpeza). Estes comportamentos em conjunto representam mais de 80% dos comportamentos apresentados espontaneamente pela espécie, corroborando com a característica de exploração inata dos roedores. Em contrapartida, estes também apresentam alguns comportamentos defensivos associados à aversão a lugares novos e áreas desprotegidas, por exemplo, o comportamento de tigmotaxia, no qual o animal espontaneamente prefere a periferia do aparato, se posicionando próximo às paredes (CASARRUBEA et al., 2016).

Baseado no que se conhece das bases da esquizofrenia, é imprescindível entender melhor os mecanismos fisiopatológicos, para um melhor entendimento da desordem como um todo e, conseqüentemente, alcançar melhoras nos diagnósticos e tratamentos. Por meio da hipótese glutamatérgica, esse trabalho visa uma caracterização comportamental comparativa entre CET e MK-801 em modelo murinho.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi a análise dos comportamentos espontâneos apresentados pelos roedores mediante insulto químico com CET e MK-801 como modelo farmacológico de esquizofrenia.

### 2.2 Objetivos específicos

- Implementar o protocolo de coleta de vídeo-EEG e comportamento no Laboratório de Neurociências, Metabolismo e Comportamento da UnB;
- Aplicar o protocolo de análise comportamental com uso do *software Any-maze* para extração de dados de duração, frequência e latência;
- Analisar os parâmetros comportamentais para as doses de CET 20 mg/Kg e MK-801 0,1 mg/Kg; e
- Comparar parâmetros obtidos das análises entre as fases do experimento (basal x controle x tratamento).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Sujeitos experimentais

A presente pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília no processo SEI nº 23106.050441/2022-93 (**Anexo 1**). Foram utilizados 15 ratos Wistar (250-400 g, machos) que foram alojados em gaiolas com 5 animais e mantidos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas em ambiente controlado a 25°C de temperatura, 55% de umidade, 12 horas de ciclo claro/escuro e com ração e água *ad libitum*. Os procedimentos cirúrgicos e testes comportamentais foram realizados nas dependências do Laboratório de Neurociências, Metabolismo e Comportamento do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biológicas.

#### 3.2 Procedimento cirúrgico<sup>1</sup>

Todos os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (*i.p.*) com uma combinação de Acepromazina (2,0 mg/Kg, Vetnil), CET (90,0 mg/Kg, Vetnil) e Xilazina (9,0 mg/Kg, Vetnil) e posicionados no aparelho estereotáxico para cirurgia. Após assepsia com iodopovidona, foi feita uma anestesia local adicional com lidocaína e uma injeção subcutânea (*s.c.*) de Meloxicam para analgesia. Em seguida, com a superfície do crânio exposta, foram feitas as medidas estereotáxicas para posicionamento dos eletrodos de profundidade pelas coordenadas segundo atlas (PAXINOS; WATSON, 2006): CPF: antero-posterior (AP) +3,0 mm, médio-lateral (ML) +1,0 mm e dorso-ventral (DV) -2,3 mm; Hipocampo (Hipp) direito e esquerdo: AP -3,6 mm, ML +/- 2,5 mm e DV -3,0. Os eletrodos foram confeccionados por colaboradores utilizando um fio de tungstênio de 127 µm de diâmetro. Além disso, foi posicionado um parafuso no lobo occipital para funcionar como eletrodo de referência e aterramento do encefalograma, e outros 3 parafusos com a finalidade de fixação da estrutura do capacete posteriormente montado. Os eletrodos foram soldados ao conector de seis pinos (*Pinnacle Technologies*, EUA, modelo 8235-SM), no qual os

---

<sup>1</sup> O procedimento cirúrgico está sendo explicitado pelo impacto comportamental que o mesmo apresenta. A cirurgia fez parte dos objetivos do projeto de mestrado da aluna Mariana B. M. Correia, a fim de coletar dados eletrofisiológicos.



canais 1 e 2 foram soldados nos eletrodos do hipocampo direito e esquerdo, respectivamente. O canal 3A foi soldado ao CPF e o canal 3B, aos canais de aterramento e referência, a fim de garantir que todos os canais estivessem em esquema de referenciamento unipolar. Ao final da solda, o contato elétrico foi testado com auxílio de um multímetro e, por fim, foi feito um capacete de acrílico dental para fixação dos componentes. Ao final da cirurgia, foi realizada uma assepsia com iodopovidona e foi administrado 1,0 mL de salina s.c. para re-hidratação do animal até a recuperação da anestesia. Os animais passaram por um período de recuperação de sete a 10 dias.

### 3.3 Procedimento experimental

Para a coleta de dados, foi utilizado um computador portátil (*Dell*, Brasil) com processador *IntelCore* i7 de 3,4 GHz e 16 GB de memória RAM e um campo aberto com as dimensões 50 cm x 50 cm x 30 cm. Em cada sessão experimental, o animal, conectado ao sistema *wireless* de aquisição eletrofisiológica (*PinnacleTechnologies*, EUA, sistema 8200-K9-SE3) que se encaixa ao conector de seis pinos implantado no processo cirúrgico<sup>2</sup>, foi posicionado na arena do campo aberto e teve seus dados comportamentais registrados por um gravador digital de vídeo (*Intelbras VD 3008*, Brasil). Esse sistema remoto permite a movimentação livre do animal no aparato, como pode ser visto na **Figura 5**.

