

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE EDUCAÇÃO E CIÊNCIAS HUMANAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA

**EFEITOS DA META-CLOROFENILPIPERAZINA (mCPP) SOBRE A
AUTOLIMPEZA E ALTERNÂNCIA ESPONTÂNEA EM RATOS: INFLUÊNCIAS
DO SEXO E DO CICLO ESTRAL**

LETICIA MITSUKO TAGUCHI

São Carlos - SP

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE EDUCAÇÃO E CIÊNCIAS HUMANAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA

**EFEITOS DA META-CLOROFENILPIPERAZINA (mCPP) SOBRE A
AUTOLIMPEZA E ALTERNÂNCIA ESPONTÂNEA EM RATOS: INFLUÊNCIAS
DO SEXO E DO CICLO ESTRAL**

LETICIA MITSUKO TAGUCHI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Psicologia, da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Psicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira

São Carlos - SP

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Educação e Ciências Humanas
Programa de Pós-Graduação em Psicologia

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Leticia Mitsuko Taguchi, realizada em 26/11/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira (UFSCar)

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza (UFSCar)

Profa. Dra. Telma Gonçalves Carneiro Spera de Andrade (UNESP)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Psicologia.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por meio do fornecimento de Bolsa de Mestrado (processo no. 2019/04351-9), bem como de reserva técnica para a aquisição de equipamentos e material de consumo e para a participação em eventos científicos nos quais versões prévias do trabalho foram apresentadas. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

A pesquisa também contou com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio de Auxílio Universal (processo no. 401032/206-7), e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX; Código de Financiamento 001).

*Aos meus pais Cleusa Naoko Totake Taguchi e Genesio Kenzo Taguchi e
irmãs Patricia Mayumi Taguchi e Juliana Midori Taguchi.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira, minha orientadora desde a iniciação científica, agradeço a paciência, dedicação, incentivo e apoio, além do excelente trabalho e brilhante orientação, será sempre um exemplo de pesquisadora, professora e mulher. Me inspiro e me espelho em você e espero poder ter a honra de continuar trabalhando em conjunto.

À minha banca examinadora, Profa. Dra. Azair Liane Canto de Souza e Profa. Dra. Telma Gonçalves Carneiro Spera de Andrade que gentilmente aceitaram participar e colaborar com este trabalho. Ao Prof. Dr. Marcos Hortes Nisihara Chagas e a Dra. Raquel Chacon Ruiz Martinez por cada contribuição feita no exame de qualificação.

Aos meus familiares, que sempre me apoiaram e me ajudaram a conquistar meus sonhos, agradeço o amor e carinho incondicionais, incentivo e compreensão.

Às minhas queridas amigas “chinelas” e “mestramigas”, vocês são um presente que São Carlos me deu e sou muito grata por ter vocês em minha vida; em especial, a Manu Foresto, Helô Zapparoli, Amanda Ribeiro e Thalita Nicolau, agradeço por cada conselho, parceria e cumplicidade.

Aos meus colegas do Laboratório de Psicologia de Aprendizagem, pelo acolhimento e aprendizado diário, e em especial, as minhas amigas Camila Alves, Isa Waku, Jéssica da Silva e Débora Fabris, que compartilharam comigo os perrengues, conquistas e desabafos por todos esses anos.

À equipe Dragão Branco Aerodesign, por toda experiência, conhecimento e amizades. Em especial, ao Leonardo dos Santos Almelin Guimarães, agradeço a companhia, paciência, amor e carinho, que foi essencial para o meu bem-estar e saúde mental, principalmente durante a pandemia, para que eu conseguisse concluir meu trabalho.

À Universidade e a todo seu corpo docente pelo meu crescimento profissional.

Aos funcionários da secretaria do Programa por estarem sempre dispostos a ajudar nas questões burocráticas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro – número do processo: 2019/04351-9.

TAGUCHI, L. M. (2021) *Efeitos da meta-clorofenilpiperazina (mCPP) sobre a autolimpeza e alternância espontânea em ratos: influências do sexo e do ciclo estral*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Psicologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 67 pp.

RESUMO

O Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC) é caracterizado por obsessões e/ou compulsões que causam grande sofrimento aos portadores. As bases neurais subjacentes ao TOC precisam ser melhor investigadas, considerando-se, por exemplo, as diferenças existentes em termos de prevalência, severidade e sintomatologia entre homens e mulheres. Além disso, modelos animais para estudo do TOC ainda não estão bem estabelecidos, sendo o agonista serotoninérgico meta-clorofenilpiperazina (mCPP) utilizado como ferramenta na tentativa de explorar a relação entre a transmissão serotoninérgica e o TOC. O presente estudo teve como objetivos comparar a expressão basal da autolimpeza e alternância espontânea em ratos machos e fêmeas (proestro/estro e metaestro/diestro) e avaliar os efeitos da administração aguda ou repetida da mCPP sobre esses comportamentos. Para isso, ratos Wistar machos e fêmeas em proestro/estro e metaestro/diestro tiveram a autolimpeza e alternância espontânea basais comparadas (exp.1); ou receberam injeção intraperitoneal de salina ou mCPP (0,1, 0,5 ou 1,0 mg/kg) de forma aguda (exp.2) ou repetida (exp.3) para avaliação dos efeitos sobre esses comportamentos. Não foram encontradas diferenças basais para autolimpeza ou alternância espontânea entre machos e fêmeas ou entre fêmeas em diferentes fases do ciclo estral. A administração aguda ou repetida da mCPP não alterou, de forma importante, os comportamentos de autolimpeza ou alternância espontânea para machos ou fêmeas. De fato, houve apenas diminuição da autolimpeza para fêmeas em metaestro/diestro tratadas agudamente com mCPP 1,0 mg/kg e aumento significativo da latência para entradas no teste de alternância causado pelas doses mais altas de mCPP administradas de forma aguda em fêmeas em proestro/estro e de forma repetida em fêmeas em metaestro/diestro. Assim, de maneira geral, nossos resultados indicam que os comportamentos naturais de autolimpeza e alternância espontânea em ratos da linhagem Wistar não parecem diferir entre machos e fêmeas ou estar associados às alterações hormonais apresentadas ao longo do ciclo estral. Além disso, diferentemente do esperado, a mCPP não exacerbou o comportamento de autolimpeza ou prejudicou a alternância espontânea em nosso estudo para machos ou para fêmeas. Por outro lado, os efeitos da mCPP observados parecem indicar um potencial comprometimento motor induzido pelo fármaco ocorrendo apenas nas fêmeas.

Palavras-chave: serotonina; labirinto em T; alternância espacial; Transtorno Obsessivo-Compulsivo; fêmeas.

TAGUCHI, L. M. (2021) *Effects of meta-chlorophenylpiperazine (mCPP) on grooming and spontaneous alternation in rats: influences of sex and estrous cycle*. Master's Thesis in Psychology, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP. 67 pp.

ABSTRACT

Obsessive-Compulsive Disorder (OCD) is characterized by obsessions and/or compulsions that cause great suffering to patients. The neural bases underlying OCD need to be better investigated, considering, for example, the existing differences in terms of prevalence, severity, and symptomatology between men and women. In addition, animal models for the study of OCD are not yet well established, with the serotonergic agonist meta-chlorophenylpiperazine (mCPP) being used as a tool in an attempt to explore the relationship between serotonergic transmission and OCD. The present study aimed to compare the basal expression of self-grooming and spontaneous alternation in male and female rats (proestrus/estrus and metestrus/diestrus) and to evaluate the effects of acute or repeated administration of mCPP on these behaviors. For this, male and female Wistar rats (females in proestrus/estrus and metestrus/diestrus) had basal self-grooming and spontaneous alternation compared (exp.1); or received intraperitoneal injection of saline or mCPP (0.1, 0.5 or 1.0 mg/kg) acutely (exp.2) or repeatedly (exp.3) to assess the effects on these behaviors. No baseline differences were found for self-grooming or spontaneous alternation between males and females or between females at different stages of the estrous cycle. Acute or repeated administration of mCPP did not significantly alter self-grooming behaviors or spontaneous alternation in males or females. In fact, there was only a decrease in self-grooming for females in metestrus/diestrus treated acutely with 1.0 mg/kg mCPP and a significant increase in latency for entries in the alternation test caused by the higher doses of mCPP administered acutely on females in proestrus/estrus and repeatedly on females in metestrus/diestrus. Thus, overall, our results indicate that the natural behaviors of self-grooming and spontaneous alternation in Wistar rats do not appear to differ between males and females or be associated with hormonal changes presented along the estrous cycle. Furthermore, contrary to expectations, mCPP did not exacerbate the self-grooming behavior or impair spontaneous alternation in our study for males or females. On the other hand, the observed effects of mCPP seem to indicate a potential drug-induced motor impairment occurring only on females.

Keywords: serotonin; T maze; special alternation; obsessive-compulsive disorder; females

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografias ilustrativas da avaliação citológica característica das fases do ciclo estral de ratas. Aumento de 10x. (A) Proestro, (B) Estro, (C) Metaestro e (D) Diestro. As setas em preto, vermelho e verde indicam células nucleadas, células cornificadas e leucócitos, respectivamente.....28
- Figura 2.** Fotografia da caixa experimental utilizada para observação da autolimpeza.....29
- Figura 3.** Imagem do labirinto em T utilizado para realização do teste de alternância espontânea.....30
- Figura 4.** Delineamento do Experimento 1. O procedimento é o mesmo para os machos, excluindo as etapas de classificação e checagem do ciclo estral.....31
- Figura 5.** Delineamento do Experimento 2. O procedimento é o mesmo para os machos, excluindo as etapas de classificação e checagem do ciclo estral.....32
- Figura 6.** Delineamento do Experimento 3. O procedimento é o mesmo para os machos, excluindo as etapas de classificação e checagem do ciclo estral.....33
- Figura 7.** *Autolimpeza e Alternância Espontânea entre machos e fêmeas.* Frequência de ocorrência de episódios de autolimpeza (A) e duração total da resposta de autolimpeza (B) durante 20 min em ratos machos e fêmeas. Número de tentativas até a primeira alternância ocorrer (C), porcentagem de alternância entre os braços (D) e latência para entradas nos braços (E) durante o teste de alternância espontânea em ratos machos e fêmeas. Média ± EPM. Teste t de Student ou Mann-Whitney. n = 14 machos e n = 17 fêmeas.....35
- Figura 8.** *Autolimpeza e Alternância Espontânea entre fêmeas em proestro/estro e metaestro/diestro.* Frequência de ocorrência de episódios de autolimpeza (A) e duração total da resposta de autolimpeza (B) durante 20 min em fêmeas em Proestro/Estro (P/E) e Metaestro/Diestro (M/D). Número de tentativas até a primeira alternância ocorrer (C), porcentagem de alternância entre os braços (D) e latência para entradas nos braços (E) durante

o teste de alternância espontânea em fêmeas em P/E e M/D. Média \pm EPM. Teste t de Student ou Mann-Whitney. n = 9 P/E e n = 8 M/D.....37

Figura 9. *Efeitos da mCPP sobre a Autolimpeza e Alternância Espontânea em machos.* Frequência de ocorrência de episódios de autolimpeza (**A**) e duração total da resposta de autolimpeza (**B**) durante os 20 min imediatamente após a administração i.p de salina ou mCPP nas doses de 0,1, 0,5 ou 1,0 mg/kg. Número de tentativas até a primeira alternância ocorrer (**C**), porcentagem de alternância entre os braços (**D**) e latência para entradas nos braços (**E**) durante o teste de alternância espontânea em machos. Média \pm EPM. ANOVA de uma via ou Kruskal-Wallis. n = 12.....39

Figura 10. *Efeitos da mCPP sobre a Autolimpeza e Alternância Espontânea de fêmeas em proestro/estro.* Frequência de ocorrência de episódios de autolimpeza (**A**) e duração total da resposta de autolimpeza (**B**) durante os 20 min imediatamente após a administração i.p. de salina ou mCPP nas doses de 0,1, 0,5 ou 1,0 mg/kg em fêmeas em Proestro/Estro (P/E). Número de tentativas até a primeira alternância ocorrer (**C**), porcentagem de alternância entre os braços (**D**) e latência para entradas nos braços (**E**) durante o teste de alternância espontânea em fêmeas em P/E. Média \pm EPM. ANOVA de uma via ou Kruskal-Wallis seguido por DSCF. *Diferença estatística em relação ao grupo salina ($p < 0,05$). n = 14 Salina e mCPP 0,5; n = 12 mCPP 0,1 e mCPP 1,0.....41

Figura 11. *Efeitos da mCPP sobre a Autolimpeza e Alternância Espontânea de fêmeas em metaestro/diestro.* Frequência de ocorrência de episódios de autolimpeza (**A**) e duração total da resposta de autolimpeza (**B**) durante os 20 min imediatamente após a administração i.p. de salina ou mCPP nas doses de 0,1, 0,5 ou 1,0 mg/kg em fêmeas em Metaestro/Diestro (M/D). Número de tentativas até a primeira alternância ocorrer (**C**), porcentagem de alternância entre os braços (**D**) e latência para entradas nos braços (**E**) durante o teste de alternância espontânea em fêmeas em M/D. Média \pm EPM. Kruskal-Wallis ou ANOVA de uma via seguida por Tukey. *Diferença estatística em relação ao grupo salina ($p < 0,05$). n=12.....43

Figura 12. *Efeitos da administração repetida da mCPP sobre a Autolimpeza e Alternância Espontânea em machos.* Frequência de ocorrência de episódios de autolimpeza (**A**) e duração

total da resposta de autolimpeza (**B**) durante os 20 min imediatamente após a 4ª administração i.p. de salina ou mCPP nas doses de 0,1, 0,5 ou 1,0 mg/kg. Número de tentativas até a primeira alternância ocorrer (**C**), porcentagem de alternância entre os braços (**D**) e latência para entradas nos braços (**E**) durante o teste de alternância espontânea em machos. Média ± EPM. ANOVA de uma via ou Kruskal-Wallis. n = 12.....45

Figura 13. *Efeitos da administração repetida da mCPP sobre a Autolimpeza e Alternância Espontânea de fêmeas em proestro/estro.* Frequência de ocorrência de episódios de autolimpeza (**A**) e duração total da resposta de autolimpeza (**B**) durante os 20 min imediatamente após a 4ª administração i.p. de salina ou mCPP nas doses de 0,1, 0,5 ou 1,0 mg/kg em fêmeas em Proestro/Estro (P/E). Número de tentativas até a primeira alternância ocorrer (**C**), porcentagem de alternância entre os braços (**D**) e latência para entradas nos braços (**E**) durante o teste de alternância espontânea em fêmeas em P/E. Média ± EPM. Kruskal-Wallis ou ANOVA de uma via seguido por Tukey. #Diferença estatística em relação ao grupo mCPP 0,1 (p < 0,05). n = 14 Salina; n = 12 mCPP 0,1, 0,5 e 1,0.....47

Figura 14. *Efeitos da administração repetida da mCPP sobre a Autolimpeza e Alternância Espontânea de fêmeas em metaestro/diestro.* Frequência de ocorrência de episódios de autolimpeza (**A**) e duração total da resposta de autolimpeza (**B**) durante os 20 min imediatamente após a 4ª administração i.p. de salina ou mCPP nas doses de 0,1, 0,5 ou 1,0 mg/kg em fêmeas em Metaestro/Diestro (M/D). Número de tentativas até a primeira alternância ocorrer (**C**), porcentagem de alternância entre os braços (**D**) e latência para entradas nos braços (**E**) durante o teste de alternância espontânea em fêmeas em M/D. Média ± EPM. ANOVA de uma via seguido por Tukey ou Kruskal-Wallis seguido por DSCF. *Diferença estatística em relação ao grupo salina (p < 0,05). #Diferença estatística em relação ao grupo mCPP 0,1 (p < 0,05). n = 13 Salina, mCPP 0,1 e 1,0; n = 14 mCPP 0,5.....49

LISTA DE SIGLAS

DSM-IV: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – Quarta Edição;

DSM-5: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – Quinta Edição;

ISRS: Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina;

I.P.: Intraperitoneal;

M/D: Metaestro/Diestro;

P/E: Proestro/Estro;

mCPP: Meta-clorofenilpiperazina;

TOC: Transtorno Obsessivo-Compulsivo;

TDAH: Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Transtorno Obsessivo-Compulsivo.....	15
1.2. Mecanismos serotoninérgicos e a meta-clorofenilpiperazina.....	16
1.3. Modelos animais para o estudo do TOC.....	18
1.4. Diferenças sexuais no TOC e nos modelos animais para TOC.....	22
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Animais.....	27
3.2. Determinação da fase do ciclo estral.....	27
3.3. Drogas.....	28
3.4. Equipamentos e procedimentos.....	29
3.5. Delineamento experimental.....	31
3.6. Análise estatística.....	33
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Experimento 1 – Autolimpeza e alternância espontânea em ratos machos e fêmeas em Proestro/Estro e Metaestro/Diestro.....	34
4.2. Experimento 2 – Efeitos da administração aguda de mCPP sobre a autolimpeza e alternância espontânea.....	38
4.3. Experimento 3 – Efeitos da administração repetida de mCPP sobre a autolimpeza e alternância espontânea.....	44

5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÕES.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no uso animal da UFSCar.....	67

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transtorno Obsessivo-Compulsivo

O Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC) é caracterizado, no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), pela presença de obsessões e/ou compulsões, considerando obsessões os pensamentos, imagens ou impulsos indesejados, mas recorrentes e persistentes; e compulsões como atos mentais ou comportamentos repetitivos que o indivíduo sente necessidade de executar como resposta a alguma obsessão (American Psychiatric Association, 2014). Em outras palavras, são comportamentos e pensamentos recorrentes, que impedem que o indivíduo tenha qualidade de vida, tomando grande parte do seu tempo, impedindo a realização de outras atividades e gerando sofrimento significativo para quem tem o transtorno.

Os sintomas geralmente são graves e em 10 % dos casos, incapacitantes (Cordioli, 2014). Em uma pesquisa realizada pela Organização Mundial da Saúde, o TOC estava entre as 10 principais causas de incapacitação no mundo em 2004, na categoria de transtornos neuropsiquiátricos, que juntos são responsáveis por 22 % de incapacitação e prejuízo da qualidade de vida em mulheres entre 15 e 49 anos ao redor do mundo (WHO, 2008). O TOC é, ainda, um importante fator de risco para separações e divórcios, em razão dos constantes conflitos que os sintomas provocam na família (Lensi et al., 1996). Estima-se que o transtorno acometa entre 1,2 e 2,3 % das pessoas ao longo da vida (Ruscio et al., 2010; Mathes et al., 2019).

Estudos utilizando neuroimagem possibilitaram a visualização do cérebro em funcionamento, permitindo comparar o metabolismo cerebral de indivíduos com e sem TOC e identificar as regiões relacionadas ao transtorno (Menzies et al., 2008; Cordioli, 2014). A desregulação do circuito córtico-estriado-tálamo-cortical foi uma das primeiras propostas de

alteração neuroanatômica no TOC, sendo investigada por diversos estudos, nos quais encontraram alterações principalmente nas regiões orbitofrontal e estriatal (Menzies et al., 2008; Milad e Rauch, 2012; Stein et al., 2019). Adicionalmente, pesquisas sugerem que anormalidades no funcionamento da amígdala também possam ser relevantes para o TOC, por causa de sua forte integração com os sistemas córtico-estriado-tálamo-corticais e seu papel bem estabelecido na regulação da ansiedade, memória do medo e flexibilidade comportamental, que se encontram comprometidas no TOC (Milad e Rauch, 2012; Milad et al., 2013; Stein et al., 2019; Zhang et al., 2020).

Em uma pesquisa realizada com adultos americanos, 90 % dos portadores de TOC afirmou apresentar comorbidades com outros transtornos. Os transtornos de ansiedades foram os mais comumente relatados, seguidos por transtornos de humor, de controle e de uso de substâncias (Ruscio et al., 2010). Até o DSM-IV, o TOC estava categorizado juntamente com os Transtornos de Ansiedade (APA, 2000). Porém, no DSM-5 foi criada uma classificação que tem o TOC como diagnóstico principal do novo grupo Transtorno Obsessivo-Compulsivo e Transtornos Relacionados (APA, 2014). A separação do TOC dos Transtornos de Ansiedade sugere que a ansiedade não seja característica fundamental ou não exerça influência decisiva sobre o TOC (Diniz et al., 2012), embora seja raro encontrar pacientes com TOC sem comorbidades (Ruscio et al., 2010; Fineberg et al., 2011). As pesquisas sobre as bases biológicas do TOC, até então escassas, tornaram-se ainda mais necessárias para que se tenha mais conhecimento sobre suas características e fisiopatologia, entendendo assim melhor o transtorno e sua relação com a ansiedade.

1.2. Mecanismos serotoninérgicos e a meta-clorofenilpiperazina

Por muito tempo, o tratamento farmacológico do TOC feito com antidepressivos tricíclicos, antagonistas de receptores dopaminérgicos ou moduladores dos receptores

GABAérgicos, era pouco utilizado pois não apresentava resultados eficazes (Kreiss et al., 2013). Na medida em que a utilização de antidepressivos que atuam mais especificamente na neurotransmissão serotoninérgica começou a fazer mais efeito, vários estudos clínicos e pré-clínicos demonstraram o papel do sistema serotoninérgico na mediação do TOC (Fineberg e Gale, 2005; Korff e Harvey, 2006; Stein, 2002; Zohar e Insel, 1987; Kreiss et al., 2013; Nardo et al., 2014; Stewart et al., 1989). Com a utilização de inibidores seletivos de recepção de serotonina (ISRS) como tratamento farmacológico, os resultados começaram a aparecer e a taxa de melhora significativa subiu para cerca de 60% dos pacientes; entretanto, estes pacientes raramente ficam completamente sem sintomas (Kreiss et al., 2013; Marques, 2001; Shavitt et al., 2001). Ainda, estudos de neuroimagem funcional realizados em pacientes com TOC, durante a provocação de sintomas, demonstraram atividade cerebral elevada no córtex cingulado anterior e orbitofrontal, estriado e tálamo, que diminui após o tratamento bem-sucedido com os ISRS (Saxena e Rauch, 2000).

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é um neurotransmissor do tipo amina, derivado do aminoácido triptofano, amplamente encontrado no mesencéfalo. Os receptores 5-HT são divididos em 7 classes (5-HT₁ a 5-HT₇) com pelo menos 14 subtipos (Rang et al., 2012; Stahl, 2014). As principais áreas de projeções serotoninérgicas que podem estar relacionadas ao TOC são o córtex, hipocampo, sistema límbico e hipotálamo (Rang et al., 2012; Milad e Rauch, 2012). A meta-clorofenilpiperazina (mCPP) é uma substância cujo papel como agonista não seletivo de receptores serotoninérgicos está bem estabelecido na literatura, tendo sido um dos primeiros compostos amplamente utilizado em pesquisas científicas (Korff & Harvey, 2006; Stein, 2002; Zohar & Insel, 1987; Lombardi, 2012). Seus efeitos são aparentemente mediados pelos receptores 5-HT_{2c}, que parecem envolvidos na regulação das funções serotoninérgicas e dopaminérgicas em diversas regiões encefálicas (Graf et al, 2003; Papakosta et al., 2013; Reimer et al., 2018). Com a administração local de mCPP no núcleo accumbens

em ratos Sprague-Dawley machos acordados, foi observado, por meio de microdiálise, um aumento da concentração de 5-HT e dopamina nessa estrutura (Baumann et al., 2001).

Explorando a hipótese do envolvimento da neurotransmissão serotoninérgica no TOC, foi demonstrado em estudo randomizado, duplo-cego, placebo-controlado, que a mCPP é capaz de exacerbar de forma transitória os sintomas dos pacientes com TOC em comparação aos indivíduos sem esse diagnóstico (Zahar et al, 1987). Além disso, a administração de mCPP também exacerbou os sintomas e induziu alterações nas respostas neuroendócrinas em pacientes com TOC não tratados (Stein, 2002; Zohar & Insel, 1987). Em outro estudo, observou-se que pacientes tratados cronicamente com fluoxetina (um dos ISRS mais prescritos), além de apresentarem melhora nos sintomas do TOC, não mais tiveram esses sintomas exacerbados em resposta a administração de mCPP (Hollander et al, 1991).

Assim, disfunções nas vias serotoninérgicas têm sido relacionadas à expressão dos sintomas do TOC, tendo os ISRS se estabelecido como classe de medicamentos ainda considerados como um dos tratamentos de primeira linha para o transtorno, uma vez que a redução dos sintomas de TOC continua sendo comprovada tanto na prática clínica como em inúmeras pesquisas (Hollander et al., 1991; Saxena e Rauch, 2000; Cordioli, 2014). Todavia, ainda é necessário investigar a seletividade dos efeitos dos ISRS para pacientes com TOC, já que na maioria das vezes a resposta terapêutica é parcial, levantando a hipótese de que a neurotransmissão serotoninérgica seja importante apenas para parte dos sintomas (Marques, 2001; Shavitt et al., 2001; Kreiss et al., 2013; Cordioli, 2014). Devido à diversidade das manifestações clínicas e a evolução dos sintomas ao longo da vida, que podem se modificar, desaparecerem ou surgirem novos sintomas, a hipótese serotoninérgica carece de maiores investigações (Cordioli, 2014).

1.3 Modelos animais para o estudo do TOC

Uma outra questão importante no estudo do TOC é que ainda não existem modelos animais ideais para esse transtorno, que se enquadrem simultaneamente nos critérios de validação de face, constructo e previsibilidade. De fato, devido à natureza cognitiva das obsessões, estas não podem ser diretamente acessadas nos animais. Já os comportamentos do tipo compulsivo podem ser analisados e são comumente utilizados em modelos animais para o TOC. Como as manifestações motoras estão intimamente conectadas com as manifestações cognitivas no TOC, é válido observá-las como forma de tentar entender melhor o transtorno (Fineberg et al., 2011). Para modelar completamente o TOC, seria necessário cobrir aspectos comportamentais, neuroquímicos e de anormalidades estruturais cerebrais específicas, análogas ao transtorno (Stein, 2000; Phillips, 2002; Korff & Harvey, 2006). Não é possível, entretanto, estabelecer um modelo animal que simule todas as características de um transtorno mental. Assim, é mais adequado selecionar modelos que avaliem características específicas do transtorno separadamente, usando diversos modelos animais para explorar diferentes aspectos do TOC (Graf et al., 2003; Kreiss et al., 2013; Joel, 2006; Stewart et al., 1989).

Nesse sentido, a autolimpeza e a alternância espontânea são exemplos de comportamentos que podem ser observados em roedores e extrapolados a comportamentos vistos em pacientes com TOC (Joel, 2006; Korff e Harvey, 2006; Reimer et al., 2015). O comportamento de autolimpeza é composto por uma sequência de movimentos coordenados que incluem lambar, coçar e limpar, voltados para a limpeza do pelo da cabeça e do corpo do animal (Graf et al., 2003; Kalueff et al., 2007; Reimer et al., 2015; Sachs, 1988). Esse comportamento, com claras funções adaptativas em determinadas situações, é considerado deslocado em alguns contextos, pois pode aparecer, por exemplo, quando o animal é colocado em situações atípicas ou estressantes, como o labirinto em cruz elevado (Anseloni e Brandão, 1997; Sachs, 1988). Esse comportamento quando realizado excessivamente pode ser comparado aos comportamentos obsessivos e compulsivos relacionados a

contaminação/limpeza em pacientes com TOC (Diniz et al, 2012; Reimer et al., 2015). No estudo de Estanislau e colaboradores (2019), o comportamento de autolimpeza espontâneo em ratos foi registrado em testes comportamentais e seus resultados sugerem uma relação entre a realização da autolimpeza e o aumento da persistência desse comportamento durante ou após uma situação estressante. Ainda, a mCPP foi capaz de exacerbar o comportamento de autolimpeza em ratos machos (Graf et al., 2003; Georgiadou et al., 2012), e teve seu aumento revertido pelo SB-242084, um antagonista de receptores do tipo 5-HT_{2c} (Graf et al., 2003).

Já a alternância espacial refere-se à tendência natural do rato em explorar novos lugares sequencialmente e sucessivamente, ou seja, se apresentado a dois caminhos, o animal vai escolher um e depois vai visitar o outro (Joel, 2006; Korff e Harvey, 2006). A diminuição da alternância espacial pode ser comparada à indecisão e à perseveração observadas nos pacientes com TOC (Joel, 2006; Korff e Harvey, 2006; Yadin et al., 1991). Em um estudo realizado em 1991, Yadin e colaboradores colocaram ratos privados de alimento em um labirinto em T que continha leite achocolatado em cada braço, e estudaram o padrão de escolha desses animais pelos diferentes braços do labirinto. Traçada a linha de base, na qual os animais apresentaram alternância nas visitas, foram administrados um agonista não-seletivo serotoninérgico, a 5-MeODMT, ou um agonista seletivo 5-HT_{1A}, o 8-OH-DPAT. Ambas as drogas aumentaram significativamente as escolhas repetidas no labirinto em T, ou seja, diminuíram a alternância, apontando uma relação entre comportamentos tipo-compulsivos e a serotonina. Alguns estudos também foram capazes de induzir a perseveração em ratos no teste de alternância espacial reforçada utilizando a mCPP (Tsaltas et al., 2005; Kontis et al., 2008; Papakosta et al., 2013), indicando que essa persistência pode ser modulada por receptores do tipo 5-HT_{2c} (Papakosta et al., 2013).

O animal não parece, entretanto, precisar estar em privação para apresentar alternância espacial (Deacon e Rawlins, 2006). Em estudo prévio de nosso grupo de pesquisa (Taguchi,

2018), mostramos que ratos não privados de alimento ou água, quando colocados no labirinto em “T” elevado durante a linha de base, fase em que o animal ainda não havia sido manipulado farmacologicamente, obtiveram em média 57 % de alternância, valor dentro do esperado para alternância espontânea sem privação/recompensa (Deacon e Rawlins, 2006). Ou seja, mesmo sem nenhum estímulo diferencial no aparato, o rato tendeu a visitar ambos os braços do labirinto em “T” elevado e alternar essas visitas em mais da metade das tentativas. Ainda nesse estudo, observamos uma tendência clara de diminuição da porcentagem de alternância espontânea quando administrada a mCPP, principalmente para as doses de 0,1 e 0,5 mg/kg no período de teste, tanto em relação à linha de base quanto em relação ao grupo salina no próprio teste (Taguchi, 2018). Imaginamos que tal efeito poderia vir a se tornar mais robusto com a execução do teste sem exposição prévia dos animais ao aparato, uma vez que demonstramos não ser necessário treinamento prévio no labirinto e observamos aumento da latência para entrada nos braços no teste em relação à linha de base (Taguchi, 2018), o que poderia estar influenciando a tomada de decisão.

De maneira geral, a literatura considera a utilização da mCPP na indução de comportamentos repetitivos/persistentes como um modelo animal para o TOC promissor, apesar de apontar resultados diferentes dependendo da dosagem, teste, espécies e linhagens utilizados (Stewart et al., 1989; Joel, 2006; Korff e Harvey, 2006; Kreiss et al., 2013; Nardo et al., 2014; Reimer et al., 2018). Nesse sentido, pesquisas nesse caminho precisam continuar a serem feitas, em busca da dose efetiva da mCPP a ser utilizada, da padronização da metodologia empregada e do estabelecimento das relações entre os comportamentos tipo-compulsivos induzidos pela mCPP e os comportamentos tipicamente avaliados em testes de ansiedade, por exemplo. Por existirem muitas inconsistências nos estudos, há necessidade de explorar os comportamentos avaliados e os métodos utilizados a fim de facilitar a replicação dos estudos e ser menos custoso para o animal. Adicionalmente, a grande maioria das pesquisas focam seus

estudos apenas em machos, generalizando seus resultados para as fêmeas, o que pode ser prejudicial para o entendimento completo do transtorno.

Dada a importância da investigação das alterações biológicas envolvidas nos transtornos mentais e as diferenças encontradas nos protocolos dos modelos animais para o TOC, é importante que pesquisas nessa área continuem sendo realizadas. Com o desenvolvimento de modelos animais cada vez mais padronizados, e que levem em consideração diferenças entre sexos, será possível compreender mais sobre a fisiopatologia do TOC e contribuir para intervenções terapêuticas cada vez mais eficazes para esse transtorno.

1.4. Diferenças sexuais no TOC e nos modelos animais para TOC

A manifestação do TOC em homens e mulheres pode ocorrer de diversas formas, como medos de contaminação/lavagens, dúvidas/checagens, ordem/simetria, obsessões de conteúdo inaceitável, compulsão por acumulação ou colecionismo (Cordioli, 2014). O diagnóstico de TOC é um pouco mais comum em meninos durante a infância, com sintomas emergindo mais cedo e frequentemente associados a tiques/transtorno de Tourette ou transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (TDAH), enquanto as meninas apresentam maiores riscos de desenvolver o transtorno na adolescência, durante ou após a menarca, e vida adulta, com a maioria dos casos permanecendo ao longo da vida (Kinrys e Wygant, 2005; Ruscio et al., 2010; Cordioli, 2014; Mathes et al., 2019).

Torresan e colaboradores (2013) observaram que, para homens, além de apresentarem mais tiques, os sintomas de dimensão sexual/religiosa foram mais comuns e graves, enquanto as mulheres eram mais propensas a apresentar sintomas de agressividade e contaminação/limpeza. Além disso, mulheres têm maiores riscos de desenvolver o transtorno durante ou após a gravidez (Mathes et al., 2019). Ainda, segundo uma meta-análise realizada para estimar a prevalência do TOC em mulheres grávidas ou em pós-parto, foi evidenciado que

elas têm maiores chances de experienciar o TOC quando comparadas à população geral, com apresentação de sintomas relacionados a contaminação e/ou obsessões agressivas, geralmente relacionadas ao bebê (Russell et al., 2013). Essas pesquisas indicam que os hormônios ovarianos poderiam estar envolvidos no desenvolvimento do transtorno e precisam ser melhor investigados (Kinrys e Wygant, 2005; Russell et al., 2013; Mathes et al., 2019).