Em cada sessão, foi realizada uma divisão temporal de duas horas, sendo 30 minutos para coleta basal, 30 minutos para salina e uma hora para o fármaco, como demonstrado na **Figura 6**. As sessões de testes foram pseudoaleatorizadas de forma em que cada animal tivesse 10 sessões, divididas em cinco com CET 20 mg/Kg *i.p.* (0,1 g/mL, Vetnil, mistura racêmica) e as outras cinco com 0,1 mg/Kg *i.p.* de MK-801 (diluído em salina a 0,25 mg/mL, Sigma-Aldrich, EUA), com intervalo mínimo de 72 horas entre os testes. As doses escolhidas foram as menores encontradas em estudos similares, para MK-801 (HOFFMAN, 1992; LIAN et al., 2018; SVOBODA et al., 2015; VAN DER STAAY et al., 2011) e para CET, inicialmente 25 mg/Kg (NICOLÁS et al., 2011; RAZOUX; GARCIA; LÉNA, 2007). Nas primeiras sessões, pela forte ataxia

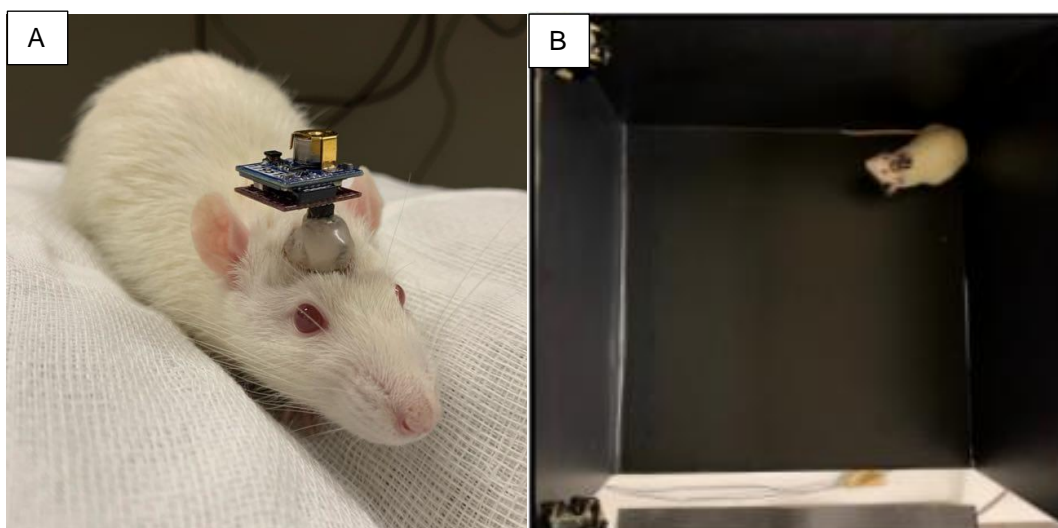
---

<sup>2</sup> Protocolo experimental para aquisição dos dados eletrofisiológicos de potencial de campo local (LFP, do inglês, *Local Field Potential*).

observada com CET, optou-se por diminuir para 20 mg/Kg, e ao contrário para MK-801, em que não observamos alteração comportamental, porém o aumento da dose dependia de passar o projeto novamente pela CEUA.

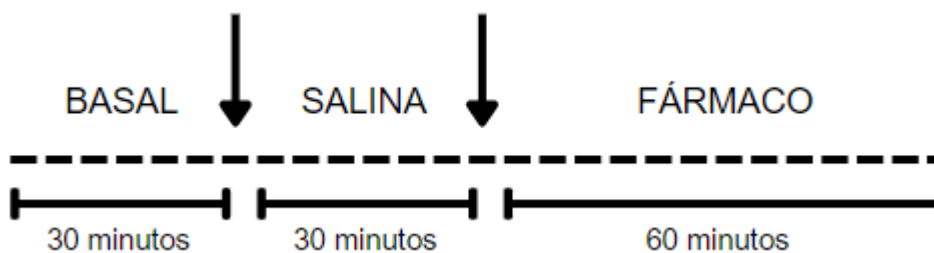
Em função de intercorrências experimentais, os dados de sete animais foram considerados. Para cada animal, seis sessões foram contabilizadas, sendo três para cada fármaco. Houve, então, um total 42 sessões (21 de CET e 21 de MK-801).

**Figura 5** – (A) Rato Wistar macho com implante craniano crônico e transmissor conectado para início do teste experimental. (B) vista superior do animal no CA.



Fonte: Mariana B. M. Correia.

**Figura 6** – Modelo esquemático da sessão de teste.



Fonte: própria (Canva)

### 3.4 Análise dos dados comportamentais

A análise dos dados comportamentais obedeceu a protocolos específicos criados (**Apêndice A**) utilizando o *software Any-maze (Stoelting Co.)*. Os comportamentos espontâneos foram marcados em função do tempo, bem como a distância percorrida pelo animal. A locomoção foi automatizada, com o referencial sendo a cabeça do sujeito experimental e foi realizada uma análise do seu padrão de locomoção, para contabilizar as entradas em cada zona divididas dentro do aparato em periferia e centro.

Os comportamentos contabilizados foram autolimpeza (*grooming*), *sniffing* (exploração), elevação e ataxia, de acordo com o etograma (**Tabela 1**). Para cada um destes, foram contabilizados o tempo total e a frequência em que ocorreram.