Estudos experimentais com animais também indicam diferenças comportamentais dependendo do sexo dos roedores (Gouveia et al., 2004; Ulloa et al., 2004; Reimer et al., 2018). Para esses animais, a produção cíclica de hormônios sexuais é chamada de ciclo estral, dura em média quatro ou cinco dias e é caracterizado por quatro fases, proestro, estro, metaestro e diestro, as quais podem ser determinadas pela proporção dos três tipos celulares: células epiteliais, células cornificadas e leucócitos (Marcondes et al., 2002). O início do ciclo começa pelo proestro, fase na qual as células epiteliais nucleadas estão presentes em grande quantidade e a concentração dos hormônios sexuais está alta. A ovulação ocorre na fase de estro, marcada pela predominância das células cornificadas, não nucleadas, e pelo pico de progesterona. A fase seguinte, metaestro, é caracterizada pela proporção equivalente de leucócitos, células cornificadas e células epiteliais nucleadas, e pelos baixos níveis de estrógeno e um pequeno aumento da concentração de progesterona. Já a fase de diestro é caracterizada predominantemente por leucócitos, sendo o período em que ocorre a queda abrupta dos níveis de progesterona, que marcam o fim do ciclo (Butcher et al., 1974; Lovick et al., 2014).

Em um estudo realizado no labirinto em T, ratas pré-adolescentes apresentaram taxas mais baixas de alternância espontânea e permaneceram repetindo suas escolhas por mais tempo que os machos, entretanto, apenas os machos tratados com 8-OH-DPAT apresentaram perseveração na alternância espontânea (Ulloa et al., 2004). Em outro estudo, Olvera-Hernández e colaboradores (2013) observaram que alterações das concentrações de estradiol

durante o ciclo estral interferiram no comportamento persistente das ratas induzido pelo agonista serotoninérgico 8-OH-DPAT.

Em 2018, Reimer e colaboradores mostraram que tanto ratos machos quanto fêmeas apresentaram índices mais altos de autolimpeza quando receberam administração de mCPP durante o pré-teste e nos treinamentos de extinção do medo condicionado ao contexto e ao som. A atividade motora também foi comprometida com a dosagem mais alta para ambos os sexos, diminuindo a locomoção, mobilidade e o número de entradas no centro da arena quando avaliados no teste de campo aberto. Outro dado interessante desse estudo foi que apenas as fêmeas tiveram a retenção da extinção do medo prejudicadas pela mCPP, principalmente as fêmeas submetidas ao treinamento de extinção do medo nas fases de metaestro/diestro (Reimer et al., 2018). Assim como nessas fêmeas, esse prejuízo na retenção da extinção também pôde ser observado em pacientes com TOC (Milad et al., 2009, 2013).

Desta forma, investigar as diferenças entre os sexos se mostra interessante, uma vez que existem indícios de que as diferenças hormonais influenciem o surgimento do TOC e sua forma e intensidade de manifestação (Gouveia et al., 2004; Ulloa et al., 2004; Kinrys e Wygant, 2005; Mathes et al., 2019).

Assim, o presente estudo visa contribuir na busca por um melhor modelo animal que possa ser utilizado para o estudo do TOC. Em específico, temos por objetivos avaliar a expressão basal dos comportamentos de autolimpeza e alternância espontânea em ratos machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral e, em seguida, avaliar os efeitos da administração aguda e repetida da mCPP na indução de comportamento de autolimpeza nos animais, observando potenciais diferenças sexuais e hormonais, e explorar sua relação com o comportamento de alternância espontânea no labirinto em T, sem que o animal precise ficar em privação ou tenha que treinar no aparato antes de ser exposto ao teste. Além disso, o presente

estudo pode contribuir para o melhor entendimento acerca do envolvimento dos receptores 5-HT_{2c} na geração de comportamentos que podem ser associados a sintomas do TOC. Temos como hipóteses que, inicialmente, os comportamentos basais de autolimpeza e alternância espontânea não se diferenciariam em relação ao sexo do animal, mas que tanto a administração aguda quanto repetida da mCPP aumentaria o comportamento de autolimpeza e esse estaria associado a diminuição da alternância espontânea para ambos os sexos; porém, com a administração repetida, esperávamos efeitos mais robustos. Além disso, esperávamos que as fêmeas na fase de metaestro/diestro (fase de baixa quantidade de hormônios gonadais) apresentassem menores índices de alternância após tratamento com mCPP, tanto em comparação com as fêmeas em proestro/estro quanto quando comparadas com os machos, o que indicaria que este seria um modelo animal mais promissor para o estudo do TOC.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo é avançar a busca por um melhor modelo animal para o estudo do TOC utilizando a mCPP para indução de comportamentos tipo-compulsivos em ratos e explorando potenciais efeitos diferenciais em machos e fêmeas.

2.2. Objetivos específicos

1) avaliar a expressão dos comportamentos de autolimpeza e de alternância espontânea basais em ratos, considerando a influência do sexo e das fases do ciclo estral em fêmeas;

2) avaliar os efeitos da administração aguda de mCPP sobre a expressão dos comportamentos de autolimpeza e de alternância espontânea em ratos, considerando a influência do sexo e das fases do ciclo estral em fêmeas;

3) avaliar os efeitos da administração repetida de mCPP sobre a expressão dos comportamentos de autolimpeza e alternância espontânea, considerando a influência do sexo e das fases do ciclo estral em fêmeas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Ao todo, foram utilizados 110 ratos *Wistar* machos e 220 fêmeas, com aproximadamente 75 dias de vida e pesando em média 350 g e 270 g, respectivamente, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos, *campus* São Carlos. Para o experimento 1 foram utilizados 14 machos e 17 fêmeas. Para o experimento 2, foram utilizados 48 machos e 100 fêmeas. Para o experimento 3, foram utilizados 48 machos e 103 fêmeas. Os animais ficaram no biotério setorial do Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA) do Departamento de Psicologia da Universidade Federal de São Carlos, alojados em grupos de 5 ratos, em caixas de polipropileno (40 × 33 × 25 cm) forradas com maravalha, com livre acesso a água e comida. A iluminação foi artificial, com ciclo claro/escuro 12 × 12 h, iniciando o período claro às 7:00 h. Todos os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo. Os animais foram transportados individualmente até a sala experimental em caixas de polipropileno (40 × 33 × 17 cm) forradas com maravalha. Todos os experimentos foram realizados seguindo os princípios éticos da experimentação animal, com protocolos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA- UFSCar nº 6139080419, ANEXO A).

3.2. Determinação da fase do ciclo estral

Antes do início dos experimentos com as fêmeas, por no mínimo 2 semanas, foi realizado esfregaço vaginal diariamente para acompanhamento do ciclo estral, sempre entre 12h00 e 14h00. Para recolher as amostras de tecido epitelial, uma haste esterilizada e umedecida em solução fisiológica foi utilizada. As amostras foram então depositadas em lâminas de microscopia. Foi utilizado o corante do tipo Panótico Rápido (Laborclin Ltda., Brasil) e, após

a coloração e secagem, a lâmina foi submetida à microscopia óptica com aumento de 40 ou 100 × para avaliação celular. As fases do ciclo foram verificadas e classificadas com base na proporção de células epiteliais, células cornificadas e leucócitos observados no esfregaço (Maeng et al., 2015). As ratas foram divididas em dois grupos de acordo com a fases do ciclo estral: em proestro/estro, fases iniciais do ciclo, marcadas pela presença de células nucleadas e maiores concentrações de hormônios sexuais, e metaestro/diestro, fases finais do ciclo em que os leucócitos são encontrados em grande quantidade, que posteriormente se desfazem, e há uma queda abrupta dos níveis de progesterona (Fig. 1) (Becker et al., 2005; Maeng et al., 2015; McLean, 2012). Apenas as fêmeas que completaram pelo menos dois ciclos regulares foram consideradas aptas a realizarem os testes comportamentais.

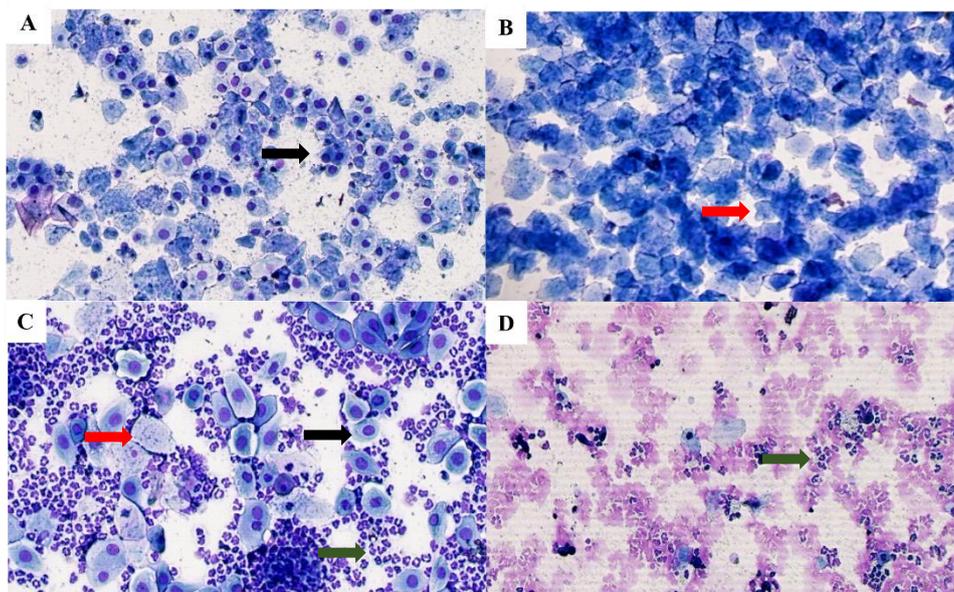


Figura 1. Fotomicrografias ilustrativas da avaliação citológica característica das fases do ciclo estral de ratas. Aumento de 100x. (A) Proestro, (B) Estro, (C) Metaestro e (D) Diestro. As setas em preto, vermelho e verde indicam células nucleadas, células cornificadas e leucócitos, respectivamente.

3.3. Drogas

A droga utilizada foi o agonista serotoninérgico meta-clorofenilpiperazina (mCPP), nas doses 0,1; 0,5 e 1,0 mg/kg. A mCPP foi administrada intraperitonealmente em volume constante de 1,0 ml/kg. Foi administrado o volume equivalente de salina fisiológica (0,9 %) para os

grupos controle. A administração aguda da mCPP ocorreu imediatamente antes da avaliação da resposta de autolimpeza e, conseqüentemente, 20 min antes do teste de alternância espontânea. A administração repetida de mCPP ocorreu por 4 dias consecutivos, sendo a última administração imediatamente antes da avaliação da resposta de autolimpeza e, conseqüentemente, 20 min antes do teste de alternância espontânea. As doses da droga foram escolhidas com base em estudos anteriores (Graf et al., 2003; Taguchi, 2018; Tsaltas, 2005; Reimer et al., 2018).

3.4. Equipamentos e procedimentos

Caixa de observação: Para avaliar por 20 min a emissão do comportamento de autolimpeza, observado imediatamente após a administração de droga ou salina, o animal foi colocado em uma caixa medindo $30 \times 30 \times 30$ cm (Fig. 2), sendo que o teto, a porta e a parede posterior eram de acrílico transparente, as duas paredes laterais de alumínio e o assoalho constituído por um suporte de polipropileno. Foram avaliadas a frequência e duração da execução do comportamento de autolimpeza, que inclui, lambar, coçar e limpar toda região do corpo e cabeça do animal.



Figura 2. Fotografia da caixa experimental utilizada para observação da autolimpeza.

Labirinto em T: Para o teste de alternância espontânea, foi utilizado um labirinto em T (Fig. 3). O aparato é composto por dois braços de acrílico com as mesmas dimensões (10 cm de largura e 50 cm de comprimento), com paredes laterais de acrílico com 40 cm de altura e portas móveis de acrílico que permitem isolar os braços. O terceiro braço (10 cm de largura e 35 cm de comprimento) está disposto entre os outros dois braços perpendicularmente, formando um “T”. Os animais foram expostos ao labirinto em T após completarem 20 min de exposição à caixa de observação da autolimpeza. O animal foi colocado na porção final do braço perpendicular do labirinto. Quando o animal entrou em um dos braços com o corpo inteiro, a porta móvel foi colocada e decorridos 30 s, o animal foi retirado do aparato para a limpeza com solução alcoólica (20 %) e ácido acético (5%), para evitar a perda do interesse em explorar o labirinto (Deacon e Rawlins, 2006). O período máximo de permanência do animal em cada tentativa foi de 300 s. Quando o animal não atingiu o braço ou ficou entre os dois braços por quatro vezes seguidas, foi descartado do experimento. Foram avaliados o braço escolhido e a latência para a entrada em um total de 7 tentativas consecutivas (Yadin et al., 1991; Taguchi, 2018).



Figura 3. Imagem do labirinto em T utilizado para realização do teste de alternância espontânea.

3.5. Delineamento experimental

Experimento 1 – Autolimpeza e alternância espontânea em ratos machos e fêmeas em Proestro/Estro e Metaestro/Diestro (Fig. 4)

Primeiramente, os animais ficaram no biotério setorial do LPA por pelo menos 3 dias para habituação. Na sequência, foi realizado diariamente o esfregaço vaginal nas fêmeas para acompanhamento do ciclo por pelo menos duas semanas, sendo verificada a fase do ciclo no dia do experimento. O animal foi colocado na caixa de observação para verificação do comportamento de autolimpeza por 20 min. Em seguida, foram expostos sete vezes ao labirinto em T para realização do teste de alternância espontânea. Ao final do experimento foi realizada a confirmação da fase do ciclo nas fêmeas. Para os machos, os procedimentos foram os mesmos, com exceção daqueles relativos à checagem do ciclo.

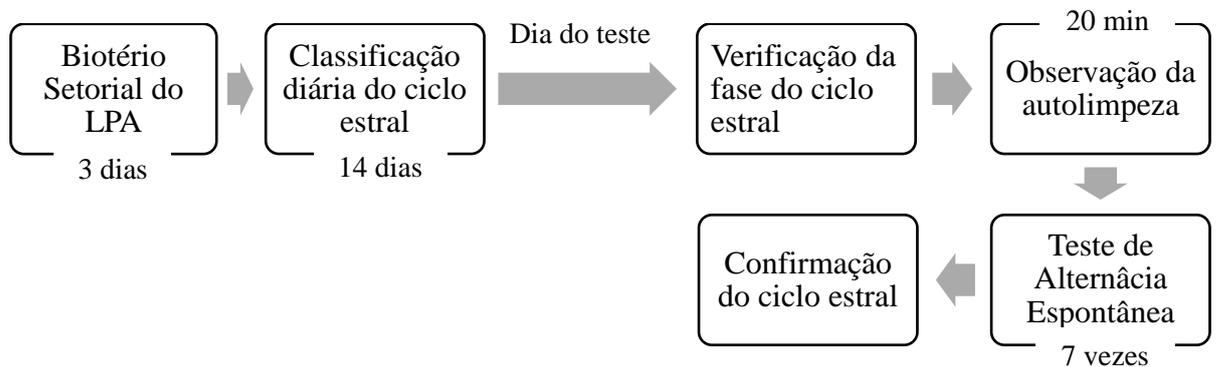


Figura 4. Delineamento do Experimento 1. O procedimento é o mesmo para os machos, excluindo as etapas de classificação e checagem do ciclo estral.

Experimento 2 – Efeitos da administração aguda de mCPP sobre a autolimpeza e alternância espontânea (Fig. 5)

Primeiramente, os animais ficaram no biotério setorial do LPA por pelo menos 3 dias para habituação. Na sequência, foi realizado diariamente o esfregaço vaginal nas fêmeas para acompanhamento do ciclo durante aproximadamente duas semanas. No dia do experimento, foi realizada a verificação da fase do ciclo nas fêmeas e cada animal recebeu uma injeção i.p. de

salina ou mCPP nas diferentes doses, formando os seguintes grupos: salina, mCPP 0,1 mg/kg, mCPP 0,5 mg/kg e mCPP 1,0 mg/kg. Em seguida o animal foi colocado na caixa de observação para verificação do comportamento de autolimpeza por 20 min. Os animais foram, na sequência, expostos sete vezes ao labirinto em T para realização do teste de alternância espontânea. Ao final do experimento foi realizada a confirmação da fase do ciclo nas fêmeas. Para os machos, os procedimentos foram os mesmos, com exceção daqueles relativos à checagem do ciclo.

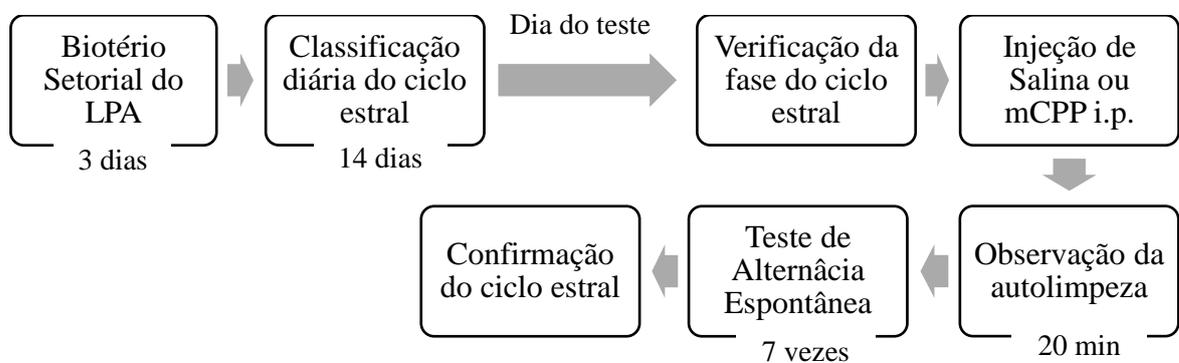


Figura 5. Delineamento do Experimento 2. O procedimento é o mesmo para os machos, excluindo as etapas de classificação e checagem do ciclo estral.

Experimento 3 – Efeitos da administração repetida de mCPP sobre a autolimpeza e alternância espontânea (Fig. 6)

Primeiramente, os animais ficaram no biotério setorial do LPA por pelo menos 3 dias para habituação. Foi realizado diariamente o esfregaço vaginal nas fêmeas para acompanhamento do ciclo durante aproximadamente duas semanas. Na sequência, durante 4 dias consecutivos, foi administrado i.p. salina ou mCPP nas diversas doses, formando os seguintes grupos: salina, mCPP 0,1 mg/kg, mCPP 0,5 mg/kg e mCPP 1,0 mg/kg. No quarto dia foi realizado o experimento. Primeiramente foi realizada a verificação da fase do ciclo nas fêmeas e cada animal foi colocado na caixa de observação para verificação do comportamento

de autolimpeza por 20 min. Em seguida, os animais foram expostos sete vezes ao labirinto em T para realização do teste de alternância espontânea. Ao final do experimento foi realizada a confirmação da fase do ciclo nas fêmeas. Para os machos, os procedimentos foram os mesmos, com exceção daqueles relativos à checagem do ciclo.

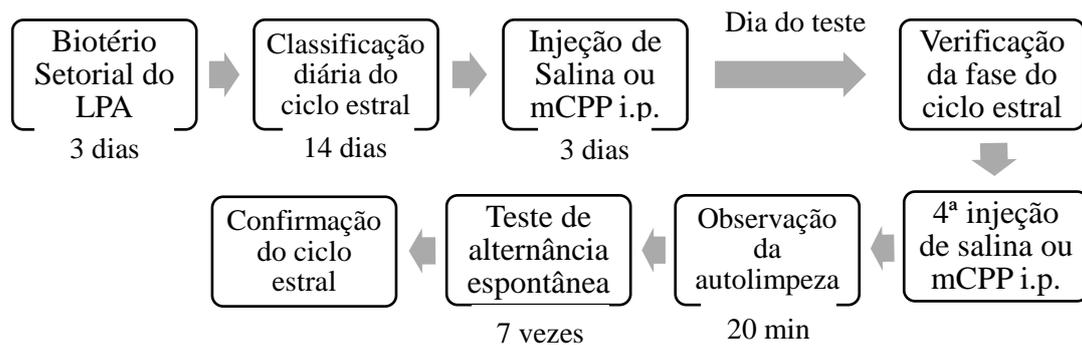


Figura 6. Delineamento do Experimento 3. O procedimento é o mesmo para os machos, excluindo as etapas de classificação e checagem do ciclo estral.

3.6. Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm EPM. Inicialmente foram realizados testes de normalidade Shapiro-Wilk. Nos casos de distribuição normal, foi realizado o teste de igualdade de variâncias Levene e, a depender do resultado, foram utilizados testes t de Student ou Análises de Variância (ANOVAs) de uma via, ambos com ou sem correção de Welch, conforme apropriado. Para a ANOVA, no caso de significância estatística, a análise *post hoc* com o teste de Tukey foi utilizada. Nos casos em que os dados não seguem distribuição normal, foram utilizadas análises não paramétricas com os testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, conforme apropriado. Para o teste de Kruskal-Wallis, no caso de significância estatística, a análise *post hoc* com o teste Dwass-Steel-Critchlow-Fligner (DSCF) foi utilizada. Os resultados são considerados como significativos para valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1 – Autolimpeza e alternância espontânea em ratos machos e fêmeas em Proestro/Estro e Metaestro/Diestro

Os resultados do experimento 1, referentes à frequência e ao tempo do comportamento de autolimpeza durante 20 minutos, entre ratos machos e fêmeas são mostrados nas figuras 7A e 7B, respectivamente. O teste de Mann-Whitney não mostrou diferença significativa para a frequência de autolimpeza ($U = 86, p > 0,05$). O teste t de Student não apontou diferença para o tempo de autolimpeza ($t_{29} = -0,52, p > 0,05$) entre machos e fêmeas. As figuras 7C, 7D e 7E são referentes às tentativas até a primeira alternância, porcentagem de alternância e latência para entradas, respectivamente, no teste de alternância espontânea entre machos e fêmeas. Os testes de Mann-Whitney não mostraram diferenças significativas para as tentativas até a primeira alternância ($U = 106, p > 0,05$), porcentagem de alternância espontânea ($U = 118,5, p > 0,05$) ou latência para entradas ($U = 93,5, p > 0,05$) entre machos e fêmeas.

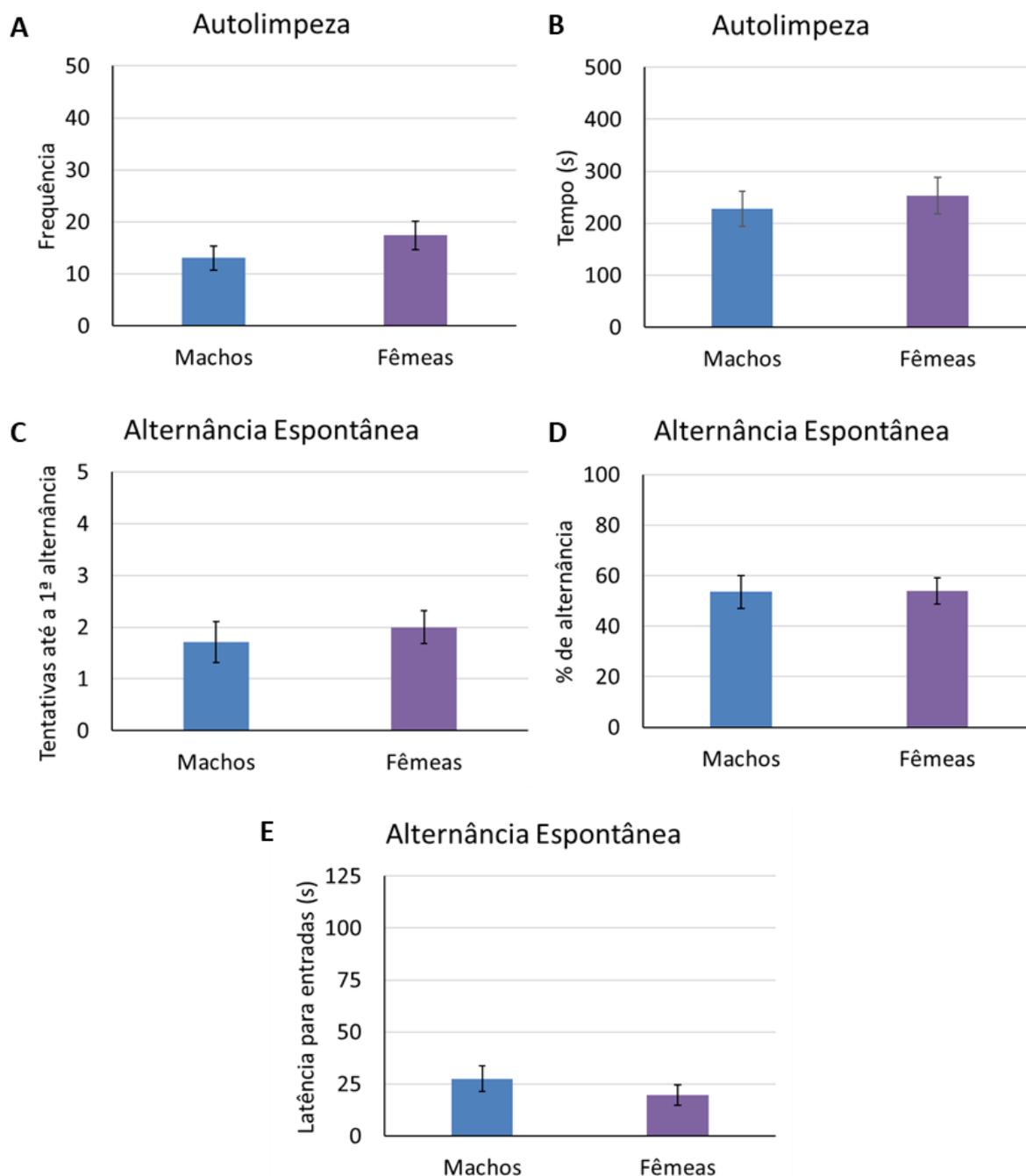


Figura 7. *Autolimpieza e Alternância Espontânea entre machos e fêmeas.* Frequência de ocorrência de episódios de autolimpieza (A) e duração total da resposta de autolimpieza (B) durante 20 min em ratos machos e fêmeas. Número de tentativas até a primeira alternância ocorrer (C), porcentagem de alternância entre os braços (D) e latência para entradas nos braços (E) durante o teste de alternância espontânea em ratos machos e fêmeas. Média \pm EPM. Teste t de Student ou Mann-Whitney. n = 14 machos e n = 17 fêmeas.

As figuras 8A e 8B são referentes à frequência e ao tempo do comportamento de autolimpeza durante 20 minutos entre ratas nas fases de Proestro/Estro (P/E) e Metaestro/Diestro (M/D), respectivamente. Os testes t de Student não mostraram diferenças significativas para o tempo ($t_{15} = -1,08, p > 0,05$) ou para a frequência ($t_{15} = -2,04, p > 0,05$), de autolimpeza entre as fases do ciclo nas fêmeas. As figuras 8C, 8D e 8E são referentes às tentativas até a primeira alternância, porcentagem de alternância e latência para entradas, respectivamente, no teste de alternância espontânea entre as fêmeas em P/E e M/D. Os testes de Mann-Whitney não mostraram diferenças significativas para as tentativas até a primeira alternância ($U = 26, p > 0,05$) ou latência para entradas ($U = 30, p > 0,05$) entre as fêmeas em diferentes fases do ciclo estral. O teste t de Student não apontou diferença para a porcentagem de alternância espontânea ($t_{15} = -1,18, p > 0,05$)

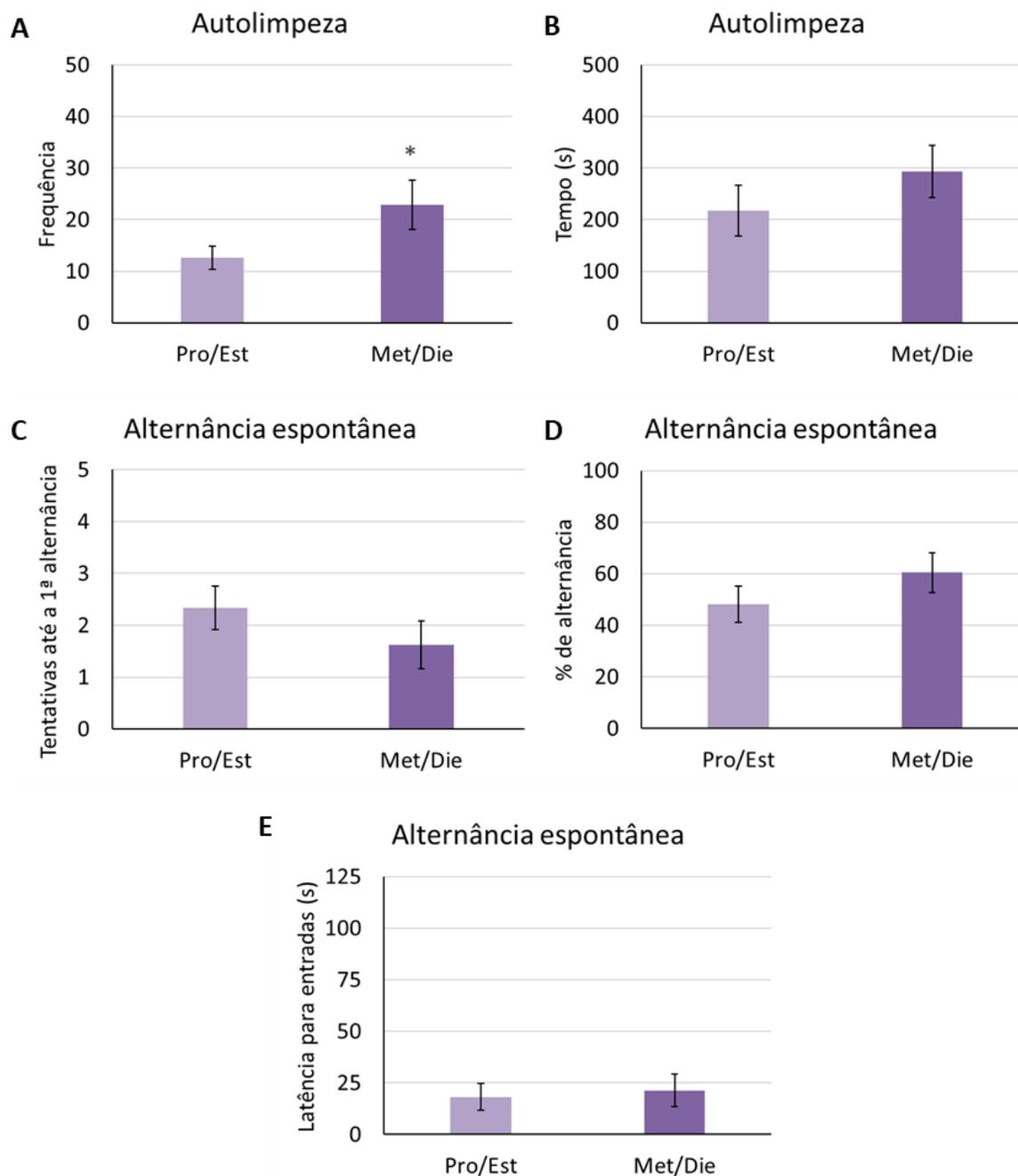


Figura 8. *Autolimpeza e Alternância Espontânea entre fêmeas em proestro/estro e metaestro/diestro.* Frequência de ocorrência de episódios de autolimpeza (A) e duração total da resposta de autolimpeza (B) durante 20 min em fêmeas em Proestro/Estro (Pro/Est) e Metaestro/Diestro (Met/Die). Número de tentativas até a primeira alternância ocorrer (C), porcentagem de alternância entre os braços (D) e latência para entradas nos braços (E) durante o teste de alternância espontânea em fêmeas em Pro/Est e Met/Die. Média ± EPM. Teste t de Student ou Mann-Whitney. n = 9 Pro/Est e n = 8 Met/Die.

4.2. Experimento 2 – Efeitos da administração aguda de mCPP sobre a autolimpeza e alternância espontânea

As figuras 9, 10 e 11 mostram os resultados do experimento 2. As figuras 9A e 9B são referentes à frequência e ao tempo do comportamento de autolimpeza dos machos durante os 20 minutos após a administração i.p. de salina ou de mCPP, nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, respectivamente. A ANOVA de uma via e o teste de Kruskal-Wallis não apresentaram diferenças significativas para os tratamentos na frequência ($F_{3,44} = 1,15$, $p > 0,05$) e tempo ($H_3 = 2,17$, $p > 0,05$) de autolimpeza em machos, respectivamente. As figuras 9C, 9D e 9E representam o número de tentativas até a primeira alternância, a porcentagem de alternância e a latência para entradas no teste de alternância espontânea, respectivamente. Os testes de Kruskal-Wallis não apresentaram diferenças significativas para os tratamentos sobre o número de tentativas até a primeira alternância ($H_3 = 2,58$, $p > 0,05$) e para a latência para entradas ($H_3 = 2,11$, $p > 0,05$). Já para a porcentagem de alternância em machos (figura 9D), a ANOVA de uma via não revelou efeito significativo dos tratamentos ($F_{3,44} = 1,86$, $p > 0,05$).