**Tabela 1** – Etograma do comportamento do rato no CA.

Elemento comportamental	Descrição do comportamento	Dado extraído
Autolimpeza ( <i>grooming</i> )	Movimento em si mesmo (se esfregar) com as patas dianteiras e se lambar	Duração e frequência
Elevação/escalada	Estar sobre as duas patas traseiras, apoiado ou não no aparato	Duração e frequência
Exploração ( <i>sniffing</i> )	Movimentação das vibrissas, estando móvel ou imóvel	Duração e frequência
Caminhada	Andar sobre o aparato	Distância total percorrida e frequência na zona central do aparato
Ataxia	Locomoção oscilante ou rastejante, movimentos descoordenados, deitado de lado ou sobre o abdômen	Duração e frequência

**Fonte:** Adaptado de Casarrubea et al. (2016) e Sams-Dodd (2016).

### 3.5 Análise estatística

Para análise estatística, foram selecionados os dados de tempo total e frequência de cada comportamento e a distância total percorrida em cada segmento da sessão. Estabelecemos a média de comportamento, por minuto, colapsada de 3 sessões para cada fármaco. A normalização se deu pelo tempo, a fim de se comparar as diferentes etapas da sessão que tiveram durações diferentes. A análise estatística foi feita no *software GraphPad Prism 9*, por meio de teste Two-way ANOVA (análise de variância de duas vias) e do teste de Tukey para comparações múltiplas. O valor de significância estabelecido para todos os testes foi de  $p < 0,05$ .

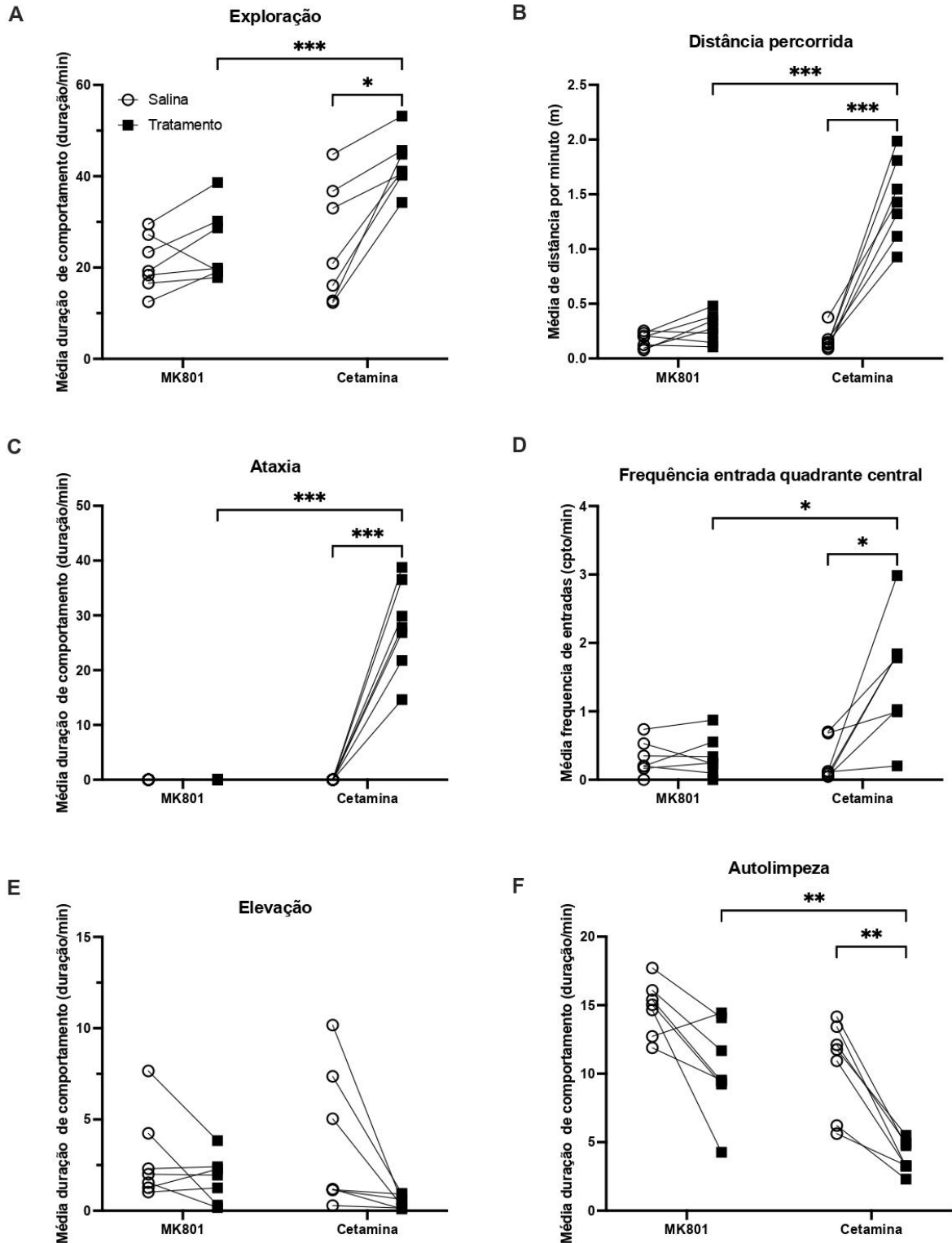
## 4 RESULTADOS

Os comportamentos de exploração, locomoção, ataxia, entrada na zona central do aparato, elevação e autolimpeza foram analisados via média de duração de cada um. A etapa "salina", foi usada como controle e os valores de CET e MK-801 foram comparados com os respectivos controles e entre si.