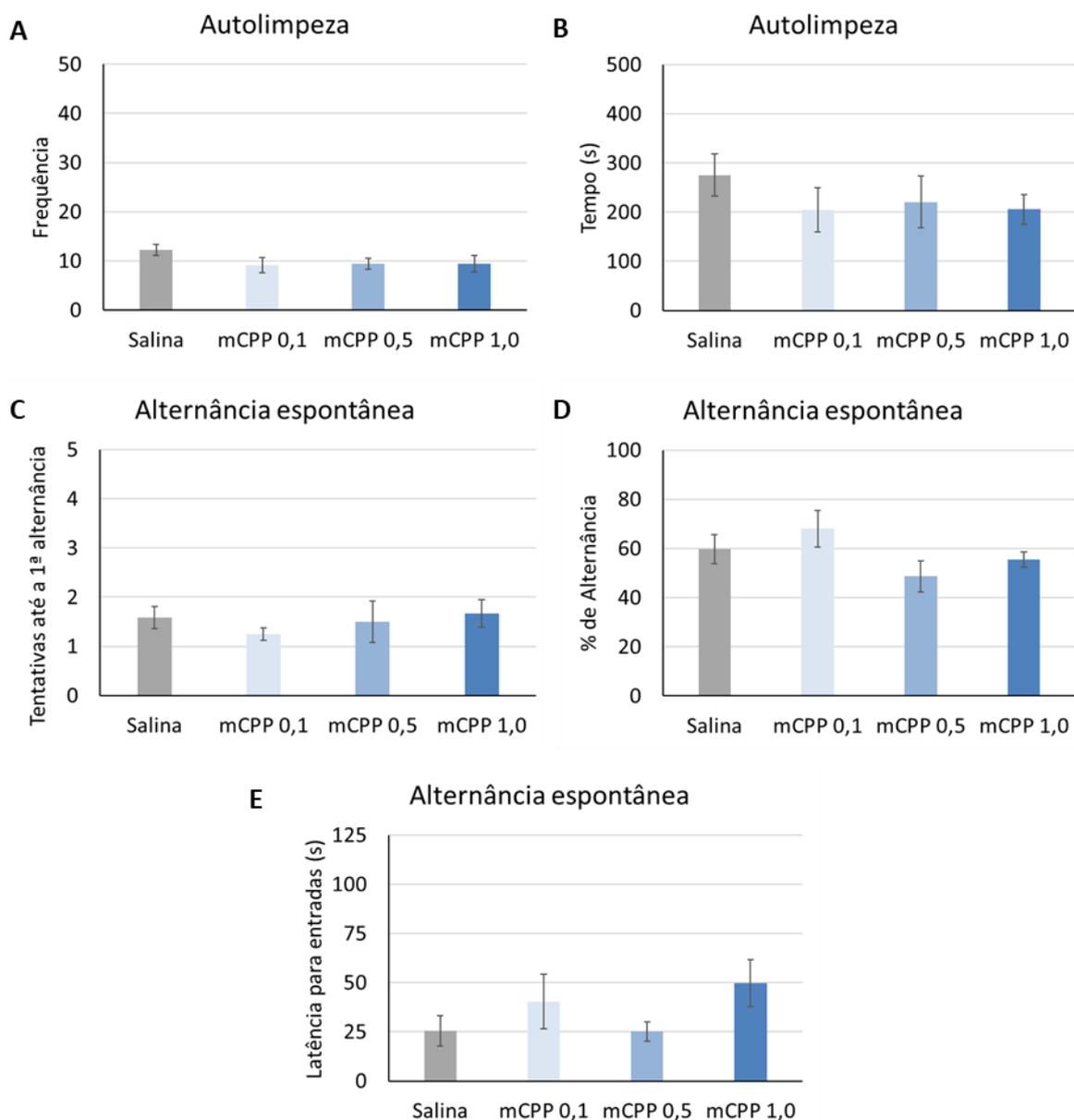


Figura 9. Efeitos da mCPP sobre a Autolimpieza e Alternância Espontânea em machos. Frequência de ocorrência de episódios de autolimpieza (A) e duração total da resposta de autolimpieza (B) durante os 20 min imediatamente após a administração i.p. de salina ou mCPP nas doses de 0,1, 0,5 ou 1,0 mg/kg. Número de tentativas até a primeira alternância ocorrer (C), porcentagem de alternância entre os braços (D) e latência para entradas nos braços (E) durante o teste de alternância espontânea em machos. Média \pm EPM. ANOVA de uma via ou Kruskal-Wallis. n = 12.

As figuras 10A e 10B são referentes à frequência e ao tempo do comportamento de autolimpieza de fêmeas nas fases de Proestro/Estro (P/E) durante os 20 minutos após a administração i.p. de salina ou de mCPP, nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, respectivamente. Os testes de Kruskal-Wallis e a ANOVA de uma via não apresentaram diferenças significativas

para os tratamentos na frequência ($H_3 = 3,88$, $p > 0,05$) e tempo ($F_{3,48} = 2,20$, $p > 0,05$) de autolimpeza nas fêmeas em P/E, respectivamente. As figuras 10C, 10D e 10E representam o número de tentativas até a primeira alternância, a porcentagem de alternância e latência para entradas no teste de alternância espontânea, respectivamente. Os testes de Kruskal-Wallis não apresentaram diferenças significativas para os tratamentos sobre o número de tentativas até a primeira alternância ($H_3 = 1,57$, $p > 0,05$), mas sim para a latência para entradas ($H_3 = 9,40$, $p < 0,05$). A análise *post hoc* com o teste DSCF revelou que a latência para entradas do grupo que recebeu a dose de mCPP 0,5 é significativamente maior que a latência para entradas do grupo salina ($p < 0,05$). Já para a porcentagem de alternância de fêmeas em P/E (figura 10D), a ANOVA de uma via não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ($F_{3,48} = 1,31$, $p > 0,05$).

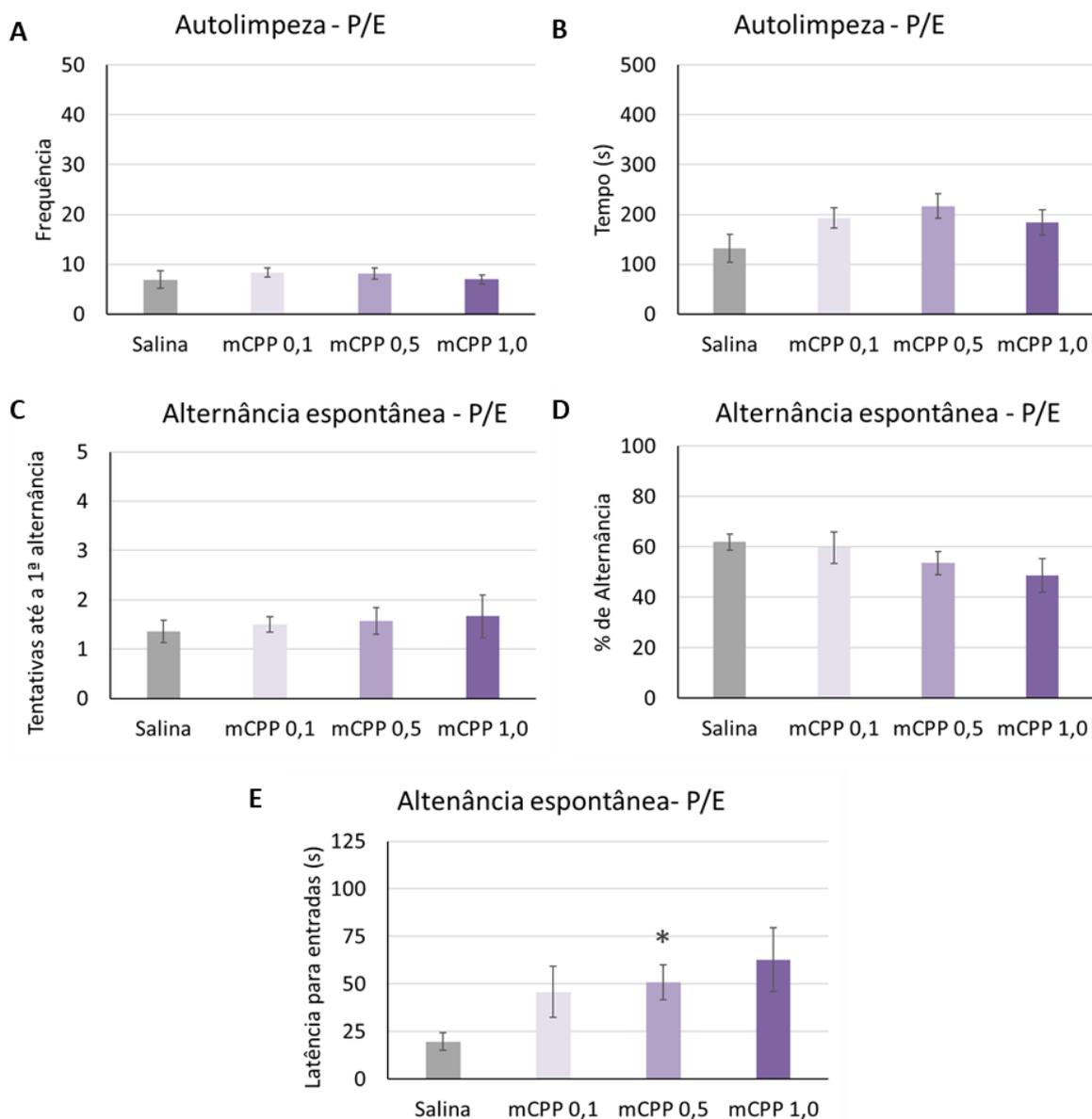


Figura 10. Efeitos da mCPP sobre a Autolimpeza e Alternância Espontânea de fêmeas em proestro/estro. Frequência de ocorrência de episódios de autolimpeza (A) e duração total da resposta de autolimpeza (B) durante os 20 min imediatamente após a administração i.p. de salina ou mCPP nas doses de 0,1, 0,5 ou 1,0 mg/kg em fêmeas em Proestro/Estro (P/E). Número de tentativas até a primeira alternância ocorrer (C), porcentagem de alternância entre os braços (D) e latência para entradas nos braços (E) durante o teste de alternância espontânea em fêmeas em P/E. Média \pm EPM. ANOVA de uma via ou Kruskal-Wallis seguido por DSCF. *Diferença estatística em relação ao grupo salina ($p < 0,05$). $n = 14$ Salina e mCPP 0,5; $n = 12$ mCPP 0,1 e mCPP 1,0.

As figuras 11A e 11B são referentes à frequência e ao tempo do comportamento de autolimpeza de fêmeas nas fases de Metaestro/Diestro (M/D) durante os 20 minutos após a administração i.p. de salina ou de mCPP, nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, respectivamente. A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa dos tratamentos para a frequência de

autolimpeza nas fêmeas em M/D ($F_{3,44} = 3,54$, $p < 0,05$). A análise *post hoc* com o teste de Tukey revelou que a frequência de autolimpeza do grupo que recebeu a dose de mCPP 1,0 é significativamente menor que a frequência de autolimpeza do grupo salina ($p < 0,05$). Para o tempo de autolimpeza, o teste de Kruskal-Wallis não mostrou nenhuma diferença significativa ($H_3 = 6,08$, $p > 0,05$). As figuras 11C, 11D e 11E representam o número de tentativas até a primeira alternância, a porcentagem de alternância e latência para entradas no teste de alternância espontânea, respectivamente. Os testes de Kruskal-Wallis não apresentaram diferenças significativas dos tratamentos para o número de tentativas até a primeira alternância ($H_3 = 1,82$, $p > 0,05$) nem para a latência para entradas ($H_3 = 7,25$, $p > 0,05$). Já para a porcentagem de alternância de fêmeas em M/D (figura 11D), a ANOVA de uma via com correção de Welch não revelou efeito significativo para os tratamentos ($F_{3,23} = 1,20$, $p > 0,05$).

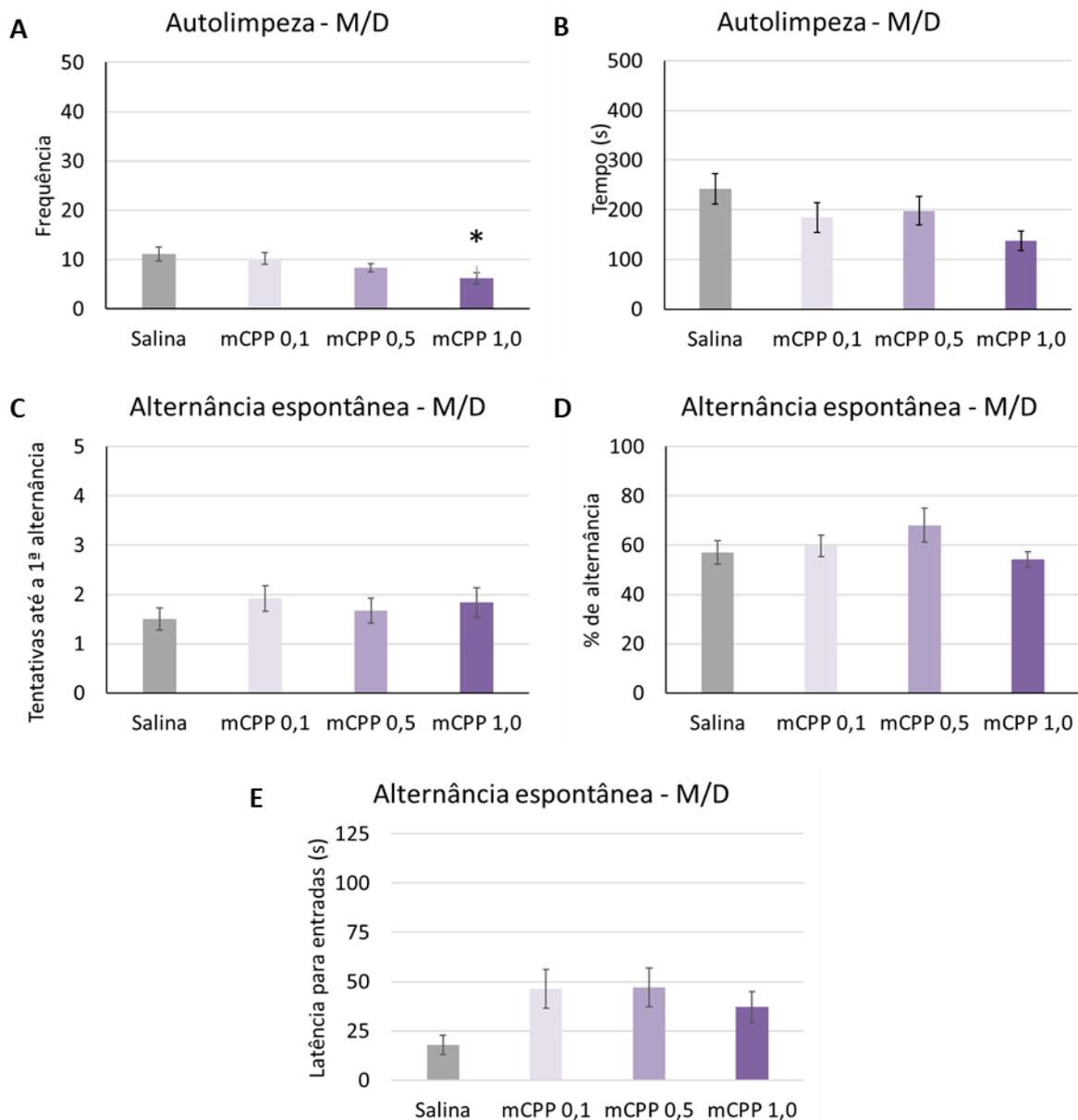


Figura 11. Efeitos da mCPP sobre a Autolimpieza e Alternância Espontânea de fêmeas em metaastro/diestro. Frequência de ocorrência de episódios de autolimpieza (A) e duração total da resposta de autolimpieza (B) durante os 20 min imediatamente após a administração i.p. de salina ou mCPP nas doses de 0,1, 0,5 ou 1,0 mg/kg em fêmeas em Metaastro/Diestro (M/D). Número de tentativas até a primeira alternância ocorrer (C), porcentagem de alternância entre os braços (D) e latência para entradas nos braços (E) durante o teste de alternância espontânea em fêmeas em M/D. Média \pm EPM. Kruskal-Wallis ou ANOVA de uma via seguida por Tukey. *Diferença estatística em relação ao grupo salina ($p < 0,05$). $n=12$.

4.3. Experimento 3 – Efeitos da administração repetida de mCPP sobre a autolimpeza e alternância espontânea

As figuras 12, 13 e 14 mostram os resultados do experimento 3. As figuras 12A e 12B são referentes à frequência e ao tempo do comportamento de autolimpeza dos machos durante os 20 minutos após a 4ª. administração i.p. de salina ou de mCPP, nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, respectivamente. A ANOVA de uma via não apresentou diferenças significativas para os tratamentos na frequência (com correção de Welch: $F_{3,23} = 2,69$, $p > 0,05$) e tempo ($F_{3,44} = 1,82$, $p > 0,05$) de autolimpeza em machos. As figuras 12C, 12D e 12E representam o número de tentativas até a primeira alternância, a porcentagem de alternância e a latência para entradas no teste de alternância espontânea, respectivamente. Os testes de Kruskal-Wallis não apresentaram diferenças significativas para os tratamentos sobre o número de tentativas até a primeira alternância ($H_3 = 0,01$, $p > 0,05$) e para a porcentagem de alternância ($H_3 = 1,56$, $p > 0,05$). Já para a latência para entradas em machos (figura 12D), a ANOVA de uma via com correção de Welch não revelou efeito significativo dos tratamentos ($F_{3,23} = 2,70$, $p > 0,05$).