A administração *i.p.* de 20 mg/Kg de CET induziu uma significativa expressão comportamental minutos após a aplicação, consistente com o aumento da exploração (efeito principal de tratamento  $F_{(1,6)} = 53,62$  e por etapa  $F_{(1,6)} = 23,38$ ; **Figura 7 – A**), locomoção (efeito principal de tratamento  $F_{(1,6)} = 25,79$  e por etapa  $F_{(1,6)} = 37,02$ ; **Figura 7 – B**) e ataxia (efeito principal de tratamento  $F_{(1,6)} = 80,31$  e por etapa  $F_{(1,6)} = 80,60$ ; **Figura 7 – C**). Houve também uma alteração no comportamento basal de entrada na zona central do aparato, com aumento relevante na frequência (efeito principal de tratamento  $F_{(1,6)} = 23,46$  e por etapa  $F_{(1,6)} = 12,33$ ; **Figura 7 – D**). Não foi observada nenhuma alteração relevante na média de duração do comportamento de elevação (efeito principal de tratamento  $F_{(1,6)} = 0,1403$  e etapa por  $F_{(1,6)} = 6,026$ ; **Figura 7 – E**). Além disso, também foi observada uma diminuição na média da duração de autolimpeza (efeito principal de tratamento  $F_{(1,6)} = 39,71$  e por etapa  $F_{(1,6)} = 31,60$ ; **Figura 7 – F**).

Nenhuma alteração significativa foi observada com administração de *i.p.* de 0,1 mg/Kg de MK-801 (**Figura 7 – A;F**).

**Figura 7** – Resultados comportamentais sobre efeito de CET e MK-801. (A) Média da duração de exploração em minutos. (B) Média de distância percorrida em metros. (C) Média da duração de ataxia em minutos. (D) Média da frequência de entradas na zona central. (E) Média da duração de elevação em minutos. (F) Média da duração de autolimpeza em minutos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



## 5 DISCUSSÃO

No presente experimento, 20 mg/Kg *i.p.* de CET alterou significativamente os parâmetros comportamentais analisados no campo aberto, enquanto 0,1 mg/Kg *i.p.* de MK-801 não obteve nenhuma alteração válida estatisticamente.

### 5.1 Efeitos na locomoção

A administração 20 mg/Kg *i.p.* de CET demonstrou hiperlocomoção, o que não foi observado com 0,1 mg/Kg *i.p.* de MK-801. Gilmour et al. (2009) em seu estudo com antagonistas do receptor NMDA em diferentes doses, CET apresentou hiperlocomoção nas doses 5, 10 e 25 mg/Kg *i.p.* nos primeiros 30 minutos após aplicação *s.c.*, porém, no tempo 30-60 min, nenhuma dose apresentou diferença estatística. Nesse mesmo estudo, MK-801 apresentou hiperlocomoção nas doses 0,25 e 0,5 mg/Kg no tempo 30-60 min após a administração *s.c.* e a dose de 0,1 mg/kg não gerou uma diferença estatística em relação ao grupo controle (GILMOUR et al., 2009). Hunt et al. (2010) com ratos Wistar machos também não observou diferença significativa na locomoção com MK-801 0,1 mg/Kg. Os achados do presente trabalho corroboram os de Gilmour *et al.* (2009) e Hunt *et al.* (2010).

Em contrapartida, Lian et al. (2018) utilizaram 0,1 mg/Kg de MK-801, com administração *i.p.* em Sprague-Dawley, e observaram uma diferença significativa na locomoção, e em outro estudo com a mesma espécie e dose, porém via *s.c.*, foi considerado confiável o aumento da locomoção e de comportamento estereotipado de cheirar (*sniffing*; HOFFMAN, 1992).

Em outro trabalho, no qual o autor considerou a posologia como regime subcrônico, (0,063 mg/Kg, por 3 dias) a MK-801 demonstrou hiperlocomoção, comportamento estereotipado e ataxia (SAMS-DODD, 1996). Dessa forma, o papel da cinética intrínseca de cada componente, apesar de apresentarem a mesma farmacodinâmica, é um fator a ser considerado no delineamento experimental. Os efeitos comportamentais de CET foram observados logo após a administração, o que é compatível com o pico sérico aos 20 minutos pós-administração e com alterações comportamentais (PÁLENÍČEK et al., 2011). Andiné *et al.*, (1999) demonstraram presença de MK-801 no plasma, em humanos e ratos, seis minutos após a injeção, mas sugerem que diferenças entre os sexos pode refletir no metabolismo do fármaco,

pela menor capacidade da metabolização hepática de MK-801 por fêmeas, além da possibilidade da diferença do desenvolvimento e organização cerebral que os hormônios acarretam, uma vez que a presença dos hormônios na circulação não demonstra uma diferença em diferentes estágios do ciclo estral de ratas e no efeito entre os sexos (D; HARLAN; GARCIA, 2002; HO" NACK; LO" SCHER, 1993). Também discutiram que, 30 minutos após administração *i.p.* a concentração cerebral de MK-801 é 10 vezes maior que concentração sérica, local no qual o mecanismo de ação proposto da hipótese, o que reforça que a dose utilizada foi insuficiente, visto que a droga se concentra no sítio de ação.

É importante considerar que a MK-801 teve seu efeito correlacionado tanto com a dose administrada, quanto com fatores como idade e sexo: fêmeas mais responsivas ao fármaco e com alteração comportamental em todas as idades (10 a 80 dias) e machos com pico de ação aos 10 dias de idade (ANDINÉ et al., 1999). Neste trabalho, utilizamos ratos Wistar machos, e os testes comportamentais foram feitos cerca de 110 dias após o nascimento, devido ao peso mínimo esperado no protocolo de cirurgia estereotáxica para assegurar que os alvos corticais estivessem coerentes com as coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (2006). Pelas características dos sujeitos experimentais, a comparação entre sexo não foi possível e o fator idade se torna limitante, visto a que o protocolo incorporado envolve cirurgia a estereotáxica.

## **5.2 Autolimpeza e frequência de entrada no centro do aparato**

Como apresentado anteriormente, CET 20 mg/Kg induziu uma diminuição significativa no comportamento de autolimpeza e também induziu um aumento na frequência de entrada na zona central, o que não ocorreu para a dose utilizada de MK-801. A autolimpeza é considerada uma medida sensível do estresse e, por isso, usada com inferência de ansiedade, de maneira em que efeitos ansiogênicos são traduzidos em comportamento de autolimpeza (FRAGA et al., 2018).

Outra maneira de analisar fatores da ansiedade é o tempo no centro do aparato pois, como já supracitado, os ratos espontaneamente preferem as proximidades das paredes do CA e, portanto, um maior tempo na zona central está relacionado a um efeito ansiolítico. Há uma discussão sobre o efeito antidepressivo de antagonistas do receptor NMDA (YANG et al., 2015). Em estudo com camundongos, CET 10 mg/Kg



*i.p.* aumentou o tempo total que o animal passou no centro do CA, porém não alterou o parâmetro de autolimpeza (FRAGA et al., 2018). Nesse estudo, os autores dividem a autolimpeza corporal e na face, o que não foi aplicado ao presente estudo pela influência do capacete montado na cirurgia e seu impacto no comportamento em questão.

Em Yang, (2015), também com camundongos em testes específicos para efeitos antidepressivos, a administração de CET, separando seus isômeros *R* e *S*, mostrou resultados diferentes. *S-CET* (5, 10 e 20 mg/Kg), que apresenta uma afinidade pelo receptor NMDA quatro vezes maior que *R-CET*, mostrou aumento da locomoção, de forma dose-dependente, com efeito rápido, dentro dos primeiros 30 minutos. Já *R-CET*, que também apresenta afinidade por outros receptores como  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolpropiónico (AMPA), não demonstrou efeito na locomoção. A mesma conclusão foi feita para efeitos cognitivos, no qual *S-CET* causou déficit no teste PPI. Os autores concluíram que *R-CET* é mais eficaz no uso como antidepressivo em comparação com *S-CET*, uma vez que não apresenta os efeitos psicotomiméticos (YANG et al., 2015).

Embora o foco do trabalho não envolva as propriedades ansiolíticas de CET, os resultados encontrados nos comportamentos de autolimpeza e frequência na zona central do CA corroboram este dado, considerando que foi administrada CET racêmica, ou seja, uma mistura dos dois isômeros.

### **5.3 Sniffing**

O tratamento de CET 20 mg/Kg induziu um aumento significativo no comportamento de exploração (*sniffing*), o que não foi observado com a dose administrada de MK-801. Em um estudo com ratos Sprague-Dawley, doses de 0,16 e 0,33 mg/Kg *i.p.* de MK-801 induziram um aumento de *sniffing* pelo aumento das vezes que os ratos encostaram o focinho na parede do aparato e também um aumento do comportamento estereotipado, com pico aos 45 minutos (TIEDTKE; BISCHOFF; SCHMIDT, 1990). Owolabi et al. (2008) também demonstraram aumento significativo de exploração em ratos Wistar mediante administração *i.p.* de 15 mg/Kg de CET, bem como aumento com anfetamina e CET como pré-tratamento agudo (15 mg/Kg).

#### 5.4 Elevação

A administração de 20 mg/Kg de CET e 0,1 mg/Kg MK-801 não apresentaram alteração nos comportamentos de elevação. Em um estudo com ratos Sprague-Dawley, a administração de CET 10 mg/Kg *i.p.* mostrou que (1) quanto mais velho o animal, menor o efeito de CET em machos e maior em fêmeas e (2) a possibilidade da diminuição de comportamentos devido à perda de equilíbrio ou falta de coordenação motora (WILSON et al., 2007). É possível inferir que a média da duração de elevação não se alterou em CET pela junção desses dois fatores: presença expressa de ataxia e a idade dos animais em teste. Ao longo das análises comportamentais a ataxia, embora não tenha atrapalhado a locomoção, esta foi realizada de forma desordenada, oscilante e rápida, o que não foi observado com elevação que, principalmente sem apoio na parede, o animal não se mantinha sobre as duas patas e caía de lado.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo do presente trabalho foi analisar os comportamentos induzidos por CET e MK-801 em modelo murino de esquizofrenia. Visando um modelo farmacológico, baseado na validade por construto da administração de fármacos antagonistas do receptor NMDA em uma análise dos sintomas positivos, o que se espera é um aumento no padrão de locomoção do animal. Os principais achados foram: (1) CET 20 mg/Kg *i.p.* induz alteração comportamental, especificamente com hiperlocomoção e, portanto, os dados são condizentes com um modelo farmacológico de esquizofrenia; (2) MK-801 0,1 mg/Kg *i.p.* não foi suficiente para induzir alteração comportamental significativa dentro do intervalo de tempo analisado e, portanto, não pode ser utilizado como modelo, de acordo com as características específicas do protocolo proposto. Sugerimos, então, novas análises com a dose de 0,25 mg/Kg, considerando os diferentes fatores atribuídos a diferentes efeitos de MK-801 e, ainda, uma análise comportamental que esteja mais adequada ao pico de ação do fármaco (*i.e.*, 15-75 minutos pós-injeção).

O trabalho apresentou limitações, com amostra reduzida dos sujeitos experimentais bem como das sessões-teste, por intercorrências relacionadas direta ou indiretamente ao procedimento cirúrgico e ao caráter crônico dos testes. Alguns animais conseguiam retirar o transmissor durante a aquisição de dados, o que findou tanto na perda dos dados, quanto em dano ao equipamento. Para mitigar esta limitação, propomos a colocação de hastes no capacete feito durante a cirurgia, para uma maior fixação do transmissor.

A despeito destas limitações, os resultados aqui coletados indicam que a CET na dose 20 mg/Kg é capaz de induzir alterações comportamentais, capaz de mimetizar a esquizofrenia com validade por construto, sendo um modelo útil para analisar a hipótese glutamatérgica e propostas de tratamento farmacológico.