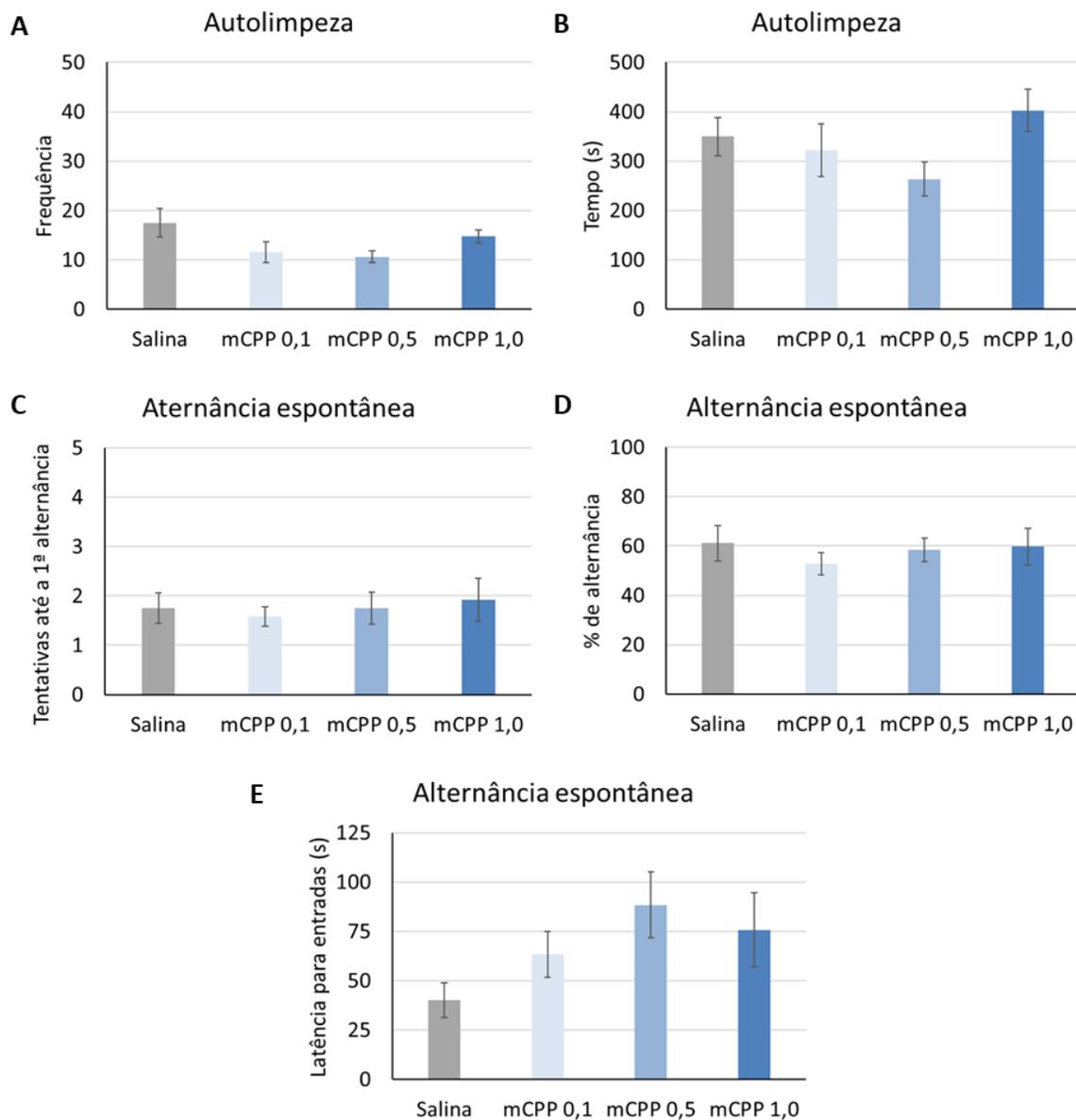


Figura 12. Efeitos da administração repetida da mCPP sobre a Autolimpieza e Alternância Espontânea em machos. Frequência de ocorrência de episódios de autolimpieza (A) e duração total da resposta de autolimpieza (B) durante os 20 min imediatamente após a 4ª administração i.p. de salina ou mCPP nas doses de 0,1, 0,5 ou 1,0 mg/kg. Número de tentativas até a primeira alternância ocorrer (C), porcentagem de alternância entre os braços (D) e latência para entradas nos braços (E) durante o teste de alternância espontânea em machos. Média ± EPM. ANOVA de uma via ou Kruskal-Wallis. n = 12.

As figuras 13A e 13B são referentes à frequência e ao tempo do comportamento de autolimpieza de fêmeas nas fases de Proestro/Estro (P/E) durante os 20 minutos após a 4ª

administração i.p. de salina ou de mCPP, nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, respectivamente. O teste de Kruskal-Wallis não apresentou diferença significativa para os tratamentos na frequência ($H_3 = 3,19$, $p > 0,05$) de autolimpeza nas fêmeas em P/E. Já para o tempo, a ANOVA de uma via mostrou diferenças significativas ($F_{3,46} = 3,00$, $p < 0,05$). A análise *post hoc* com o teste de Tukey revelou que o tempo de autolimpeza do grupo que recebeu a dose de mCPP 1,0 é significativamente menor que a frequência de autolimpeza do grupo mCPP 0,1 ($p < 0,05$). As figuras 13C, 13D e 13E representam o número de tentativas até a primeira alternância, a porcentagem de alternância e latência para entradas no teste de alternância espontânea, respectivamente. Os testes de Kruskal-Wallis não apresentaram diferenças significativas para os tratamentos sobre o número de tentativas até a primeira alternância ($H_3 = 1,17$, $p > 0,05$) nem para a latência para entradas ($H_3 = 4,36$, $p > 0,05$). Já para a porcentagem de alternância de fêmeas em P/E (figura 13D), a ANOVA de uma via não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ($F_{3,46} = 0,86$, $p > 0,05$).

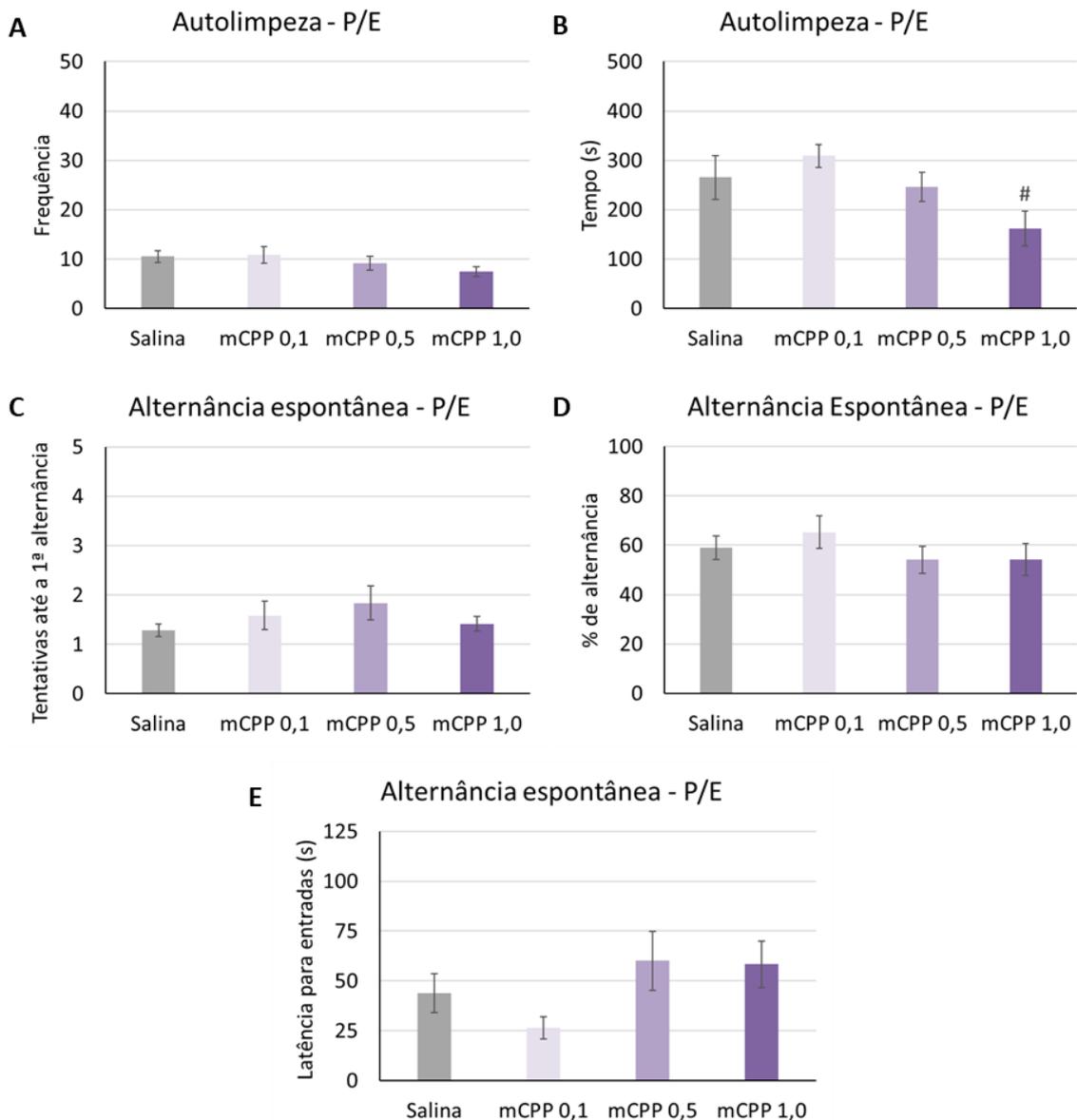


Figura 13. Efeitos da administração repetida da mCPP sobre a Autolimpieza e Alternância Espontânea de fêmeas em proestro/estro. Frequência de ocorrência de episódios de autolimpieza (A) e duração total da resposta de autolimpieza (B) durante os 20 min imediatamente após a 4ª administração i.p. de salina ou mCPP nas doses de 0,1, 0,5 ou 1,0 mg/kg em fêmeas em Proestro/Estro (P/E). Número de tentativas até a primeira alternância ocorrer (C), porcentagem de alternância entre os braços (D) e latência para entradas nos braços (E) durante o teste de alternância espontânea em fêmeas em P/E. Média \pm EPM. Kruskal-Wallis ou ANOVA de uma via seguido por Tukey. #Diferença estatística em relação ao grupo mCPP 0,1 ($p < 0,05$). $n = 14$ Salina; $n = 12$ mCPP 0,1, 0,5 e 1,0.

As figuras 14A e 14B são referentes à frequência e ao tempo do comportamento de autolimpieza de fêmeas nas fases de Metaestro/Diestro (M/D) durante os 20 minutos após a 4ª administração i.p. de salina ou de mCPP, nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg, respectivamente. A ANOVA de uma via mostrou diferenças significativas dos tratamentos para a frequência

($F_{3,49} = 4,44$, $p < 0,05$) mas não para o tempo ($F_{3,49} = 2,70$, $p > 0,05$) de autolimpeza nas fêmeas em M/D. A análise *post hoc* com o teste de Tukey revelou que a frequência de autolimpeza dos grupos que receberam as doses de mCPP 0,5 e 1,0 são significativamente menores que o tempo de autolimpeza do grupo mCPP 0,1 ($p < 0,05$). As figuras 14C, 14D e 14E representam o número de tentativas até a primeira alternância, a porcentagem de alternância e latência para entradas no teste de alternância espontânea, respectivamente. O teste de Kruskal-Wallis não apresentou diferenças significativas dos tratamentos para o número de tentativas até a primeira alternância ($H_3 = 5,57$, $p > 0,05$) mas sim para a latência para entradas ($H_3 = 10,91$, $p < 0,05$). A análise *post hoc* com o teste DSCF revelou que as latências para entradas dos grupos que receberam as doses de mCPP 0,5 e 1,0 são significativamente maiores que a latência para entradas do grupo salina ($p < 0,05$). Já para a porcentagem de alternância de fêmeas em M/D (figura 14D), a ANOVA de uma via não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ($F_{3,49} = 1,13$, $p > 0,05$).

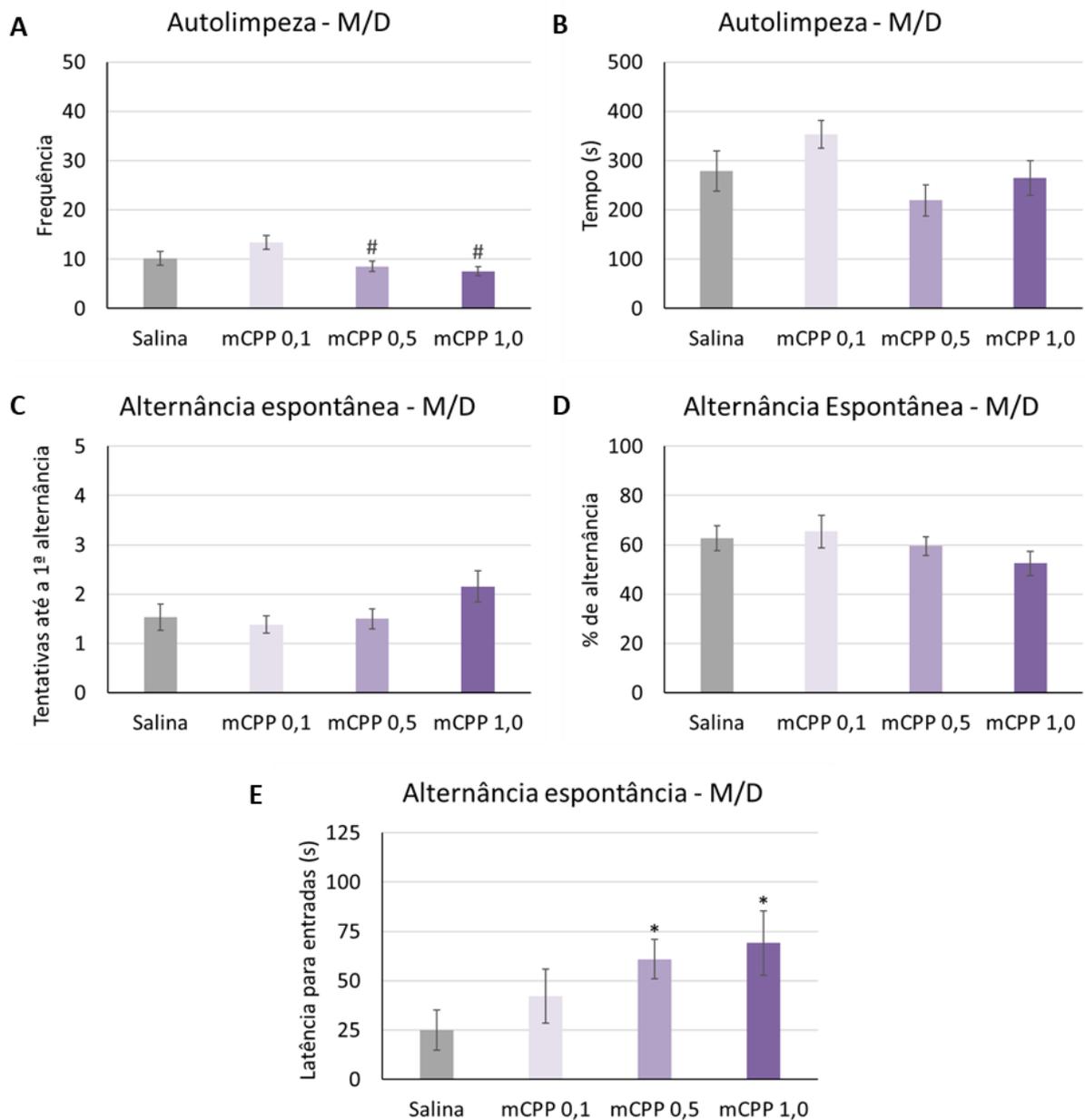


Figura 14. Efeitos da administração repetida da mCPP sobre a Autolimpeza e Alternância Espontânea de fêmeas em metaestro/diestro. Frequência de ocorrência de episódios de autolimpeza (A) e duração total da resposta de autolimpeza (B) durante os 20 min imediatamente após a 4ª administração i.p. de salina ou mCPP nas doses de 0,1, 0,5 ou 1,0 mg/kg em fêmeas em Metaestro/Diestro (M/D). Número de tentativas até a primeira alternância ocorrer (C), porcentagem de alternância entre os braços (D) e latência para entradas nos braços (E) durante o teste de alternância espontânea em fêmeas em M/D. Média ± EPM. ANOVA de uma via seguido por Tukey ou Kruskal-Wallis seguido por DSCF. *Diferença estatística em relação ao grupo salina ($p < 0,05$). #Diferença estatística em relação ao grupo mCPP 0,1 ($p < 0,05$). $n = 13$ Salina, mCPP 0,1 e 1,0; $n = 14$ mCPP 0,5.