## 7 REFERÊNCIAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5**. 5º ed. [s.l.] Porto Alegre : Artmed, 2014, 2014.

ANDINÉ, P. et al. Characterization of MK-801-Induced Behavior as a Putative Rat Model of Psychosis. **THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS**, v. 290, n. 3, p. 1393–1408, 1 set. 1999.

BROWN, A. S. **The environment and susceptibility to schizophrenia. Progress in Neurobiology**, jan. 2011.

BROWN, R. E.; BOLIVAR, S. The importance of behavioural bioassays in neuroscience. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 300, p. 68–76, 15 abr. 2018.

CARLSSON ARVID; LINDQVIST MARGIT. 1963\_Arvid Carlsson and Margit Lindqvist\_Effect of Chlorpromazine or Haloperidol on Formation of 3-Methoxytyramine and Normetanephrine in mouse brain. **Acta pharmacol. et toxicol.**, p. 140–144, 1963.

CASARRUBEA, M. et al. Application of t-pattern analysis in the study of rodent behavior: Methodological and experimental highlights. Em: **Neuromethods**. [s.l.] Humana Press Inc., 2016. v. 111p. 217–235.

D, D. N.; HARLAN, R. E.; GARCIA, M. M. Sexually dimorphic effects of morphine and MK-801: sex steroid-dependent and-independent mechanisms. 2002.

FRAGA, D. B. et al. Anxiolytic effects of ascorbic acid and ketamine in mice. **Journal of Psychiatric Research**, v. 100, p. 16–23, 1 maio 2018.

GILMOUR, G. et al. Diverse and often opposite behavioural effects of NMDA receptor antagonists in rats: Implications for “nMDA antagonist modelling” of schizophrenia. **Psychopharmacology**, v. 205, n. 2, p. 203–216, ago. 2009.

GUERRIN, C. G. J. et al. **The dual hit hypothesis of schizophrenia: Evidence from animal models. Neuroscience and Biobehavioral Reviews** Elsevier Ltd, , 1 dez. 2021.

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, 15 mar. 2018.

HOFFMAN, D. C. **Journal of Neural Transmission Typical and atypical neuroleptics antagonize MK-801-induced locomotion and stereotypy in rats** *J Neural Transm.* [s.l: s.n.].

HO" NACK, D.; LO" SCHER, W. Sex differences in NMDA receptor mediated responses in rats. **Brain Research**, v. 620, n. 1, p. 167–170, 20 ago. 1993.

HOWES, O. D.; KAPUR, S. **The dopamine hypothesis of schizophrenia: Version III - The final common pathway.** **Schizophrenia Bulletin**, maio 2009.

HUNT, M. J.; FALINSKA, M.; KASICKI, S. Local injection of MK801 modifies oscillatory activity in the nucleus accumbens in awake rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 24, n. 6, p. 931–941, jun. 2010.

JELLEN, L. A.; YOUNG, A. H.; STONE, J. M. **Ketamine: A tale of two enantiomers.** **Journal of Psychopharmacology** SAGE Publications Ltd, , 1 fev. 2021.

JONES, C. A. et al. Themed Issue: Translational Neuropharmacology-Using Appropriate Animal Models to Guide Clinical Drug Development Animal models of schizophrenia Correspondence LINKED ARTICLES. 2011.

KIM, J. S. et al. **LOW CEREBROSPINAL FLUID GLUTAMATE IN SCHIZOPHRENIC PATIENTS AND A NEW HYPOTHESIS ON SCHIZOPHRENIA** *Neuroscience Letters.* [s.l: s.n.].

LEWIS, D. A.; LIEBERMAN, J. A. **Review Catching Up on Schizophrenia: Natural History and Neurobiology (diac malformations, and a distinctive facial appearance), which carries a substantially increased risk of schizo-phrenia, although the incidence of bipolar disorder in** *Neuron.* [s.l: s.n.].

LIAN, B. et al. Object, spatial and social recognition testing in a single test paradigm. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 152, p. 39–49, 1 jul. 2018.

National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 3821,

Ketamine" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ketamine>. Acesso em 5 de julho de 2023.

National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 180081,  
Dizocilpine" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dizocilpine>. Acesso em 5 de julho de 2023.

NICOLÁS, M. J. et al. Ketamine-induced oscillations in the motor circuit of the rat basal ganglia. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.

OWOLABI, A. R.; AKANMU, M. A.; UKPONMWAN, O. E. Functional reactivity of the dopaminergic system following acute and chronic ketamine treatments. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 378, n. 1, p. 117–124, jul. 2008.

PÁLENÍČEK, T. et al. Electroencephalographic spectral and coherence analysis of ketamine in rats: Correlation with behavioral effects and pharmacokinetics. **Neuropsychobiology**, v. 63, n. 4, p. 202–218, maio 2011.

PAXINOS, George; WATSON, Charles. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Elsevier, 2006.

PERÄLÄ, J. et al. **Lifetime Prevalence of Psychotic and Bipolar I Disorders in a General Population** *Arch Gen Psychiatry*. [s.l: s.n.].

PRUT, L.; BELZUNG, C. **The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review.** *European Journal of Pharmacology* Elsevier, , 28 fev. 2003.

RAZOUX, F.; GARCIA, R.; LÉNA, I. Ketamine, at a dose that disrupts motor behavior and latent inhibition, enhances prefrontal cortex synaptic efficacy and glutamate release in the nucleus accumbens. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 3, p. 719–727, mar. 2007.

SAMS-DODD, F. 1996\_Sams-Dodd, F.\_Phencyclidine-induced stereotyped behaviour and social isolation in rats a possible animal model of schizophrenia. 1996.

STAHL, S. M. Beyond the dopamine hypothesis of schizophrenia to three neural networks of psychosis: Dopamine, serotonin, and glutamate. **CNS Spectrums**, v. 23, n. 3, p. 187–191, 1 jun. 2018.

STAHL, S. M. **Stahl's Essential Psychopharmacology Neuroscientific Basis and Practical Applications Fifth Edition**. [s.l: s.n.].

SVOBODA, J. et al. Acute administration of MK-801 in an animal model of psychosis in rats interferes with cognitively demanding forms of behavioral flexibility on a rotating arena. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 9, n. APR, 1 abr. 2015.

TIEDTKE, P. I.; BISCHOFF, C.; SCHMIDT, W. J. **Journal of Neural Transmission MK-801-induced stereotypy and its antagonism by neuroleptic drugs** *J Neural Transm*. [s.l: s.n.].

UNO, Y.; COYLE, J. T. PCN FRONTIER REVIEW PCN Glutamate hypothesis in schizophrenia. 2019.

VAN DEN BUUSE, M. **Modeling the positive symptoms of schizophrenia in genetically modified mice: Pharmacology and methodology aspects**. **Schizophrenia Bulletin**, mar. 2010.

VAN DER STAAY, F. J. et al. Effects of the cognition impairer MK-801 on learning and memory in mice and rats. **Behavioural Brain Research**, v. 220, n. 1, p. 215–229, 20 jun. 2011.

WAHBEH, M. H.; AVRAMOPOULOS, D. **Gene-environment interactions in schizophrenia: A literature review**. **GenesMDPI**, , 1 dez. 2021.

WARNER, D. S.; DOMINO, E. F. **CLASSIC PAPERS REVISITED Taming the Ketamine Tiger** *Anesthesiology*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.anesthesiology.org](http://www.anesthesiology.org)>.


WILSON, C. et al. Effects of age and sex on ketamine-induced hyperactivity in rats. **Physiology and Behavior**, v. 91, n. 2–3, p. 202–207, 8 jun. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schizophrenia**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia>. Acesso em 05 junho de 2023.

YANG, C. et al. R-ketamine: A rapid-onset and sustained antidepressant without psychotomimetic side effects. **Translational Psychiatry**, v. 5, 1 set. 2015.



## ANEXO 1 – Certificados de Aprovação pela Comissão de Ética no Uso Animal




**Universidade de Brasília**  
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 15 de junho de 2022.


**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto de ensino intitulado "CARACTERIZAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DE NEURÔNIOS DO CÓRTEX PRÉFRONTAL E HIPOCAMPO EM MODELO FARMACOLÓGICO DA ESQUIZOFRENIA", SEI n.º 23106.050441/2022-93, sob responsabilidade do Professor Rafael Plakoudi Souto Maior, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, na 175ª reunião ordinária, realizada em 10/6/2022. Este projeto foi aprovado para utilização de *Rattus norvegicus* – Wistar (10 machos), provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

O presente certificado é válido pelo período de 15/6/2022 a 31/12/2023.



*Carina Krewer*  
Dra. Carina da Costa Krewer  
Coordenadora da CEUA – UnB



\*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

Brasília, 13 de dezembro de 2022.

### **DECLARAÇÃO – ADEUDO**

Declaramos que o adendo ao projeto intitulado “CARACTERIZAÇÃO ELETRFISIOLOGICA DE NEURÔNIOS DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO EM MODELO FARMACOLÓGICO DA ESQUIZOFRENIA”, SEI n.º 23106.050441/2022-93, sob responsabilidade do pesquisador Rafael Plakoudi Souto Maior, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, na 186ª reunião extraordinária, realizada em 12/12/2022. Este adendo foi aprovado para: 1. autorizar o uso de 5 animais (*Rattus norvegicus* Wistar, machos).



*Carina Krewer*  
Dra. Carina da Costa Krewer  
Coordenadora da CEUA – UnB

\*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

## ANEXO 2 – Protocolo de análise experimental *Any-maze*

### 1. Apparatus

#### 1.1. Schizo

This protocol specifies that ANY-maze will operate in Video tracking mode. In this mode the system will track the animal in the video image. Keys can also be used to score the animal's behaviour.

#### 1.2. Video sources

New video source

Images for this source are captured from the C:\Users\Felicia\LabNeuro-UnB Dropbox\Beatriz\vídeos\B2\F1B2 fármaco certo.avi interface which is viewing the apparatus from above. The complete captured images measure 320 x 240 pixels. This source uses a subset of this area measuring 320 x 240 pixels and positioned at 0, 0 (see figure 1).

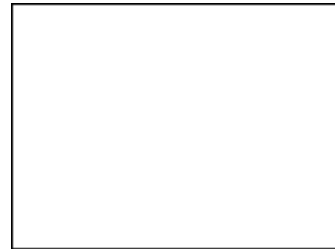


Figure 1. The New video source video source uses the un-shaded area of the complete image captured from the C:\UnB Dropbox

OF

1.3. Apparatus  
The image of this apparatus is provided by the New video source video source. This video file will rewind and start the video automatically at test start. Figure 2 shows the apparatus map for this apparatus; the 'ruler' line shown in the map extends from (93,195) to (247,199) and represents a real-world distance of 500 millimetres.

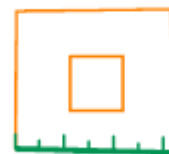


Figure 2. OF apparatus map.

### 2. Tracking

#### 2.1. Animals

The animals that will be tracked are rats (not hooded). The animals are lighter than the background of the apparatus.

#### 2.2. Tracking the animal's head & tail

The system will track the animal's head and tail as well as its centre of gravity. The results will therefore include measures specific to the position of the animal's head and tail during the test.