5. DISCUSSÃO

Os objetivos do presente estudo consistiram em avaliar a expressão basal dos comportamentos de autolimpeza e alternância espontânea em ratos, considerando a influência do sexo e das fases do ciclo estral em fêmeas e, na sequência, avaliar os efeitos da administração aguda e repetida de mCPP sobre esses comportamentos. Nossas hipóteses eram de que, uma vez não encontradas diferenças basais entre os comportamentos avaliados em machos e fêmeas, a mCPP aumentaria a autolimpeza e diminuiria a alternância espontânea em ambos os sexos. Isto é, os animais passariam mais tempo fazendo autolimpeza e escolheriam mais vezes um dos braços do labirinto em T quando sob efeito da mCPP, indiferentemente do sexo ou fase do ciclo estral, mas com maiores efeitos quando tratados com mCPP repetidamente. Além disso, esperava-se que as fêmeas na fase de metaestro/diestro apresentassem menores índices de alternância após o tratamento com mCPP, tanto em comparação com as fêmeas em proestro/estro quanto quando comparadas com os machos.

O comportamento de autolimpeza, caracterizado pela sequência ritualizada de limpeza do animal, vem sendo amplamente utilizado para o estudo do TOC em modelos animais (Joel, 2006; Korff e Harvey, 2006; Reimer et al., 2015). Não foi possível encontrar diferenças significativas basais para as respostas de autolimpeza ao compararmos ambos os sexos ou entre fêmeas em proestro/estro e metaestro/diestro no experimento 1. Na comparação entre fases do ciclo em fêmeas, as ratas em metaestro/diestro, que estão com baixas concentrações hormonais quando comparadas às fêmeas em proestro/estro (Maeng et al., 2015; McLean et al., 2012), apresentaram visualmente maiores frequências e tempo de autolimpeza, porém não foram diferenças estatisticamente significativas. Em uma pesquisa realizada com portadoras de TOC, 49% das entrevistadas indicaram a exacerbação dos sintomas obsessivos-compulsivos durante o período pré-menstrual (Vulink et al., 2006), indicando uma possível relação hormonal com a severidade dos sintomas de TOC em mulheres. Esses dados poderiam sugerir que a fase do

ciclo estral em que a rata se encontra no momento da avaliação da autolimpeza teria influência na duração e quantidade de vezes que o animal expressa esse comportamento considerado tipo-compulsivo. Essa possível relação entre os hormônios femininos e o TOC vem sendo investigada por diversos pesquisadores (Maeng e Milad, 2015; Milad et al., 2009; Vulink et al., 2006), mas não foi observada no presente estudo.

Em relação aos efeitos da mCPP sobre a autolimpeza, os ratos Wistar machos não apresentaram diferenças significativas para frequência ou tempo de autolimpeza em nenhuma das doses de mCPP aqui administradas, tanto aguda quanto repetidamente. Esse resultado está de acordo com o observado na pesquisa de iniciação científica de Taguchi (2018), na qual não houve aumento significativo da autolimpeza em ratos da linhagem Wistar com a administração aguda da mCPP. Entretanto, esse não era o resultado esperado e observado na literatura. Wright e Rodgers (2014) observaram um aumento da autolimpeza com a administração de mCPP 3,0 mg/kg, em ratos da linhagem Hooded Lister. Ainda, Georgiadou e colaboradores (2012) observaram um aumento da duração e dos episódios de autolimpeza para ratos machos Wistar com apenas uma administração de mCPP na dose de 0,6 mg/kg. O mesmo foi mostrado por Graf e colaboradores (2003), que administraram doses de mCPP entre 0,1 e 2,5 mg/kg em ratos Sprague-Dawley para induzir a autolimpeza, também obtendo o máximo efeito com a dose de 0,6 mg/kg.

Uma possível justificativa para nosso resultado é que a alta duração de autolimpeza encontrada em nossos animais controle possa ter influenciado na avaliação da exacerbação da autolimpeza pela mCPP, principalmente nos machos, que apresentaram em média aproximadamente 250 s, enquanto outros experimentos relatam de 30 a 50 s de autolimpeza (Georgiadou et al., 2012; Reimer et al., 2018) ou 180 s (Taguchi, 2018). Esses achados seriam indícios de que a ação da mCPP poderia ser diferenciada para linhagens distintas, e que também variaria a dose da droga para que o efeito pudesse ser observado, com risco de prejuízo no

sistema motor do animal. As doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/kg foram escolhidas para o presente estudo com o objetivo de padronizar as pesquisas para ratos, pois já foram utilizadas em experimentos anteriores em nosso laboratório, e investigar seus efeitos nas fêmeas, o que ainda não havia sido realizado. Ainda, doses maiores de mCPP já foram utilizadas em nosso laboratório causando importante efeito motor, tanto em machos (Kawaoku,2017) quanto em fêmeas (Da Silva, 2020).

Para as fêmeas, resultados diferenciais de acordo com a fase do ciclo puderam ser encontrados ao administrar mCPP aguda ou repetidamente. As ratas em metaestro/diestro tratadas com mCPP 1,0 mg/kg apresentaram significativamente menores frequências de autolimpeza em relação ao grupo salina com a administração única de mCPP, mas nenhum efeito significativo da mCPP foi encontrado para o tempo de autolimpeza em metaestro/diestro ou para frequência e tempo de autolimpeza em proestro/estro. Já para a administração repetida da mCPP em fêmeas, foi possível encontrar diferenças significativas tanto nas ratas em proestro/estro quanto em metaestro/diestro para as respostas de autolimpeza. Nenhuma alteração em relação ao grupo controle foi, no entanto, observada. Para as fêmeas em proestro/estro tratadas com mCPP 1,0 mg/kg, o tempo de autolimpeza foi significativamente menor quando comparadas ao grupo mCPP 0,1 mg/kg. Já para as fêmeas em metaestro/diestro tratadas com mCPP 0,5 e 1,0 mg/kg, as frequências de autolimpeza foram menores em relação ao grupo mCPP 0,1 mg/kg. De qualquer forma, diferentemente do esperado, não foi possível observar aumento significativo da autolimpeza com a administração aguda ou repetida de mCPP em fêmeas Wistar em nenhuma fase do ciclo, mas sim uma diminuição do comportamento de autolimpeza com as doses maiores, também observado por Da Silva (2020) para a dose de 3,0 mg/kg em fêmeas em proestro e diestro tardio.

Esses dados divergem do que foi encontrado na pesquisa de Reimer e colaboradores (2018), em que ratas Sprague-Dawley, independentemente da fase do ciclo estral, apresentaram

aumento significativo da autolimpeza para mCPP 3,0 mg/kg quando comparadas ao grupo salina durante o pré-teste e os treinamentos de extinção do medo condicionado ao contexto e ao som. Apenas Reimer e colaboradores (2018) relataram os efeitos da mCPP sobre a autolimpeza em fêmeas, limitando a comparação dos resultados encontrados no presente estudo. Sugere-se a influência da linhagem de animais utilizada no comportamento de autolimpeza expressado, uma vez que os resultados relatados nos estudos divergiram. Ademais, foi observado nos animais controle uma diferença inicial no tempo de autolimpeza, com duração de menos de 40 s em Reimer e colaboradores (2018) e em média 250 s no presente estudo.

A tendência natural à alternância e exploração do ambiente pode refletir a motivação para procurar água, alimento, abrigo ou parceiros e é conhecida como alternância espontânea (Deacon e Rawlins, 2006). Em roedores, a falta de alternância poderia ser extrapolada para a perseverança observada em pacientes com TOC (Joel, 2006; Korff e Harvey, 2006; Yadin et al., 1991). Mostramos no presente estudo que a privação alimentar não precisa ser realizada para que o animal alterne as visitas no Labirinto em T (Deacon e Rawlins, 2006). Assim como em Taguchi (2018), o presente estudo demonstrou a alternância espontânea, tanto para os machos quanto agora também para as fêmeas. Os animais do experimento 1, mesmo não estando em privação em nenhum momento a não ser durante o curto período de realização do experimento, apresentaram, em média, 55% de alternância, valor dentro do esperado para alternância espontânea sem privação (Deacon e Rawlins, 2006). Ou seja, tanto os machos quanto as fêmeas tenderam a visitar ambos os braços do Labirinto em T e alternar essas visitas em mais da metade das tentativas, mesmo sem nenhum estímulo diferencial no aparato. Não foi possível, no presente estudo, identificar diferenças basais significativas entre machos e fêmeas, ou entre fêmeas em proestro/estro e metaestro/diestro, para o número de tentativas até a primeira alternância, porcentagem de alternância e latência para entradas, como esperado.

Em relação ao tratamento com mCPP, a tendência de diminuição da porcentagem de alternância espontânea para as doses agudas de mCPP 0,1 e 0,5 mg/kg, observada em machos por Taguchi (2018), não apareceu no presente estudo, tanto para a administração aguda ou repetida de mCPP. Uma possível justificativa para a não ocorrência desse fenômeno pode ser explicada pela mudança de aparato utilizado no teste de alternância espontânea, que antes era realizado em um Labirinto em T modificado, com dois braços fechados e um braço aberto, e atualmente foi feito no labirinto totalmente fechado. O modelo anterior seria uma adaptação do Labirinto em “T” elevado, mais utilizado para o estudo de transtornos do pânico, já que envolve um fator ansiogênico, a aversão a lugares abertos (Zangrossi Jr. e Graeff, 2014). Esse fator não estaria presente no modelo atual, uma vez que o animal já é colocado inicialmente em um braço fechado dentro do labirinto, fazendo com que o animal esteja menos exposto e, logo, sinta-se mais seguro para explorar ambos os braços sem precisar escolher rapidamente apenas um braço para se proteger. Assim, o fator ansiogênico do labirinto em T modificado (dois braços fechados e um aberto) aparentemente parece influenciar nesse comportamento.

Nenhum outro estudo avaliou os efeitos da mCPP na alternância espacial espontânea. Ao utilizarem o modelo de alternância reforçada, Papakosta e colaboradores (2013) observaram em ratos machos Wistar o aumento da taxa de persistência com a administração única de mCPP 2,5 mg/kg para o grupo que apresentou maiores níveis de persistência espontânea antes do tratamento com mCPP. Tsaltas e colaboradores (2005), também utilizando ratos Wistar, observaram taxas de persistência aumentadas quando administraram 2,0 mg/kg de mCPP durante 4 dias consecutivos. Kontis e colaboradores (2008), utilizando o mesmo método, também observaram aumento significativo da persistência ao administrar a dose de mCPP 2,5 mg/kg. Isso mostra que, nesses casos, doses mais altas do que as que foram utilizadas em nosso estudo conseguiram diminuir a alternância em labirinto em T utilizando reforço alimentar. O fato de avaliarmos a alternância espontânea e não a aprendida por reforço também seria uma

explicação para a divergência de resultados. Não foram utilizadas doses mais altas de mCPP no presente estudo, conforme discutido anteriormente, porque outros estudos do nosso laboratório mostraram diminuição da atividade locomotora no campo aberto em animais tratados com mCPP principalmente na dose de 3,0 mg/kg (Kawaoku, 2017; Taguchi, 2018; Da Silva, 2020). Os animais que receberam essa dose foram os que apresentaram maiores latências para entradas nos braços fechados no teste de alternância espontânea no labirinto em T elevado modificado (Taguchi, 2018).

Além disso, de acordo com uma revisão sistemática de literatura que conduzimos (Neurosci Biobehav Rev, *under review*), esses foram os três únicos experimentos que utilizaram a mCPP no modelo de alternância reforçada (Tsaltas et al., 2005; Kontis et al., 2008; Papakosta et al., 2013), indicando a necessidade de uma maior investigação das doses e delineamentos para uma padronização na literatura, facilitando as replicações de experimentos e avançando no conhecimento.

Para fêmeas, não houve efeito significativo para as diferentes doses de mCPP administradas aguda ou repetidamente na alternância espontânea. É importante ressaltar que, na revisão de literatura sobre modelos animais para o TOC utilizando mCPP (Neurosci Biobehav Rev, *under review*), dos 28 artigos encontrados, apenas dois estudos administraram mCPP em roedores fêmeas, um utilizando camundongos (Troelsen et al., 2005) e um utilizando ratos (Reimer et al., 2018). Nenhum deles avaliou a alternância espontânea para poder comparar com os resultados obtidos no presente estudo. Por isso, mais pesquisas com fêmeas precisam ser realizadas para que diferenças sexuais, especificações ou generalizações possam ser descobertas ou confirmadas. Apesar das fêmeas em metaestro/diestro apresentarem uma diminuição significativa da frequência de autolimpeza e as fêmeas em proestro/estro diminuírem significativamente seu tempo de autolimpeza, elas não se diferenciaram nos comportamentos de alternância espontânea, também considerados tipo-compulsivos. Então, a

princípio, esses comportamentos relacionados à autolimpeza e alternância espontânea poderiam estar modelando aspectos específicos associados ao TOC, que seriam influenciados de forma distinta pela característica hormonal das diferentes fases do ciclo estral.

Ainda para o teste de alternância espontânea, também não observamos diferença significativa na latência para entradas no labirinto em T para machos tratados com mCPP aguda ou repetidamente. Já para as fêmeas, observamos aumento da latência para entradas das ratas em metaestro/diestro tratadas repetidamente com mCPP 0,5 e 1,0 mg/kg e para as ratas em proestro/estro com administração única de mCPP 0,5 mg/kg. Comparadas ao grupo salina, elas obtiveram maiores latências para entradas, ou seja, demoraram mais tempo para se locomover, indicando possível déficit motor causado pela mCPP, o que seria mais um indício de prejuízo motor causado por esse fármaco em ratas. Esses achados estão de acordo com o que foi encontrado pelo nosso grupo de pesquisa com ratos Wistar machos, ao observar uma diminuição da frequência de cruzamentos e de levantamentos no campo aberto (Kawaoku, 2018), também observado por Kennett e Curzon (1988) ao administrar doses mais altas de mCPP (5,0 mg/kg e 10 mg/kg) quando comparados aos do grupo salina e mCPP 1,0 mg/kg e 2,0 mg/kg. Ainda no campo aberto, a interferência motora também pôde ser observada ao diminuir a locomoção, mobilidade e o número de entradas no centro da arena tanto em ratos Sprague-Dawley machos quanto em fêmeas (Reimer et al., 2018). Por fim, foi possível observar uma diminuição significativa na frequência total de cruzamentos e levantamentos e um aumento significativo do tempo de imobilidade em fêmeas Wistar tratadas com mCPP nas doses 0,5, 1,0 e 3,0 mg/kg em relação ao grupo salina no teste de campo aberto (Da Silva, 2020).

Assim, de maneira geral, nossos resultados indicam que os comportamentos naturais de autolimpeza e alternância espontânea em ratos da linhagem Wistar não parecem diferir entre machos e fêmeas ou estar associados às alterações hormonais apresentadas ao longo do ciclo estral. Além disso, diferentemente do esperado, a mCPP não exacerbou o comportamento de

autolimpeza ou prejudicou a alternância espontânea em nosso estudo para machos ou para fêmeas. Por outro lado, os efeitos da mCPP observados na latência para entrada no teste de alternância espontânea parecem indicar um potencial comprometimento motor induzido pelo fármaco, nas doses utilizadas, ocorrendo apenas nas fêmeas.