### 2.3. Tracking options

The animals will *not* be in the apparatus before the start of the test.

Background frames will be retained from one test to the next.

## 3. Behaviour

### 3.1. Zones

Centro

Figure 3 shows the area(s) in the apparatus which correspond to this zone. The system will consider that the animal is in this zone whenever its head is within the zone.



Figure 3. Position of the Centro zone in the OF.

Periferia

Figure 4 shows the area(s) in the apparatus which correspond to this zone. The system will consider that the animal is in this zone whenever its head is within the zone.



Figure 4. Position of the Periferia zone in the OF.

### 3.2. Orientation and movement

ANY-maze will not analyse the animal's *orientation* towards zones and points.

ANY-maze will not analyse the animal's *movement* towards and away from zones and points.

### 3.3. Immobility detection

The system will detect periods when the animal is immobile and therefore the results will include mobility specific measure. The animal will be considered to be immobile if it doesn't change location and at least 65% of its body remains static for a period of 3s or more.

### 3.4. Freezing detection

The system won't detect periods when the animal is freezing.

### 3.5. Keys

Sniffing

The key's behaviour is scored while the key is held down.

	<p>Key stroke for OF : F</p> <p>The behaviour represented by this key is an activity. This means that the animal will be deemed to be active when this key is pressed, even if it's not mobile.</p>
Elevação	<p>The key's behaviour is scored while the key is held down.</p> <p>Key stroke for OF : E</p> <p>The behaviour represented by this key is an activity. This means that the animal will be deemed to be active when this key is pressed, even if it's not mobile.</p>
Autolimpeza	<p>The key's behaviour is scored while the key is held down.</p> <p>Key stroke for OF : J</p> <p>The behaviour represented by this key is an activity. This means that the animal will be deemed to be active when this key is pressed, even if it's not mobile.</p>
Ataxia	<p>The key's behaviour is scored while the key is held down.</p> <p>Key stroke for OF : I</p>
Head weaving	<p>The key's behaviour is scored while the key is held down.</p> <p>Key stroke for OF : O</p>

## 4. Testing

### 4.1. Test scheduling

Tests will be scheduled automatically by the system.

### 4.2. Stages

Each animal will proceed through all the stages in this protocol before the next animal starts to be tested.

Basal

Tests in this stage have a duration of 1h (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

Any animal which reaches the end of this stage without satisfying any stage end rule will automatically be retired.

Salina

Tests in this stage have a duration of 1h (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.  
Any animal which reaches the end of this stage without satisfying any stage end rule will automatically be retired.

Fármaco

Tests in this stage have a duration of 90min (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

### 4.3. Automatic starting of tests

The system will automatically start tests when the experimenter leaves the camera's field of view.

### 4.4. What to record while testing

The system will automatically select the frequency at which it will record the animals' position based on the programmed duration of the tests in the experiment.

A video of each test will be recorded automatically if tracking from a camera, and will be given a file name of the format 'Test [TestNum].szv'. The videos will start with a sequence of 5 seconds showing the empty apparatus (this will make it simpler to retrack tests from the videos, if required). Videos will be recorded using *Best quality - larger files*.

## 5. Additional information

### 5.1. Treatment groups

Animals will be grouped together into treatment groups.

Under this protocol experiments will be run blind - i.e. the treatment groups will be assigned random single letter codes, the meanings of which will be hidden from the user. However, the system won't assign the animals to the treatment groups and this will have to be done manually by the user.

### 5.2. Animal ID

ANY-maze will refer to animals by their animal numbers. These are simple sequential numbers starting at 1; so Animal 1, Animal 2, etc.

## 6. Analysis

### 6.1. Analysis across time

In any analysis that the system performs *within* tests (i.e. through the use of the *Segment* measure) it will use a segment length of 60s. That's to say that it will break the tests into equal length segments of this duration (although the last segment may be shorter) and analyse the results in each one.

### 6.2. Analysis options

#### General analysis settings

ANY-maze will use a level of significance of  $p \leq 0.05$  in all statistical tests.

In this protocol the latency for events which don't occur will be *undefined*. For example, if the animal does not enter a particular zone during a test then the latency to the first entry to that zone will be undefined. This will mean that the animal will not be included in the results for the measure. This will cause the measure's N to be reduced. This will apply to: Zone entries/exits which don't occur, key presses which don't occur and sequences which don't occur.

When calculating averages where the denominator of the calculation is zero (for example, the average speed in a zone that the animal never entered) the system will consider the result to be undefined. This will mean that, in these cases, the animal won't be included in the results for the

measure. This will cause the measure's N to be reduced.

In tests where the animal does not enter a certain zone, the path efficiency to that zone will be undefined. This will reduce the 'N' for this measure.

The Corrected Integrated Path Length (CIPL) for a zone will be calculated based on the path up to the first zone entry. This means that if the animal never enters the zone the CIPL will be reported as #N/A.

### Analysis of heading errors

The animal's initial heading error will be calculated using the vector that joins the animal's initial position and its position 500ms after the test start (ignoring periods when the animal is immobile).

ANY-maze will calculate the average heading error to a zone based on all the points on the zone's perimeter. Thus a heading error to a zone will be the heading to the perimeter point with the smallest error.

### Additional scoring - overlapping key strokes

If, in tests that are rescored, the same key is pressed at the same time in multiple 'scorings' of the test, then the system will merge the overlapping key presses so the total time pressed remains accurate.

## 7. Notes about this report

This report shows details of the ANY-maze protocol which affect how the experiment is performed. It does *not* include sections of the protocol which determine which results are currently selected for display (for example, Reports and Charts) or how information is formatted or displayed during a test.