6. CONCLUSÕES

- Os comportamentos naturais de autolimpeza e alternância espontânea em ratos da linhagem Wistar não parecem diferir entre machos e fêmeas ou estar associados às alterações hormonais apresentadas ao longo do ciclo estral nas fêmeas.
- Diferentemente do esperado, o tratamento agudo ou repetido com mCPP não exacerbou o comportamento de autolimpeza em machos ou em fêmeas.
- A alternância espontânea de ratos machos e fêmeas não foi prejudicada pela administração de mCPP de forma aguda ou repetida em nosso estudo.
- Ainda, no teste de alternância espontânea, os efeitos da mCPP observados na latência para entrada parecem indicar um potencial comprometimento motor induzido pelas doses mais altas do fármaco ocorrendo apenas nas fêmeas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. 4ª edição. Editora Artmed, Porto Alegre, 2000.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. 5ª edição. Editora Artmed, Porto Alegre, 2014.
- ANSELONI, V. Z.; BRANDÃO, M. L. Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze. **Behavioural Pharmacology**, v. 8, p. 533-540, 1997.
- BAUMANN, M. H.; AYESTAS, M. A.; DERSCH, C. M.; ROTHMAN, R. B. 1-(m-chlorophenyl)piperazine (mCPP) dissociates in vivo serotonin release from long-term serotonin depletion in rat brain. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. 492–501, 2001.
- BECKER J. B.; ARNOLD, A. P.; BERKLEY, K. J.; BLAUSTEIN, J. D.; ECKEL, L. A.; HAMPSON, E.; HERMAN, J. P.; MARTS, S.; SADEE, W.; STEINER, W.; TAYLOR, J.; YOUNG, E. Strategies and Methods for Research on Sex Differences in Brain and Behavior. **Endocrinology**, v. 146, p. 1650–1673, 2005.
- BUTCHER, R. L.; COLLINS, W. E.; FUGO, N. W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. **Endocrinology**, v. 94, n. 6, p. 1704-1708, 1974.
- CORDIOLI, A. V. TOC: manual de terapia cognitivo - comportamental para o transtorno obsessivo-compulsivo, 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- DA SILVA, J. F. Efeitos da meta-clorofenilpiperazina (mCPP) na indução de comportamentos do tipo compulsivo em ratas: influência do ciclo estral. Monografia (Graduação em Psicologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020.
- DEACON, R. M. J.; RAWLINS, J. N. P. T-maze alternation in the rodent. **Nature Publishing Group**, v. 1, 2006.
- DINIZ, J. B.; MIGUEL, E. C.; DE OLIVEIRA, A. R.; REIMER, A. E.; BRANDÃO, M. L.; MATHIS, M. A.; BATISTUZZO, M. C.; COSTA, D. L. C.; HOEXTER, M. Q.

Desenhando as novas fronteiras para a compreensão do transtorno obsessivo-compulsivo: uma revisão de sua relação com o medo e a ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34 (Supl 1), p. 81-103, 2012.

ESTANISLAU, C., VELOSO, A. W. N., FILGUEIRAS, G. B., MAIO, T. P., DAL-CÓL, M. L. C., CUNHA, D. C., KLEIN, R.; CARMONA, L. F.; FERNÁNDEZ-TERUEL, A. Rat self-grooming and its relationships with anxiety, dearousal and perseveration: Evidence for a self-grooming trait. **Physiology & Behavior**, v. 209, 2019

FINEBERG, N.A.; CHAMBERLAIN S. R.; HOLLANDER, E.; BOULOUGOURIS, V.; ROBBINS, T. W. Translational approaches to obsessive-compulsive disorder: from animal models to clinical treatment. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 1044–1061, 2011.

FINEBERG, N. A.; GALE, T. M. Evidence-based pharmacotherapy of obsessive-compulsive disorder. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 8, p. 107-129, 2005.

GEORGIADOU, G., TARANTILIS, P. A., PITSIKAS, N. Effects of the active constituents of *Crocus Sativus* L., crocins, in an animal model of obsessive-compulsive disorder. **Neuroscience letters**, v. 528, p. 27–30, 2012.

GOUVEIA, A. JR.; DOS SANTOS, U. D.; FELISBINO, F. E.; DE AFONSECA, T. L.; ANTUNES, G.; MORATO, S. Influence of the estrous cycle on the behavior of rats in the elevated T-maze. **Behavioural processes**, v. 67(2), p. 167–171, 2004.

GRAF, M.; KANTOR, S.; ANHEUER, Z. E.; MODOS, E. A.; BAGDY, G. m-CPP-induced self-grooming is mediated by 5-HT_{2C} receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 142, p. 175–179, 2003.

HOLLANDER, E.; DECARIA, C.; GULLY, R.; NITESCU, A.; SUCKOW, R. F.; GORMAN, J. M.; KLEIN, D. F.; LIEBOWITZ, M. R. Effects of Chronic Fluoxetine Treatment on Behavioral and Neuroendocrine Responses to Meta-Chlorophenylpiperazine in Obsessive-Compulsive Disorder, **Psychiatry Research**, v. 36, p. 1-17, 1991.

JOEL, D. Current animal models of obsessive-compulsive disorder: A critical review. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 30, p. 374-388, 2006.

- KALUEFF, A. V.; ALDRIDGE, J. W.; LAPORTE, J. L.; MURPHY, D. L.; TUOHIMAA, P. Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. *Nature protocols*, v. 2, p. 2538–2544, 2007.
- KAWAOKU, V. M. Efeitos da meta-clorofenilpiperazina (mcpp) na indução de comportamentos “tipo compulsivo” em ratos avaliados no teste do campo aberto. Monografia (Graduação em Psicologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.
- KENNETT G. A.; CURZON, G. Evidence that mCPP may have behavioural effects mediated by central 5-HT_{1c} receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 94, p. 137-147, 1988.
- KINRYS G.; WYGANT, L. E. Anxiety disorders in women: does gender matter to treatment? **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 2, p. 43-50, 2005.
- KONTIS, D.; BOULOUGOURIS, V.; PAPAKOSTA, V. M.; KALOGERAKOU, S.; PAPADOPOULOS, S.; POULOPOULOU, C.; PAPADIMITRIOU, G. N. TSALTAS, E. Dopaminergic and serotonergic modulation of persistent behaviour in the reinforced spatial alternation model of obsessive–compulsive disorder, **Psychopharmacology**, v. 200, p.587-610, 2008.
- KORFF, S.; HARVEY, B. H. Animal models of obsessive-compulsive disorder: Rationale to understanding psychobiology and pharmacology. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 29, p. 371-190, 2006.
- KREISS, D. S.; COFFMAN, C. F.; FIACCO, N. R.; GRANGER, J. C.; HELTON, B. M.; JACKSON, J. C.; KIM, L. V.; MISTRY, R. S.; MIZER, T. M.; PALMER, L. V.; VACCA, J. A.; WINKLER, S. S.; ZIMMER, B. A. Ritualistic chewing behavior induced by mCPP in the rats is an animal model of obsessive-compulsive disorder. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 104, p. 119-124, 2013.
- LENSI, P.; CASSANO, G. B.; CORREDDU, G.; RAVAGLI, S.; KUNOVAC, J. L.; AKISKAL, H. S. Obsessive–Compulsive Disorder. **British Journal of Psychiatry**, v. 169, p. 101–107, 1996.
- LOMBARDI, L. Efeitos da meta-clorofenilpiperazina (mCPP) sobre mecanismos da mobilização leucocitária: Estudos *in vivo* e *in vitro*. Tese (Mestrado) -

Departamento de análises e clínicas e toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MAENG, L. Y.; COVER, K. K.; LANDAU, A. J.; MILAD, M. R.; LEBRON-MILAD, K. Protocol for studying extinction of conditioned fear in naturally cycling female rats. **Journal of Visualized Experiments**, v. 96, 52202, 2015.

MAENG, L. Y.; MILAD, M. R. Sex Differences in Anxiety Disorders: Interactions between Fear, Stress, and Gonadal Hormones. **Hormones and Behavior**, v. 76, p. 106-117, 2015.

MARQUES, C. Tratamento farmacológico do transtorno obsessivo-compulsivo. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23 (Supl II), p. 49-51, 2001.

MATHES, B. M.; MORABITO, D. M.; SCHMIDT, N. B. Epidemiological and clinical gender differences in OCD. **Current Psychiatry Report**, v. 21, 2019.

MCLAUGHLIN, N. C. R.; STRONG, D.; ABRANTES A.; GARNAAT, S.; CERNY, A.; O'CONNELL, O.; FADOK, R.; SPOFFORD, C.; RASMUSSEN, S. A.; MILAD, M. R.; GREENBERG, B. D. Extinction retention and fear renewal in a lifetime obsessive-compulsive disorder sample, **Behavioural Brain Research**, V.280, P. 77-78, 2014.

MCLEAN, A. C.; VALENZUELA, N.; FAI, S.; BENNETT, S. A. L. Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. **Journal of Visualized Experiments**, (67), e4389, 2012.

MENZIES, L.; CHAMBERLAIN, S. R.; LAIRD, A. R.; THELEN, S. M.; SAHAKIAN, B. J.; BULLMORE, E. T. Integrating evidence from neuroimaging and neuropsychological studies of obsessive-compulsive disorder: The orbitofronto-striatal model revisited. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 32, p. 525–549, 2008.

MILAD, M. R.; IGOE, S. A.; LEBRON-MILAD, K.; NOVALES, J. E. Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. **Neuroscience**, v.164, p. 887–895, 2009.

MILAD, M. R.; FURTAK, S. C.; GREENBERG, J. L.; KESHAVIAH, A.; IM, J. J.; FALKENSTEIN, M. J.; JENIKE, M; RAUCH, S. L.; WILHELM, S. Deficits in

- Conditioned Fear Extinction in Obsessive-Compulsive Disorder and Neurobiological Changes in the Fear Circuit. **JAMA Psychiatry**, v. 70, P. 608-618, 2013.
- MILAD, M. R.; RAUCH, S. L. Obsessive-compulsive disorder: beyond segregated cortico-striatal pathways. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 16, p. 43–51, 2012.
- NARDO M.; CASAROTTO P.C.; GOMES F. V.; GUIMARÃES F. S. Cannabidiol reverses the mCPP induced increase in marble-burying behavior. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 28, p. 544-550, 2014.
- OLVERA-HERNÁNDEZ, S., CHAVIRA, R., & FERNÁNDEZ-GUASTI, A. Sex- and endocrine-stage-differences in middle-aged rats in an animal model of OCD. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 44, p. 81–87, 2013.
- PAPAKOSTA, V.-M.; KALOGERAKOU, S.; KONTIS, D.; ANYFANDI, E.; THEOCHARI, E.; BOULOUGOURIS, V.; PAPADOPOULOS, S.; PANAGIS, G.; TSALTAS, E. 5-HT_{2C} receptor involvement in the control of persistence in the Reinforced Spatial Alternation animal model of obsessive-compulsive disorder. **Behavioural Brain Research**, v. 243, p. 176–183, 2013.
- PHILLIPS, K. A. The obsessive-compulsive spectrums. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 25, p. 791–809, 2002.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON G. Rang & Dale. *Farmacologia*. 7 ed., Rio de Janeiro, Elsevier, 2012, 808 p.
- REIMER, A. E.; DE OLIVEIRA, A. R.; DINIZ, J. B.; HOEXTER, M. Q.; CHIAVEGATTO, S.; BRANDÃO, M. L. Rats with differential self-grooming expression in the elevated plus-maze do not differ in anxiety-related behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 292, p. 370-380, 2015.
- REIMER, A. E.; DE OLIVEIRA, A. R.; DINIZ, J. B.; HOEXTER, M. Q.; MIGUEL, E. C.; MILAD, M. R.; BRANDÃO, M. L. Fear extinction in an obsessive-compulsive disorder animal model: Influence of sex and estrous cycle. **Neuropharmacology**, v. 131, p. 104-115, 2018.

- RUSCIO, A. M.; STEIN, D. J.; CHIU, W. T.; KESSLER, R. C. The epidemiology of obsessive-compulsive disorder in the National Comorbidity Survey Replication. **Molecular Psychiatry**, v. 15, p. 53–63, 2008.
- RUSSELL, E. J.; FAWCETT, J. M.; MAZMANIAN, D. Risk of Obsessive-Compulsive Disorder in Pregnant and Postpartum Women. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 74, p. 377–385, 2013.
- SACHS, B. D. The development of the grooming and its expression in adult animals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 525, p.1-17, 1988.
- SAXENA, S.; RAUCH, S. L. Functional neuroimaging and the neuroanatomy of obsessive-compulsive disorder. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 23, p. 563–586, 2000.
- SHAVITT, R. G.; FERRÃO, Y. A.; BRAVO, M.C.; BELOTTO, C.; JUNIOR, A. L.; MIGUEL, E.C. Transtorno obsessivo-compulsivo resistente: conceito e estratégias de tratamento. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23 (Supl II), p. 52-57, 2001.
- STAHL, S. Psicofarmacologia: Bases Neurocientíficas e Aplicações Práticas. 4. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2014.
- STEIN, D. J. Obsessive-compulsive disorder. **Lancet**, v. 360, p. 397–405, 2002.
- STEIN, D. J.; COSTA, D. L. C.; LOCHNER, C.; MIGUEL, E. C.; REDDY, Y. C. J.; SHAVITT, R. G.; HEUVEL, O. A. V. D; SIMPSON, H. B. Obsessive–compulsive disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, 2019.
- STEWART, B. R.; JENNER, P.; MARSDEN, C. D. Induction of purposeless chewing behaviour in rats by 5-HT agonist drugs. **European Journal of pharmacology**, v. 162, p. 101-107, 1989.
- TAGUCHI, L. M. Relações entre a autolimpeza induzida por meta-clorofenilpiperazina (mCPP) e os comportamentos de alternância espontânea e checagem compulsiva em ratos. Monografia (Graduação em Psicologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.
- TORRESAN, R. C.; RAMOS-CERQUEIRA, A. T. A.; SHAVITT, R. G.; DO ROSÁRIO, M. C.; DE MATHIS, M. A.; MIGUEL, E. C.; TORRES, A. R. Symptom dimensions,

- clinical course and comorbidity in men and women with obsessive-compulsive disorder. **Psychiatry Research**, v. 209, p. 186–195, 2013.
- TROELSEN, K. B.; NIELSEN, E.; MIRZA, N. R. Chronic treatment with duloxetine is necessary for an anxiolytic-like response in the mouse zero maze: The role of the serotonin transporter. **Psychopharmacology**, v. 181, p. 741–750, 2005.
- TSALTAS, E.; KONTIS, D.; CHRYSIKAKOU, S.; GIANNOU, H.; BIBA, A.; PALLIDI, S.; CHRISTODOULOU, A.; MAILLIS, A.; RABAVILAS, A. Reinforced Spatial Alternation as an Animal Model of Obsessive-Compulsive Disorder (OCD): Investigation of 5-HT_{2C} and 5-HT_{1D} Receptor Involvement in OCD Pathophysiology. **Biological Psychiatry**, v. 57, p. 1176–1185, 2005.
- ULLOA, R. E.; NICOLINIC, H.; FERNÁNDEZ-GUASTIA, A. Sex differences on spontaneous alternation in prepubertal rats: implications for an animal model of obsessive-compulsive disorder, **Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 28, p. 687– 692, 2004.
- VULINK, N. C. C.; DENYS, D.; BUS, L.; WESTENBERG, H. G. M. Female hormones affect symptom severity in obsessive-compulsive disorder. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 21, ed. 3, p. 171–175, 2006.
- WHO. The Global Burden of Disease: 2004 Update. World Health Organization: Geneva, 2008.
- WRIGHT, F. L.; RODGERS, R. J. On the behavioural specificity of hypophagia induced in male rats by mCPP, naltrexone, and their combination, **Psychopharmacology**, v. 231, p. 787–800, 2014.
- YADIN, E.; FRIEDMAN, E.; BRIDGER, W. H. Spontaneous alternation behavior: An animal model for obsessive-compulsive disorder? **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 40, p. 311-315, 1991.
- ZANGROSSI JR., H.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze, **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, p.1-10, 2014.
- ZHANG, L.; HU, X.; LU, L.; LI, B.; HU, X.; BU, X.; LI, H.; TANG, S.; GAO, Y.; YANG, Y.; SWEENEY, J. A.; GONG, Q.; HUANG, X. Anatomic alterations across amygdala subnuclei in medication-free patients with obsessive–compulsive disorder. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 45, p. 334–343, 2020.

ZOHAR, J.; INSEL, T. R. Obsessive-Compulsive Disorder: Psychobiological Approaches to Diagnosis, treatment, and Pathophysiology. **Biological Psychiatry**, v. 22, p. 667-687, 1987.

ZOHAR, J.; MUELLER, E. A.; INSEL, T. R.; ZOHAR-KADOUCHE, R. C.; MURPHY, D. L. Serotonergic Responsivity in Obsessive-Compulsive Disorder: Comparison of Patients and Healthy Controls, **Archives of General Psychiatry**, v. 44, p. 946-951, 1987.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da meta-clorofenilpiperazina (mCPP) sobre a autolimpeza e alternância espontânea em ratos: influências do sexo e do ciclo estral", protocolada sob o CEUA nº 6139080419 (ID 001254), sob a responsabilidade de **Amanda Ribeiro de Oliveira e equipe; Leticia Mitsuko Taguchi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 26/06/2019.

We certify that the proposal "Effects of meta-chlorophenylpiperazine (mCPP) on grooming and spontaneous alternation in rats: influences of sex and the estral cycle", utilizing 288 Heterogenics rats (96 males and 192 females), protocol number CEUA 6139080419 (ID 001254), under the responsibility of **Amanda Ribeiro de Oliveira and team; Leticia Mitsuko Taguchi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 06/26/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2019** a **10/2021** Área: **Psicologia**

Origem:	Biotério Central da UFSCar	sexo:	Machos	idade:	60 a 90 dias	N:	96
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	250 a 300 g		
Linhagem:	Wistar						
Origem:	Biotério Central da UFSCar	sexo:	Fêmeas	idade:	60 a 90 dias	N:	192
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	250 a 300 g		
Linhagem:	Wistar						

Local do experimento: Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA) - DPsi

São Carlos, 26 de junho de 2019

Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos