



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal
Laboratório de Neurociências e Comportamento

**Caracterização da Inibição por Pré-pulso em Primatas
Não-Humanos (*Sapajus* spp.) e Avaliação dos Efeitos da
Dizocilpina e Canabidiol na Modulação do
Filtro Sensório-motor**

Patrícia Grandizoli Saletti

Brasília, 2015



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal
Laboratório de Neurociências e Comportamento

**Caracterização da Inibição por Pré-pulso em Primatas
Não-Humanos (*Sapajus* spp.) e Avaliação dos Efeitos da
Dizocilpina e Canabidiol na Modulação do
Filtro Sensório-motor**

Patrícia Grandizoli Saletti

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Biologia Animal (Neurociências).

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Bezerra Tomaz
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior

Brasília, 2015

Patrícia Grandizoli Saletti

**Caracterização da Inibição por Pré-pulso em Primatas Não-Humanos
(*Sapajus* spp.) e Avaliação dos Efeitos da Dizocilpina e Canabidiol na
Modulação do Filtro Sensório-motor**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília.

Aprovada em: 10 de agosto de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Alberto Bezerra Tomaz (Presidente)
Universidade de Brasília

Prof^a. Dr^a. Regina Cláudia Barbosa da Silva
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Joaquim Pereira Brasil Neto
Universidade de Brasília

Prof^a. Dr^a. Marília Barros
Universidade de Brasília

Prof^a. Dr^a. Márcia Renata Mortari
Universidade de Brasília

Prof^a. Dr^a. Vania Maria Moraes Ferreira (Suplente)
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Tomaz e ao meu coorientador Prof. Dr. Rafael Souto Maior por todos os ensinamentos, discussões e principalmente pelo apoio durante todos esses anos;

Aos professores Dr. Hisao Nishijo, Dr. Etsuro Hori, Dra. Clotilde Tavares, Dr. Renato Malcher-Lopes, Dr. Ricardo Myasaka, Dr. Valdir Pessoa, Dra. Vânia Ferreira, Dra. Concepta Pimentel, Dra. Marília Barros, Dra. Márcia Mortari, Dra. Regina Cláudia da Silva e Dr. Joaquim Brasil Neto pelas considerações e sugestões que tanto acrescentaram ao trabalho;

Aos meus colegas do Laboratório de Neurociências e Comportamento em especial Renata Duarte, Rosângela Correa, Eduardo Gutierrez, Natália Gonczarowska, Mariana Jacobsen por todas as nossas discussões sobre neurociências em momentos alegres e nos difíceis também.

Aos alunos de graduação Priscila Medeiros, Vanessa Ferreira, Matheus Teles, José Antônio Fiorote, Ana Claudia Lopes, Ana Beatriz dos Santos, Lyssa Utida e Marina Komatsu pela ajuda na coleta de dados;

Ao Sr. Alexis Souto Maior pela paciência em fazer e refazer o aparato experimental;

A todos do Centro de Primatologia pelo cuidado com os animais e principalmente pela ajuda durante o experimento, aos tratadores Geinaldo da Silva e Almir Araújo, e aos veterinários Cecília Azevedo, Raimundo de Oliveira e Lucas Pereira;

Aos veterinários Danilo Teixeira e José Jivago pela ajuda na neurocirurgia e na diluição das drogas, respectivamente;

Aos meus pais, Tânia e Luiz, e ao meu irmão, Flávio, por sempre estarem ao meu lado. Ao meu marido, Tiago, por dividir comigo a paixão pela neurociência e pela paciência em me ajudar e me apoiar durante essa trajetória. Obrigada pelo apoio em todos os momentos difíceis, sem vocês eu não teria conseguido;

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Animal;

À Capes e ao CNPq pela bolsa de doutorado, à FAP/DF pelo financiamento;

A todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

“A vida sem ciência é uma espécie de morte.”
Sócrates

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| LISTA DE FIGURAS | i |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | iii |
| RESUMO | v |
| ABSTRACT | vii |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Reflexo de sobressalto | 1 |
| 1.2. Inibição por pré-pulso da resposta de sobressalto | 2 |
| 1.2.1. Bases neuroanatômicas e neuroquímicas da IPP | 3 |
| 1.3. Colículo Superior | 8 |
| 1.4. Transtornos neurológicos com alteração na inibição por pré-pulso | 9 |
| 1.5. Esquizofrenia | 11 |
| 1.5.1. Hipóteses da Esquizofrenia | 14 |
| 1.5.2. Modelos farmacológicos experimentais baseados em antagonistas glutamatérgicos de NMDA | 17 |
| 1.5.3. Tratamento Farmacológico da Esquizofrenia | 22 |
| 1.5.4. O Papel do Sistema Endocanabinoide na Esquizofrenia | 24 |
| 1.5.5. Canabidiol (CBD) | 27 |
| 1.6. Primatas como modelo experimental em pesquisas biomédicas | 29 |
| 2. OBJETIVOS | 33 |
| 2.1. Objetivos gerais: | 33 |
| 2.2. Objetivos específicos: | 33 |
| 2.2.1. Estudo 1 | 33 |
| 2.2.2. Estudo 2 | 33 |
| 3. ESTUDO 1 | 35 |
| 3.1. Objetivo | 35 |
| 3.2. Materiais e Método | 35 |
| 3.2.1. Sujeitos | 37 |
| 3.2.2. Procedimento | 37 |
| 3.2.3. Análise estatística | 46 |
| 3.3. Resultados | 47 |
| 3.4. Discussão | 54 |
| 3.5. Conclusão | 57 |

| | |
|--------------------------------------|------------|
| 4. ESTUDO 2 | 58 |
| 4.1. Objetivo | 58 |
| 4.2. Materiais e Método | 58 |
| 4.2.1. Análise Estatística | 62 |
| 4.3. Resultados | 63 |
| 4.4. Discussão | 72 |
| 4.5. Conclusão | 77 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 78 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 79 |
| ANEXO | 108 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquematização de possíveis alterações no reflexo de sobressalto | 2 |
| Figura 2. Circuitos neurais envolvidos nas respostas de sobressalto acústico e inibição por pré-pulso | 5 |
| Figura 3. Representação das vias dopaminérgicas no sistema nervoso central | 14 |
| Figura 4. Indivíduo jovem de <i>Sapajus</i> spp. | 30 |
| Figura 5. Centro de Primatologia/ UnB | 36 |
| Figura 6. Vista frontal de um dos viveiros | 36 |
| Figura 7. Sala de teste com isolamento acústico | 38 |
| Figura 8. Fêmea de <i>Sapajus</i> em fase inicial de condicionamento | 40 |
| Figura 9. Cadeira de restrição para macaco-prego | 41 |
| Figura 10. Acelerômetro | 42 |
| Figura 11. Representação esquemática do teste da amplitude da resposta de sobressalto | 43 |
| Figura 12. Representação esquemática do teste da inibição por pré-pulso da resposta de sobressalto | 44 |
| Figura 13. Representação esquemática do teste de inibição por pré-pulso com animais dos grupos LCS, CF, CTRL | 45 |
| Figura 14. Ressonância magnética | 46 |
| Figura 15. Média da amplitude da resposta de sobressalto para cada intensidade de estímulo | 48 |
| Figura 16. Média da amplitude de resposta de sobressalto para cada bloco de apresentação de estímulos | 49 |
| Figura 17. Média da amplitude de resposta de sobressalto para cada situação experimental | 50 |
| Figura 18. Porcentagem de inibição da resposta de sobressalto provocada pelo pré-pulso em diferentes intervalos | 51 |
| Figura 19. Média da amplitude de resposta de sobressalto para cada bloco de apresentação de estímulos | 52 |
| Figura 20. Porcentagem de inibição de cada grupo experimental | 53 |
| Figura 21. Média da amplitude de resposta de sobressalto para cada bloco de apresentação de estímulos | 54 |
| Figura 22. Representação esquemática do experimento 1 | 60 |
| Figura 23. Representação esquemática do experimento 2 | 61 |

| | |
|---|----|
| Figura 24. Representação esquemática dos procedimentos experimentais do experimento 3 | 62 |
| Figura 25. Mediana da porcentagem de inibição para cada dose de MK-801 | 64 |
| Figura 26. Média da amplitude de sobressalto | 65 |
| Figura 27. Média da porcentagem de inibição da resposta de sobressalto na 1 ^a e na 4 ^a semana de administração | 66 |
| Figura 28. Média da amplitude de sobressalto na 1 ^a e na 4 ^a semana de administração | 67 |
| Figura 29. Média da porcentagem de inibição para cada dose de CBD | 68 |
| Figura 30. Média da porcentagem de inibição da resposta de sobressalto em cada semana de administração de CBD | 69 |
| Figura 31. Média da amplitude de sobressalto | 70 |
| Figura 32. Média da porcentagem de inibição | 71 |
| Figura 33. Média da amplitude de sobressalto | 72 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|---|
| PnC | Núcleo reticular pontino caudal |
| IPP | Inibição por pré-pulso |
| ms | Milissegundos |
| dB | Decibéis |
| CI | Colículo inferior |
| CS | Colículo superior |
| PPTg | Núcleo pedunculopontino tegmental |
| CPFm | Córtex pré-frontal medial |
| COF | Córtex orbitofrontal |
| GABA | Ácido gama-aminobutírico |
| PV | Pálido ventral |
| MDMA | Metilenodioximetanfetamina |
| AMPA | Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| PCP | Fenciclidina |
| MK-801 | Dizocilpina |
| TDAH | Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade |
| TOC | Transtorno obsessivo compulsivo |
| THC | Δ^9 -tetraidrocannabinol |
| CBD | Canabidiol |
| MC | Matéria cinzenta |
| SNC | Sistema nervoso central |
| Am | Amígdala |
| Hip | Hipocampo |
| P | Putamen |
| Hyp | Hipófise |
| Ac | Núcleo accumbens |
| Sep | Septo pelúcido |
| SN | Substância negra |
| Th | Tálamo |
| Str | Estriado |
| C | Cerebelo |
| 5-HT | Serotonina |
| LSD | Diatilamina do ácido lisérgico |
| 5-HIAA | Ácido 5-hidroxiindolacético |
| CA ²⁺ | Cálcio |
| i.m. | Intramuscular |
| i.p. | Intraperitoneal |
| ECS | Sistema endocanabinoide |
| FCE | Fluido cérebro-espinhal |
| 2-AG | 2-araquidonoilglicerol |
| PEA | Palmitoiletanolamida |
| FAAH | Enzima amida hidrolase dos ácidos graxos |
| TRPV ₁ | Receptor transiente vaniloide-1 |
| mg | Miligrama |
| kg | Quilograma |
| m | Metro |
| cm | Centímetro |
| h | Hora |
| CP/UnB | Centro de Primatologia/Universidade de Brasília |

| | |
|------------|---|
| IBAMA | Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais |
| Renováveis | |
| COBEA | Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso Animal |
| LCS | Grupo com lesão no colículo superior |
| LF | Grupo lesão fictícia |
| CTRL | Grupo controle |
| IBO | Ácido ibotênico |
| PBS | Phosphate-Buffered Saline |
| VEH | Solução veículo |
| G1 | Grupo 1 |
| G2 | Grupo 2 |
| LTP | Potenciação de longa duração |

RESUMO

O reflexo de sobressalto acústico é uma resposta primitiva de defesa dos animais após um estímulo sonoro intenso e repentino. Essa resposta é inibida quando um estímulo de baixa intensidade é apresentado previamente. A inibição por pré-pulso (IPP) da resposta de sobressalto é uma maneira de mensurar o filtro sensorio-motor, mecanismo utilizado para filtrar o excesso de informação do meio. O teste de IPP é muito utilizado de forma experimental para testar déficits no filtro sensorio-motor em modelos animais. Alguns transtornos neurológicos humanos apresentam danos na resposta de IPP, como por exemplo a esquizofrenia, devido a déficits no funcionamento do filtro sensorio-motor comuns em pacientes com esse transtorno. Algumas drogas podem ser utilizadas para gerar efeitos esquizotípicos, como antagonistas de receptores glutamatérgicos NMDA. Sabe-se que essas drogas causam déficits no teste de IPP em roedores. Com a validação de um protocolo experimental que envolve a resposta de IPP é possível realizar testes de substâncias que provocam efeitos esquizotípicos, bem como substâncias que apresentam características antipsicóticas. Geralmente os animais utilizados como modelos de esquizofrenia são roedores e poucos estudos tem sido realizados para avaliar o efeito de substâncias no teste de IPP em primatas não-humanos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um teste de IPP para ser utilizado em macacos-pregos (*Sapajus* spp.). Além disso, objetivou-se avaliar o papel do colículo superior na resposta de IPP e testar os efeitos de dois fármacos, a dizocilpina (MK-801) e o canabidiol na medida de IPP desses primatas. Para isso, esse trabalho foi dividido em dois estudos. O estudo 1 avaliou a resposta de IPP em oito macacos-pregos utilizando um protocolo experimental que mensura o movimento do corpo do animal. Após essa primeira análise, dois animais com lesão no colículo superior, dois animais submetidos à lesão fictícia e os oito macacos acima citados foram testados nesse protocolo para que fosse identificada alguma alteração na resposta de IPP. Os resultados do primeiro estudo mostraram que o gênero *Sapajus* segue o mesmo padrão de resposta de IPP que outros primatas não-humanos. Observamos que as intensidades de 115 dB e 80 dB foram suficientes para gerar sobressalto e inibir essa resposta, respectivamente. Além disso, observamos que o intervalo entre os dois estímulos apresentados que melhor inibiu a resposta de sobressalto foi o de 120 ms. Os animais com lesão no colículo superior apresentaram uma tendência a diminuição da IPP corroborando estudos realizados em roedores, que indicam participação dessa estrutura cerebral na via neural da IPP. O estudo 2 foi realizado para determinar os efeitos do MK-

801 e do canabidiol na resposta de IPP em primatas não-humanos. Novamente, oito macacos-pregos foram submetidos ao teste após administrações das drogas. O MK-801 foi administrado em três diferentes doses (0,01; 0,02; 0,03 mg/kg) antes do teste de IPP. Após algumas semanas os animais foram submetidos ao teste após o tratamento com canabidiol também em três doses (15, 30, 60 mg/kg). Posteriormente, os animais receberam MK-801 por quatro semanas consecutivas e foram expostos ao teste de IPP. Na quarta semana, além do MK-801, os animais foram pré-tratados com canabidiol e submetidos ao teste de IPP. Os resultados do estudo 2 mostraram que a MK-801, na maior dose testada diminuiu a resposta de IPP nos macacos de forma aguda. Entretanto, ao contrário do que é observado em roedores, a administração repetida do MK-801, concomitantemente ao teste de IPP, gerou uma interação droga-treino que reverteu o efeito inicial gerado pelo MK-801. Devido a isso, não foi possível detectar efeito antipsicótico do canabidiol. Porém, corroborando estudos prévios realizados em roedores, o canabidiol isoladamente não alterou a resposta de IPP dos macacos-pregos. Concluimos assim, que animais do gênero *Sapajus* são bons modelos experimentais para o teste de IPP e que o MK-801 pode ser utilizado para gerar déficits de IPP de forma aguda nesses animais para avaliação de antipsicóticos. O processo de habituação observado nos animais indica que efeitos adversos do MK-801, como prejuízo no filtro sensorio-motor, podem ser reduzidos pela tolerância e pela familiarização ao teste de IPP. Ademais foi possível identificar diferenças neurofarmacológicas entre roedores e primatas e a importância desses animais para pesquisas básicas e testes pré-clínicos.

Palavras chave: Inibição por pré-pulso, Primatas, Esquizofrenia, MK-801, CBD

ABSTRACT

The acoustic startle reflex is a primitive defense response in animals that occurs after an intense and sudden acoustic stimulus. This response can be inhibited when a low stimulus is presented previously. The prepulse inhibition (PPI) of the startle response is a useful way to measure sensorimotor gating mechanisms. This mechanism protects against an excess of information. PPI test is widely used experimentally to test deficits in sensorimotor gating in animal models. PPI deficits are commonly observed in some human neurological disorders, such as schizophrenia, due to damage in sensorimotor gating caused by cognitive deficits. Some drugs can be used to induce schizophrenic-like effects, such as NMDA receptor antagonists. These drugs induce deficits in PPI response in rodents. Validation of an experimental protocol on PPI response makes it possible to perform tests on substances that cause schizophrenic-like effects, as well as compounds with antipsychotic properties. Studies usually employ rodents as experimental models of schizophrenia and only few studies have been performed with nonhuman primates to test pharmacological effects in the PPI paradigm. Thus, the present study aimed to develop a PPI test to be applied in capuchin monkeys (*Sapajus* spp.) to evaluate the role of the superior colliculus in PPI response and test the effects of two drugs in these animals: dizocilpine (MK-801) and cannabidiol. Therefore, two studies were conducted. The first study characterized the PPI response of eight capuchin monkeys using a whole-body prepulse inhibition protocol. After that, two animals with superior colliculus (SC) lesion, two SC sham lesion and the eight monkeys cited above were tested to evaluate the role of this brain structure in the PPI response. Results showed that *Sapajus* follows the same PPI pattern as other nonhuman primates. The intensities of 115 dB and 80 dB were sufficient to induce a startle response and to inhibit this response, respectively. We also observed that 120 ms was the best interstimuli interval for PPI. Animals with superior colliculus lesion showed a downward tendency of PPI response, corroborating studies in rodents that indicate a participation of this brain structure in the neural pathway of PPI. The second study was conducted to determine the effects of MK-801 and cannabidiol on nonhuman primates' PPI response. MK-801 was administered in three different doses (0.01; 0.02; 0.03 mg/kg) before the PPI assay. After a few weeks, the animals were submitted to PPI test after receiving cannabidiol also in three doses (15, 30, 60 mg/kg). Subsequently, animals received MK-801 during four consecutive weeks and were then exposed to the PPI test. On the fourth week, subjects were pre-treated with cannabidiol before the MK-801 administration and then the PPI test was performed. Results from the second study demonstrated that MK-801, at the dose of 0.03 mg/kg, decreased the PPI

response of an acute administration. However, repeated administration of MK-801 throughout the PPI test induced a drug-training interaction that reversed the effects of MK-801 on PPI disruption, unlike reports in rodents. As such it was not possible to detect an antipsychotic effect for cannabidiol. However, cannabidiol alone did not change the PPI response in the capuchin monkeys, corroborating previous studies in rodents. Therefore, we conclude that capuchin monkeys are useful experimental models to test PPI response. Moreover, MK-801 can be used to induce PPI deficits in this species. The habituation process observed in our study indicates that the adverse effects of MK-801, as sensorimotor gating impairments, may be reduced by MK-801 tolerance effect such as after familiarization with the PPI test. Furthermore, our results underscore neuropharmacological differences between rodents and nonhuman primates and the importance of primates in basic research and preclinical assays.

Keywords: Prepulse inhibition, Primates, Schizophrenia, MK-801, CBD

1. INTRODUÇÃO

1.1. Reflexo de sobressalto

Um dos principais desafios na área da neurociência comportamental é desenvolver índices comportamentais de emoção e atenção que possam ser medidos em várias espécies de animais. Um comportamento que preenche os critérios necessários para uma forma objetiva de mensuração é o reflexo de sobressalto provocado por um estímulo acústico (Winslow *et al.*, 2002).

O reflexo de sobressalto é uma resposta primitiva de proteção dos animais a um estímulo intenso e repentino. Segundo Davis *et al.* (1982), o reflexo de sobressalto é considerado um bom modelo de estudo da análise de mecanismos neurais de mudanças comportamentais, pois possui um circuito relativamente simples. O *input* acústico entra pelo núcleo coclear, que pertence à via auditiva primária. Apenas após a intensidade do estímulo acústico ultrapassar o limiar de 80 dB, a informação é transmitida para o núcleo tegmental ventro-lateral e para o núcleo reticular pontino caudal (PnC). O PnC é um dos núcleos mais inferiores do tronco cerebral e tem projeções diretas para os neurônios motores que dão origem ao reflexo de sobressalto (Davis *et al.*, 1982; Bosch & Schmid, 2006).

A resposta de sobressalto pode ser provocada por um estímulo suficientemente súbito e intenso para várias modalidades sensoriais (visuais, táteis ou auditivas) e é considerada uma resposta aversiva ou defensiva do indivíduo. O reflexo de sobressalto ocasionado por um estímulo acústico provoca uma rápida contração dos músculos da face e do corpo (Lang *et al.*, 1990; Braff *et al.*, 2001a).

O reflexo de sobressalto acústico pode ser utilizado como um modelo experimental para o estudo de sensibilização, habituação, inibição por pré-pulso, sobressalto potencializado pelo medo, bem como para testar os efeitos de drogas no comportamento (Li *et al.*, 1998; Koch, 1999; Winslow *et al.*, 2002, 2007). A sensibilização pode ser entendida como o aumento de uma resposta após sucessivas apresentações de um forte estímulo (Figura 1A), ao passo que

a habituação diz respeito ao fenômeno de diminuição da resposta comportamental a um estímulo após algumas tentativas (Figura 1B). A resposta de sobressalto pode ser aumentada quando o reflexo é provocado em uma situação na qual esteja relacionado a uma condição de medo, ou seja, quando condicionado a um estímulo aversivo. Essa situação é conhecida como sobressalto potencializado pelo medo (Figura 1C). Por outro lado, a resposta de sobressalto pode ser minimizada quando o reflexo ocorrer logo após um estímulo de intensidade mais fraca, a inibição por pré-pulso (Figura 1D) (Davis *et al.*, 2008).

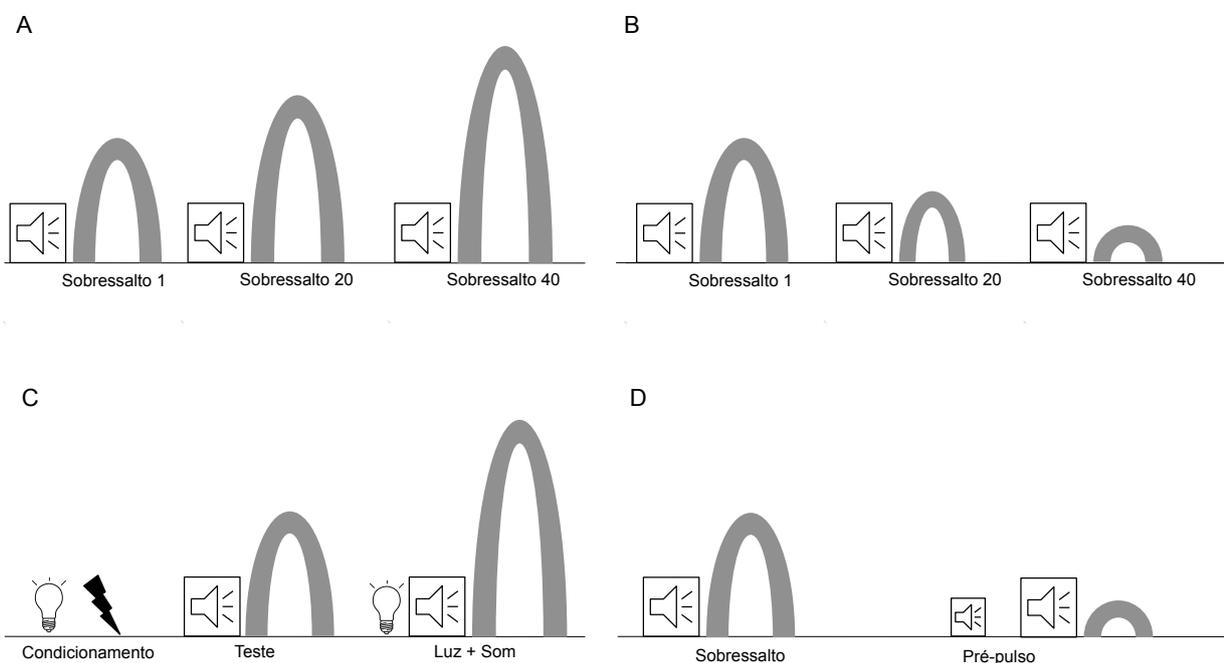


Figura 1. Esquematização de possíveis alterações no reflexo de sobressalto. A. Sensibilização; B. Habituação; C. Sobressalto potencializado pelo medo; D. Inibição por pré-pulso (modificado de Koch, 1999).

1.2. Inibição por pré-pulso da resposta de sobressalto

A inibição por pré-pulso (IPP - do inglês *Prepulse inhibition* - PPI) da resposta de sobressalto é a redução dessa resposta quando previamente gerado um estímulo sensorial de menor intensidade, o chamado pré-pulso, em um intervalo de tempo específico (Braff *et al.*, 2001b). IPP é uma forma bem estabelecida de mensurar a modulação do filtro sensorial-motor

(Li *et al.*, 1998). A presença do pré-pulso ativa mecanismos que inibem o processamento do pulso. Inibindo o processamento sensorial ele evita um excesso de informação (Graham, 1975).

Kohl *et al.*, (2013) enumera algumas vantagens do teste de IPP: (1) é um paradigma aplicável em estudos translacionais, pois a IPP ocorre em todos os mamíferos, incluindo primatas; (2) independente da motivação do sujeito é possível realizar a mensuração; e (3) a resposta de sobressalto é sensível a manipulações sensoriais, cognitivas e farmacológicas, o que possibilita uma ampla variedade de pesquisas.

A resposta de IPP depende de algumas variáveis relacionadas ao estímulo: intensidade, duração, frequência e associação entre diferentes estímulos Winslow *et al.* (2002). Alguns estudos foram realizados utilizando intervalos de tempo diferentes, determinando, assim, qual o melhor intervalo entre o pré-pulso e o pulso para que ocorra a inibição do sobressalto. Para humanos e primatas do gênero *Macaca*, o intervalo de tempo ideal encontrado foi de 120 ms (Winslow *et al.*, 2002; Dahmen & Corr, 2004). Além disso, a intensidade do estímulo utilizado também deve ser considerada. (Winslow *et al.*, 2002) demonstraram que pulsos gerados com intensidades entre 100 e 120 dB são eficientes para provocar resposta de sobressalto, no entanto o pulso de 115 dB é o mais eficiente para estudos com *Macaca*. O pré-pulso com intensidade de 80 dB foi eficaz para inibir a resposta de sobressalto no gênero acima mencionado. Em contrapartida, em humanos, essa intensidade provocou resposta de sobressalto em 50% dos testes, além dos sujeitos experimentais terem se habituado ao som após algumas tentativas (Dahmen & Corr, 2004). Esses experimentos mostram a importância de haver cautela na escolha da intensidade do estímulo e do intervalo entre os estímulos para cada espécie estudada.

1.2.1. Bases neuroanatômicas e neuroquímicas da IPP

O mesencéfalo é uma região crítica para a inibição por pré-pulso da resposta de sobressalto (Li *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2005; Yeomans *et al.*, 2006). A IPP de estímulos acústicos é desencadeada pelo *input* excitatório da via auditiva para o colículo inferior (CI) no

mesencéfalo. O CI, por sua vez, ativa o colículo superior (CS), que apresenta projeções para o núcleo pedunculopontino tegmental (PPTg), que inibe o PnC. A inibição do PnC provoca uma infrarregulação da resposta de sobressalto, ou seja, o efeito mensurável da IPP (Koch & Schnitzler, 1997). O CI parece ser particularmente importante para a supressão da resposta de sobressalto na presença do pré-pulso (Leitner & Cohen, 1985; Li *et al.*, 1998). Como observado por Silva *et al.*, (2005), a estimulação elétrica do CI diminui a percepção do som, que pode reduzir a percepção do pré-pulso e conseqüentemente diminuir a resposta de IPP. O CS desempenha um importante papel na articulação entre a informações de diferentes modalidades sensoriais e na transferência de informação para o PPTg, tornando-o uma relevante estrutura na resposta de IPP. Fendt *et al.*, (1994) identificaram a participação do CS na inibição da resposta de sobressalto acústico em ratos. Os autores observaram uma redução, mas não bloqueio total, na resposta de inibição por pré-pulso nesses animais. A ausência do bloqueio pode ter ocorrido porque nem todas as camadas do CS estão envolvidas diretamente com a IPP de estímulos acústicos (Yeomans *et al.*, 2006).

Problemas na comunicação entre o sistema límbico e os núcleos da base podem levar ao déficit de IPP (Swerdlow *et al.*, 1992). O núcleo accumbens parece ser uma estrutura importante na redução de IPP. Do mesmo modo, manipulações no hipocampo, amígdala basolateral e disfunções no córtex medial pré-frontal e no córtex orbitofrontal podem alterar respostas de IPP (para revisão veja Kohl *et al.*, 2013). A figura 2 resume esses circuitos relacionados às respostas de sobressalto e IPP.

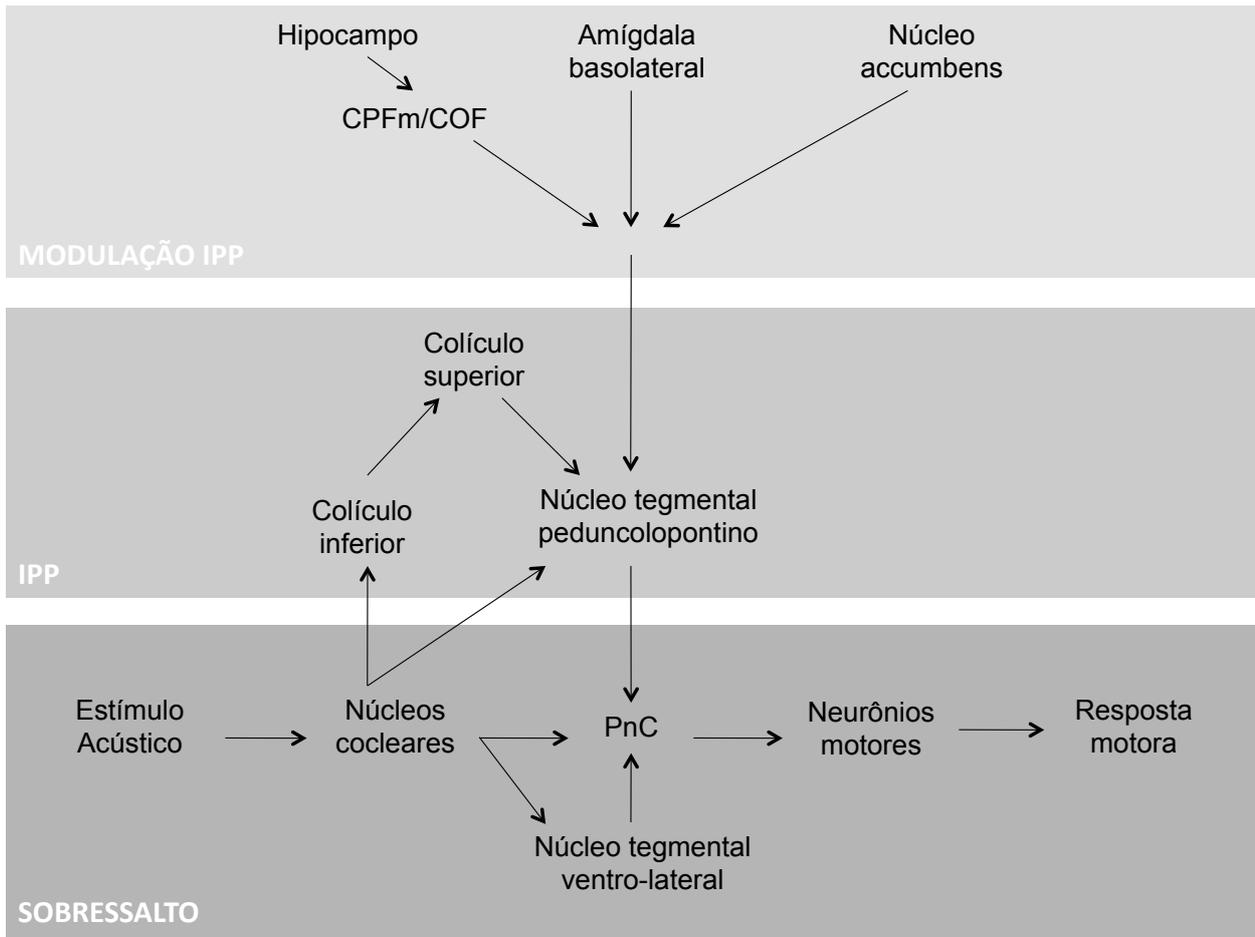


Figura 2. Circuitos neurais envolvidos nas respostas de sobressalto acústico e inibição por pré-pulso (CPFm – córtex pré-frontal medial; COF – córtex orbitofrontal; PnC – núcleo reticular pontino caudal; modificado de Kohl *et al.* (2013).

Vários estudos identificaram algumas vias neurotransmissoras envolvidas na IPP. A função da dopamina na resposta de IPP pode ser comprovada pela grande quantidade de estudos demonstrando que diversos psicoestimulantes agonistas dopaminérgicos como, por exemplo, anfetaminas, apomorfina, quinpirole e cocaína, prejudicam a IPP em roedores (Druhan *et al.*, 1998; Byrnes & Hammer, 2000; Feifel *et al.*, 2002; Culm & Hammer, 2004; Satake *et al.*, 2012). No mesmo sentido, drogas antipsicóticas antagonistas de receptores dopaminérgicos são capazes de reverter esse dano (Rigdon & Viik, 1991; Swerdlow *et al.*, 1991; Hoffman & Donovan, 1994; Cáceda *et al.*, 2012). A excessiva atividade de receptores dopaminérgicos do tipo D₂ na via mesoaccumbens provoca redução na resposta de IPP (Koch, 1999). O aumento dopaminérgico no núcleo accumbens provoca uma redução na liberação de

neurotransmissores GABA (ácido gama-aminobutírico) para o pálido ventral (PV) (Kretschmer & Koch, 1998). O PV tem como uma das funções a regulação tônica no PPTg (Fendt *et al.*, 2001), importante estrutura relacionada com a IPP, como citado anteriormente (veja figura 2).

Os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico podem apresentar interações recíprocas em função de projeções do *locus coeruleus* e núcleo da rafe dorsal, e também estão envolvidos com a resposta de IPP (Koch, 1999; Geyer *et al.*, 2001; Baisley *et al.*, 2012). O sistema noradrenérgico possui três tipos de receptores: α_1 , α_2 , β . A estimulação de receptores α_1 e β provocam déficits de IPP e, conseqüentemente, antagonistas desses receptores revertem a resposta (Alsene *et al.*, 2006, 2010, 2011). Foi observado em ratos que agonistas dos receptores serotoninérgicos dos tipos 5-HT_{1A} e 1B induziram uma diminuição da resposta de IPP (Rigdon & Weatherspoon, 1992; Dulawa *et al.*, 1997, 1998). Por outro lado, em camundongos, a ativação de receptores 5-HT_{1A} por agonistas causou um aumento na resposta de IPP (Dulawa *et al.*, 1997, 1998, 2000). Já receptores 5-HT_{2A} parecem estar envolvidos com déficit de IPP, isso porque agonistas de 5-HT_{2A} provocam prejuízos na IPP, ao passo que antagonistas revertem este efeito (Geyer *et al.*, 2001).

Em humanos, alguns resultados diferentes de roedores foram encontrados. O agonista de 5-HT metilendioximetanfetamina (MDMA) e o alucinógeno agonista de 5-HT_{1A/2} psilobicina causaram um aumento na resposta de IPP. Sugere-se que essas drogas, por terem afinidade pelo receptor 5-HT_{1A}, podem causar o aumento de IPP em humanos pela ativação desse receptor específico, como foi observado em camundongo, mas não em ratos (para revisão veja Geyer *et al.*, 2001).

O sistema glutamatérgico está fortemente relacionado a alterações na resposta de IPP. Antagonistas não-competitivos do receptor glutamatérgico NMDA (N-metil D-aspartato), como a fenciclidina (PCP), quetamina e a dizocilpina (MK-801) provocam déficits na IPP tanto em roedores, quanto em primatas (Geyer & Mansbach, 1989; Mansbach & Geyer, 1991; Javitt & Lindsley, 2001; Linn & Javitt, 2001; Schulz *et al.* 2001; Linn *et al.*, 2003; Long *et al.*, 2006). Deutsch *et al.* (2001) propôs que os antagonistas não-competitivos de NMDA, ao bloquearem esse receptor, levam à estimulação de receptores glutamatérgicos não-NMDA como o alfa-

amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e cainato por meio da redução da estimulação em interneurônios GABAérgicos e por consequência desinibição de neurônios glutamatérgicos.

A PCP e o MK-801 são os antagonistas de NMDA mais utilizados em experimentos de IPP com animais. Estudos com quetamina mostram resultados controversos, tanto com roedores, quanto com humanos, em relação a sua eficácia em prejudicar a resposta de IPP em doses subanestésicas (Geyer *et al.*, 2001).

Com o objetivo de identificar o substrato neural responsável por mediar o efeito de diminuição da IPP causado por antagonistas de NMDA, Bakshi & Geyer (1998) realizaram vários testes com MK-801 em ratos. Os autores injetaram MK-801 em seis estruturas cerebrais e observaram déficit na IPP quando administrado na amígdala, hipocampo dorsal, além de uma tendência à diminuição quando injetado no córtex medial pré-frontal. Nenhuma alteração na IPP foi encontrada no núcleo accumbens, hipocampo ventral e tálamo dorsomedial, embora já tenha sido observada que a injeção intra-accumbens de MK-801 aumenta a IPP (Reijmers *et al.*, 1995).

Sabe-se que os antagonistas não-competitivos de NMDA provocam redução na resposta de IPP após administração sistêmica. Este dano na IPP, entretanto, não é revertido por antipsicóticos típicos (antagonistas de dopamina), como o haloperidol (Keith *et al.*, 1991; Linn *et al.*, 2003). Por outro lado, o resultado é positivo quando administrados antipsicóticos atípicos, como o clozapina (Bakshi *et al.*, 1994; Linn *et al.*, 2003; Lipina *et al.*, 2005), por antagonistas do receptor α_1 , por inibidores da síntese de óxido nítrico (Johansson *et al.* 1997) e por canabinoides derivados da *Cannabis*, como o canabidiol (Long *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2014).

Percebe-se, portanto, que várias vias farmacológicas afetam a resposta de IPP. Estudos com substâncias que alteram a resposta de IPP em modelos animais e seres humanos auxiliam a compreensão dos mecanismos neuroquímicos envolvidos nesse comportamento.

1.3. Colículo Superior

O CS é uma estrutura cerebral localizada na região mesencefálica e é um importante centro de integração sensório-motora que recebe informações visuais, auditivas, somatossensoriais e uma variedade de informações de áreas corticais e subcorticais. O CS é uma estrutura dividida em camadas (Kaas & Huerta, 1988). Foram identificadas sete camadas sendo as mais dorsais consideradas como superficiais, são elas: *stratum zonale*, *stratum griseum superficiale* e *stratum opticum*. Duas são intermediárias: *stratum griseum intermedium* e *stratum album intermedium*. Finalmente, as mais ventrais são as duas profundas: *stratum griseum profundum* e *stratum album profundum*.

As células nervosas das camadas superficiais estão envolvidas exclusivamente com a visão (Stein *et al.*, 1975), incluindo detecção de movimento e alterações no iluminante (Kadoya *et al.*, 1971). Essas células recebem informações da retina e se projetam para o núcleo geniculado lateral e para a parte inferior do complexo pulvinar látero-posterior (Benevento & Rezak 1975; Glendenning *et al.*, 1975; Harting & Van Lieshout 1991; Harting *et al.*, 1991; Stepniewska *et al.*, 2000). Conexões entre as camadas superficiais e as camadas profundas aparentemente fornecem uma via rápida para orientação de movimento da cabeça e dos movimentos sacádicos dos olhos (Isa 2002; Doubell *et al.*, 2003).

As camadas profundas do CS, por sua vez, contêm apenas células não-visuais, as camadas intermediárias apresentam uma sobreposição multimodal, ou seja, nessas camadas são encontradas células visuais, somáticas e auditivas (Stein *et al.*, 1975). As camadas profundas estão envolvidas com comportamentos motores relacionados a comportamentos de defesa (Isbell, 2006; Maior *et al.*, 2011, 2012). Neurônios das camadas profundas fazem conexões com a matéria cinzenta periaquedutal e com o núcleo cuneiforme, áreas que estão associadas a respostas motoras, bem como com o núcleo tegmental pedunculopontino (Vianna & Brandão, 2003; Yeomans *et al.*, 2006). Além disso, essas camadas estão envolvidas com mudanças no foco de atenção (Ignashchenkova *et al.*, 2004).

A alteração no foco de atenção em primatas está relacionada com conexões entre as camadas profundas do colículo superior e o pulvinar dorsal, os campos visuais frontais e a substância negra, na porção ventral do mesencéfalo (Fries, 1984; Helminski & Segraves, 2003). Essas conexões fornecem um curto sinal que permite mamíferos interromperem certas atividades e assim redirecionarem a atenção para um estímulo imprevisível (Comoli *et al.* 2003).

1.4. Transtornos neurológicos com alteração na inibição por pré-pulso

Sabe-se que existe uma alteração na resposta de IPP em pacientes com alguns distúrbios neurológicos. Essa alteração pode estar associada a um dano nos processos de integração sensório-motora desses pacientes.

A Síndrome de Tourette é um transtorno neuropsiquiátrico caracterizado por diversos tiques físicos e vocais. Castellanos *et al.*, (1996) realizaram um estudo com crianças diagnosticadas com Tourette, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e crianças diagnosticadas com as duas síndromes, Tourette e TDAH. Os autores identificaram que as crianças com síndrome de Tourette, independente da presença de TDAH apresentavam prejuízos na resposta de IPP. Do mesmo modo, Swerdlow *et al.* (2001b) observaram que, embora as crianças com síndrome de Tourette apresentassem magnitude e habituação da resposta de sobressalto normal, elas apresentaram uma diminuição da resposta de IPP quando comparadas aos controles. Ainda não se sabe se a alteração da IPP se deve a uma maior imaturidade neurológica dos sujeitos ou a uma deficiência na inibição do pálido (Castellanos *et al.*, 1996; Kohl *et al.*, 2013).

Blefaroespasma é uma doença caracterizada por uma excitabilidade anormal dos músculos da pálpebra (Berardelli *et al.*, 1985). Essa disfunção está associada a problemas no controle exercido pelos núcleos da base na excitação de interneurônios do tronco encefálico do circuito do trigêmeo facial (Gómez-Wong *et al.*, 1998). Essa falha no controle dos núcleos da base também gera uma alteração na resposta de IPP.

Pacientes com Transtorno do Pânico também apresentaram déficits na resposta de IPP, além de uma redução na habituação quando comparados com controle (Ludewig *et al.*, 2002) e exibiram maior reatividade da resposta de sobressalto quando não medicados (Ludewig *et al.*, 2005). Não se tem certeza quais as bases anatômicas de IPP deficientes em transtornos de ansiedade, porém sabe-se que o circuito que modula a IPP (circuito córtico-estriado-pálido-pontino) está envolvido com comportamentos de medo em pacientes com transtorno do pânico (Ludewig *et al.*, 2005).

O Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC) integra os distúrbios de ansiedade e se caracteriza por comportamentos recorrentes de compulsões e obsessões e também apresenta déficits na resposta de IPP (Swerdlow *et al.*, 1993; Hoenig *et al.*, 2005; Ahmari *et al.*, 2012). Pacientes com TOC, com histórico de tiques, podem ter maior comprometimento na modulação do filtro sensório-motor do que pacientes que não apresentam tiques (Ahmari *et al.*, 2012), o que explica o déficit de IPP.

Pacientes com Transtorno Bipolar também foram testados para identificar alterações na resposta de IPP, porém os resultados são bastante contraditórios. Perry *et al.*, (2001) encontrou uma redução na IPP em paciente com mania recorrente e características psicóticas. Barrett *et al.*, (2005) estudaram a resposta de IPP em pacientes na fase de eutimia e não encontraram diferença de comportamento quando comparados com controles. Este resultado pode ser explicado porque a disfunção sensório-motora em pacientes com transtorno bipolar pode depender da fase em que se encontram e a redução transitória da IPP pode ser alterada pela transmissão noradrenérgica (Barrett *et al.*, 2005). Já em outro estudo pacientes na fase de mania foram testados e não foi encontrada diferença da resposta de IPP (Carroll *et al.*, 2007). Nesse estudo, apenas um dos 14 sujeitos com mania apresentava psicose o que pode explicar a diferença de resultado com o primeiro estudo. Assim, é possível que a alteração na resposta de IPP no transtorno bipolar esteja correlacionado com presença de psicose nos pacientes (Kohl *et al.*, 2013).

Vários estudos já demonstraram que pacientes com esquizofrenia apresentam uma resposta de sobressalto maior do que pacientes saudáveis quando o estímulo é apresentado

com um pré-pulso, ou seja apresentam uma diminuição da resposta de IPP (Grillon *et al.*, 1992; Judd *et al.*, 1992; Kumari *et al.*, 1999; Weike *et al.*, 2000; Braff *et al.*, 2001a). Além disso, diversos estudos com modelos animais identificaram que drogas que geram efeitos esquizotípicos diminuem a resposta de IPP, tanto em roedores, quanto em primatas não-humanos e fármacos antipsicóticos revertem esse efeito (Swerdlow & Geyer, 1993; Javitt & Lindsley, 2001; Linn & Javitt, 2001; Linn *et al.*, 2003; López-Gil *et al.*, 2007). Essa redução na IPP se dá em função do acentuado déficit no processamento de informações na esquizofrenia (Braff *et al.*, 1978).

1.5. Esquizofrenia

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico cujos sintomas estão relacionados a quadros psicóticos que se iniciam ao final da adolescência e apresenta alta prevalência na população mundial, aproximadamente quatro casos para cada mil pessoas. A incidência é em torno de 1,4 vezes maior em homens do que em mulheres. Uma possível explicação para isso é o fato do estrógeno ser um hormônio que pode preservar a plasticidade sináptica, possibilitando uma melhora na neurotransmissão e protegendo contra a neurodegeneração, além de melhorar a cognição (Seeman, 2013). A prevalência dessa doença é maior em populações urbanas do que em rurais, bem como em imigrantes. Além disso, evidências indicam que a prevalência é mais alta em países desenvolvidos do que nos em desenvolvimento. No entanto, a esquizofrenia aparece com mais frequência em populações de classes sócio-econômicas mais baixas do que nas mais altas em uma mesma comunidade (para revisão veja Tandon *et al.*, 2008).

A esquizofrenia se caracteriza por dois diferentes tipos de sintomas: positivos e negativos (Crow, 1980). Os sintomas positivos caracterizam-se por alucinações, delírios, desordens de pensamento e fala. Já os sintomas negativos incluem, principalmente, embotamento afetivo, pobreza de fala e falta de iniciativa. Existem também na esquizofrenia sintomas relacionados a déficits cognitivos, os quais se sobrepõe aos sintomas negativos e se

caracterizam principalmente pela dificuldade de processar informações, déficit de atenção, incoerência na fala e déficits de memória.

Aparentemente a esquizofrenia tem um forte fator poligênico (Tsuang, 2000). Diversos estudos envolvendo familiares de pacientes com esquizofrenia demonstram uma importante base genética nesse transtorno. Estudos realizados com gêmeos univitelinos e bivitelinos, primos, sobrinhos, além de filhos adotivos indicam que existe uma alta correlação entre o grau de parentesco e o índice de aparecimento da doença. A incidência desse transtorno em parentes de 3º grau chega aproximadamente a 2%, cerca de 6% em parentes de 2º grau e até 17% em parentes de 1º grau. Em gêmeos monozigóticos essa incidência é em torno de 50%. Estudos com filhos adotados mostram que o risco do aparecimento do transtorno não se relaciona aos pais adotivos (Lewis & Lieberman, 2000).

Porém, apenas a presença de genes relacionados à esquizofrenia não é suficiente para o seu aparecimento. Além de aspectos genéticos, existem também fatores de risco ambientais que influenciam o aparecimento da esquizofrenia. A desnutrição e a infecção materna durante os primeiros meses gestacionais (Meyer *et al.*, 2007; Penner & Brown, 2007), traumas físicos e psicológicos na infância, como danos na cabeça ou perda do cuidado parental, (David & Prince, 2005; Read *et al.*, 2005; Schäfer *et al.*, 2006; Morgan & Fisher, 2007) o uso de determinadas substâncias, como o Δ^9 -tetraidrocannabinol (THC) durante a adolescência (Semple *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2007) podem contribuir para o aparecimento da esquizofrenia em sujeitos com predisposição genética. Existe também uma correlação entre esquizofrenia e nascimentos no final do inverno ou início da primavera (Davies *et al.*, 2003). Não se sabe ao certo o porquê deste fenômeno, porém acredita-se que essa relação exista pela maior quantidade de complicações gestacionais e obstétricas, como as citadas acima, ocorridas nesse período do ano (Tandon *et al.*, 2008).

A esquizofrenia é uma psicopatologia de desenvolvimento neural, com menor perfusão sanguínea e metabolismo em regiões do córtex pré-frontal; desorganização citoarquitetônica cortical; redução no volume da formação hipocampal (Lewis & Lieberman, 2000).

Em indivíduos com esquizofrenia, tanto crônica quanto com apenas um episódio de surto psicótico, observa-se uma redução do volume total do cérebro (Wright *et al.*, 2000), bem como do volume intracranial (Woods *et al.*, 2005). Alteração no volume dos ventrículos também está presente (Davis *et al.*, 1998). Em pacientes com apenas um episódio psicótico, os ventrículos laterais esquerdo e direito, bem como o terceiro ventrículo apresentam aumento de volume (McCarley *et al.*, 1999). Da mesma forma, em pacientes com esquizofrenia crônica há um aumento do volume ventricular, nos ventrículos laterais esquerdo e direito, nos terceiro e quarto ventrículos (Wright *et al.*, 2000). Esse aumento dos ventrículos está consequentemente associado à redução do volume das estruturas adjacentes (Lewis & Lieberman, 2000).

Em uma sistemática revisão, Shepherd *et al.* (2012) reuniram importantes informações a respeito de alterações de volume de estruturas cerebrais em pacientes com esquizofrenia. Estudos mostram uma redução na área do corpo caloso, redução do lobo frontal, principalmente devido a redução da matéria cinzenta (MC) nos giros inferior esquerdo e medial frontal, e redução da densidade de MC nos giros medial bilateral e frontal médio. Há também uma redução da densidade de MC no giro pós-central no lobo parietal, bem como no lobo temporal, no qual há redução da MC nos giros temporal superior bilateral e medial esquerdo, assim como redução do giro temporal transversal (para revisão veja Shepherd *et al.*, 2012).

Outras estruturas cerebrais também foram identificadas como apresentando alterações em pacientes com esquizofrenia. Existe uma redução da MC no córtex cingulado anterior, predominantemente no hemisfério esquerdo; diminuição do volume da ínsula bilateral; reduções bilaterais, porém mais acentuadas no hemisfério esquerdo, do parahipocampo; redução da MC na formação hipocampal direita, além de menor volume bilateral do hipocampo, redução do volume bilateral da amígdala; redução bilateral do tálamo e aumento dos núcleos da base, especialmente do putamen, globo pálido direito e no núcleo caudado bilateral (Shepherd *et al.*, 2012).

A interação dos genes relacionados à esquizofrenia, o mal desenvolvimento cerebral e questões ambientais parecem resultar em uma conectividade defeituosa entre algumas regiões cerebrais, como núcleo accumbens, tálamo, temporo-límbicas e córtex pré-frontal (Selemon &

Goldman-Rakic, 1988). Por consequência, pessoas com esquizofrenia possuem disfunções em diversos sistemas neuroquímicos.

1.5.1. Hipóteses da Esquizofrenia

Hipótese Dopaminérgica

A primeira teoria proposta para tentar explicar a esquizofrenia foi a teoria dopaminérgica, que propõe que nesse transtorno há uma hiperfunção dopaminérgica. Essa teoria surgiu nos anos 1950 com a descoberta dos efeitos da clorpromazina, um antagonista dopaminérgico (Moghaddam & Javitt, 2012). Logo após, diversos estudos com seres humanos e animais expostos a substâncias que produzem efeitos muito semelhantes ao observado em quadros psicóticos, comuns em pacientes com esquizofrenia, como a anfetamina e a apomorfina (Yokel & Wise, 1975; Meltzer & Stahl, 1976; Ellison, 1994). Esses fármacos são agonistas de receptores dopaminérgicos do tipo D₂ e causam efeitos esquizotípicos semelhantes aos sintomas positivos da esquizofrenia.

Existem no sistema nervoso central (SNC) quatro vias dopaminérgicas: nigro-estriatal, mesolímbica, mesocortical e túbero-hipofisal (Figura 3).

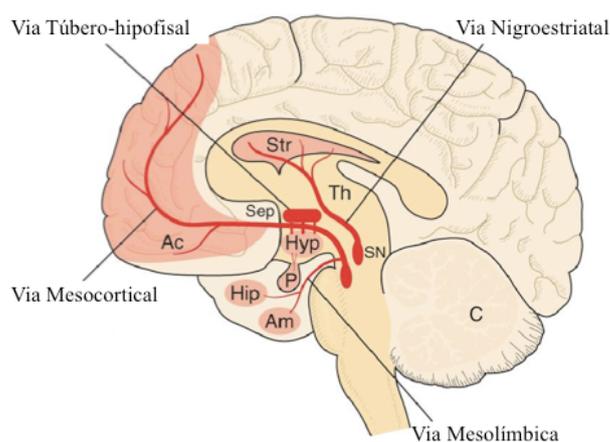


Figura 3. Representação das vias dopaminérgicas no SNC. Am- Amígdala; Hip- Hipocampo; P- Putamen; Hyp- Hipófise; Ac- Núcleo Accumbens; Sep- Septo pelúcido; SN- Substância Negra; Th- Tálamo; Str- Estriado; C- Cerebelo. (modificado de Rang *et al.*, 2003).

A via mesolímbica projeta-se dos corpos celulares da área tegmental ventral do mesencéfalo para o sistema límbico, como núcleo accumbens e o complexo amigdalóide (Ac e Am, respectivamente na figura 3). Acredita-se que na esquizofrenia haja uma hiperatividade dopaminérgica nessa via e que a disfunção nela via esteja relacionada aos sintomas positivos (Stevens, 1979). Estudos *post-mortem* revelaram níveis de dopamina acima do normal no núcleo accumbens, caudado e amígdala de pacientes com esquizofrenia (Davis *et al.*, 1991). No sistema límbico, os neurônios pós-sinápticos possuem receptores dopaminérgicos inibitórios do tipo D₂, conseqüentemente, a presença de grande quantidade de dopamina no sistema límbico não permite a ativação do córtex pré-frontal por neurônios glutamatérgicos, serotoninérgicos e GABAérgicos hiperpolarizados. Dessa forma, não é possível que haja o *feedback* negativo do córtex pré-frontal para o mesencéfalo, fazendo diminuir a liberação de dopamina (Lewis & Lieberman, 2000).

A via mesocortical também possui corpos celulares localizados na área tegmental ventral no mesencéfalo, porém esses neurônios projetam-se para áreas corticais, principalmente para o córtex pré-frontal (região sombreada de vermelho na figura 3). Acredita-se que nesta via haja uma hipoatividade dopaminérgica (Davis *et al.*, 1991; Akil *et al.*, 1999), responsável por causar os efeitos negativos e cognitivos da esquizofrenia.

A via nigro-estriatal é parte do sistema nervoso extrapiramidal e possui corpos celulares na substância negra e terminais axônicos no estriado e núcleos da base (Davis *et al.*, 1991). Essa via está relacionada principalmente a comportamentos motores. E finalmente, a via túbero-hipofisal é composta por pequenos neurônios que possuem corpos neuronais no hipotálamo ventral e se projetam para a glândula pituitária (Stevens, 1979). Essas duas últimas vias aparentemente não apresentam disfunções na esquizofrenia, porém estão fortemente relacionadas aos efeitos adversos causados pelos antipsicóticos.

Hipótese Glutamatérgica

Existe também a hipótese da hipofunção glutamatérgica na esquizofrenia. Essa hipótese foi proposta a partir de estudos que observaram os efeitos psicóticos de drogas como

fenciclidina (PCP), quetamina e dizocilpina (MK-801), substâncias que bloqueiam a neurotransmissão dos receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Javitt & Zukin, 1991; Olney & Farber, 1995). A administração dessas substâncias em indivíduos saudáveis provoca alterações comportamentais similares a sintomas positivos e negativos e prejuízos cognitivos observados em pacientes com esquizofrenia, como surtos psicóticos, afastamento social e déficits de memória e aprendizado (Seibt *et al.*, 2011; Adell *et al.*, 2012; Javitt *et al.*, 2012).

Existe um envolvimento funcional do sistema glutamatérgico em aprendizagem e memória, desenvolvimento e funções motoras. Além disso, há uma grande concentração de receptores glutamatérgicos em áreas do SNC relacionados à esquizofrenia (Tamminga, 1998). A hipótese da hipofunção glutamatérgica fundamenta-se também no fato de pacientes com esquizofrenia apresentarem alterações na concentração de metabólitos e receptores de glutamato, como reduzida concentração de glutamato e baixa concentração de receptores NMDA (Tamminga, 1998; Pilowsky *et al.*, 2006).

Sabe-se que o bloqueio de receptores NMDA no córtex pré-frontal diminui a transmissão dopaminérgica, causando sintomas negativos e cognitivos e ocasionam a falta de *feedback* negativo citada acima. O bloqueio dos receptores NMDA no sistema límbico, por outro lado, aumenta a liberação de dopamina e induzem sintomas positivos (Breier *et al.*, 1998; Kegeles *et al.*, 2000).

Hipótese Serotoninérgica

Outro receptor que parece ter importância para a compreensão da fisiopatologia da esquizofrenia é a serotonina (5-HT). A ideia do envolvimento da 5-HT na esquizofrenia está relacionada tanto pelos efeitos alucinógenos, causados pela diatilamina do ácido lisérgico (LSD) que são semelhantes ao que ocorre com pacientes com esquizofrenia, quanto aos efeitos do antipsicótico atípico clozapina.

Estudos demonstram que os efeitos do LSD, indolaminas e fenetilamina estão relacionados à ativação de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2A} (Sanders-Bush &

Breeding, 1988; Marek & Aghajanian, 1996). Esses receptores são encontrados em diversas regiões cerebrais, como bulbo olfatório, claustro, núcleo accumbens, e núcleos motores, córtex cerebral (Aghajanian & Marek, 2000). A ativação de receptores 5-HT_{2A} aumenta a transmissão glutamatérgica no *locus coeruleus* e no córtex pré-frontal, o que certamente está relacionado a alucinações geradas por agonistas de 5-HT_{2A} (Aghajanian & Marek, 2000). Sabe-se que a administração de antagonistas de NMDA gera elevação dos níveis cerebrais extracelulares de 5-HT, assim como do seu metabólito, o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), no córtex pré-frontal. Além disso, antagonistas de 5-HT₂ bloqueiam alguns comportamentos gerados por antagonistas de NMDA, como por exemplo a hiperlocomoção (Aghajanian & Marek, 2000).

Da mesma forma, o antipsicótico clozapina, que apresenta propriedades antagonistas de 5-HT_{2A}, reverte efeitos comportamentais provocados pela administração de antagonistas de NMDA, como a PCP e o MK-801 (Bakshi *et al.*, 1994; Linn *et al.*, 2003; Lipina *et al.*, 2005). Estas evidências indicam uma relação entre os receptores 5-HT_{2A} e o sistema glutamatérgico.

Acredita-se que a desregulação serotoninérgica na esquizofrenia pode ser uma das responsáveis pelos sintomas negativos e pelos altos índices de depressão observados em pacientes com esquizofrenia (Selvaraj *et al.*, 2014). Isso porque antagonistas serotoninérgicos, como a clozapina, risperidona, olanzapina, ziprasidona são capazes de tratar sintomas negativos da doença (Meltzer *et al.*, 2012) e antagonistas do receptor 5-HT₇, como o antipsicótico amisulprida, tem ações antidepressivas (Abbas *et al.*, 2009).

Diante do exposto acima, é possível afirmar que a esquizofrenia é um transtorno mental complexo que envolve diversas vias neurotransmissoras e que as hipóteses propostas parecem se complementarem para explicar a psicopatologia dessa doença.

1.5.2. Modelos farmacológicos experimentais baseados em antagonistas glutamatérgicos de NMDA

Administração aguda de antagonista de receptores de glutamato NMDA resulta em uma diminuição da liberação de GABA no córtex pré-frontal, que contribui para o aparecimento de comportamentos esquizotípicos negativos e cognitivos (Enomoto *et al.*, 2011), além de

aumentar a liberação de dopamina no estriado ventral, o que está fortemente relacionado ao surgimento de sintomas positivos. O aumento da atividade pré-frontal possivelmente ocorre porque essas substâncias bloqueiam preferencialmente receptores NMDA localizados em neurônios GABAérgicos do circuito corticolímbico, o que prejudica a inibição cortical e conseqüentemente desinibe os neurônios glutamatérgicos piramidais associados com intensa atividade neuronal. A inibição de neurônios GABAérgicos resulta na diminuição da liberação de GABA no córtex pré-frontal, o que induz alterações cognitivas, comportamentais e dopaminérgicas que são semelhantes as alterações na esquizofrenia (Adell *et al.*, 2012).

Para a realização de estudos que auxiliem na compreensão dos circuitos neurais envolvidos na esquizofrenia, bem como estudos que tragam potenciais terapêuticos, diversas substâncias farmacológicas são utilizadas tanto em modelos animais quanto em seres humanos.

A hipofunção dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA está fortemente relacionada a etiologia da esquizofrenia (Cohen *et al.*, 2015). A hipótese de que há uma hipofunção do receptor glutamatérgico deu-se a partir da observação do efeito de antagonistas de NMDA, como a PCP e a quetamina em pacientes saudáveis. Os efeitos causados em uma única administração, em doses baixas desses fármacos então utilizados como anestésicos, eram muito semelhantes ao relatado por pacientes com esquizofrenia (Javitt & Zukin, 1991; Adell *et al.*, 2012).

A PCP foi primeiramente utilizada como um anestésico nos anos 1950, pois produzia efeitos de catatonia que permitiam a realização de pequenas cirurgias. No entanto, muitos pacientes submetidos à anestesia desenvolviam severos quadros de psicose, como agitação exagerada, comportamento fora do padrão, paranoia, distúrbios de pensamento e severos distúrbios alucinatorios. Efeitos semelhantes foram observados também em pacientes que recebiam doses subanestésicas de PCP como agente analgésico (para revisão veja Javitt & Zukin, 1991).

A quetamina foi desenvolvida como um substituto para a PCP como analgésico, sedativo e anestésico (Morgan & Curran, 2012). Esta droga apresenta estrutura semelhante à de PCP

(White *et al.*, 1982) e em doses subanestésicas também foi observado distúrbios de pensamento em voluntários saudáveis semelhante ao de pacientes com esquizofrenia (Adler *et al.*, 1999). Após retornarem da anestesia, muitos pacientes relataram estarem tendo ilusões, alucinações, delírios, confusões, e algumas vezes experiências extracorpóreas e de “quase-morte” (Morgan & Curran, 2012). Apesar disso, a quetamina ainda é utilizada como anestésico, ao contrário da PCP.

Em virtude desses efeitos adversos encontrados nesses anestésicos, essas substâncias são muito utilizadas em modelos experimentais de esquizofrenia. Diversos estudos comportamentais demonstram que a PCP e quetamina provocam prejuízos cognitivos, como déficits de memória, déficits no reconhecimento de novos objetos e isolamento social, tanto em roedores (Handelmann *et al.*, 1987; Jentsch *et al.*, 1997; Stefani & Moghaddamm, 2002; Boulay *et al.*, 2004; Bruins Slot *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Marrs *et al.*, 2005; Nikiforuk *et al.*, 2013; McIntosh *et al.*, 2013; Gaskin *et al.*, 2014; Grayson *et al.*, 2014; Jeevakumar *et al.*, 2015), quanto em macacos (Jentsch *et al.*, 2000; Abdul-Monim *et al.*, 2006; Paule *et al.*, 2011; Nakako *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014).

Já foi demonstrado que, tanto a PCP, quanto a quetamina são capazes de gerar déficits na resposta de IPP em roedores (Bakshi, 1994; Brody *et al.*, 2003; 2004; Becker & Grecksch, 2004; Egerton *et al.*, 2008). Entretanto, em humanos a quetamina não modificou a resposta de IPP na dose de 0,3 mg/kg, embora tenha induzido outros efeitos como aumento da secreção de cortisol, frequência cardíaca, pressão arterial, disfunção motora (Van Berckel *et al.*, 1998). Em uma dose mais alta (0,5 mg/kg) chegou a aumentar a IPP em homens saudáveis (Duncan *et al.*, 2001; Abel *et al.*, 2003).

Poucos trabalhos com primatas não-humanos foram realizados no intuito de identificar os efeitos de antagonistas de NMDA na resposta de IPP desses animais. Um grupo de pesquisa realizou alguns estudos de IPP com macaco-prego (*Cebus apella*) e macaco-cinomoigo (*Macaca fascicularis*). O primeiro estudo foi realizado com nove fêmeas e um macho de macacos-prego, os quais receberam administração aguda de PCP (0,12 ml/kg i.m.) e tiveram a resposta de sobressalto mensurada a partir da contração de músculos da pálpebra. Os animais

apresentaram diminuição da resposta de IPP, sem alteração da resposta sobressalto quando apresentado apenas o estímulo de pulso (Linn & Javitt, 2001). Posteriormente, com oito fêmeas de *C. apella*, repetiram o protocolo de IPP, porém realizaram pré-tratamento com clozapina (2,5 mg/kg i.m.) ou haloperidol (0,035 mg/kg i.m.). A clozapina reverteu o efeito da PCP na resposta de IPP, ao contrário do haloperidol (Linn *et al.*, 2003). Além desses dois estudos, esse grupo também realizou um estudo com um único indivíduo de cinomolgo para identificar o efeito da PCP (0,25 mg/kg i.m.) na resposta de IPP. Da mesma forma, a PCP diminuiu a resposta de IPP nesse animal (Javitt & Lindsley, 2001). Nenhum outro estudo com IPP foi realizado posteriormente para testar efeitos de drogas antagonistas de NMDA em macacos.

Dizocilpina (MK-801)

A administração de antagonistas do receptor glutamatérgico NMDA provoca um aumento nos níveis extracelulares de glutamato, dopamina, serotonina e acetilcolina na área frontal do cérebro de roedores e macacos (Moghaddam *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1998; Jentsch & Roth, 1999). O uso de substâncias antagonistas do receptor NMDA, como a PCP, quetamina e MK-801 é extremamente comum em estudos de modelo de esquizofrenia em animais, isso devido ao fato dessas drogas serem capazes de provocarem efeitos esquizotípicos.

O MK-801 ((+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[1,d]ciclohepten-5-10-iminemaleato), também conhecido como dizocilpina, é um potente antagonista do receptor glutamatérgico NMDA que apresenta uma alta afinidade pelo sítio de ligação da fenciclidina (Wong *et al.*, 1986). MK-801 é aproximadamente dez vezes mais potente que a PCP (Boireau *et al.*, 1996). Além disso, diferente da PCP, MK-801 não apresenta afinidade pelo transportador de dopamina (Maurice *et al.*, 1991). Tem sido demonstrado que a PCP aumenta a reabsorção vesicular de dopamina, ao passo que o MK-801 não afeta a proteína transportadora (Crosby *et al.*, 2002).

Vários estudos com roedores mostraram efeitos esquizotípicos causados pela administração de MK-801, como por exemplo, prejuízos na memória de reconhecimento,

hiperatividade e hiperlocomoção (Park *et al.*, 2014; Basurto *et al.*, 2015), déficits de aprendizagem e memória espacial (Hikichi *et al.*, 2013; Karamihalev *et al.*, 2014), reconhecimento social (Yoshimi *et al.*, 2015) e na IPP (Long *et al.*, 2006; Arai *et al.*, 2008; Ishii *et al.*, 2010; Gururajan *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2014; Khella *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2014).

Estudos com primatas não-humanos também demonstraram que o MK-801 é eficaz na indução de efeitos esquizotípicos nesses animais. Ogura & Aigner (1993), realizaram um estudo com macacos *rhesus* (*Macaca mulatta*) e demonstraram que o MK-801 causou prejuízos na memória visual de reconhecimento. No mesmo sentido, Buffalo *et al.*, (1994) realizou uma Bateria de Teste Operante, também em *rhesus*. Eles demonstraram que o MK-801 prejudicou o aprendizado, motivação, memória de curto-prazo e a discriminação de cores. Memória operacional também foi prejudicada após administrações agudas e crônicas de MK-801 em *rhesus* (Tsukada *et al.*, 2005). Do mesmo modo, em saguis-de-tufos-brancos (*Callithrix jachus jachus*), o MK-801 provocou danos na aquisição visuo-espacial no *Wisconsin General Test Apparatus* (Harder *et al.*, 1998; Harder & Ridley, 2000). Em um estudo mais recente com macacos *rhesus* foi evidenciado que uma única administração de MK-801 nas doses de 0,02 e 0,04 mg/kg foi suficiente para prejudicar a memória operacional quando comparado a resposta dos mesmos animais antes da administração da droga (Wang *et al.*, 2012).

O MK-801 parece ter seus efeitos mais pronunciados quando administrado de forma repetida. Na resposta de IPP em roedores foi observado um efeito temporal em administrações crônicas. Após nove dias consecutivos de administração de MK-801 em ratos, foi observado uma diminuição da IPP, além de um aumento na resposta de sobressalto na ausência do pré-pulso (Schulz *et al.*, 2001). Gomes *et al.*, (2014) também observaram um efeito de sensibilização após um tratamento de 28 dias consecutivos em camundongos, mesmo administrando a droga um dia antes do teste de IPP.

Apesar disso, o MK-801 perde o efeito após a familiarização com o ambiente em que é realizado o teste ou com o objeto de reconhecimento quando o paradigma experimental envolve memória e aprendizagem (Shapiro & O'Connor, 1992; Uekita & Okaichi, 2005; Chan & McNally, 2009; Ennaceur *et al.*, 2011), da mesma maneira que acontece com outros

antagonistas de NMDA (Saucier *et al.*, 1996; Roesler *et al.*, 1998; Otnaess *et al.*, 1999; Sanders & Fanselow, 2003), pelo menos em roedores.

1.5.3. Tratamento Farmacológico da Esquizofrenia

O tratamento da esquizofrenia é usualmente realizado com o uso de drogas antipsicóticas. Substâncias antipsicóticas aliviam sintomas característicos da esquizofrenia, como alucinações e delírios, entretanto podem variar em eficácia e efeitos adversos dependendo de seu mecanismo de ação.

Antipsicóticos típicos

Os antipsicóticos típicos, ou de primeira geração, foram desenvolvidos na primeira metade do século XX. Esses fármacos foram desenvolvidas com base na hipótese dopaminérgica da esquizofrenia, a qual está relacionada com a desequilíbrio da neurotransmissão dopaminérgica, ou seja, excesso de atividade dopaminérgica na via mesolímbica e redução na via mesocortical (Davis *et al.*, 1991). Assim, os antipsicóticos típicos atuam como antagonistas de receptores pós-sinápticos dopaminérgicos D₂ e diminuem a liberação de dopamina na via mesolímbica, reduzindo os sintomas positivos (Seeman, 1992). No entanto, essa classe de antipsicótico não é muito eficaz no que diz respeito aos sintomas negativos e déficits cognitivos.

Antagonistas de D₂, não atuam apenas em áreas desejadas quando administrado, logo essas substâncias provocam diversos efeitos adversos nos pacientes. Devido ao bloqueio dos receptores dopaminérgicos na via nigro-estriatal surgem efeitos extrapiramidais, hipercinesia, discinesia tardia, tremores, distonia. O bloqueio na via túbero-hipofisal causa hiperprolactinemia (De Hert *et al.*, 2011), que pode provocar em alguns casos ginecomastia, galactorreia, disforia, osteoporose e câncer de mama (Bushe *et al.*, 2008).

Antipsicóticos atípicos

Os antipsicóticos atípicos, também chamados de segunda geração, foram desenvolvidos para ampliar o foco terapêutico. Essas substâncias geram a modulação de outros neurotransmissores, como a norepinefrina, acetilcolina e serotonina, e apresentam menor afinidade pelo receptor D_2 e D_3 (Meltzer, 2012). Dessa forma, os tratamentos com antipsicóticos atípicos englobam melhor sintomas positivos, negativos e cognitivos, devido a interação desses fármacos com sistemas dopaminérgicos e serotoninérgicos (Lewis & Lieberman, 2000).

A interação dessas drogas com o sistema serotoninérgico é bastante importante no tratamento dos sintomas da esquizofrenia. Os antipsicóticos atípicos variam conforme a afinidade com o receptor serotoninérgico. Por exemplo, a amisulprida é um potente antagonista de $5-HT_7$, a cariprazina é um potente antagonista de $5-HT_{2B}$ e agonista parcial de $5-HT_{1A}$ (Meltzer, 2012). Assim, em uma revisão, foi constatado que quatro antipsicóticos atípicos, amisulprida, clozapina, olanzapina e risperidona apresentam maior eficácia na alteração de sintomas positivos, negativos e cognitivos do que antipsicóticos típicos, ao passo que aripiprazol, quetiapina, sertindol, ziprasidona, zotepina são comparáveis aos antipsicóticos típicos (Leucht *et al.*, 2009).

A clozapina foi a primeira droga antipsicótica considerada como atípica, desenvolvida em 1961. Este antipsicótico é um antagonista dos receptores dopaminérgicos D_1 , D_2 , D_3 , D_4 e D_5 e é um antagonista do receptor serotoninérgico $5-HT_{2A}$, além de agonista parcial de $5-HT_{1A}$ e é considerado o antipsicótico mais eficaz até agora (Meltzer, 1994; Moghaddam & Javitt, 2012).

Na via mesocortical, antipsicóticos antagonistas de receptores $5-HT_{2A}$ provocam aumento dopaminérgico e revertem os efeitos negativos e cognitivos, além de não causarem tantos efeitos adversos como discinesia tardia e hiperprolactinemia. Isso provavelmente ocorre porque, o antagonismo de $5-HT_{2A}$ reverte o antagonismo de D_2 tanto na via nigro-estriatal como na túbero-infundibular (Stahl, 2000). Assim, os antipsicóticos atípicos não apenas têm afinidade por receptores D_2 , mas também envolvem neurotransmissores como a serotonina, cuja atividade reduz efeitos adversos e têm ação em uma maior gama de efeitos positivos e

negativos (Peluso *et al.*, 2012). Embora os efeitos adversos sejam menores que os causados por antipsicóticos típicos, alguns são ainda observados em pacientes após a administração de clozapina, tais como sedação, taquicardia, constipação, tremores, distúrbios visuais (Safferman *et al.*, 1991).

1.5.4. O Papel do Sistema Endocanabinoide na Esquizofrenia

O termo endocanabinoide origina-se da descoberta de receptores de membrana, nos quais se ligam componentes de plantas do gênero *Cannabis*, como o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) (Di Marzo *et al.*, 2004). *Cannabis sativa* e *C. indica* são plantas cultivadas pelo homem há pelo menos 3000 anos e desde a antiguidade, na Índia e na China, já eram descritas propriedades ansiolíticas, analgésicas e anticonvulsivantes (Baker *et al.*, 2003; Mechoulam & Parker, 2011).

O isolamento dos compostos da *Cannabis*, chamados de fitocanabinoides, ou simplesmente canabinoides, permitiu o aprofundamento de estudos a respeito do sistema endocanabinoide (ECS). Já foi identificada a existência de dois tipos de receptores endocanabinoides CB₁ e CB₂, os quais pertencem à família dos receptores de membrana acoplados à proteína G inibitória, que quando é ativada, inibe a ação da enzima adenilato ciclase, levando, assim, a diminuição dos níveis de AMP cíclico e a consequente inibição de canais de cálcio (Pacher & Ba, 2006; Piomelli *et al.*, 2003). Os receptores CB₁ são os receptores mais abundantes nos cérebros de mamíferos, predominantemente em neurônios pré-sinápticos e também são encontrados em menor concentração em áreas periféricas do sistema nervoso (Pacher & Ba, 2006). Os CB₂ são principalmente encontrados em células dos sistemas imunológico e hematopoético (Munro *et al.*, 1993), mas também em células cerebrais (Gong *et al.*, 2006). Alguns estudos já indicam uma possível existência de outros receptores no ECS (pra revisão veja Di Marzo *et al.*, 2004).

Os ligantes endógenos dos receptores do ECS são chamados de endocanabinoides e todos até agora identificados são derivados de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa,

os mais estudados são o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) e a anandamida (N-araquidonoiletanolamina) (Di Marzo *et al.*, 2004). A síntese desses endocanabinoides ocorre a partir de fosfolípidios na membrana de neurônios pós-sinápticos, assim agem como mensageiros cerebrais retrógrados (Petrocellis *et al.*, 2004). Isso significa que, o influxo de cálcio ocasiona a liberação desses ligantes na fenda sináptica que, por sua vez, estimulam os receptores CB₁ em terminais pré-sinápticos (Di Marzo & Matias, 2005). Essa ativação de CB₁ inibe a liberação de neurotransmissores como GABA e glutamato (Volk & Lewis, 2015). Além disso, a anandamida também ativa receptores vaniloides de potencial transitório subtipo 1 (TRPV₁). Esses receptores são abundantes em neurônios sensoriais e na medula espinhal, e também são encontrados no SNC e estão envolvidos na regulação glutamatérgica e em respostas inflamatórias (Robson *et al.*, 2014). Sabe-se que existe um aumento seletivo e transitório de endocanabinoides em determinadas áreas cerebrais durante condições patológicas do SNC, como por exemplo no hipocampo após excitotoxicidade glutamatérgica e após muitos estímulos estressores, assim como no hipotálamo e no sistema límbico após privação de alimento (Di Marzo *et al.*, 2004).

Acredita-se que alterações no nível de neuromoduladores do ECS estejam associados à esquizofrenia. Leweke *et al.*, (1999) observou um aumento da concentração de anandamida e palmitiletanolamida (PEA), outro endocanabinoide, no fluido cérebro-espinhal (FCE) de pacientes com esquizofrenia quando comparados com pacientes saudáveis. Isto refletiria um possível estado “hipercanabinérgico” na esquizofrenia. Em outro estudo, Giuffrida *et al.*, (2004) identificaram níveis de anandamida oito vezes maior no FCE de pacientes em primeiro episódio de esquizofrenia paranoide não medicados quando comparados com pessoas saudáveis. Além disso, encontraram uma correlação negativa entre os níveis de anandamida no FCE e sintomas psicopatológicos nesses pacientes. Os autores sugerem que esta correlação negativa indica que a anandamida pode exercer um papel adaptativo na esquizofrenia aguda (Giuffrida *et al.*, 2004), ou seja, a liberação de anandamida no cérebro pode servir como um mecanismo compensatório durante psicoses agudas. Nesse sentido, trabalhos com roedores mostram que agonistas de D₂ estimulam a liberação de anandamida no estriado dorsal e outras estruturas

dos núcleos da base (Leweke *et al.*, 2007). Outro ponto importante é que pacientes tratados com antipsicóticos típicos (antagonistas de D₂) apresentam níveis de anandamida semelhante aos de pessoas saudáveis, ao passo que os tratados com atípicos apresentam elevados níveis de anandamida (Giuffrida *et al.*, 2004). Isso deve-se ao fato de antipsicóticos típicos normalizarem os níveis de anandamida bloqueando receptores D₂, que iniciam a síntese de anandamida em áreas motoras e límbicas. Os antipsicóticos atípicos, por outro lado, interagem principalmente com receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} (Parolaro *et al.*, 2010).

Vários estudos mostram alterações na concentração de receptores CB₁ em diferentes regiões cerebrais de pacientes com esquizofrenia, como córtex pré-frontal dorso-lateral, córtex cingulado anterior e córtex cingulado posterior (Dean *et al.*, 2001; Zavitsanou *et al.*, 2004; Newell *et al.*, 2006; Eggen & Lewis, 2007). Embora os receptores CB₁ sejam encontrados em todo o cérebro, como dito anteriormente, em humanos a maior densidade deles está em áreas relacionadas à esquizofrenia, como córtex pré-frontal, núcleos da base, hipocampo e córtex cingulado anterior (Glass, 2001).

O uso de substâncias que provocam efeitos esquizotípicos em modelos animais também tem ajudado na compreensão do papel do ECS na esquizofrenia. Viganò *et al.*, (2009) observaram que a administração crônica de PCP em ratos provocou alterações na funcionalidade de CB₁ e nos níveis de endocanabinoides, principalmente no córtex pré-frontal, sendo um aumento de 2-AG e redução de anandamida. A PCP aumentou os sítios de ligação no CB₁ na amígdala e na área tegmental ventral e reduziu no córtex pré-frontal, hipocampo, substância negra e cerebelo. No entanto, o mesmo não foi observado por Seillier & Giuffrida (2009) que não encontrou alterações na expressão de CB₁ após administrações semi-crônicas de PCP também em ratos. Ainda assim, agonistas de CB₁ reduzem a neurotransmissão glutamatérgica em diversas áreas cerebrais, incluindo o córtex pré-frontal (Auclair *et al.*, 2009). O que mostra a existência de uma relação entre os sistemas endocanabinoide e o glutamatérgico que pode estar associado à esquizofrenia. Apesar de estudos controversos, muitas são as evidências de que o ECS apresenta disfunções na esquizofrenia e mais estudos no sentido de esclarecer essas questões precisam ser realizados.

1.5.5. Canabidiol (CBD)

A *Cannabis* é a droga ilegal mais consumida em todo o mundo (Pacher *et al.*, 2006) e muitos estudos têm sido realizados no sentido de identificar seus efeitos farmacológicos e terapêuticos. Atualmente, cerca de 80 canabinoides já foram identificados na *Cannabis* (Console-Bram *et al.*, 2012), sendo os mais estudados o psicoativo, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), e o não-psicotrópico, canabidiol (CBD) (Baker *et al.*, 2003).

O estudo dos efeitos de fitocanabinoides tem auxiliado no entendimento do ECS na esquizofrenia. O THC provoca euforia, sedação, distorções sensoriais e de percepção de tempo e prejuízos cognitivos, analgesia e apresenta efeitos antieméticos (Martin & Wiley, 2004). O THC apresenta propriedade agonista do receptor CB₁ e pode causar sintomas psicóticos em pacientes saudáveis (Zuardi *et al.*, 2012), induzir prejuízos cognitivos característicos na esquizofrenia (Emrich *et al.*, 1997; Leweke *et al.*, 1999) e, em doses altas, atua como ansiogênico (Crippa *et al.*, 2010).

O CBD constitui cerca de 40% do extrato da *Cannabis sativa* (Grlic, 1976) e apresenta efeitos opostos ao do THC em determinadas áreas do cérebro. Em um estudo com administração oral de CBD e THC, Bhattacharyya *et al.* (2010) identificou efeitos opostos entre esses dois compostos no estriado, córtex pré-frontal cingulado anterior, medial e lateral, giro parahipocampal, amígdala, córtex temporal e córtex occipital. Além disso, o CBD atenua os prejuízos de memória causados pelo THC, possivelmente pelo seu efeito antagonista de CB₁ (Morgan *et al.*, 2010). O THC é um agonista de CB₁, ao passo que o CBD é um antagonista não competitivo de CB₁ e CB₂ (Thomas *et al.*, 2007).

O CBD tem efeitos ansiolíticos (Zuardi *et al.*, 1982; Crippa *et al.*, 2004; Campos & Guimarães, 2008), antiepilépticos (Carlini & Cunha; Tamir *et al.*, 1980; Mechoulam *et al.*, 2002), anti-inflamatórios (Mechoulam *et al.*, 2002), antioxidante (Hampson *et al.*, 1998; Malfait *et al.*, 2000) e antipsicóticos (Zuardi *et al.*, 1991; Leweke *et al.*, 2004, 2012; Bhattacharyya *et al.*, 2010).

O mecanismo de ação do CBD parece ser bastante complexo e ainda não é completamente conhecido, porém algumas ideias surgiram para tentar explicar a ação antipsicótica do CBD. Sabe-se que, assim como a clozapina, o canabidiol é um agonista do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} (Resstel *et al.*, 2009). Esse canabinoide, como dito anteriormente, também tem ação antagonista do receptor endocanabinoide CB₁ (Thomas *et al.*, 2007). Zuardi *et al.*, (2012) propõem que o efeito antipsicótico do CBD está relacionado ao aumento da disponibilidade de anandamida. O CBD é um inibidor da captação de anandamida, inibindo a degradação intracelular desse endocanabinoide que é catalizado pela enzima hidrolase de amida de ácidos graxos (FAAH: *fatty acid amide hydrolase*) (Bisogno *et al.*, 2001), o que proporciona um aumento da ação da anandamida (Mechoulam *et al.*, 2002). O aumento dos níveis de anandamida induzido pelo CBD pode atenuar a liberação de GABA dos neurônios do pálido ventral, restaurando a função normal do sistema em pacientes com esquizofrenia (Zuardi *et al.*, 2012). Além disso, o canabidiol ativa receptores TRPV₁, encontrados no córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo, áreas cerebrais relacionadas à psicose (Cristino *et al.*, 2006). O principal agonista endógeno de TRPV₁ é a anandamida (Di Marzo *et al.*, 2001) e a ativação pré-sináptica desse receptor facilita a liberação de glutamato (Xing & Li, 2007). O envolvimento do TRPV₁ parece ser bastante importante, pois os efeitos do CBD sobre o prejuízo de IPP causado pelo MK-801 foi prevenido por um antagonista vaniloide, a capsaicina (Long *et al.*, 2006). Logo, o efeito antipsicótico do CBD parece ocorrer pela facilitação da atividade glutamatérgica no córtex pré-frontal de forma direta, sendo um agonista de TRPV₁ e indireta, por aumentar os níveis de anandamida ativando o CB₁ e diminuindo a liberação de GABA (Zuardi *et al.*, 2012). De qualquer maneira, o efeito antipsicótico do CBD não depende do receptor dopaminérgico D₂ como grande parte dos antipsicóticos conhecidos (Robson *et al.*, 2014).

O primeiro estudo clínico do efeito do CBD como um potencial antipsicótico foi realizado por Zuardi *et al.* (1995) em uma paciente esquizofrênica de 19 anos de idade que recebeu CBD por quatro semanas em doses acima de 1500 mg/dia e foi observada uma melhora significativa dos sintomas psicóticos, inclusive de forma mais eficiente que o antipsicótico haloperidol. Após

este, outros estudos também apontaram redução dos sintomas psicóticos em pacientes com esquizofrenia (Zuardi *et al.*, 2006; Leweke *et al.*, 2012). Foi demonstrado inclusive um aumento dos níveis séricos de anandamida correlacionado a alívio dos sintomas psicóticos em 42 pacientes, após a administração de CBD (Leweke *et al.*, 2012).

Alguns estudos foram realizados com teste de IPP para testar o efeito do CBD em animais. Long *et al.*, (2006), encontraram uma reversão dos efeitos causados por MK-801 em camundongos. No entanto, o mesmo efeito não foi encontrado por Gururajan *et al.*, (2011) quando o teste de IPP foi realizado após a administração de MK-801 em ratos pré-tratados com CBD. Em um estudo com administração crônica de MK-801, Gomes *et al.*, (2014) demonstraram que o CBD é eficaz na reversão do déficit de IPP induzido pelo MK-801 em camundongos. Da mesma forma, Levin *et al.* (2014) mostrou que o CBD alterou IPP na dose de 30 mg/kg em ratos espontaneamente hipertensos, tornando a resposta de IPP semelhante a dos animais controle. Até o presente momento, não há na literatura estudos que mostrem o efeito do CBD na resposta de IPP de primatas não-humanos.

1.6. Primatas como modelo experimental em pesquisas biomédicas

Desde a antiguidade, primatas não-humanos despertavam interesse em estudiosos que realizavam pesquisas biomédicas (Pissinatti & Andrade, 2010). O uso de animais em pesquisas é de extrema importância para a compreensão da natureza de transtornos neurológicos humanos (Dam & Deyn, 2014), em especial quando se trata de primatas. A proximidade filogenética desses animais com seres humanos possibilita uma extrapolação mais fidedigna dos dados encontrados em experimentos com macacos para humanos (Bontrop, 2001).

No presente trabalho, foram empregados indivíduos do gênero *Sapajus* (Alfaro *et al.*, 2012) popularmente conhecidos como macacos-prego (Figura 4). O gênero *Sapajus* é formado por várias espécies de macacos neotropicais encontrados na América do Sul, em uma área que se estende da Amazônia até o sul do Brasil, passando pelo cerrado na região central (Alfaro *et al.*, 2012). São animais onívoros de médio porte que se alimentam de frutas, folhas,

insetos e pequenos vertebrados (Chapman & Fedigan, 1990; Canale *et al.*, 2013). Os macacos-prego são animais facilmente encontrados em cativeiro e despertam interesse científico por apresentarem grande capacidade cognitiva, como a utilização de ferramentas, transmissão de conhecimento social e apresentam um complexo repertório comportamental (Fragaszy *et al.*, 2004).



Figura 4. Indivíduo jovem de *Sapajus* spp.

Já foi demonstrada uma correlação positiva entre o tamanho do cérebro (proporcionalmente ao tamanho do corpo) e a longevidade em primatas (Fragaszy *et al.*, 2004). Sugere-se que isso ocorre devido a maior capacidade de defesa, de evitar riscos e de solucionar problemas dos animais com maior índice de encefalização. Essa característica é observada em macacos-prego, que chegam a viver até 45 anos de idade e apresentam o volume da massa encefálica proporcionalmente ao tamanho do corpo semelhante ao de

grandes primatas. Além disso, esses animais também possuem o córtex cerebral, o tálamo e o cerebelo tão desenvolvidos quanto de catarrinos, primatas da Ásia e África (Fragaszy *et al.*, 2004).

Macacos são utilizados para diversas áreas de estudos neurocientíficos, como memória e aprendizagem (Belham *et al.*, 2013; Bachevalier *et al.*, 2014; Gasbarri *et al.*, 2014; Inoue *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014), visão de cores (Araújo *et al.*, 2008; Bunce *et al.*, 2011; Altavini *et al.*, 2012; Matsushita *et al.*, 2014; Pessoa *et al.*, 2014; de Lima *et al.*, 2015), neuroendócrina (Raper *et al.*, 2013a, 2013b; Short & Coe, 2014), entre outros. Entretanto, no paradigma experimental de que trata o presente trabalho, pouca informação se tem com primatas não-humanos. A maior parte dos estudos realizados com teste de inibição da resposta de sobressalto por pré-pulso acústico foram realizados em roedores (ex. Li *et al.*, 1998; Yeomans *et al.*, 2006), alguns poucos em primatas não-humanos (Winslow *et al.* 2002, 2007).

Apenas um grupo de pesquisa realizou experimentos em macacos-prego utilizando esse o teste de IPP (Linn & Javitt, 2001; Linn *et al.*, 2003). Esses estudos tiveram como objetivo verificar os efeitos da PCP na resposta inibitória do reflexo de sobressalto acústico. Além desses estudos que avaliaram a resposta de IPP em macacos-prego do gênero *Cebus* realizados pelo grupo de pesquisa de Prof. Javitt, nenhum outro estudo avaliou efeitos de antagonistas de NMDA na resposta de IPP em primatas não-humanos.

Dessa forma, existe uma lacuna no conhecimento acerca dos efeitos de MK-801 em macacos no que diz respeito ao paradigma de IPP. Da mesma forma, nenhum estudo avaliou os efeitos do CBD em primatas não-humanos. Considerando que muito tem-se discutido a respeito da importância terapêutica desse fitocanabinoide, estudos que demonstrem a ação do CBD em primatas podem trazer dados interessantes.

Desta forma, estudos com modelos animais, principalmente primatas não-humanos, envolvendo inibição da resposta de sobressalto acústico são importantes para auxiliar o entendimento dos mecanismos neurais de transtornos psiquiátricos humanos. O desenvolvimento de um novo protocolo para estudo da esquizofrenia, utilizando animais do gênero *Sapajus* como sujeitos experimentais, possibilita a realização de testes de novas

substâncias potencialmente antipsicóticas com melhor ação e menos efeitos adversos, em um animal relativamente de fácil manipulação e filogeneticamente próximo do ser humano.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais:

- Desenvolver um paradigma para o teste de inibição por pré-pulso da resposta de sobressalto acústico em primatas não-humanos (*Sapajus* spp.);
- Avaliar o papel do colículo superior na inibição por pré-pulso de sobressalto acústico utilizando indivíduos do gênero *Sapajus*;
- Avaliar o efeito de fármacos na resposta de inibição por pré-pulso em indivíduos de *Sapajus* spp.

2.2. Objetivos específicos:

2.2.1. Estudo 1

- Estabelecer as intensidades sonoras mais adequadas para provocar resposta de sobressalto em indivíduos do gênero *Sapajus*;
- Estabelecer os intervalos interestímulo mais adequados para inibição da resposta de sobressalto acústico em indivíduos de *Sapajus* spp.;
- Avaliar a amplitude de resposta de sobressalto após um pré-pulso em indivíduos do gênero *Sapajus* com lesão no colículo superior;

2.2.2. Estudo 2

- Avaliar o efeito agudo do MK-801 em indivíduos de *Sapajus* spp. no teste de inibição por pré-pulso;
- Identificar possíveis efeitos temporais do MK-801 no teste de inibição por pré-pulso em indivíduos de *Sapajus* spp.;
- Avaliar os efeitos do canabidiol em indivíduos de *Sapajus* spp. no teste de inibição por pré-pulso;

- Avaliar o efeito do canabidiol em indivíduos de *Sapajus* spp. após a administração repetida de MK-801 no teste de inibição por pré-pulso da resposta de sobressalto acústico.

3. ESTUDO 1

3.1. Objetivo

Esse estudo foi realizado com o intuito de identificar as intensidades mais eficazes para causar resposta de sobressalto e intervalos interestímulo mais adequados para provocar inibição dessa resposta em indivíduos de *Sapajus* spp. e avaliar o papel do cóliculo superior na modulação da resposta de IPP em primatas não-humanos.

3.2. Materiais e Método

Todos os procedimentos experimentais foram realizados com indivíduos de macacos-prego (*Sapajus* spp.), pertencentes ao plantel do Centro de Primatologia na Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília (UnB) localizado a aproximadamente 30 km do centro de Brasília (16°30"S, 46°30"W). O Centro de Primatologia (CP/UnB) (Figura 5) é um criadouro de primatas para fins científicos credenciado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (Registro IBAMA, 1/53/1999/000006-2).

No CP/UnB, os macacos-prego são alojados em viveiros que possuem substrato natural de terra e serragem, com balanços de corda ou mangueira e caixas ninho. Cada viveiro possui área de 3 m x 3 m x 1,8 m (Figura 6) onde os animais são dispostos em pares ou tríades sob condições naturais de luminosidade e temperatura. Os animais não foram privados de água e comida durante o experimento, exceto no momento em que estavam realizando o teste. A alimentação foi oferecida duas vezes ao dia, de manhã e ao final da tarde e a água foi oferecida *ad libitum* através de bebedouros automáticos conectados aos viveiros. Todos os procedimentos experimentais foram realizados no período matutino, das 8h às 12h, logo após o período de alimentação dos animais.



Figura 5. Centro de Primatologia/ UnB. A. Vista frontal do Centro de Primatologia. B. Vista dos viveiros do macacos-prego da parte inferior do CP/UnB. C. Vista de trás dos viveiros do macacos-prego da parte inferior do CP/UnB. D. Viveiros dos macacos-prego na parte superior do CP/UnB. (Fotos C e D de Mariana Jacobsen).



Figura 6. A. Vista frontal de um dos viveiros da parte superior do CP/UnB.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o estabelecido pela Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), de acordo com a Lei Federal nº 11.794/08 (Lei Arouca) e pelos Princípios de Cuidado de Animais de Laboratório (*Principles of Laboratory Animal Care, National Institute of Health* no. 85-23, 1996). Esse estudo foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnBDOC nº 128181/2011 e UnBDOC nº 131791/2013 em anexo).

3.2.1. Sujeitos

Nesse estudo foram utilizados um total de 12 indivíduos de macacos-prego (*Sapajus* spp.) com idade aproximadamente de 5 a 18 anos. Foram utilizados oito (dois machos e seis fêmeas) animais saudáveis, que nunca foram submetidos a procedimentos cirúrgicos, foram empregados nos experimentos 1 e 2, explicados a seguir, e quatro (duas fêmeas e dois machos), que foram submetidos a neurocirurgia para lesão do colículo superior, participaram do experimento 3. Os animais utilizados pesavam entre 2kg e 5kg e todos são pertencentes ao plantel do CP/UnB. Todas as condições de manejo e alojamento estão descritas na seção acima.

3.2.2. Procedimento

Os testes de IPP foram realizados em uma sala próxima aos viveiros. Nessa sala foi construído um compartimento (140 x 100 x 170 cm) revestido de espuma própria para isolamento acústico que dificultava a entrada de som externo na sala de teste, como visto na figura 7, no qual eram realizados os testes com os animais.



Figura 7. Sala de teste com isolamento acústico.

Para a realização dos testes, os animais foram capturados no viveiro pelo tratador responsável com o auxílio de um puçá e posicionados na cadeira de teste pelo experimentador. Para minimizar um eventual desconforto e diminuir o estresse, os animais foram submetidos a uma fase de condicionamento para que permanecessem dentro da cadeira de teste. Os animais foram posicionados na cadeira de forma que a cabeça ficava posicionada na parte superior próxima às caixas de som e as patas traseiras flexionadas em cima do acelerômetro de maneira que os animais ficassem sentados na plataforma do acelerômetro.

O período de condicionamento variou de duas a quatro semanas conforme o comportamento de cada indivíduo. Na fase inicial (Figura 8), os animais tiveram acesso ao aparato de teste onde recebiam alimentos. Após essa fase o animal era posicionado dentro da cadeira de restrição apenas com o ruído branco de 65 dB ligado durante uma hora. Como reforço positivo foi utilizado uva passa ou fresca quando o animal permanecia imóvel dentro do aparato experimental. Como garantia de que o animal estava condicionado de forma adequada

para a realização do teste a atividade basal do animal dentro da cadeira foi registrada e comparada ao seu comportamento com o estímulo de sobressalto.

A cadeira de restrição (Figura 9) foi construída especialmente para este experimento com macacos-prego, feita de material acrílico transparente de 15 mm de espessura, constituída por uma caixa que media 60 x 30 cm, onde o animal era colocado, e uma base de madeira de 40 x 45 cm. Essa base de madeira foi feita para manter o animal longe do chão, melhorando o bem-estar do sujeito durante o teste. Na parte superior da cadeira havia duas caixas de som (*Foster Model FT96H Frequency band; 4 KHz, 30 KHz*, E.U.A.) posicionadas a uma distância de 10 cm da cabeça do animal. As caixas de som foram conectadas ao equipamento gerador do estímulo sonoro (*O'Hara & Co., Ltda.*, Japão). O movimento dos animais foi captado por um acelerômetro (*San Diego Instruments*, E.U.A.) localizado na parte inferior da cadeira de restrição. O acelerômetro (Figura 10) foi ligado a um software (*Animal Startle – PCI 6024E*, desenvolvido por *O'Hara & Co., Ltda.*, Japão) que registrava a amplitude dos movimentos. Uma câmera de vídeo (Modelo Clone #1004124, Brasil) permitiu um monitoramento contínuo dos sujeitos por um computador durante todo o procedimento.



Figura 8. Fêmea de *Sapajus* em fase inicial de condicionamento em contato com a cadeira de restrição pela primeira vez.



Figura 9. Cadeira de restrição para macaco-prego. Na parte superior estão localizadas as caixas de som por onde são emitidos os estímulos sonoros e na parte inferior da caixa de acrílico o acelerômetro que registra o movimento do corpo do animal. O animal foi posicionado na cadeira com as patas traseiras apoiadas em cima da plataforma do acelerômetro de forma que permanecesse sentado na plataforma com a cabeça próxima às caixas de som.

A.



B.



Figura 10. Acelerômetro. Esse instrumento foi utilizado para captar os movimentos do corpo do animal que permanecia sentado em cima do acelerômetro durante as sessões de teste. A. Vista superior do acelerômetro. B. Vista frontal do acelerômetro.

Experimento 1. Amplitude da resposta de sobressalto

Na primeira etapa foram utilizados seis indivíduos, sendo dois machos e quatro fêmeas. Essa primeira fase experimental teve como intuito testar diferentes intensidades de pulso para estabelecer um parâmetro para estudos com *Sapajus* spp. na mensuração do sobressalto do corpo inteiro.

Os animais, acomodados na cadeira de restrição, foram submetidos a uma única sessão composta de 10 blocos iguais e consecutivos com cinco diferentes estímulos de ruído branco pseudoaleatórios (90, 95, 100, 115, 120 dB) de 40 ms de duração (Winslow *et al.*, 2002), totalizando 50 apresentações de estímulos, com um intervalo de 60 segundos entre as apresentações (Figura 11). Antes do início do experimento os animais tiveram dez minutos de aclimação na cadeira de teste. A resposta de sobressalto foi definida como o pico máximo da amplitude de voltagem do acelerômetro ao longo de 400 ms após a apresentação do estímulo e 400 ms antes da apresentação do estímulo foi registrado o pico máximo da voltagem de acelerômetro e essa medida foi registrada como atividade basal do animal.

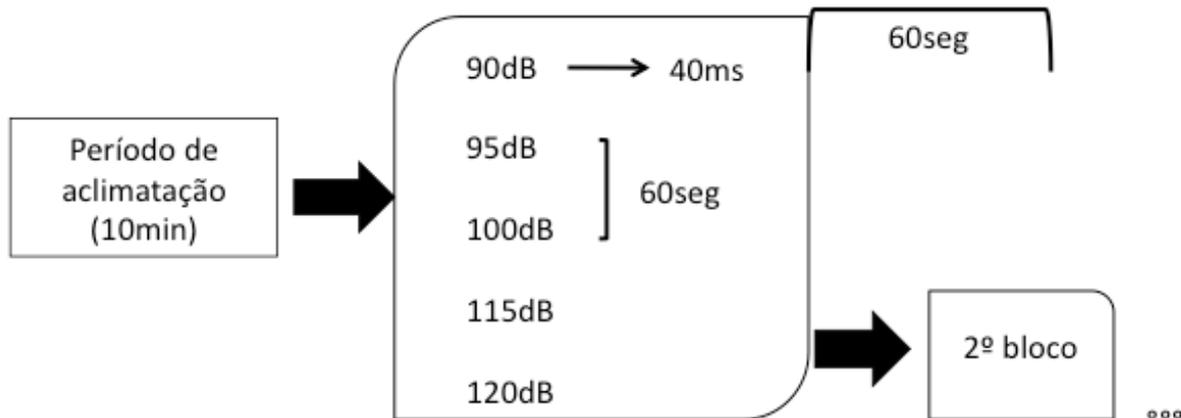


Figura 11: Representação esquemática do teste da amplitude da resposta de sobressalto.

Experimento 2. Inibição por pré-pulso

No segundo experimento foram utilizados oitos animais, sendo dois machos e seis fêmeas para determinar o melhor intervalo entre o pré-pulso e o pulso para indivíduos de *Sapajus spp.*

Nessa fase o procedimento experimental ocorreu de forma semelhante ao acima citado, entretanto neste momento a intensidade do pulso foi determinada em 115 dB. A intensidade de 115 dB foi estabelecida como a mais adequada para causar resposta de sobressalto, como será melhor descrito na seção de resultados. Os animais passaram por sessão única de sete blocos consecutivos com setes apresentações pseudoaleatórias em cada bloco. Cada bloco consistiu na apresentação de um estímulo sonoro, apenas com o pulso de 115 dB e 40 ms de duração, um com apenas o pré-pulso de ruído branco de 80dB e 20ms de duração e cinco apresentações de pré-pulso e pulso, variando o intervalos entre esses dois estímulos (45, 70, 120, 520 e 1020 ms) (Winslow *et al.*, 2002). O intervalo entre cada apresentação foi de 60 segundos (Figura 12). A resposta de sobressalto foi registrada ao longo de 1800 ms após cada apresentação. A porcentagem de inibição da resposta foi calculada para cada indivíduo a partir da seguinte fórmula:

$$\frac{100 * (p - pp)}{p}$$

onde p significa a resposta do animal após a apresentação do pulso (115 dB) e pp significa a resposta do animal após a apresentação dos estímulos de pré-pulso (80 dB) e pulso (115 dB) com intervalo de 120 ms. A média da porcentagem de inibição foi calculada para o grupo como realizado por (Fendt *et al.*, 1994; Winslow *et al.*, 2002, 2007).

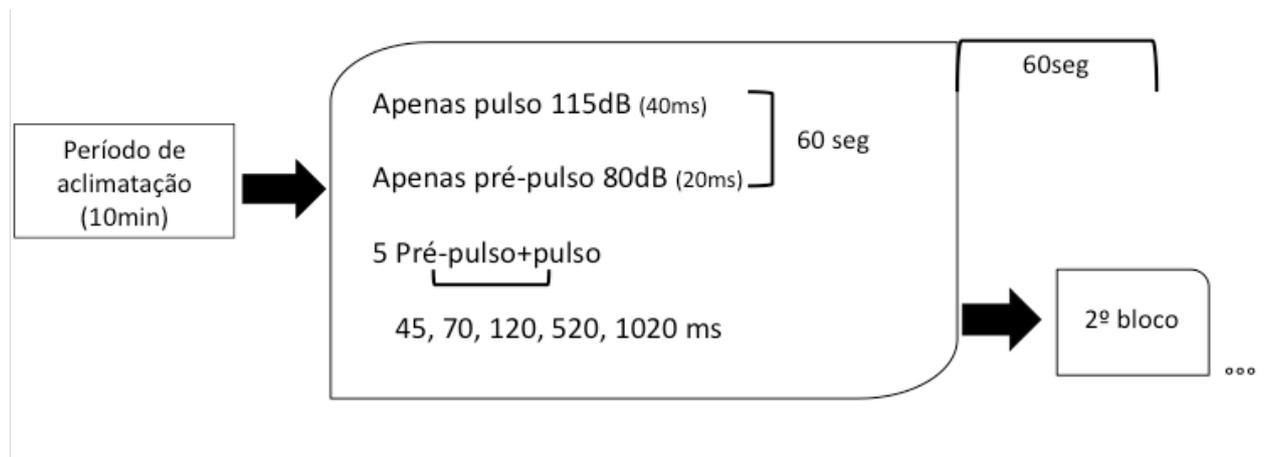


Figura 12: Representação esquemática do teste da inibição por pré-pulso da resposta de sobressalto.

Experimento 3. Efeito da lesão no colículo superior na inibição por pré-pulso

Nessa fase experimental os animais utilizados passaram por neurocirurgia (detalhada abaixo), dois machos tiveram lesão bilateral do colículo superior (LCS) e duas fêmeas passaram por lesão fictícia (LF). Os oito animais do experimento 2 (Inibição por pré-pulso) também foram submetidos a esse experimento e serviram como controle (CTRL).

Esses animais passaram por uma sessão única de dez blocos iguais e consecutivos, com apresentações pseudoaleatórias da seguinte forma: um pulso de 115dB e 40ms de duração, um pré-pulso de 80dB e 20ms de duração e uma apresentação de pré-pulso e pulso com intervalo de 120 ms. O intervalo de 120 ms foi escolhido para este experimento devido aos resultados encontrados no experimento 2 (para maiores detalhes vide seção de resultados). A resposta de sobressalto foi registrada ao longo de 600 ms após cada apresentação (Figura 13).

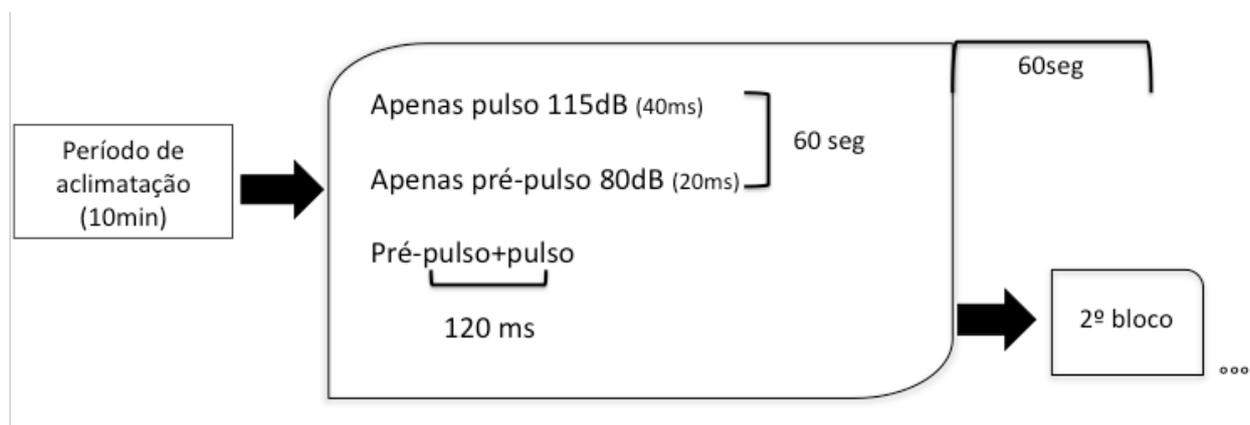


Figura 13. Representação esquemática do teste de inibição por pré-pulso com animais dos grupos LCS, LF, CTRL.

Cirurgia Estereotáxica

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados antes do início do presente trabalho, assim maiores detalhes podem ser encontrados em *Maior et al.* (2011).

Para a realização das cirurgias estereotáxicas foi utilizado um atlas estereotáxico para o gênero *Sapajus* (*Manocha et al.*, 1968). Os indivíduos foram anestesiados com isoflurano e tiveram os sinais vitais monitorados durante toda a cirurgia por um veterinário. Os animais foram fixados no aparelho estereotáxico para registrar as coordenadas referenciais, baseadas no atlas estereotáxico.

Após a tricotomia, a área de incisão foi desinfetada e foi aplicado um anestésico local. A craniotomia foi realizada por uma broca cirúrgica em regiões acima do colículo superior. Uma micropipeta de vidro conectada a uma seringa contendo ácido ibotênico (IBO) foi inserida verticalmente pelas incisões. Foram injetados de 0,4 a 0,6 μ L de IBO ou a mesma quantidade de veículo (10 mg/kg de *Phosphate-Buffered Saline* – PBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.) em cada estrutura, à uma taxa de 1 ml/ 5 min para evitar danos mecânicos no tecido nervoso. Após a injeção a micropipeta foi deixada no local por aproximadamente 2 min para dispersão do IBO ou PBS e para evitar refluxo durante a retirada. A lesão no crânio foi preenchida com acrílico dental e as incisões suturadas. Após 10 a 15 dias os animais foram

submetidos a sessão de ressonância magnética (Figura 14) para verificar a extensão da área atingida. Foram realizadas imagens de T-2 e FLAIR (*Fluid Attenuated Inversion Recovery*) com separação de cortes de 2 mm em GE Gyroscan de 1,5 T. As injeções de IBO resultaram em lesões bilaterais circunscritas, caracterizadas por perda neuronal recoberta por gliose, em todos os animais do grupo lesão. As lesões ocorreram em todas as camadas do CS até o limite inferior e se estenderam em dois terços do eixo rostrocaudal do CS.



Figura 14. Ressonância magnética (corte axial) de um dos sujeitos experimentais do grupo LCS após sete dias da neurocirurgia. Os círculos brancos mostram o edema bilateral no CS. Fonte: Rafael S. Maior.

3.2.3. Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no *IBM SPSS Statistics* Versão 20.

Amplitude de sobressalto: Foram realizados teste de análise de variância de medidas repetidas de um fator (ANOVA) e teste *post hoc* Bonferroni para examinar os efeitos das intensidades sonora do estímulo na amplitude de sobressalto sobre a atividade basal, a

resposta de sobressalto a diferentes intensidades de estímulos e a média de resposta de sobressalto para todas as intensidades ao longo dos blocos de apresentação de estímulos.

Inibição por pré-pulso: A porcentagem de inibição da resposta de sobressalto foi calculada para cada indivíduo pela seguinte fórmula (explicada anteriormente):

$$\frac{100 * (p - pp)}{p}$$

ANOVA de um fator foi realizada para comparação da resposta dos sujeitos nos diferentes intervalos interestímulos e a resposta ao longo dos blocos. O *post hoc* Bonferroni foi realizado para examinar os efeitos individuais.

Lesão no colículo superior: A porcentagem de inibição foi calculada como explicado acima. Um teste de *Kruskal-Wallis* foi realizado para comparar as médias da porcentagem de inibição para cada grupo (LCS, CF, CTRL).

Para todos os dados analisados foi considerado como significativo valores de $p < 0,05$. Os dados foram representados como a média da resposta de sobressalto ou da IPP \pm erro padrão da média (E.P.M.).

3.3. Resultados

Experimento 1. Amplitude da resposta de sobressalto

A resposta de sobressalto apresentou um aumento gradativo na amplitude de resposta com o aumento da intensidade do estímulo sonoro. Não foi encontrada diferença na atividade basal dos animais ($F_{4,295}=0,816$; $p=0,516$). Entretanto, o comportamento dos animais antes da apresentação do estímulo (atividade basal) diferiu do comportamento dos animais após a apresentação do estímulo. A figura 15 apresenta a média da resposta de sobressalto acústico relativo a cada estímulo sonoro apresentado e a atividade basal do animal dentro da cadeira de restrição. ANOVA seguido do *post hoc* Bonferroni mostrou que apenas as respostas de

sobressalto causadas pelas intensidades de 90 dB vs. 95 dB ($F_{4,295}=30,133$; $p=1,000$) e 115 dB vs. 120 dB ($F_{4,295}=30,133$; $p=1,000$) não tiveram diferença significativa quando comparadas entre elas.

Não houve diferença significativa na resposta de sobressalto dos animais durante a apresentação dos dez blocos repetidos de estímulos ($F_{9,290}=0,862$; $p=0,55$) (Figura 16).

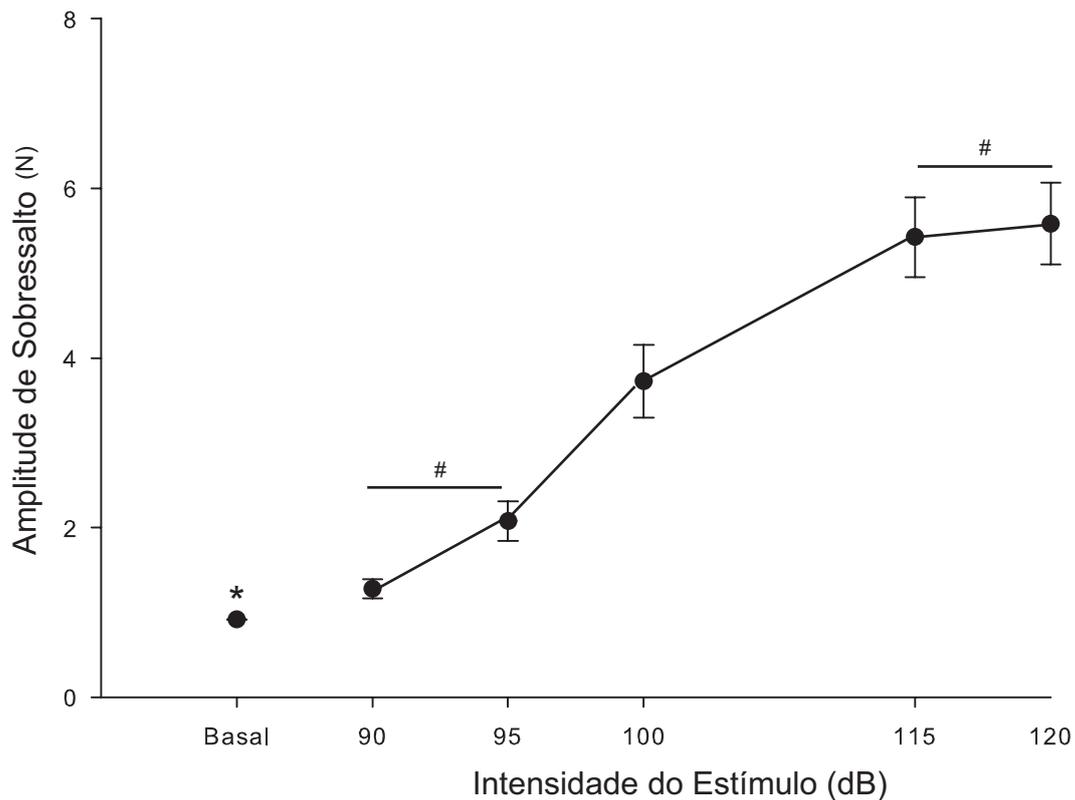


Figura 15. Média da amplitude da resposta de sobressalto para cada intensidade de estímulo (* representa diferença estatística entre atividade basal e todas as intensidades; # significa que não houve diferença estatística. (\pm E.P.M.) ($n=6$)).

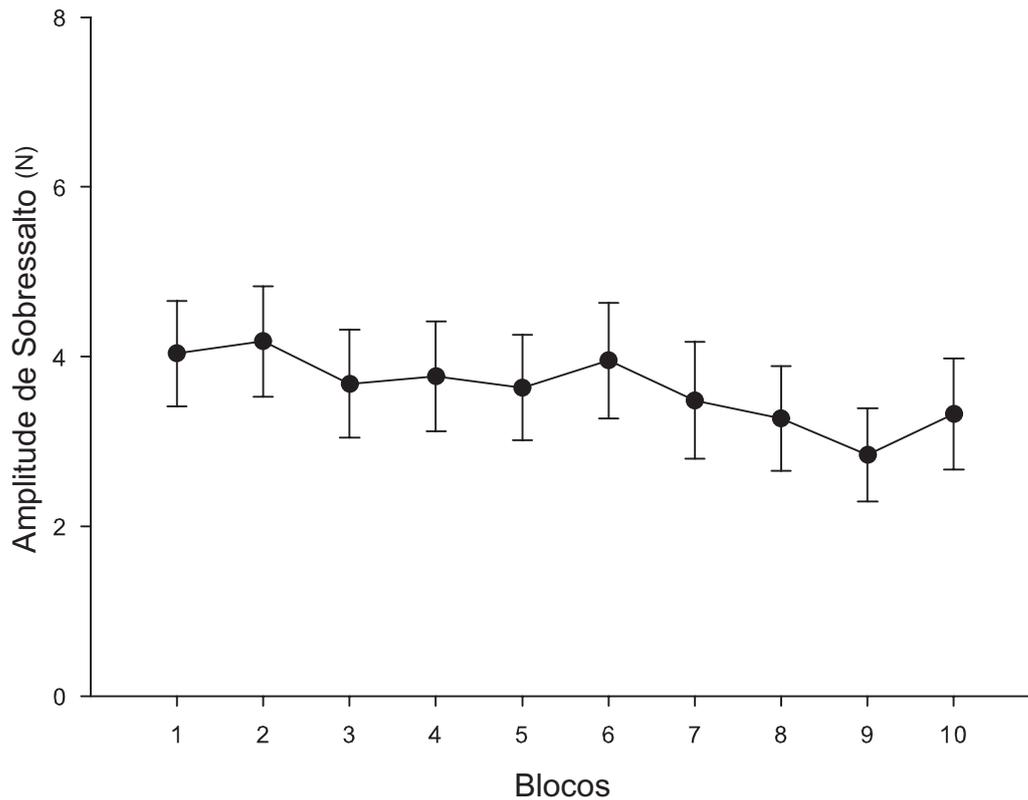


Figura 16. Média da amplitude de resposta de sobressalto para cada bloco de apresentação de estímulos (\pm E.P.M.) (n=6).

Experimento 2. Inibição por pré-pulso

A figura 17 mostra que apenas a apresentação do pré-pulso ($F_{6,441}=5,535$; $p<0,001$) e a apresentação do pré-pulso+pulso com intervalo de 120 ms ($F_{6,441}=5,535$; $p=0,01$) provocou resposta estatisticamente diferente da resposta de sobressalto causada pela apresentação do pulso (Pulso vs. 45 ms: $F_{6,441}=5,535$; $p=1,000$; Pulso vs. 70 ms: $F_{6,441}=5,535$; $p=0,618$; Pulso vs. 520 ms: $F_{6,441}=5,535$; $p=1,000$; Pulso vs. 1020 ms: $F_{6,441}=5,535$; $p=1,000$). Na figura 18 pode-se observar a porcentagem de inibição causada pelo pré-pulso nos diferentes intervalos interestímulo testados.

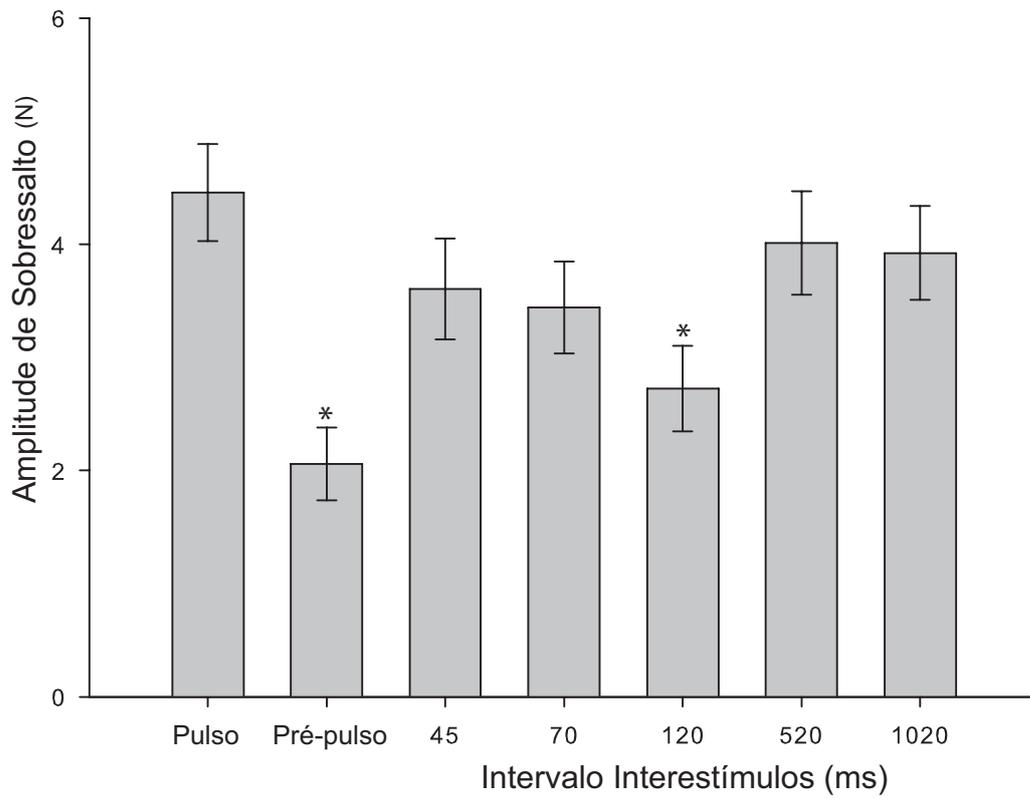


Figura 17. Média da amplitude de resposta de sobressalto para cada situação experimental, apenas pulso; apenas pré-pulso; cinco diferentes intervalos entre o pré-pulso e o pulso (\pm E.P.M.) (n=8).

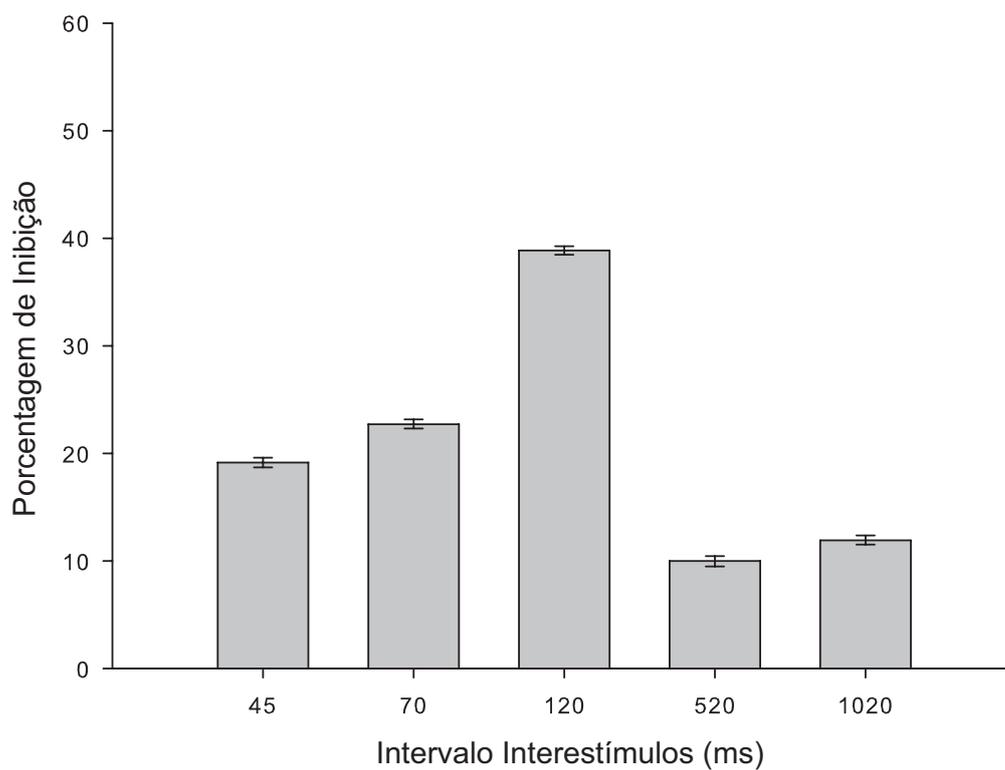


Figura 18. Porcentagem de IPP provocada pelo pré-pulso nos diferentes intervalos apresentados (\pm E.P.M.) (n=8).

Não houve diferença estatística da média da resposta de sobressalto durante a apresentação dos sete blocos de estímulos ($F_{6,385}=0,99$; $p=0,43$) (Figura 19).

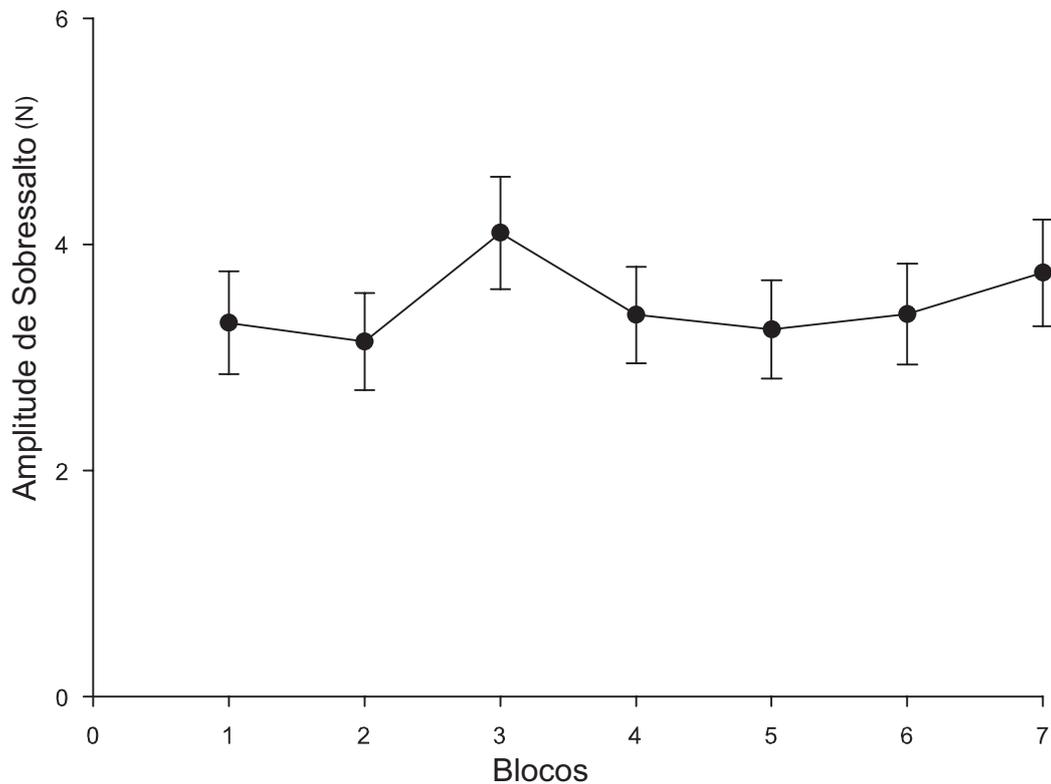


Figura 19. Média da amplitude de resposta de sobresalto para cada bloco de apresentação de estímulos (\pm E.P.M.) (n=8).

Experimento 3. Lesão no colículo superior

Como visto na figura 20, o teste de Kruskal-Wallis mostrou não haver diferença significativa na porcentagem de inibição quando comparado os três grupos, apesar de ser possível observar que porcentagem de inibição no grupo LCS tende a diminuir ($X^2=2,965$; $p=0,227$).

Não foi encontrada diferença entre os dez blocos de apresentações de estímulos. [CTRL: $F_{9,230}=1,116$; $p=0,15$; LF: $F_{9,79}=0,858$; $p=0,57$; LCS: $F_{9,70}=1,19$; $p=0,31$] (Figura 21).

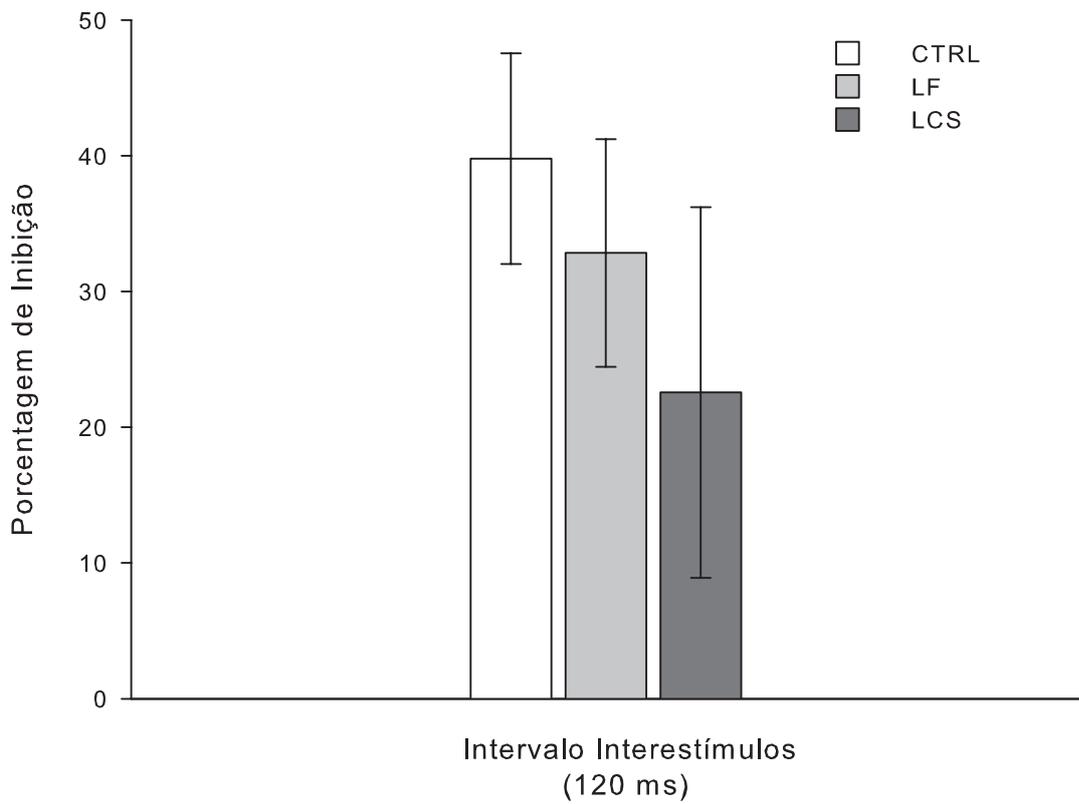


Figura 20. Porcentagem de inibição de cada grupo experimental (\pm E.P.M.) (Controle - CTRL: n=8; Lesão Fictícia - LF: n=2; Lesão no Colículo Superior - LCS: n=2).

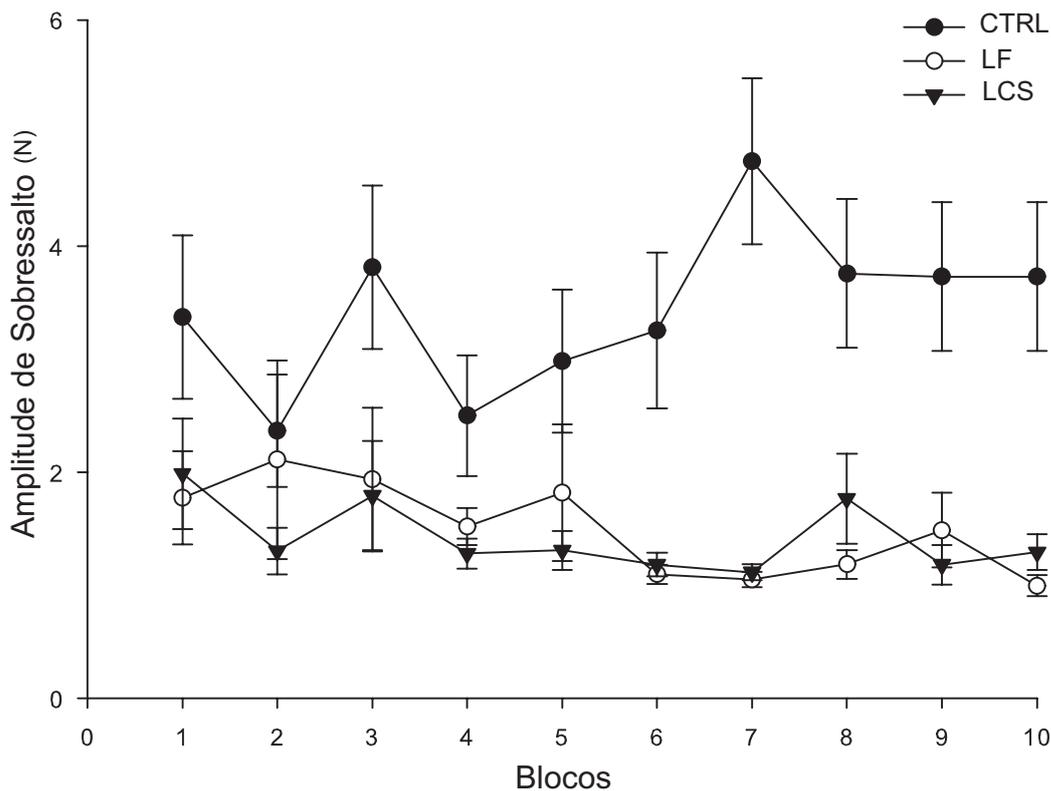


Figura 21. Média da amplitude de resposta de sobressalto para cada bloco de apresentação de estímulos (\pm E.P.M.) (Controle - CTRL: n=8; Lesão Fictícia - LF: n=2; Lesão no Colículo Superior - LCS: n=2).

3.4. Discussão

Os resultados demonstram o padrão de resposta de sobressalto de indivíduos do gênero *Sapajus* em um protocolo que mensura o reflexo do corpo todo do animal. Pode-se observar um aumento gradual da resposta de sobressalto conforme aumenta-se a intensidade do estímulo sonoro. Nossos dados corroboram um estudo realizado em macacos *rhesus* que revelou a possibilidade de se avaliar o padrão de resposta de sobressalto de indivíduos da espécie *Macaca mulatta* neste tipo de protocolo (Winslow *et al.*, 2002). Assim, mostramos que o padrão de resposta de sobressalto dessas duas espécies é o mesmo. As intensidades de 115 dB e 120 dB foram igualmente eficientes para causar resposta de sobressalto nos animais. Dessa forma, considerando que 115 dB foi intenso o suficiente para causar o reflexo esperado, essa intensidade foi a selecionada para o teste de IPP (experimentos 2 e 3).

O primeiro trabalho que mensurou a resposta de IPP em primatas não-humanos foi publicado em 2001, no entanto os autores não mostraram o padrão da resposta de sobressalto dos animais. Em tal estudo, um aparato experimental para testes em humanos foi adaptado para macacos-prego (*Cebus apella*). Os autores conseguiram, então, mensurar a IPP a partir do reflexo de piscada por meio de um eletrodo preso à pálpebra e encontraram um resultado similar ao apresentado no presente estudo (Linn & Javitt, 2001). A intensidade de estímulo utilizada para gerar o sobressalto também foi de 115 dB.

O padrão da resposta de IPP dos animais testados no presente estudo foi semelhante ao encontrado em primatas não-humanos em outros estudos (Linn & Javitt, 2001; Winslow *et al.*, 2002). Da mesma forma que foi observado em outros primatas, a intensidade de 80 dB foi ideal para inibir a resposta de sobressalto acústica quando apresentada a intensidade de 115 dB como pulso. Como mostrado nas figuras 17 e 18, o intervalo que melhor inibiu a resposta de sobressalto foi o de 120 ms, esse resultado também corrobora estudos realizados em outros primatas não-humanos (Linn & Javitt, 2001; Winslow *et al.*, 2002, 2007; Linn *et al.*, 2003).

O presente trabalho foi o primeiro estudo a demonstrar a resposta de IPP de macacos com lesão no CS. No experimento 3, tivemos a intenção de avaliar o nosso protocolo experimental e testar o papel do CS na resposta de IPP em primatas. Não foi detectada diferença significativa entre a porcentagem de inibição da resposta de sobressalto dos grupos experimentais. A pequena quantidade de indivíduos nos grupos LF e LCS foi uma limitação para a análise dos dados nesse experimento. No entanto, ainda foi possível identificar uma tendência a diminuição da porcentagem de inibição nos indivíduos com lesão no CS como observado em ratos (Fendt *et al.*, 1994; Fendt, 1999). Assim, é possível que com o aumento do número de animais seja possível uma melhor análise a respeito do papel do CS na resposta de IPP de macacos.

Sabe-se que o CS é uma importante estrutura relacionada a informações visuais (para revisão veja Isbell, 2006), entretanto o CS também recebe informações multissensoriais, como táteis e auditivas (Stein *et al.*, 1975; King & Hutchings, 1987; Sparks & Nelson, 1987). Além disso, as camadas profundas do CS estão relacionadas a comportamentos de defesa tanto em

roedores quanto em macacos (Northmore *et al.*, 1988; Brandão *et al.*, 2003; Ignashchenkova *et al.*, 2004; Maior *et al.*, 2011b, 2012). Em um antigo estudo, Leitner *et al.*, (1981) observaram que lesões na formação reticular do mesencéfalo causavam alterações na resposta de inibição do sobressalto com pré-pulsos visuais e auditivos e sugeriram que o CS pudesse estar envolvido nessa resposta. Essa hipótese foi corroborada pelo estudo realizado com lesão no CS de ratos (Fendt *et al.*, 1994). Posteriormente, foi demonstrado que o bloqueio farmacológico da atividade GABAérgica por meio de microinjeções de picrotoxina no CS aumenta a resposta de IPP, o que significa que a inibição GABAérgica provoca uma excitação dos neurônios do CS e está envolvida na resposta de IPP (Fendt, 1999).

A habituação é um processo de aprendizagem pelo qual respostas comportamentais diminuem após estímulos repetidos (Rankin *et al.*, 2009; Thompson, 2009). Como visto nas figuras 16, 19 e 21, observa-se uma leve redução, porém não significativa da amplitude do sobressalto durante a sessão de teste, o que significa que não houve habituação durante os testes. Em seres humanos, 13 repetições de estímulos sonoros são o suficiente para reduzir as respostas comportamentais com um estímulo de 100 dB como gerador de sobressalto (Lane *et al.*, 2013). Em macacos *rhesus* uma pequena diminuição na amplitude de sobressalto foi observada após 5 blocos de apresentação de estímulos dentro de uma única sessão (Winslow *et al.*, 2002). É interessante notar que déficits de habituação de sobressalto foram observados em pacientes com esquizofrenia (Geyer & Braff, 1987; Braff *et al.*, 1992). A habituação em indivíduos com lesões no CS, também não foi observada (Figura 21). No entanto, sabe-se que pacientes com esquizofrenia mostram déficits de habituação, devido à disfunção do hipocampo. Isso indicaria que esta redução de resposta de comportamento pode ser correlacionada com o desempenho de memória (Williams *et al.*, 2013) e, talvez, não haja necessariamente uma relação com o CS. Independentemente disso, a falta de habituação aqui observada sugere que os testes IPP nesta espécie podem ajudar a compreender os padrões de habituação observados em pacientes com esquizofrenia.

3.5. Conclusão

No presente estudo ficou demonstrado, a possibilidade de se testar a resposta de IPP em macacos-prego. A IPP é uma forma objetiva de mensuração da modulação do filtro sensorio-motor prejudicado em diversos transtornos neurológicos como, por exemplo, na esquizofrenia. O desenvolvimento de um teste de IPP como protocolo experimental que mensura, em primatas, o sobressalto a partir do movimento do corpo inteiro permite que novos estudos pré-clínicos sejam realizados para testar substâncias com potencial antipsicótico. Muitos estudos envolvendo novas drogas antipsicóticas têm sido realizados em roedores (p.e. Gacsályi *et al.*, 2013; Douma *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2014; Pedrazzi *et al.*, 2015). Entretanto, poucos estudos utilizam primatas para testar o efeito de drogas na resposta de IPP (Javitt & Lindsley, 2001; Linn *et al.*, 2003). Em função da proximidade filogenética entre macacos e seres humanos, o uso de primatas não-humanos como modelos experimentais para testes de drogas pode produzir resultados de grande valor para o entendimento e tratamento de transtornos psiquiátricos.

4. ESTUDO 2

4.1. Objetivo

Identificar os efeitos do antagonista do receptor NMDA, MK-801, no teste de IPP em indivíduos de *Sapajus spp.* Testar os efeitos do canabidiol após a administração de MK-801.

4.2. Materiais e Método

Nesse estudo foram utilizados oito macacos-pregos (*Sapajus spp.*), sendo dois machos e seis fêmeas. Sete animais foram utilizados no estudo apresentado no Estudo 1, apenas uma fêmea não havia sido submetida ao teste de IPP e devido a isso precisou passar pelo processo de condicionamento explicado anteriormente. É importante frisar que nenhum macaco havia recebido droga experimental antes desse estudo. As análises de dados dos experimentos 1 e 2 (explicados a seguir) foram realizadas de maneira que o experimentador não tinha conhecimento de qual tratamento o animal havia recebido.

Todas as informações a respeito de questões éticas, manutenção dos animais no CP/UnB, bem como os procedimentos experimentais do teste de IPP estão explicados detalhadamente na seção 3.2 (Estudo 1).

Após o teste de IPP os animais foram monitorados no próprio viveiro por uma câmera de vídeo (Sony DCR-SR65) durante 30 min para avaliação do comportamento e para garantir que estavam bem após a administração da droga.

Experimento 1. Efeitos do MK-801 no teste de IPP

No primeiro experimento os animais foram submetidos ao teste de IPP após receberem uma dose de MK-801. O objetivo desse experimento foi identificar os efeitos dessa droga sobre a inibição por pré-pulso em macacos-prego.

Droga:

Dizocilpina (MK-801) (0; 0,01; 0,02; 0,03 mg/kg – Sigma-Aldrich, Brasil) foi dissolvida em Tween 80 (Sigma-Aldrich, Brasil) e solução salina 0,9% (1:19) e administrada por via intramuscular (i.m.), no volume de 1 ml/kg. A escolha das doses utilizadas foi baseada em estudos anteriormente realizados em primatas não-humanos (Buffalo *et al.*, 1994; Harder *et al.*, 1998).

Procedimento:

Oito animais foram submetidos ao teste de IPP após 20 min da administração de MK-801. Cada animal recebeu uma única vez cada dose da droga, assim como a solução veículo (VEH) com um intervalo de pelo menos duas semanas entre cada administração (Tsukada *et al.*, 2005). Após a administração o sujeito foi posicionado na cadeira de restrição, onde permaneceu durante 20 min até o início do teste de IPP.

O teste de IPP consistiu em uma sessão de dez blocos iguais e consecutivos, com apresentações pseudoaleatórias de estímulos sonoros sendo: um pulso de 115dB e 40ms de duração, um pré-pulso de 80dB e 20ms de duração e uma apresentação de pré-pulso e pulso com intervalo de 120 ms. A resposta de sobressalto foi registrada ao longo de 600 ms após cada apresentação. O procedimento do teste de IPP foi o mesmo realizado no Experimento 3 do Estudo 1 (para mais detalhes veja seção 3.2.2.).

A sequência de doses de MK-801 foram administradas nos animais aleatoriamente uma vez por semana como observado na figura 22. A administração de VEH foi realizada da seguinte forma: 4 animais receberam VEH na primeira semana (grupo 1 – G1), e outros 4 receberam doses aleatórias de MK-801 (grupo 2 – G2). Na última semana de teste o G1 recebeu doses de MK-801 e o G2 recebeu VEH. Nas duas semanas intermediárias todos os animais receberam doses de MK-801.

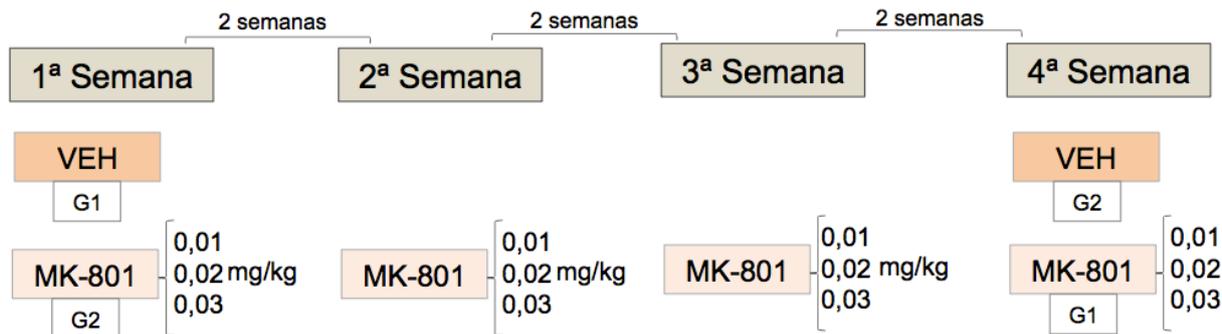


Figura 22. Representação esquemática do experimento 1.

Experimento 2. Efeitos do CBD no teste de IPP

Essa etapa teve o intuito de identificar o efeito do CBD no teste de IPP em macacos-prego. Os animais utilizados foram os mesmos do experimento anterior, no entanto devido a problemas técnicos no registro dos dados comportamentais duas fêmeas foram excluídas das análises.

Droga:

Canabidiol (CBD) (15; 30; 60 mg/kg – STI Pharm, Inglaterra) foi dissolvido em Tween 80 (Sigma-Aldrich, Brasil) e solução salina 0,9% (1:19) e administrada por via intraperitoneal (i.p.), no volume de 1 ml/kg. A escolha das doses utilizadas foi baseada em estudos anteriormente realizados em roedores (Moreira & Guimarães, 2005; Almeida *et al.*, 2013; Levin *et al.*, 2014).

Procedimento:

Essa etapa foi realizada um mês após a conclusão da etapa anterior. Oito animais foram submetidos ao teste de IPP após 30 min (Levin *et al.*, 2014) da administração do CBD. Para administração de CBD os animais foram levemente anestesiados com isoflurano, como explicado no estudo 1, para que fosse possível realizar a injeção no lugar correto sem causar lesão no animal. Cada macaco recebeu cada dose da droga uma vez por semana com um intervalo de pelo menos duas semanas entre cada administração (Figura 23). Após a administração o sujeito foi posicionado na cadeira de restrição, onde permaneceu durante 30

min até o início do teste de IPP. A administração da solução veículo (VEH) não foi repetida para evitar dupla captura e contenção dos animais e para evitar habituação ao teste de IPP, assim a resposta de sobressalto utilizada na análise de dados foi a mesma do experimento anterior. O procedimento experimental do teste de IPP foi o mesmo realizado no experimento 1.

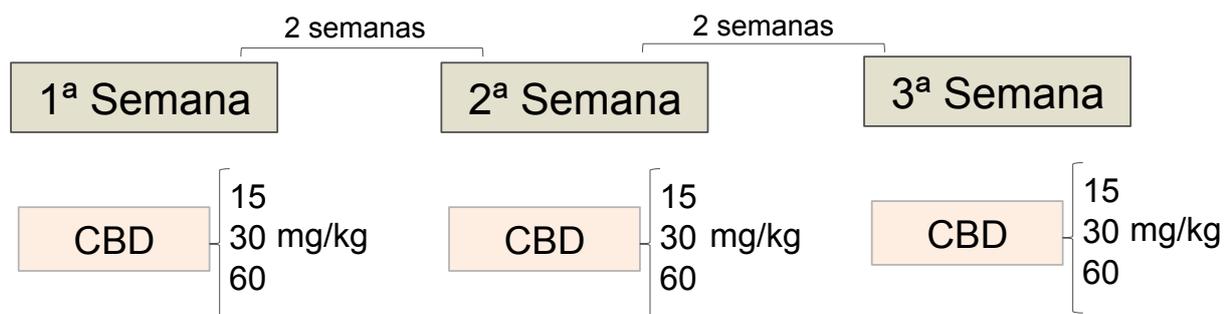


Figura 23. Representação esquemática do experimento 2.

Experimento 3. Efeitos do pré-tratamento de CBD após repetidas administrações de MK-801 no teste de IPP

Drogas:

MK-801 (0,02 mg/kg; i.m.) e CBD (60 mg/kg; i.p.) foram dissolvidas em Tween 80 (Sigma-Aldrich, Brasil) e solução salina 0,9% (1:19), no volume de 1 ml/kg.

Procedimento:

Essa etapa foi realizada quatro meses após a conclusão da etapa anterior. Os animais passaram por administrações repetidas de MK-801 (i.m. 20 min antes do teste de IPP) uma vez por semana durante três semanas consecutivas e na quarta semana receberam o CBD e o MK-801 com intervalo de 10 min, como visto na figura 24. O CBD foi administrado 30 min antes do início do teste de IPP, e o MK-801 20 min. Após duas semanas os animais receberam solução veículo (salina e Tween 80 i.m.).

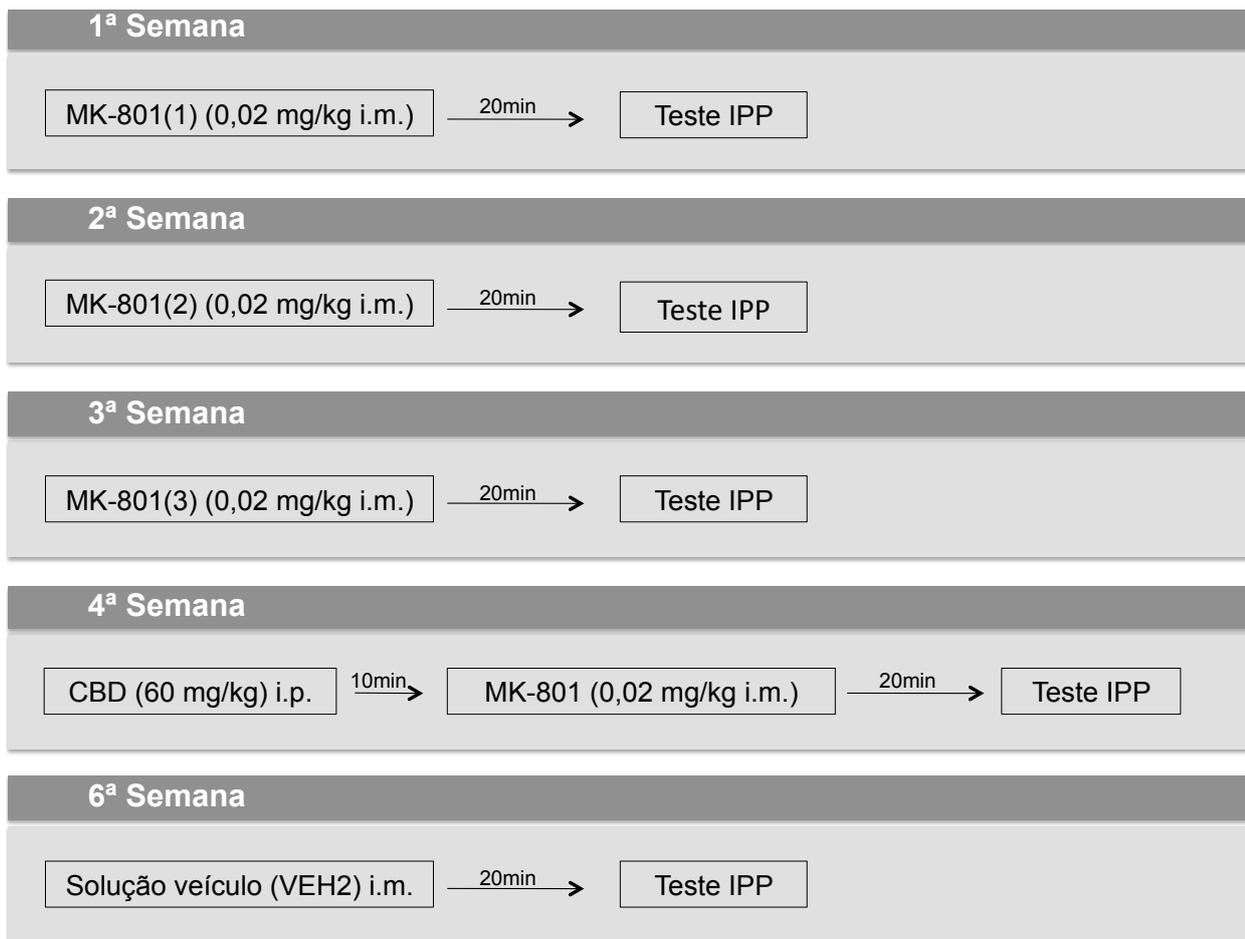


Figura 24. Representação esquemática dos procedimentos experimentais do experimento 3.

4.2.1. Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no *IBM SPSS Statistics* Versão 20.

O teste de normalidade *Shapiro Wilk* indicou que os dados desse estudo não apresentam distribuição normal. Para a normalização dos dados novamente foi realizado o cálculo da porcentagem de inibição pela fórmula (explicada anteriormente):

$$\frac{100 * (p - pp)}{p}$$

Efeitos do MK-801 no teste de IPP: Foi realizado o teste de *Friedman* para examinar os efeitos de cada dose do MK-801 na amplitude de sobressalto e porcentagem de inibição. O teste de *Wilcoxon Rank Sum* foi realizado para comparar a porcentagem de inibição na

avaliação temporal dos efeitos do MK-801 nos dados independentes e o teste de *Wilcoxon Signed Rank* nos dados dependentes.

Efeitos do CBD no teste de IPP: Foi realizado o teste de *Friedman* para examinar os efeitos de cada dose do CBD na amplitude de sobressalto e porcentagem de inibição.

Efeitos do pré-tratamento de CBD após repetidas administrações de MK-801 no teste de IPP: Foi realizado o teste de *Friedman* para comparação da amplitude de resposta e porcentagem de inibição em cada semana de administração do MK-801 e do CBD com MK-801, bem como da resposta com administração de solução veículo.

Para todos os dados analisados foi considerado como significativo valores de $p < 0,05$. Os dados foram representados como a média da resposta de sobressalto ou da IPP \pm erro padrão da média (E.P.M.). Apenas na figura 26, foi representada a mediana da porcentagem de IPP.

4.3. Resultados

Experimento 1. Efeitos do MK-801 no teste de IPP

O teste de *Friedman* indicou uma diminuição na porcentagem de inibição quando administrado o MK-801 apenas na dose de 0,03 mg/kg comparado com o veículo ($X^2_3=9.800$; $p=0.002$) como observado na figura 25.

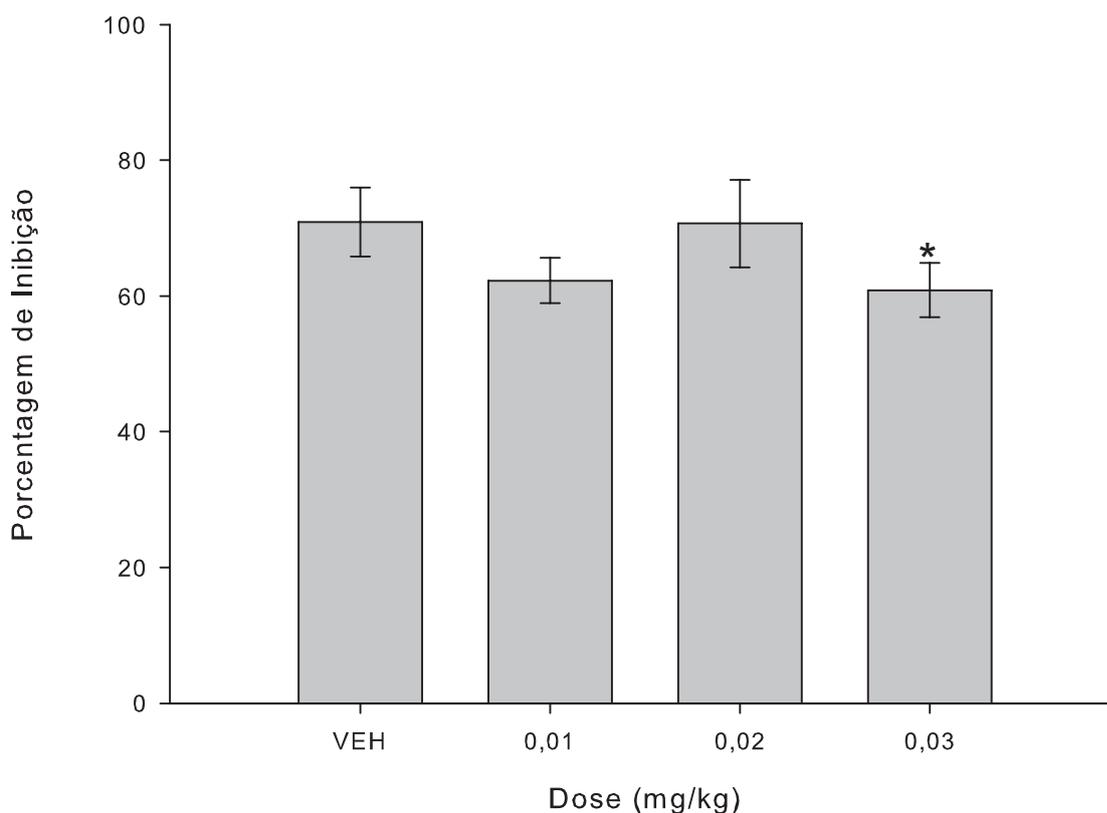


Figura 25. Mediana da porcentagem de inibição para cada dose de MK-801 (n=8). * significa diferença estatística em comparação ao veículo.

A figura 26 mostra a média da amplitude da resposta de sobressalto quando apresentado apenas o pulso e quando apresentado o pré-pulso com o pulso com intervalo de 120 ms. Quando apresentado apenas o pulso, a resposta de sobressalto apenas diferiu do VEH na dose de 0,03 mg/kg ($X^2_3=5.000$; $p=0.025$). Quando apresentado os dois estímulos, condição pré-pulso+pulso, não houve diferença estatística em nenhuma dose e VEH ($X^2_3=7.738$; $p=0.052$).

A figura 27 mostra uma comparação do efeito de VEH e MK-801 no tempo, independente da dose administrada. É possível observar um déficit da porcentagem de inibição nos animais que receberam MK-801 na primeira semana (grupo G2) em comparação com o grupo que recebeu VEH (grupo G1) ($Z=-3.830$; $p<0.001$). Além disso, houve um aumento na porcentagem de inibição após repetição do tratamento ($Z=-4.359$; $p<0.001$). Na comparação o

comportamento dos animais do grupo G2, foi observado diferença significativa entre a resposta dos animais quando receberam MK-801 na 1ª semana (MK-801/G2) e quando receberam VEH na 4ª semana (VEH/G2) ($Z=-2.151$; $p=0.032$). Não houve diferença estatística entre a porcentagem de inibição nas administrações dos VEH/G1 e VEH/G2 ($Z=-0.414$; $p=0.684$), assim como não houve diferença entre o VEH/G2 e MK-801/G1 ($Z=-0.799$; $p=0.429$). Da mesma forma, não houve diferença entre VEH/G1 e MK-801/G1 ($Z=-1.116$; $p=0.265$).

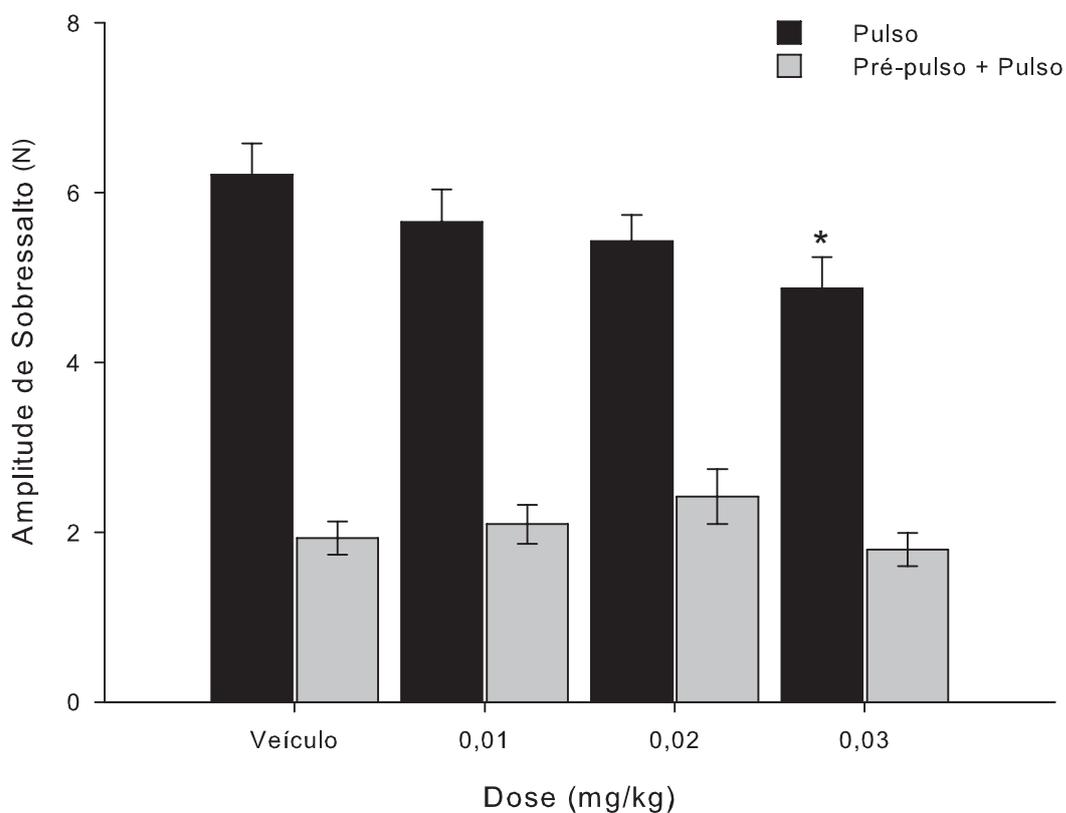


Figura 26. Média da amplitude de sobressalto Colunas pretas representam a resposta de sobressalto após a apresentação do pulso, colunas cinzas representam a resposta de sobressalto após a apresentação do pré-pulso+pulso (\pm E.P.M.) ($n=8$). * significa diferença entre dose e VEH.

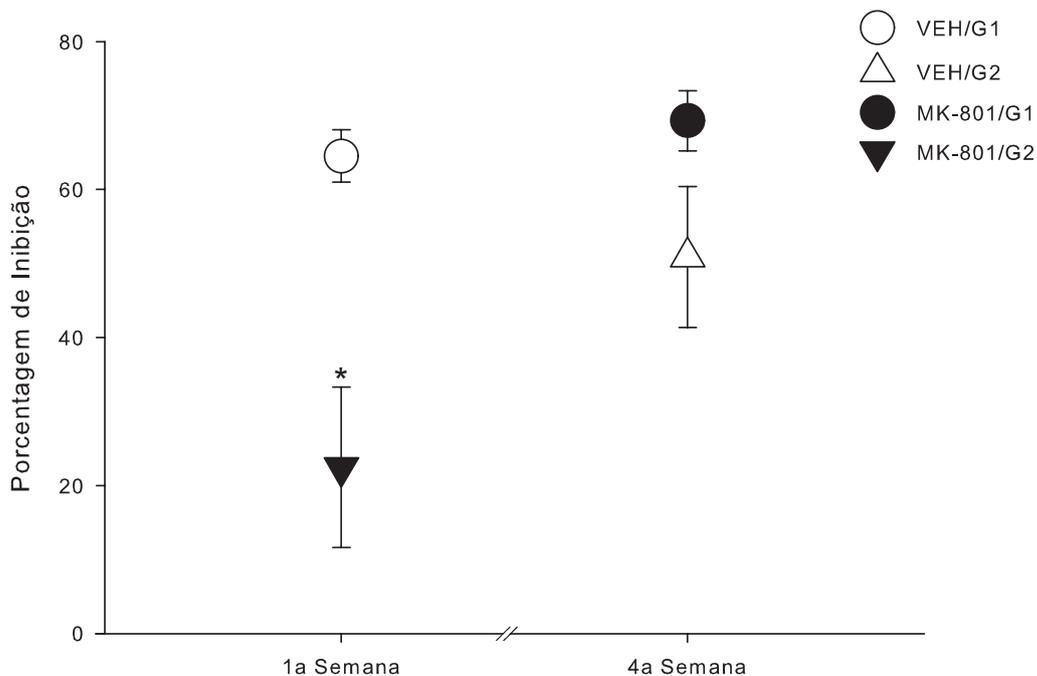


Figura 27. Média da porcentagem de inibição da resposta de sobressalto na 1ª e na 4ª semana de administração (\pm E.P.M.) (n=4 em cada grupo). Círculos representam a resposta de IPP do grupo G1, triângulos representam a resposta de IPP do grupo G2. Símbolos brancos representam a resposta de IPP após a administração de VEH e pretos significam a resposta de IPP após a administração de MK-801 (média de todas as doses). * significa diferença estatística da resposta do MK-801/G2 para todas as outras.

A figura 28 mostra a média da amplitude de sobressalto quando apresentado apenas o pulso e quando apresentado a pré-pulso com o pulso. Na apresentação apenas do pulso, a resposta de sobressalto do VEH na 4ª semana (VEH/G2) foi diferente de todas as outras respostas nessa situação (vs. VEH/G1: $Z=-2.223$, $p=0.026$; vs. MK-801/G2: $Z=-2.850$, $p=0.004$; vs. MK-801/G1: $Z=-2.098$, $p=0.036$). Na apresentação do pré-pulso+pulso, MK-801 na 4ª semana (MK-801/G1) foi estatisticamente diferente de todos os outros (vs. VEH/G1: $Z=-2.139$, $p=0.032$; vs. VEH/G2: $Z=-3.662$, $p<0.001$; vs. MK-801/G2: $Z=-2.560$, $p=0.010$). Além disso, VEH na 1ª semana (VEH/G1) diferiu do MK-801 na 1ª semana (MK-801/G2) ($Z=-2.035$, $p=0.042$).

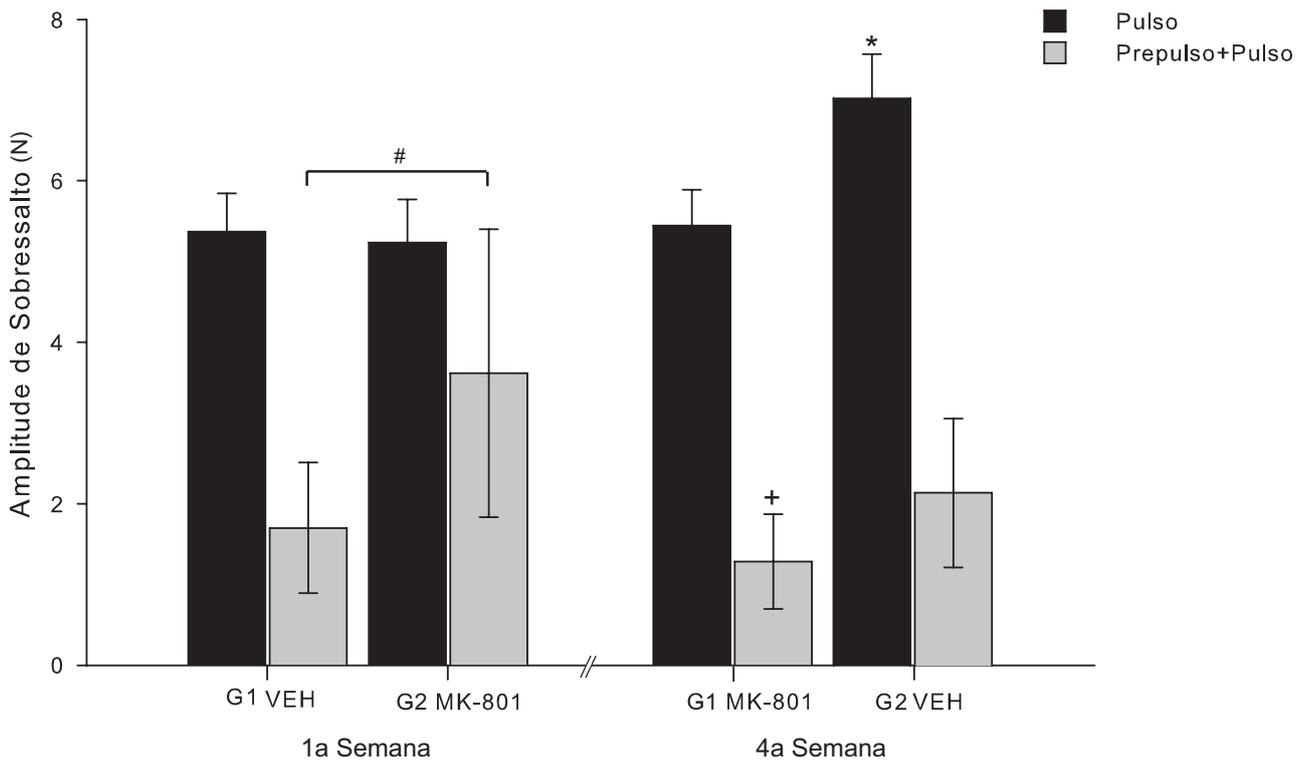


Figura 28. Média da amplitude de sobressalto na 1ª e na 4ª semana de administração (\pm E.P.M.) (n=4 para cada grupo). Colunas pretas representam resposta de sobressalto após a apresentação do pulso e colunas cinzas representam resposta de sobressalto após a apresentação de pré-pulso+pulso. * significa diferença comparado a todas as outras respostas de pulso. + significa diferente de todas as respostas de pré-pulso+pulso; # significa diferença estatística entre VEH/G1 e MK-801/G2.

Experimento 2. Efeitos do CBD no teste de IPP:

O teste de *Friedman* não indicou diferença estatística na porcentagem de inibição entre as doses de CBD entre elas e nem comparadas com o VEH ($X^2_3=3,860$; $p=0,277$) (Figura 29). Assim como também não indicou diferença entre a porcentagem de inibição durante as semanas de administração da droga, independente de dose ($X^2_3=3,600$; $p=0,165$) (Figura 30).

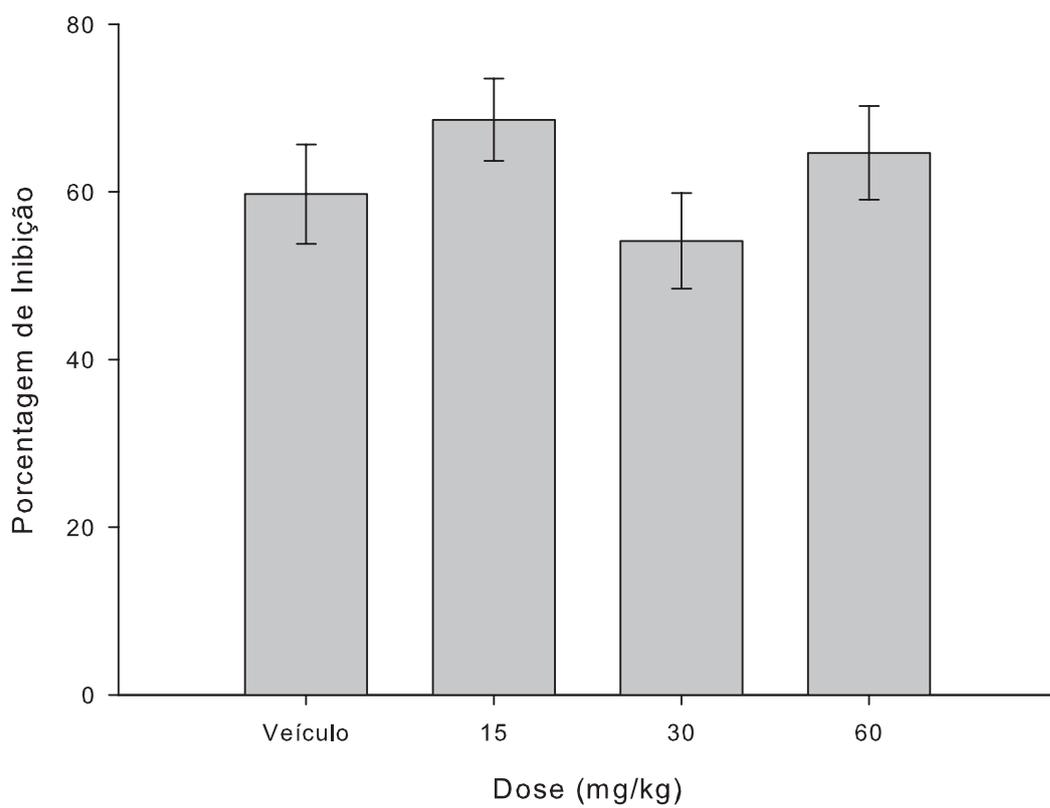


Figura 29. Média da porcentagem de inibição para cada dose de CBD (\pm E.P.M.) (n=6).

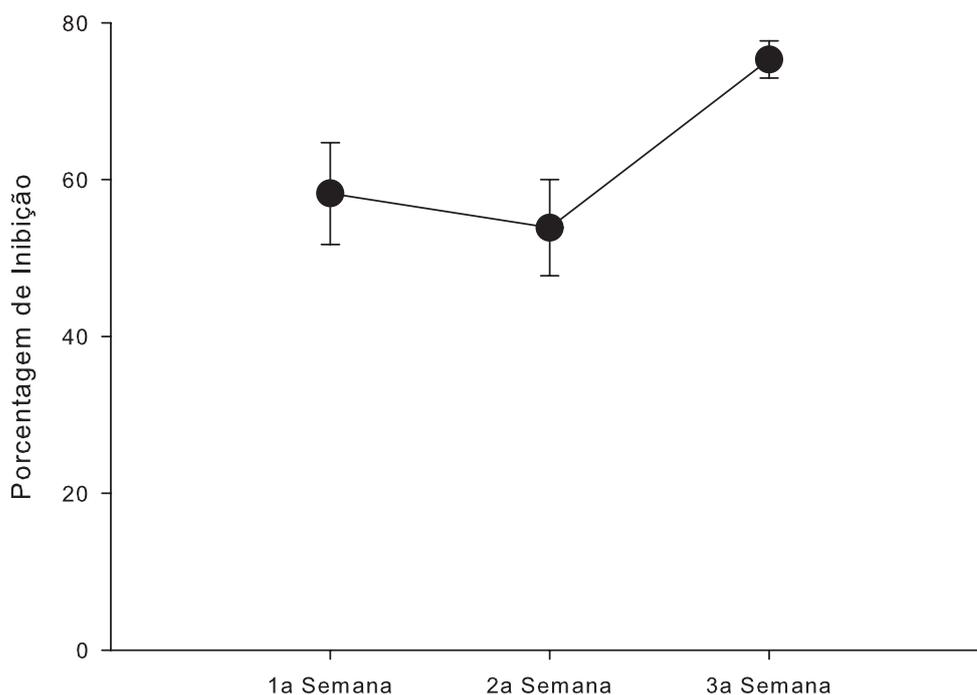


Figura 30. Média da porcentagem de IPP em cada semana de administração de CBD, independente de dose administrada (\pm E.P.M.) (n=6).

A figura 31 mostra a amplitude de resposta de sobressalto quando apresentado apenas o pulso e quando apresentado o pré-pulso+pulso. Não houve diferença entre as respostas de sobressalto quando apresentado o pulso ($X^2_3=0,340$; $p=0,952$). Porém houve diferença na resposta de sobressalto quando apresentado pré-pulso+pulso. Essa resposta na dose de 15 mg/kg foi diferente da resposta quando administrado VEH ($X^2_3=5,400$; $p=0,020$), da dose de 30 mg/kg ($X^2_3=5,586$; $p=0,018$) e de 60 mg/kg ($X^2_3=10,593$; $p=0,001$), além disso a resposta na dose de 30 mg/kg foi diferente da resposta quando administrado VEH ($X^2_3=4,267$; $p=0,039$).

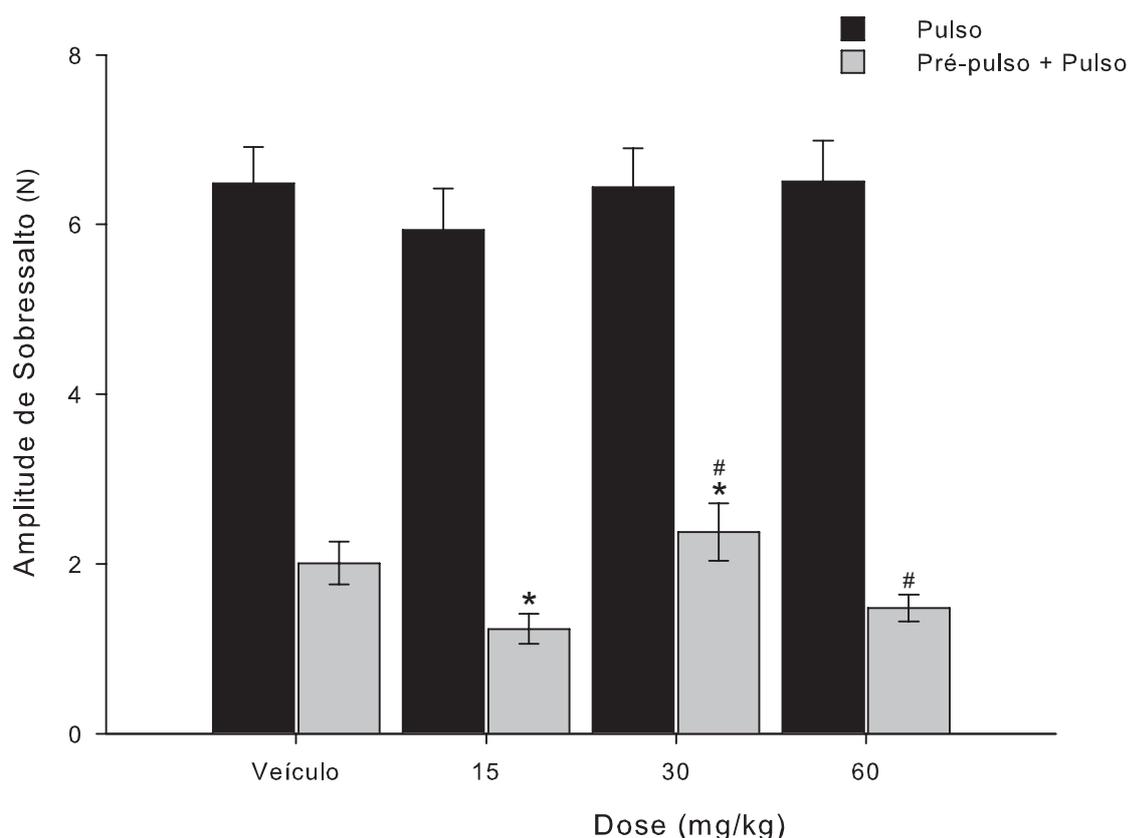


Figura 31. Média da amplitude de sobressalto (\pm E.P.M.) (n=6). Colunas pretas representam resposta de sobressalto após a apresentação do pulso. Colunas cinzas representam resposta de sobressalto quando apresentado pré-pulso+pulso. * significa diferença na resposta após a apresentação de pré-pulso+pulso na comparação das doses 15 mg/kg vs. VEH, e 30 mg/kg vs. VEH. # significa diferença quando apresentado pré-pulso+pulso na comparação das doses 30 mg/kg vs. 15 mg/kg, e 60 mg/kg vs. 15 mg/kg.

Experimento 3. Efeitos do pré-tratamento de CBD após repetidas administrações de MK-801 no teste de IPP

Após a administração de MK-801 houve um aumento da porcentagem de inibição ainda na primeira semana em relação ao VEH1 ($X^2_5=14,450$; $p<0,001$), que se manteve após três semanas consecutivas (VEH1 vs. MK-801(2): $X^2_5=6,050$; $p=0,014$; VEH1 vs. MK-801(3): $X^2_5=8,450$; $p=0,004$) (Figura 32). Ainda na figura 32 pode-se observar que com a administração do CBD na quarta semana consecutiva de teste de IPP a porcentagem de inibição diminuiu tornando-se estatisticamente igual ao do VEH realizado no experimento 1 ($X^2_5=0,001$;

$p < 0,001$), porém diferente da resposta de inibição com administração de VEH2 ($X^2_5=7,200$; $p=0,007$).

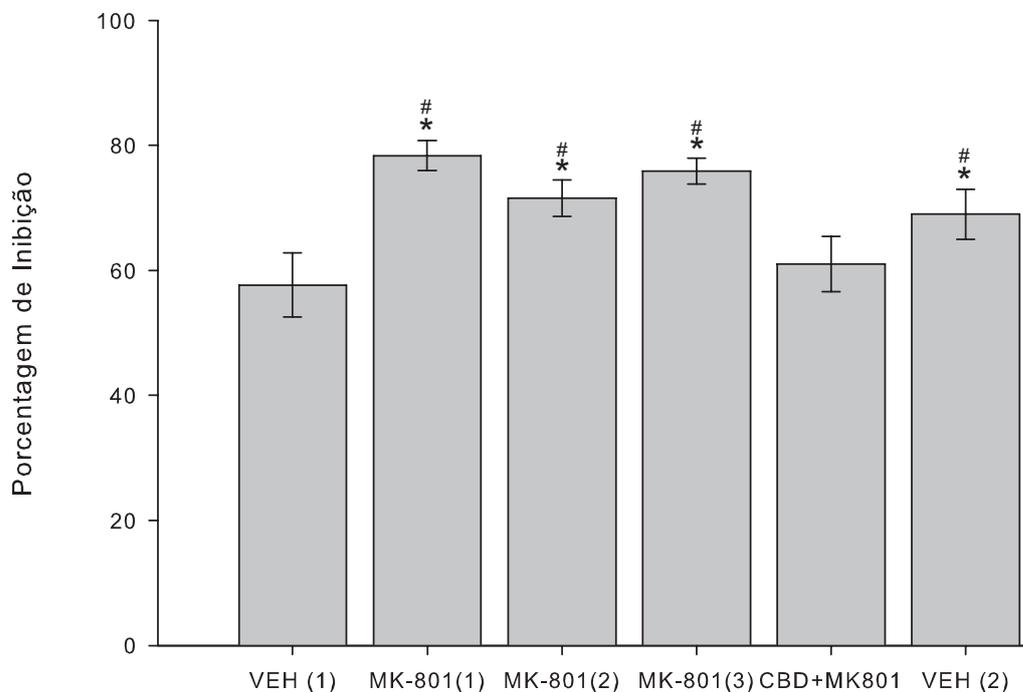


Figura 32. Média da porcentagem de inibição em cada situação experimental (\pm E.P.M.) ($n=8$) (VEH(1) significa administração de VEH do experimento 1, estudo 2; MK-801(1) significa administração de MK-801 na 1ª semana; MK-801(2) significa administração de MK-801 na 2ª semana; MK-801(3) significa administração de MK-801 na 3ª semana; CBD+MK-801 significa administração das duas drogas na 4ª semana de teste; VEH(2) significa administração de VEH na 6ª semana de teste). * significa diferente de VEH(1); # significa diferente de CBD+MK-801.

A figura 33 mostra a amplitude da resposta quando apresentado apenas o pulso e quando apresentado o pré-pulso+pulso em cada situação experimental. Quando apresentado apenas o pulso, o teste de Friedman indicou diferença estatística entre: VEH(1) vs. MK-801 ($X^2_5=7,200$; $p=0,007$), vs. MK-801(2) ($X^2_5=7,200$; $p=0,007$); MK-801(1) vs. MK-801(3) ($X^2_5=5,000$; $p=0,025$), vs. CBD+MK-801 ($X^2_5=12,800$; $p < 0,001$); e MK-801(3) vs. CBD+MK-801 ($X^2_5=5,000$; $p=0,025$). Quando apresentado o pré-pulso+pulso, foram diferentes do VEH(1) as seguintes respostas de sobressalto: MK-801(1) ($X^2_5=12,800$; $p < 0,001$); MK-801(3) ($X^2_5=26,450$; $p < 0,001$); CBD+MK-801 ($X^2_5=10,646$; $p=0,001$) e VEH2 ($X^2_5=26,450$; $p < 0,001$). A resposta de

sobressalto quando administrado MK-801(1) foi diferente de MK-801(3) ($X^2_5=4,050$; $p=0,044$) e VEH2 ($X^2_5=9,800$; $p=0,002$). Além disso, quando administrado MK-801(2) a resposta foi diferente de: MK-801(3) ($X^2_5=23,405$; $p<0,001$); CBD+MK-801 ($X^2_5=4,050$; $p=0,044$) e VEH2 ($X^2_5=14,450$; $p<0,001$).

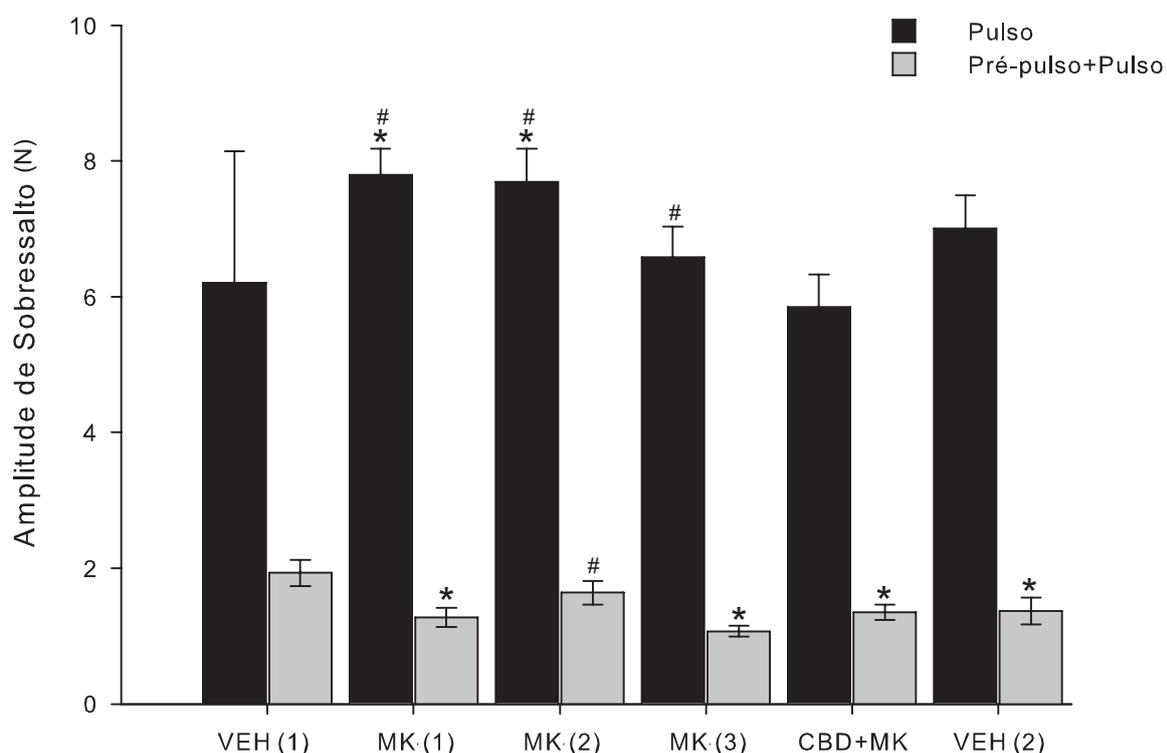


Figura 33. Média da amplitude de sobressalto (\pm E.P.M.) ($n=8$). Colunas pretas significam resposta quando apresentado pulso. Colunas cinzas significam resposta quando apresentado pré-pulso+pulso. * significa diferente de VEH(1). # significa diferente de CBD+MK-801.

4.4. Discussão

O presente estudo mostra o efeito do antagonista de NMDA, MK-801, na resposta de IPP de macacos-prego. O tratamento com MK-801 induziu uma diminuição na resposta de IPP, assim como na amplitude da resposta de sobressalto (sem apresentação do pré-pulso), na dose mais alta utilizada (0,03 mg/kg). Estudos que avaliaram os efeitos do MK-801 em outras espécies de primatas utilizaram outros paradigmas comportamentais, como testes de memória, porém também indicaram que as alterações comportamentais aparecem principalmente quando administrada a dose de 0,03 mg/kg ou doses mais altas (Ogura & Aigner, 1993; Buffalo

et al., 1994; Harder *et al.*, 1998). É possível que se utilizando doses acima de 0,03 mg/kg o déficit da resposta de IPP fosse mais acentuado. Entretanto, doses mais altas de MK-801 induzem severos quadros de ataxia e parkinsonismo, o que poderia interferir na resposta de sobressalto dos animais (Crossman *et al.*, 1989; Rupniak *et al.*, 1992). Assim, optou-se por doses mais baixas, especialmente por este se tratar do primeiro estudo de IPP com administração de MK-801 em primatas não-humanos. Mesmo assim, foi observado (porém não quantificado) alterações no comportamento motor dos animais nas duas doses mais altas (0,02; 0,03 mg/kg). Essas alterações de comportamento caracterizaram-se pela falta de coordenação dos movimentos e desequilíbrio, típicos da ataxia. Boyce *et al.*, (1991) e Rupniak *et al.*, (1992) chegaram a observar comportamentos semelhantes na administração destas mesmas doses em micos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) e macacos rhesus (*Macaca mulatta*).

A resposta de IPP foi reduzida após a administração aguda de MK-801, como ocorrido em estudos com roedores (ex. Feifel & Priebe, 1999; Gururajan *et al.*, 2011; Khella *et al.*, 2014; Long *et al.*, 2006). Como visto na figura 28, a amplitude de sobressalto, quando apresentado apenas o pulso, não foi diferente comparando os dois grupos na primeira semana. A diferença mais acentuada foi encontrada na resposta de sobressalto quando apresentados os dois estímulos (pré-pulso+pulso), o que demonstra que a alteração teria ocorrido na resposta de IPP. Nosso protocolo experimental envolveu a repetição da administração da droga em doses diferentes, pois utilizamos o sujeito como controle dele mesmo. Assim, os animais receberam tratamento uma vez por semana, com intervalo de duas semanas entre cada administração. Sendo assim, após a quarta semana de administração da droga, a resposta de IPP tornou-se semelhante à IPP dos animais quando não administrado MK-801, ou seja, o déficit causado pelo MK-801 foi revertido. Alguns estudos mostram que, após a repetição do teste de IPP, concomitantemente à administração de MK-801 em roedores, o efeito da droga tende a se intensificar e causar maiores déficits de IPP (Schulz *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2014). Apesar disso, nossos resultados indicam que a repetição do teste e da administração da droga causou a reversão do efeito inicial do MK-801 em macacos do gênero *Sapajus*.

Resultados semelhantes foram encontrados em roedores após sucessivas injeções de agonistas do receptor dopaminérgico do tipo D₂, como a anfetamina, cocaína, apomorfina e quinpirole, simultaneamente à repetição do teste de IPP (Druhan *et al.*, 1998; Byrnes & Hammer, 2000; Feifel *et al.*, 2002; Culm & Hammer, 2004; Culm *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2011). Essas drogas, quando administradas de forma aguda, causam déficit de IPP, porém após administrações repetidas perdem o efeito e a resposta de IPP é revertida. Esse fenômeno foi interpretado como efeito de tolerância à droga. No mesmo sentido, o efeito de tolerância foi observado com a administração repetida de MK-801 sobre a atividade motora de ratos (Dall'Olio *et al.*, 1992). Além disso, a repetição do tratamento com MK-801 diminui a densidade de receptores D₂ no estriado de ratos (Dall'Olio *et al.*, 1992). Considerando que agonistas de D₂ causam déficits de IPP (Ralph & Caine, 2005), a tolerância causada pelo MK-801 no nosso estudo pode ser atribuída à diminuição da densidade de receptores D₂.

Outra questão que pode estar associada à perda do efeito do MK-801 é a familiarização com o ambiente de teste. Vários estudos de memória e aprendizagem em roedores evidenciaram que MK-801 perde o efeito após o animal se familiarizar com o ambiente de teste (Chan & McNally, 2009; Shapiro & O'Connor, 1992; Uekita & Okaichi, 2005). Seguindo o mesmo raciocínio, Ennaceur *et al.* (2011) demonstraram que o MK-801 aumenta os níveis de ansiedade em camundongos e que esse efeito ansiogênico diminui após o animal ser exposto repetidas vezes ao aparato experimental durante o tratamento com a droga. Outros antagonistas de NMDA também induzem efeitos semelhantes quando o animal está familiarizado com o ambiente (Saucier *et al.*, 1996; Roesler *et al.*, 1998; Sanders & Fanselow, 2003). Antagonistas de NMDA bloqueiam a potenciação de longa duração (LTP: *Long-term potentiation*) no hipocampo, e esse efeito pode ser alterado pelo pré-treinamento ou pela familiarização ao teste por um efeito de aprendizagem latente (Otnaess *et al.*, 1999; Ennaceur *et al.*, 2011). Ademais, sabe-se que o hipocampo é uma estrutura responsável pela modulação da resposta de IPP (Swerdlow *et al.*, 2001a; Wolf *et al.*, 2006; Kohl *et al.*, 2013).

Embora a resposta de IPP reflita um processo automático que ocorre antes da percepção do estímulo (*pré-attentive*) (Graham, 1975), níveis mais altos de processamento

cognitivo possivelmente estão envolvidos nessa resposta. Isso porque existe uma correlação positiva entre o aumento da resposta de IPP e habilidades superiores na formação de estratégias em humanos mostrando que pessoas que possuem altas respostas de IPP apresentam processamento de informações mais eficientes (Bitsios *et al.*, 2006). Além disso, vários estudos têm demonstrado que uma maior atenção ao sinal do estímulo de pré-pulso aumenta a resposta de IPP (para revisão veja Li *et al.*, 2009). Nossos sujeitos foram familiarizados com o ambiente de teste e com o teste em si, o que modificou o efeito da droga. Além disso, a familiarização com o teste de IPP pode ter ocasionado uma maior atenção ao pré-pulso pelos animais, o que está relacionado a uma aprendizagem latente, e pode ter induzido um aumento na resposta de IPP dos animais.

Como relatado por Li *et al.* (2011), o teste de IPP consiste em apresentações repetidas de estímulos de sobressaltos que são considerados estressores, e a constante repetição desses estímulos pode provocar alterações no efeito de drogas na resposta de IPP. Considerando que a meia-vida do MK-801 é de aproximadamente duas horas (Hatfield *et al.*, 1992), e nossas sessões de teste ocorreram sempre com intervalo de pelo menos duas semanas, a reversão da resposta de IPP observada não pode ser atribuída apenas ao efeito do MK-801. Portanto, sugerimos que essa inesperada reversão da IPP, demonstrada nesse estudo, seja resultado de uma interação droga-treino.

Os experimentos 2 e 3 do presente estudo mostram efeitos no IPP após a administração de CBD. Os resultados mostram que o CBD não alterou a porcentagem de inibição dos animais. Embora tenha havido um aumento no sobressalto quando apresentado o pré-pulso na dose de 30 mg/kg, a resposta de IPP não foi alterada. Esses dados corroboram estudos com roedores que mostram que o CBD não interfere na resposta de IPP quando administrado sozinho (Long *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2014; Levin *et al.*, 2014; Pedrazzi *et al.*, 2015). Apenas Gururajan *et al.*, (2011) observaram uma redução na porcentagem de inibição na dose de 10 mg/kg, entretanto nas doses de 3 e 30 mg/kg também não houve alteração em comparação ao VEH. Alguns desses estudos mostraram também que há mudanças na resposta de sobressalto com administração do CBD (Long *et al.*, 2006; Gururajan *et al.*, 2011).

Considerando que todos os animais receberam três doses de CBD optou-se por não repetir a administração do controle para evitar um excesso de captura dos animais e evitar que os animais fossem expostos ao teste mais vezes do que o necessário. Portanto, a resposta de IPP do VEH utilizada para comparação foi a mesma do experimento 1 com MK-801. Como os animais foram expostos várias vezes ao teste, mesmo com duas semanas de intervalo, foi realizada uma análise para identificar algum efeito temporal ou de interação droga-treino. Diferente do que foi observado na administração de MK-801, o CBD não induziu um efeito temporal e o padrão de resposta dos animais se manteve o mesmo quando analisada a média da porcentagem de inibição das doses administradas por semana de teste.

No experimento 3, tivemos o objetivo de testar um possível efeito antipsicótico do CBD, o que não foi possível devido ao fato de não ter sido encontrado uma redução na resposta de IPP após três administrações de MK-801. Apesar da dose de 0,03 mg/kg ter diminuído a IPP na administração aguda (Figura 25), optou-se por utilizar a dose de 0,02 mg/kg no experimento 3 para evitar alto grau de ataxia nos animais. Da mesma forma, Harder *et al.*, (1998), observaram que a dose de 0,03 mg/kg causou muita ataxia em micos (*Callithrix jacchus jacchus*), por isso optaram por não utilizar essa dose em estudos subsequentes (Harder & Ridley, 2000).

Como dito anteriormente, a hipótese original do presente estudo era de que o MK-801 seria eficaz na redução da resposta de IPP após administrações repetidas (Schulz *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2014). Dessa maneira, a administração do canabidiol após quatro semanas consecutivas de administração de MK-801 indicaria a existência ou não de um efeito antipsicótico do CBD. Alguns estudos mostram que o CBD reverte o déficit de IPP causado pelo MK-801 (Long *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2014) e pela anfetamina (Pedrazzi *et al.*, 2015). Embora não se conheça completamente os mecanismos de ação do CBD como antipsicótico (Gomes *et al.*, 2015), possivelmente esse efeito está relacionado à facilitação da neuromodulação do ECS através do aumento da anandamida (Zuardi *et al.*, 2012; Pedrazzi *et al.*, 2015).

Os resultados mostraram um efeito contrário ao esperado em relação ao MK-801 administrado em três semanas consecutivas, em função de uma possível interação droga-treino. Na figura 32, é possível ver que em comparação ao VEH administrado inicialmente, a IPP é aumentada após a administração de MK-801. Esse efeito pode ter ocorrido devido a familiarização dos animais ao teste de IPP, como já explicado anteriormente. O pré-tratamento com CBD fez a resposta de IPP voltar ao padrão original. Entretanto, como houve uma tendência a habituação da resposta de sobressalto com a administração de MK-801 e a realização do teste de IPP (Figura 33), não é possível afirmar que a redução da IPP foi causada por um efeito do CBD, ou simplesmente por uma diminuição da resposta de sobressalto quando apresentado apenas o estímulo de pulso.

4.5. Conclusão

O estudo 2 mostrou pela primeira vez os efeitos do MK-801 e do CBD na resposta de sobressalto acústico em primatas não-humanos. Os resultados demonstram que é possível utilizar o macaco-prego (*Sapajus spp.*) como um modelo experimental de esquizofrenia utilizando-se um protocolo de IPP com a mensuração do movimento do corpo inteiro do animal com a administração aguda de MK-801. Diferentemente do que já foi observado em roedores, com a repetição da administração de MK-801, não encontramos sensibilização da resposta de IPP. Como foi observado, uma habituação na resposta de IPP após administração de MK-801, não foi possível demonstrar efeito antipsicótico do CBD em macacos-prego. Nesse sentido, nossos resultados enfatizam a importância da utilização de primatas em pesquisas básicas e estudos pré-clínicos, pois demonstra diferenças neurofarmacológicas existentes entre macacos e roedores (Martignoni *et al.*, 2006).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste de IPP tem sido considerado uma importante forma de mensurar danos na modulação do filtro sensório-motor por ser uma medida simples e objetiva. Esse teste é largamente utilizado em modelos animais de esquizofrenia, especialmente em roedores. O presente trabalho demonstrou que macacos-prego do gênero *Sapajus* são bons modelos experimentais para estudos de déficits da resposta de IPP.

Foi possível identificar o padrão da resposta de sobressalto e a resposta de IPP desses animais quando apresentado um estímulo acústico e mensurar o movimento do corpo todo do sujeito. Após estabelecermos nosso protocolo experimental, demonstramos uma tendência a diminuição da resposta de IPP em animais com o CS lesado, corroborando estudos com roedores que indicam a participação dessa estrutura no circuito neural da IPP.

No mesmo sentido, o presente estudo demonstrou que os macacos-prego podem ser utilizados como sujeitos em teste de IPP em modelos experimentais de esquizofrenia baseados no efeito agudo de MK-801 na modulação do filtro sensório-motor. Interessantemente, no presente trabalho, encontrou-se uma interação droga-treino após os animais serem expostos a repetidas apresentações do teste de IPP durante o tratamento do MK-801. Mostrou-se, assim, que os macacos-prego apresentam habituação da resposta de IPP nessas condições, o que impossibilitou o teste do potencial antipsicótico do CBD nesses animais. Portanto, para se estabelecer um protocolo experimental para testes de antipsicóticos em primatas utilizando-se a resposta de IPP, é necessário que seja realizada administração aguda de antagonista de NMDA. Em relação a estudos crônicos, pode-se realizar a administração crônica da droga sem a repetição do teste de IPP.

Assim, os resultados do presente estudo destacam a importância da utilização de primatas como modelos experimentais de transtornos neurológicos, em especial por termos observado diferenças neurofarmacológicas em relação ao que se encontra na literatura em diversos estudos realizados com roedores.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AI, Hedlund PB, Huang XP, Tran TB, Meltzer HY, Roth BL. Amisulpride is a potent 5-HT7 antagonist: Relevance for antidepressant actions in vivo. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009;205:119–28.
- Abdul-Monim Z, Reynolds GP, Neill JC. The effect of atypical and classical antipsychotics on sub-chronic PCP-induced cognitive deficits in a reversal-learning paradigm. *Behav Brain Res*. 2006;169:263–73.
- Abel KM, Allin MPG, Hemsley DR, Geyer M a. Low dose ketamine increases prepulse inhibition in healthy men. *Neuropharmacology*. 2003;44:729–37.
- Adell A, Jiménez-Sánchez L, López-Gil X, Romón T. Is the acute NMDA receptor hypofunction a valid model of schizophrenia? *Schizophr Bull*. 2012;38:9–14.
- Adler CM, Malhotra AK, Elman I, Goldberg T, Egan M, Pickar D, et al. Comparison of ketamine-induced thought disorder in healthy volunteers and thought disorder in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1999;156:1646–9.
- Aghajanian GK, Marek GJ. Serotonin model of schizophrenia : emerging role of glutamate. *Brain Research Reviews*. 2000; 31:302–12.
- Ahmari SE, Risbrough VB, Geyer M a, Simpson HB. Impaired Sensorimotor Gating in Unmedicated Adults with Obsessive–Compulsive Disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37:1216–23.
- Akil M, Pierri JN, Whitehead RE, Edgar CL, Mohila C, Sampson AR, et al. Lamina-specific alterations in the dopamine innervation of the prefrontal cortex in schizophrenic subjects. *Am J Psychiatry*. 1999;156:1580–9.
- Alfaro JW, Silva JDSE, Rylands AB. How Different Are Robust and Gracile Capuchin Monkeys? An Argument for the Use of *Sapajus* and *Cebus*. *Am J Primatol*. 2012;74:273–86.

- Almeida V, Levin R, Peres FF, Niigaki ST, Calzavara MB, Zuardi AW, et al. Cannabidiol exhibits anxiolytic but not antipsychotic property evaluated in the social interaction test. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2013;41:30–5.
- Alsene KM, Carasso BS, Connors EE, Bakshi VP. Disruption of prepulse inhibition after stimulation of central but not peripheral alpha-1 adrenergic receptors. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31:2150–61.
- Alsene KM, Fallace K, Bakshi VP. Ventral striatal noradrenergic mechanisms contribute to sensorimotor gating deficits induced by amphetamine. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35:2346–56.
- Alsene KM, Rajbhandari AK, Ramaker MJ, Bakshi VP. Discrete forebrain neuronal networks supporting noradrenergic regulation of sensorimotor gating. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36:1003–14.
- Altavini TS, Henriques LD, Bonci DMO, Nagy BV, Ventura DF, Pessoa VF. Using the Hardy, Randy, and Rittler Test to Evaluate Color Vision in Capuchins (*Cebus libidinosus*). *Int J Primatol*. 2012;33:1467–76.
- Arai S, Takuma K, Mizoguchi H, Ibi D, Nagai T, Takahashi K, et al. Involvement of pallidotegmental neurons in methamphetamine- and MK-801-induced impairment of prepulse inhibition of the acoustic startle reflex in mice: reversal by GABAB receptor agonist baclofen. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33:3164–75.
- Araújo AC, Didonet JJ, Araújo CS, Saletti PG, Borges TRJ, Pessoa VF. Color vision in the black howler monkey (*Alouatta caraya*). *Vis. Neurosci*. 2008;25:243-8.
- Auclair AL, Kleven MS, Barret-Grévoz C, Barreto M, Newman-Tancredi A, Depoortère R. Differences among conventional, atypical and novel putative D2/5-HT1A antipsychotics on catalepsy-associated behaviour in cynomolgus monkeys. *Behav Brain Res*. 2009;203:288–95.
- Bachevalier J, Nemanic S, Alvarado MC. The influence of context on recognition memory in monkeys: Effects of hippocampal, parahippocampal and perirhinal lesions. *Behav Brain Res*. 2014;285:89–98.

- Baisley SK, Fallace KL, Rajbhandari AK, Bakshi VP. Mutual independence of 5-HT₂ and 5-HT₁ noradrenergic receptors in mediating deficits in sensorimotor gating. *Psychopharmacology*. 2012;220:465–79.
- Baker D, Pryce G, Giovannoni G, Thompson AJ. Review The therapeutic potential of cannabis. 2003;2:291–8.
- Bakshi P. Clozapine Sensorimotor Gating of the Startle Response. *Pharmacology*. 1994.
- Bakshi VP, Geyer M a. Multiple limbic regions mediate the disruption of prepulse inhibition produced in rats by the noncompetitive NMDA antagonist dizocilpine. *J Neurosci*. 1998;18:8394–401.
- Bakshi VP, Swerdlow NR, Geyer MA. Clozapine antagonizes phencyclidine-induced deficits in sensorimotor gating of the startle response. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;27:787–94.
- Barrett SL, Kelly C, Watson DR, Bell R, King DJ. Normal levels of prepulse inhibition in the euthymic phase of bipolar disorder. *Psychol Med*. 2005;35:1737–46.
- Basurto E, Flores OG, Hoffman KL. Glycinamide prevents MK-801-induced hyperactivity and deficits in object recognition memory in an animal model of positive and cognitive symptoms of schizophrenia. *Schizophr Res*. 2015.
- Becker A, Grecksch G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: A possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2004;28:1267–77.
- Belham FS, Satler C, Garcia A, Tomaz C, Gasbarri A, Rego A, et al. Age-Related Differences in Cortical Activity during a Visuo-Spatial Working Memory Task with Facial Stimuli. *PLoS One*. 2013;8:1–8.
- Benevento LA, Rezak M. Extrageniculate projections to layers VI and I of striate cortex (area 17) in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Brain Res*. 1975;96:51–5.
- Berardelli A, Rothwell JC, Day BL, Marsden CD. Pathophysiology of Blepharospasm and Oromandibular Dystonia. *Brain*. 1985;108:593–608.

- Van Berckel BNM, Oranje B, Van Ree JM, Verbaten MN, Kahn RS. The effects of low dose ketamine on sensory gating, neuroendocrine secretion and behavior in healthy human subjects. *Psychopharmacology (Berl)*. 1998;137:271–81.
- Bhattacharyya S, Morrison PD, Fusar-Poli P, Martin-Santos R, Borgwardt S, Winton-Brown T, et al. Opposite effects of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on human brain function and psychopathology. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35:764–74.
- Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol*. 2001;134:845–52.
- Bitsios P, Giakoumaki SG, Theou K, Frangou S. Increased prepulse inhibition of the acoustic startle response is associated with better strategy formation and execution times in healthy males. *Neuropsychologia*. 2006;44:2494–9.
- Boireau a., Bordier F, Durand G, Doble a. The antidepressant metopramine is a low-affinity antagonist at N-methyl-D-aspartic acid receptors. *Neuropharmacology*. 1996;35:1703–7.
- Bontrop RE. Non-human primates: essential partners in biomedical research. *Immunol Rev*. 2001;183:5–9.
- Borges, PA, Nunes, N, Barbosa, VP, Conceição, EDV, Nishimori, CTD, Paula, DP, Carareto, R, Thiesen, R, Santos, PAC. Variáveis cardiorrespiratórias, índice bispectral e recuperação anestésica em cães anestesiados pelo isoflurano, tratados ou não com tramadol. *Arq. Bras. Vet. Zootec*. 2008, 60:613-9.
- Bosch D, Schmid S. Activation of muscarinic cholinergic receptors inhibits giant neurones in the caudal pontine reticular nucleus. *Eur J Neurosci*. 2006;24:1967–75.
- Boulay D, Depoortère R, Louis C, Perrault G, Griebel G, Soubrié P. SSR181507, a putative atypical antipsychotic with dopamine D2 antagonist and 5-HT1A agonist activities: Improvement of social interaction deficits induced by phencyclidine in rats. *Neuropharmacology*. 2004;46:1121–9.

- Boyce S, Rupniak NM, Steventon MJ, Cook G, Iversen SD. Psychomotor activity and cognitive disruption attributable to NMDA, but not sigma, interactions in primates. *Behav Brain Res.* 1991;42:115–21.
- Braff DL, Geyer M a., Swerdlow NR. Human studies of prepulse inhibition of startle: Normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology (Berl).* 2001;234–58.
- Braff DL, Geyer M a., Swerdlow NR. Human studies of prepulse inhibition of startle: Normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology (Berl).* 2001b;156:234–58.
- Braff DL, Grillon C, Geyer MA. Gating and habituation of the startle reflex in schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry.* 1992;49:206–15.
- Brandão ML, Troncoso AC, De Souza Silva MA, Huston JP. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: Empirical and conceptual considerations. *Eur. J. Pharmacol.* 2003;225–33.
- Breier A, Adler CM, Weisenfeld N, Su TP, Elman I, Picken L, et al. Effects of NMDA antagonism on striatal dopamine release in healthy subjects: Application of a novel PET approach. *Synapse.* 1998;29:142–7.
- Brody S a., Conquet F, Geyer M a. Effect of antipsychotic treatment on the prepulse inhibition deficit of mGluR5 knockout mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2004;172:187–95.
- Brody S a., Geyer M a., Arge CHL. Lamotrigine prevents ketamine but not amphetamine-induced deficits in prepulse inhibition in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2003;169:240–6.
- Bruins Slot L a., Kleven MS, Newman-Tancredi A. Effects of novel antipsychotics with mixed D2 antagonist/5-HT1A agonist properties on PCP-induced social interaction deficits in the rat. *Neuropharmacology.* 2005;49:996–1006.
- Buffalo E a, Gillam MP, Allen RR, Paule MG. Acute behavioral effects of MK-801 in rhesus monkeys: assessment using an operant test battery. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994;48:935–40.

- Bunce J a., Isbell L a., Neitz M, Bonci D, SurrIDGE AK, Jacobs GH, et al. Characterization of opsin gene alleles affecting color vision in a wild population of titi monkeys (*Callicebus brunneus*). *Am J Primatol.* 2011;73:189–96.
- Bushe C, Shaw M, Peveler RC. A review of the association between antipsychotic use and hyperprolactinaemia. *J Psychopharmacol.* 2008;22:46–55.
- Byrnes JJ, Hammer RP. The disruptive effect of cocaine on prepulse inhibition is prevented by repeated administration in rats. *Neuropsychopharmacology.* 2000;22:551–4.
- Cáceda R, Binder EB, Kinkead B, Nemeroff CB. The role of endogenous neurotensin in psychostimulant-induced disruption of prepulse inhibition and locomotion. *Schizophr Res.* 2012;136:88–95.
- Campos AC, Guimarães FS. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2008;199:223–30.
- Canale GR, de Freitas MA, Andrade LL. Predation of lizards by a critically-endangered primate (*Sapajus xanthosternos*) in a tropical biodiversity hotspot in Brazil. *Herpetol Notes.* 2013;6:323–6.
- Carlini EA, Cunha JM. Hypnotic and antiepileptic effects of cannabidiol. *J. Clin. Pharmacol.*
- Carroll C a., Vohs JL, O'donnell BF, Shekhar A, Hetrick WP. Sensorimotor gating in manic and mixed episode bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 2007;9:221–9.
- Castellanos FX, Fine EJ, Kaysen D, Marsh WL, Rapoport JL, Hallett M. Sensorimotor gating in boys with Tourette's syndrome and ADHD: Preliminary results. *Biol Psychiatry.* 1996;39:33–41.
- Chan WYM, McNally GP. Conditioned stimulus familiarity determines effects of MK-801 on fear extinction. *Behav Neurosci.* 2009;123:303–14.
- Chapman CA, Fedigan LM. Dietary differences between neighboring *Cebus capucinus* groups: local traditions, food availability or responses to food profitability? *Folia Primatol.* 1990;54:177–86.

- Cohen SM, Tsien RW, Goff DC, Halassa MM. The impact of NMDA receptor hypofunction on GABAergic neurons in the pathophysiology of schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2015, no prelo.
- Comoli E, Coizet V, Boyes J, Bolam JP, Canteras NS, Quirk RH, et al. A direct projection from superior colliculus to substantia nigra for detecting salient visual events. *Nat Neurosci*. 2003;6:974–80.
- Console-Bram L, Marcu J, Abood ME. Cannabinoid receptors: Nomenclature and pharmacological principles. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*. 2012;4–15.
- Crippa JADS, Zuardi AW, Garrido GEJ, Wichert-Ana L, Guarnieri R, Ferrari L, et al. Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29:417–26.
- Crippa JAS, Zuardi AW, Hallak JEC. Therapeutical use of the cannabinoids in psychiatry. *Rev Bras Psiquiatr*. 2010;32:56–66.
- Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*. 2006;139:1405–15.
- Crosby MJ, Hanson JE, Fleckenstein AE, Hanson GR. Phencyclidine increases vesicular dopamine uptake. *Eur J Pharmacol*. 2002;438:75–8.
- Crossman AR, Peggs D, Boyce S, Luquin MR, Sambrook MA. Effect of the NMDA antagonist MK-801 on MPTP-induced parkinsonism in the monkey. *Neuropharmacology*. 1989;28:1271–3.
- Crow TJ. Molecular pathology of schizophrenia: more than one disease process? *Br Med J*. 1980;280:66–8.
- Culm KE, Hammer RP. Recovery of Sensorimotor Gating without G Protein Adaptation after Repeated D₂-Like Dopamine Receptor Agonist Treatment in Rats. 2004;308:487–94.
- Culm KE, Lugo-Escobar N, Hope BT, Hammer RP. Repeated quinpirole treatment increases cAMP-dependent protein kinase activity and CREB phosphorylation in nucleus accumbens

- and reverses quinpirole-induced sensorimotor gating deficits in rats. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29:1823–30.
- Dahmen JC, Corr PJ. Prepulse-elicited startle in prepulse inhibition. *Biol Psychiatry*. 2004;55:98–101.
- Dall'Olio R, Gandolfi O, Montanaro N. Effect of chronic treatment with dizocilpine (MK-801) on the behavioral response to dopamine receptor agonists in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 1992;107:591–4.
- Van Dam D, De Deyn PP. Animal Models for Brain Research. *PET SPECT Neurobiol Syst*. 2014;3–46.
- David AS, Prince M. Psychosis following head injury: a critical review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76:53–60.
- Davies G, Welham J, Chant D, Torrey EF, McGrath J. A systematic review and meta-analysis of Northern Hemisphere season of birth studies in schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2003;29:587–93.
- Davis KL, Buchsbaum MS, Shihabuddin L, Spiegel-Cohen J, Metzger M, Frecska E, et al. Ventricular enlargement in poor-outcome schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1998;43:783–93.
- Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M. Dopamine in schizophrenia: A review and reconceptualization. *Am J Psychiatry*. 1991;148:1474–86.
- Davis M, Antoniadis EA, Amaral DG, Winslow JT. Acoustic Startle Reflex in Rhesus Monkeys: A Review. *Rev Neurosci*. 2008;19:2-3.
- Davis M, Gendelman DS, Tischler MD, Gendelman PM. A primary acoustic startle circuit: lesion and stimulation studies. *J Neurosci*. 1982;2:791–805.
- Dean B, Sundram S, Bradbury R, Scarr E, Copolov DD. Studies on [3H]CP-55940 binding in the human central nervous system: Regional specific changes in density of cannabinoid-1 receptors associated with schizophrenia and cannabis use. *Neuroscience*. 2001;103:9–15.
- Deutsch SI, Rosse RB, Schwartz BL, Mastropaolo J. A revised excitotoxic hypothesis of schizophrenia: therapeutic implications. *Clin Neuropharmacol*. 2001;24:43–9.

- Doubell TP, Skaliora I, Baron J, King AJ. Functional connectivity between the superficial and deeper layers of the superior colliculus: an anatomical substrate for sensorimotor integration. *J Neurosci*. 2003;23:6596–607.
- Douma TN, Millan MJ, Verdouw PM, Oosting RS, Olivier B, Groenink L. Valproate improves prepulse inhibition deficits induced by corticotropin-releasing factor independent of GABAA and GABA B receptor activation. *Neuropharmacology*. 2014;79:66–74.
- Druhan JP, Geyer MA, Valentino RJ. Lack of sensitization to the effects of d-amphetamine and apomorphine on sensorimotor gating in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 1998;135:296–304.
- Dulawa SC, Gross C, Stark KL, Hen R, Geyer MA. Knockout mice reveal opposite roles for serotonin 1A and 1B receptors in prepulse inhibition. *Neuropsychopharmacology*. 2000;22:650–9.
- Dulawa SC, Hen R, Scearce-Levie K, Geyer MA. Serotonin(1B) receptor modulation of startle reactivity, habituation, and prepulse inhibition in wild-type and serotonin(1B) knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 1997;132:125–34.
- Dulawa SC, Hen R, Scearce-Levie K, Geyer MA. 5-HT(1B) receptor modulation of prepulse inhibition: Recent findings in wild-type and 5-HT(1B) knockout mice. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;79–84.
- Duncan EJ, Madonick SH, Parwani A, Angrist B, Rajan R, Chakravorty S, et al. Clinical and sensorimotor gating effects of ketamine in normals. *Neuropsychopharmacology*. 2001;25:72–83.
- Egerton A, Reid L, McGregor S, Cochran SM, Morris BJ, Pratt J a. Subchronic and chronic PCP treatment produces temporally distinct deficits in attentional set shifting and prepulse inhibition in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008;198:37–49.
- Eggan SM, Lewis DA. Immunocytochemical distribution of the cannabinoid CB1 receptor in the primate neocortex: A regional and laminar analysis. *Cereb Cortex*. 2007;17(1):175–91.
- Ellison G. Stimulant-induced psychosis, the dopamine theory of schizophrenia, and the habenula. *Brain Res. Rev*. 1994;223–39.

- Emrich HM, Leweke FM, Schneider U. Towards a cannabinoid hypothesis of schizophrenia: Cognitive impairments due to dysregulation of the endogenous cannabinoid system. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997;56:803–7.
- Ennaceur a., Michalikova S, Van Rensburg R, Chazot PL. MK-801 increases the baseline level of anxiety in mice introduced to a spatial memory task without prior habituation. *Neuropharmacology.* 2011;61:981–91.
- Enomoto T, Tse MT, Floresco SB. Reducing prefrontal gamma-aminobutyric acid activity induces cognitive, behavioral, and dopaminergic abnormalities that resemble schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2011;69:432–41.
- Feifel D, Priebe K. The effects of subchronic haloperidol on intact and dizocilpine- disrupted sensorimotor gating. *Psychopharmacology (Berl).* 1999;146:175–9.
- Feifel D, Priebe K, Johnstone-Miller E, Christopher, Morgan J. Sensorimotor gating effects produced by repeated dopamine agonists in a paradigm favoring environmental conditioning. *Psychopharmacology (Berl).* 2002;162:138–46.
- Fendt M. Enhancement of prepulse inhibition after blockade of GABA activity within the superior colliculus. *Brain Res.* 1999;833:81–5.
- Fendt M, Koch M, Schnitzler HU. Sensorimotor gating deficit after lesions of the superior colliculus. *Neuroreport.* 1994;5:1725–8.
- Fendt M, Li L, Yeomans JS. Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex. *Psychopharmacology (Berl).* 2001;216–24.
- Fragaszy, D.M.; Visalberghi, E.; Fedigan, L.M. (2004). *The complete capuchin: the biology of the genus Cebus.* 1a ed. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 339.
- Fries W. Cortical projections to the superior colliculus in the macaque monkey: a retrograde study using horseradish peroxidase. *J Comp Neurol.* 1984;230:55–76.
- Gacsályi I, Nagy K, Pallagi K, Lévy G, Hársing LG, Móricz K, et al. Egis-11150: A candidate antipsychotic compound with procognitive efficacy in rodents. *Neuropharmacology.* 2013;64:254–63.

- Gasbarri A, Pompili A, Packard MG, Tomaz C. Habit learning and memory in mammals: Behavioral and neural characteristics. *Neurobiol Learn Mem.* 2014;114:198–208.
- Gaskin PL, Alexander SP, Fone KC. Neonatal phencyclidine administration and post-weaning social isolation as a dual-hit model of “schizophrenia-like” behaviour in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 2014;231:2533–45.
- Geyer M a., Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: A decade in review. *Psychopharmacology (Berl).* 2001.
- Geyer M, Mansbach R. Disruption of prepulse inhibition of acoustic startle in rats by phencyclidine and MK801. *Schizophr. Res.* 1989;186.
- Geyer MA, Braff DL. Startle habituation and sensorimotor gating in schizophrenia and related animal models. *Schizophr Bull.* 1987;13:643–68.
- Giuffrida A, Leweke FM, Gerth CW, Schreiber D, Koethe D, Faulhaber J, et al. Cerebrospinal anandamide levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely correlated with psychotic symptoms. *Neuropsychopharmacology.* 2004;29:2108–14.
- Glass M. The role of cannabinoids in neurodegenerative diseases. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* 2001;743–65.
- Glendenning KK, Hall JA, Diamond IT, Hall WC. The pulvinar nucleus of *Galago senegalensis*. *J Comp Neurol.* 1975;161:419–58.
- Gomes F V, Llorente R, Del EA, Viveros M, López-gallardo M, Guimarães FS. Decreased glial reactivity could be involved in the antipsychotic-like effect of cannabidiol. *Schizophrenia Research.* 2015;164:155–63.
- Gomes F V., Issy a. C, Ferreira FR, Viveros M-P, Del Bel E a., Guimaraes FS. Cannabidiol Attenuates Sensorimotor Gating Disruption and Molecular Changes Induced by Chronic Antagonism of NMDA receptors in Mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014;18.
- Gómez-Wong E, Martí MJ, Tolosa E, Valls-Solé J. Sensory modulation of the blink reflex in patients with blepharospasm. *Arch Neurol.* 1998;55:1233–7.

- Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, et al. Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* 2006;1071:10–23.
- Graham FK. The more or less startling effects of weak prestimulation. *Psychophysiology.* 1975;238–48.
- Grayson B, Adamson L, Harte M, Leger M, Marsh S, Piercy C, et al. The involvement of distraction in memory deficits induced by NMDAR antagonism: Relevance to cognitive deficits in schizophrenia. *Behav Brain Res.* 2014;266:188–92.
- Grillon C, Ameli R, Charney DS, Krystal J, Braff D. Startle gating deficits occur across prepulse intensities in schizophrenic patients. *Biol Psychiatry.* 1992;32:939–43.
- Grlic L. A comparative study on some chemical and biological characteristics of various samples of cannabis resin. *Bull narcotics.* 1976;37–46.
- Gururajan A, Taylor DA, Malone DT. Effect of cannabidiol in a MK-801-rodent model of aspects of Schizophrenia. *Behav Brain Res.* 2011;222:299–308.
- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. Neuroprotective Antioxidants Cannabidiol and (2)D9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:8268–73.
- Handelmann GE, Contreras PC, O'Donohue TL. Selective memory impairment by phencyclidine in rats. *Eur J Pharmacol.* 1987;140:69–73.
- Harder JA, Aboobaker AA, Hodgetts TC, Ridley RM. Learning impairments induced by glutamate blockade using dizocilpine (MK-801) in monkeys. *Br J Pharmacol.* 1998;125:1013–8.
- Harder JA, Ridley RM. impairments induced by dizocilpine (MK-801) in monkeys. 2000;39:547–52.
- Harting JK, Huerta MF, Hashikawa T, van Lieshout DP. Projection of the mammalian superior colliculus upon the dorsal lateral geniculate nucleus: organization of tectogeniculate pathways in nineteen species. *J Comp Neurol.* 1991;304:275–306.

- Harting JK, Van Lieshout DP. Spatial relationships of axons arising from the substantia nigra, spinal trigeminal nucleus, and pedunculo-pontine tegmental nucleus within the intermediate gray of the cat superior colliculus. *J Comp Neurol.* 1991;305:543–58.
- Hatfield RH, Gill R, Brazell C. The dose-response relationship and therapeutic window for dizocilpine (MK-801) in a rat focal ischaemia model. *Eur J Pharmacol.* 1992;216:1–7.
- Helminski JO, Segraves MA. Macaque frontal eye field input to saccade-related neurons in the superior colliculus. *J Neurophysiol.* 2003;90:1046–62.
- De Hert M, Detraux J, van Winkel R, Yu W, Correll CU. Metabolic and cardiovascular adverse effects associated with antipsychotic drugs. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;8:114–26.
- Hikichi H, Kaku A, Karasawa J, Chaki S. Stimulation of Metabotropic Glutamate (mGlu) 2 Receptor and Blockade of mGlu1 Receptor Improve Social Memory Impairment Elicited by MK-801 in Rats. *J Pharmacol Sci.* 2013;122:10–6.
- Hoening K, Hochrein A, Quednow BB, Maier W, Wagner M. Impaired prepulse inhibition of acoustic startle in obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry.* 2005;57:1153–8.
- Hoffman DC, Donovan H. D1 and D2 dopamine receptor antagonists reverse prepulse inhibition deficits in an animal model of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl).* 1994;115:447–53.
- Ignashchenkova A, Dicke PW, Haarmeier T, Thier P. Neuron-specific contribution of the superior colliculus to overt and covert shifts of attention. *Nat Neurosci.* 2004;7:56–64.
- Inoue A, Arima A, Kato H, Ebihara S. The utility of finger maze test for learning and memory abilities in infants of cynomolgus monkeys exposed to thiamazole. *Congenit Anom* 2014.
- Isa T. Intrinsic processing in the mammalian superior colliculus. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2002; 668–77.
- Isbell L a. Snakes as agents of evolutionary change in primate brains. *J Hum Evol.* 2006;51:1–35.
- Ishii D, Matsuzawa D, Kanahara N, Matsuda S, Sutoh C, Ohtsuka H, et al. Effects of aripiprazole on MK-801-induced prepulse inhibition deficits and mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Neurosci Lett.* 2010;471:53–7.

- Javitt DC, Lindsley RW. Effects of phencyclidine on prepulse inhibition of acoustic startle response in the macaque. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001;156:165–8.
- Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1991;148:1301–8.
- Javitt DC, Zukin SR, Heresco-Levy U, Umbricht D. Has an angel shown the way? Etiological and therapeutic implications of the PCP/NMDA model of schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2012;38:958–66.
- Jeevakumar V, Driskill C, Paine A, Sobhanian M, Vakil H, Morris B, et al. Ketamine administration during the second postnatal week induces enduring schizophrenia-like behavioral symptoms and reduces parvalbumin expression in the medial prefrontal cortex of adult mice. 2015;282:165–75.
- Jentsch JD, Roth RH. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: From NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 1999;20:201–25.
- Jentsch JD, Roth RH, Taylor JR. Object retrieval/detour deficits in monkeys produced by prior subchronic phencyclidine administration: Evidence for cognitive impulsivity. *Biol Psychiatry*. 2000;48:415–24.
- Jentsch JD, Tran a, Le D, Youngren KD, Roth RH. Subchronic phencyclidine administration reduces mesoprefrontal dopamine utilization and impairs prefrontal cortical-dependent cognition in the rat. *Neuropsychopharmacology*. 1997;17:92–9.
- Johansson C, Jackson DM, Svensson L. Nitric oxide synthase inhibition blocks phencyclidine-induced behavioural effects on prepulse inhibition and locomotor activity in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 1997;167–73.
- Judd LL, McAdams L, Budnick B, Braff DL. Sensory gating deficits in schizophrenia: new results. *Am J Psychiatry*. 1992;149:488–93.
- Kaas, JH, Huerta, JF (1988). The subcortical visual system of primates. In *Comparative Primate Biology*, Volume 4, H. Steklis and J. Erwin, eds. (New York: Liss), pp. 327–391.

- Kadoya S, Wolin LR, Massopust LC. Photically evoked unit activity in the tectum opticum of the squirrel monkey. *J Comp Neurol.* 1971;142:495–508.
- Karamihalev S, Prickaerts J, van Goethem NP. Donepezil and the alpha-7 agonist PHA 568487, but not risperidone, ameliorate spatial memory deficits in a subchronic MK-801 mouse model of cognitive impairment in schizophrenia. *Behav Brain Res.* 2014;272:248–51.
- Kegeles LS, Abi-Dargham A, Zea-Ponce Y, Rodenhiser-Hill J, Mann JJ, Van Heertum RL, et al. Modulation of amphetamine-induced striatal dopamine release by ketamine in humans: Implications for schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2000;48:627–40.
- Keith V a., Mansbach RS, Geyer M a. Failure of haloperidol to block the effects of phencyclidine and dizocilpine on prepulse inhibition of startle. *Biol Psychiatry.* 1991;30:557–66.
- Khella R, Short JL, Malone DT. CB2 receptor agonism reverses MK-801-induced disruptions of prepulse inhibition in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2014;231:3071–87.
- King AJ, Hutchings ME. Spatial response properties of acoustically responsive neurons in the superior colliculus of the ferret: a map of auditory space. *J Neurophysiol.* 1987;57:596–624.
- Koch M. The neurobiology of startle. *Prog. Neurobiol.* 1999;107–28.
- Koch M, Schnitzler HU. The acoustic startle response in rats - Circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. *Behav. Brain Res.* 1997;35–49.
- Kohl S, Heekeren K, Klosterkötter J, Kuhn J. Prepulse inhibition in psychiatric disorders--apart from schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2013;47:445–52.
- Kretschmer BD, Koch M. The ventral pallidum mediates disruption of prepulse inhibition of the acoustic startle response induced by dopamine agonists, but not by NMDA antagonists. *Brain Res.* 1998;798:204–10.
- Kumari V, Soni W, Sharma T. Normalization of information processing deficits in schizophrenia with clozapine. *Am J Psychiatry.* 1999;156:1046–51.
- Lane ST, Franklin JC, Curran PJ. Clarifying the nature of startle habituation using latent curve modeling. *Int J Psychophysiol.* 2013;88:55–63.
- Lang PJ, Bradley MM, Cuthbert BN. Emotion , Attention , and the Startle Reflex. 1990;377–95.

- Lee PR, Brady DL, Shapiro R a, Dorsa DM, Koenig JI. Social interaction deficits caused by chronic phencyclidine administration are reversed by oxytocin. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30:1883–94.
- Leitner DS, Cohen ME. Role of the inferior colliculus in the inhibition of acoustic startle in the rat. *Physiol Behav*. 1985;34:65–70.
- Leitner DS, Powers a. S, Stitt CL, Hoffman HS. Midbrain reticular formation involvement in the inhibition of acoustic startle. *Physiol Behav*. 1981;26:259–68.
- Leucht S, Corves C, Arbter D, Engel RR, Li C, Davis JM. Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet*. 2009;373:31–41.
- Levin R, Peres FF, Almeida V, Calzavara MB, Zuardi AW, Hallak JEC, et al. Effects of cannabinoid drugs on the deficit of prepulse inhibition of startle in an animal model of schizophrenia: The SHR strain. *Front Pharmacol*. 2014;5:1–10.
- Leweke FM, Gerth CW, Klosterkötter J. Cannabis-associated psychosis: Current status of research. *CNS Drugs*. 2004;895–910.
- Leweke FM, Giuffrida a, Wurster U, Emrich HM, Piomelli D. Elevated endogenous cannabinoids in schizophrenia. *Neuroreport*. 1999;10:1665–9.
- Leweke FM, Giuffrida A, Koethe D, Schreiber D, Nolden BM, Kranaster L, et al. Anandamide levels in cerebrospinal fluid of first-episode schizophrenic patients: Impact of cannabis use. *Schizophr Res*. 2007;94:29–36.
- Leweke FM, Piomelli D, Pahlisch F, Muhl D, Gerth CW, Hoyer C, et al. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 2012;2:e94.
- Lewis D a, Lieberman J a. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron*. 2000;28:325–34.
- Li L, Du Y, Li N, Wu X, Wu Y. Top-down modulation of prepulse inhibition of the startle reflex in humans and rats. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009;33:1157–67.

- Li L, Korngut LM, Frost BJ, Beninger RJ. Prepulse inhibition following lesions of the inferior colliculus: Prepulse intensity functions. *Physiol Behav.* 1998;65:133–9.
- Li M, He W, Chen J. Time course of prepulse inhibition disruption induced by dopamine agonists and NMDA antagonists: Effects of drug administration regimen. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011;99:509–18.
- De Lima EM, Pessoa DMA, Sena L, de Melo AGC, de Castro PHG, Oliveira-Mendes AC, et al. Polymorphic color vision in captive *Uta Hick's cuxiús*, or bearded sakis (*Chiropotes utahickae*). *Am J Primatol.* 2015;77:66–75.
- Linn GS, Javitt DC. Phencyclidine (PCP)-induced deficits of prepulse inhibition in monkeys. *Neuroreport.* 2001;12:117–20.
- Linn GS, Negi SS, Gerum S V., Javitt DC. Reversal of phencyclidine-induced prepulse inhibition deficits by clozapine in monkeys. *Psychopharmacology (Berl).* 2003;169:234–9.
- Lipina T, Labrie V, Weiner I, Roder J. Modulators of the glycine site on NMDA receptors, d-serine and ALX 5407, display similar beneficial effects to clozapine in mouse models of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl).* 2005;179:54–67.
- Long LE, Malone DT, Taylor D a. Cannabidiol reverses MK-801-induced disruption of prepulse inhibition in mice. *Neuropsychopharmacology.* 2006;31:795–803.
- López-Gil X, Babot Z, Amargós-Bosch M, Suñol C, Artigas F, Adell A. Clozapine and haloperidol differently suppress the MK-801-increased glutamatergic and serotonergic transmission in the medial prefrontal cortex of the rat. *Neuropsychopharmacology.* 2007;32:2087–97.
- Ludewig S, Geyer M a., Ramseier M, Vollenweider FX, Rechsteiner E, Cattapan-Ludewig K. Information-processing deficits and cognitive dysfunction in panic disorder. *J Psychiatry Neurosci.* 2005;30:37–43.
- Ludewig S, Ludewig K, Geyer M a., Hell D, Vollenweider FX. Prepulse inhibition deficits in patients with panic disorder. *Depress Anxiety.* 2002;15:55–60.
- Maior RS, Hori E, Barros M, Teixeira DS, Tavares MCH, Ono T, et al. Superior colliculus lesions impair threat responsiveness in infant capuchin monkeys. *Neurosci Lett.* 2011;504:257–60.

- Maior RS, Hori E, Uribe CE, Saletti PG, Ono T, Nishijo H, et al. A role for the superior colliculus in the modulation of threat responsiveness in primates: Toward the ontogenesis of the social brain. *Rev Neurosci*. 2012;23:697–706.
- Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, Malik AS, Andreakos E, Mechoulam R, et al. The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:9561–6.
- Manocha, SL, Shantha, TR, Bourne, GH. A stereotaxic atlas of the brain of the Cebus monkey (*Cebus apella*). 1a ed. Oxford: Clarendon Press, 1968, pp.97.
- Mansbach RS, Geyer MA. Parametric determinants in pre-stimulus modification of acoustic startle: interaction with ketamine. *Psychopharmacology (Berl)*. 1991;105:162–8.
- Marek GJ, Aghajanian GK. LSD and the phenethylamine hallucinogen DOI are potent partial agonists at 5-HT_{2A} receptors on interneurons in rat piriform cortex. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;278:1373–82.
- Marrs W, Kuperman J, Avedian T, Roth RH, Jentsch JD. Alpha-2 adrenoceptor activation inhibits phencyclidine-induced deficits of spatial working memory in rats. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30:1500–10.
- Martignoni M, Groothuis GMM, Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2006; 2:875-894.
- Martin BR, Wiley JL. Mechanism of action of cannabinoids: how it may lead to treatment of cachexia, emesis, and pain. *J Support Oncol*. 2004;2:305–14; discussion 314–6.
- Martin P, Carlsson ML, Hjorth S. Systemic PCP treatment elevates brain extracellular 5-HT: a microdialysis study in awake rats. *Neuroreport*. 1998;9:2985–8.
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3:771–84.
- Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L. Anandamide: Some like it hot. *Trends Pharmacol. Sci*. 2001;346–9.

Di Marzo V, Matias I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci.* 2005;8:585–9.

Matsushita Y, Oota H, Welker BJ, Pavelka MS, Kawamura S. Color Vision Variation as Evidenced by Hybrid L/M Opsin Genes in Wild Populations of Trichromatic *Alouatta* New World Monkeys. *Int J Primatol.* 2014;35:71–87.

Maurice T, Vignon J, Kamenka JM, Chicheportiche R. Differential interaction of phencyclidine-like drugs with the dopamine uptake complex in vivo. *J Neurochem.* 1991;56:553–9.

McCarley RW, Wible CG, Frumin M, Hirayasu Y, Levitt JJ, Fischer I a., et al. MRI anatomy of schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 1999;45:1099–119.

McIntosh AL, Ballard TM, Steward LJ, Moran PM, Fone KCF. The atypical antipsychotic risperidone reverses the recognition memory deficits induced by post-weaning social isolation in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2013;228:31–42.

Mechoulam R, Parker L a, Gallily R. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *J Clin Pharmacol.* 2002;42:11 – 9.

Mechoulam R, Parker L a. The Endocannabinoid System and the Brain. *Annu Rev Psychol.* 2011;64.

Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr.* 2000;130:1007 – 15.

Meltzer HY. An overview of the mechanism of action of clozapine. *J Clin Psychiatry.* 1994;47–52.

Meltzer HY. Update on Typical and Atypical Antipsychotic Drugs. *Annu Rev Med.* 2012;64.

Meltzer HY, Stahl SM. The dopamine hypothesis of schizophrenia: a review. *Schizophr Bull.* 1976;2:19–76.

Meyer U, Yee BK, Feldon J. The neurodevelopmental impact of prenatal infections at different times of pregnancy: the earlier the worse? *Neuroscientist.* 2007;13:241–56.

Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci.* 1997;17:2921–7.

- Moghaddam B, Javitt D. From Revolution to Evolution: The Glutamate Hypothesis of Schizophrenia and its Implication for Treatment. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37:4–15.
- Moore THM, Zammit S, Lingford-Hughes A, Barnes TRE, Jones PB, Burke M, et al. Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. *Lancet*. 2007;370:319–28.
- Moreira F a., Guimarães FS. Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. *Eur J Pharmacol*. 2005;512):199–205.
- Morgan C, Fisher H. Environment and schizophrenia: Environmental factors in schizophrenia: Childhood trauma - A critical review. *Schizophr. Bull*. 2007;3–10.
- Morgan CJ a, Curran HV. Ketamine use: A review. *Addiction*. 2012;107:27–38.
- Morgan CJ a, Schafer G, Freeman TP, Curran HV. Impact of cannabidiol on the acute memory and psychotomimetic effects of smoked cannabis: Naturalistic study. *Br J Psychiatry*. 2010;197:285–90.
- Mori H, Mishina M. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology*. 1995;34:1219–37.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993;365:61–5.
- Nakako T, Murai T, Ikejiri M, Hashimoto T. Effects of lurasidone on ketamine-induced joint visual attention dysfunction as a possible disease model of autism spectrum disorders in common marmosets. 2014;274:349–54.
- Newell KA, Deng C, Huang X-F. Increased cannabinoid receptor density in the posterior cingulate cortex in schizophrenia. *Exp Brain Res*. 2006;172:556–60.
- Nikiforuk A, Kos T, Fijał K, Hołuj M, Rafa D, Popik P. Effects of the Selective 5-HT₇ Receptor Antagonist SB-269970 and Amisulpride on Ketamine-Induced Schizophrenia-like Deficits in Rats. *PLoS One*. 2013;8.
- Northmore DP, Levine ES, Schneider GE. Behavior evoked by electrical stimulation of the hamster superior colliculus. *Exp Brain Res*. 1988;73:595–605.

Ogura H, Aigner TG. MK-801 impairs recognition memory in rhesus monkeys: comparison with cholinergic drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;266:60–4.

Olney JW, Farber NB. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 1995;52:998–1007.

Otnaess MK, Brun VH, Moser MB, Moser EI. Pretraining prevents spatial learning impairment after saturation of hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci.* 1999;19:RC49.

Pacher L, Ba N. The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. 2006;58:389–462.

Park SJ, Lee Y, Oh HK, Lee HE, Lee Y, Ko SY, et al. Oleanolic acid attenuates MK-801-induced schizophrenia-like behaviors in mice. *Neuropharmacology.* 2014;86:49–56.

Parolaro D, Realini N, Vigano D, Guidali C, Rubino T. The endocannabinoid system and psychiatric disorders. *Exp Neurol.* 2010;224:3–14.

Paule MG, Li M, Allen RR, Liu F, Zou X, Hotchkiss C, et al. Ketamine anesthesia during the first week of life can cause long-lasting cognitive deficits in rhesus monkeys. *Neurotoxicol Teratol.* 2011;33:220–30.

Pedrazzi JFC, Issy a. C, Gomes F V., Guimarães FS, Del-Bel E a. Cannabidiol effects in the prepulse inhibition disruption induced by amphetamine. *Psychopharmacology (Berl).* 2015.

Peluso MJ, Lewis SW, Barnes TRE, Jones PB. Extrapyramidal motor side-effects of first and second-generation antipsychotic drugs. *Br J Psychiatry.* 2012;200:387–92.

Penner JD, Brown AS. Prenatal infectious and nutritional factors and risk of adult schizophrenia. *Expert Rev Neurother.* 2007;7:797–805.

Perry W, Minassian A, Feifel D, Braff DL. Sensorimotor gating deficits in bipolar disorder patients with acute psychotic mania. *Biol Psychiatry.* 2001;50:418–24.

Pessoa DMA, Maia R, de Albuquerque Ajuz RC, De Moraes PZPMR, Spyrides MHC, Pessoa VF. The adaptive value of primate color vision for predator detection. *Am J Primatol.* 2014;76:721–9.

De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol.* 2004;141:765–74.

- Pilowsky LS, Bressan R a, Stone JM, Erlandsson K, Mulligan RS, Krystal JH, et al. First in vivo evidence of an NMDA receptor deficit in medication-free schizophrenic patients. *Mol Psychiatry*. 2006;11:118–9.
- Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nat Rev Neurosci*. 2003;11:873-84.
- Pissinatti A, Andrade MCR (2010) Histórico: Uso de primatas em experimentação. In:Andrade A, Andrade MCR, Marinho AM, Ferreira-Filho J (org.). *Biologia, Manejo e Medicina de Primatas Não-Humanos na Pesquisa Biomédica*. Ed. FioCruz, Rio de Janeiro, RJ. pp. 21-39.
- Ralph RJ, Caine SB. Dopamine D1 and D2 agonist effects on prepulse inhibition and locomotion: comparison of Sprague-Dawley rats to Swiss-Webster, 129X1/SvJ, C57BL/6J, and DBA/2J mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312:733–41.
- Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Moore, P.K. (2003). *Pharmacology*. 5a ed. Loanhead: Churchill Livingstone, pp.797.
- Rankin CH, Abrams T, Barry RJ, Bhatnagar S, Clayton DF, Colombo J, et al. Habituation revisited: An updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiol Learn Mem*. 2009;92:135–8.
- Raper J, Wallen K, Sanchez MM, Stephens SBZ, Henry A, Villareal T, et al. Sex-dependent role of the amygdala in the development of emotional and neuroendocrine reactivity to threatening stimuli in infant and juvenile rhesus monkeys. *Horm Behav*. 2013a;63:646–58.
- Raper J, Wilson M, Sanchez M, Machado CJ, Bachevalier J. Pervasive alterations of emotional and neuroendocrine responses to an acute stressor after neonatal amygdala lesions in rhesus monkeys. *Psychoneuroendocrinology*. 2013b;38:1021–35.
- Read J, Van Os J, Morrison AP, Ross CA. Childhood trauma, psychosis and schizophrenia: A literature review with theoretical and clinical implications. *Acta Psychiatr. Scand*. 2005; 330–50.

- Reijmers LG, Vanderheyden PM, Peeters BW. Changes in prepulse inhibition after local administration of NMDA receptor ligands in the core region of the rat nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol.* 1995;272:131–8.
- Resstel LBM, Tavares RF, Lisboa SFS, Joca SRL, Corrêa FMA, Guimarães FS. 5-HT 1A receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Br J Pharmacol.* 2009;156:181–8.
- Rigdon GC, Viik K. Prepulse inhibition as screening test for potential antipsychotics. *Drug Dev Res.* 1991;23:91–9.
- Rigdon GC, Weatherspoon JK. 5-Hydroxytryptamine 1a receptor agonists block prepulse inhibition of acoustic startle reflex. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;263:486–93.
- Robson PJ, Guy GW, Di Marzo V. Cannabinoids and Schizophrenia: Therapeutic Prospects. *Curr Pharm Des.* 2014;20:2194–204.
- Roesler R, Vianna M, Sant'Anna MK, Kuyven CR, Krueel A V, Quevedo J, et al. Intrahippocampal infusion of the NMDA receptor antagonist AP5 impairs retention of an inhibitory avoidance task: protection from impairment by pretraining or preexposure to the task apparatus. *Neurobiol Learn Mem.* 1998;69:87–91.
- Rupniak NMJ, Boyce S, Steventon MJ, Iversen SD, Marsden CD. Dystonia induced by combined treatment with L-dopa and MK-801 in parkinsonian monkeys. *Ann Neurol.* 1992;32:103–5.
- Safferman a, Lieberman J a, Kane JM, Szymanski S, Kinon B. Update on the clinical efficacy and side effects of clozapine. *Schizophr Bull.* 1991;17:247–61.
- Sanders MJ, Fanselow MS. Pre-training prevents context fear conditioning deficits produced by hippocampal NMDA receptor blockade. *Neurobiol Learn Mem.* 2003;80:123–9.
- Sanders-Bush E, Breeding M. Putative selective 5-HT-2 antagonists block serotonin 5-HT-1c receptors in the choroid plexus. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988;247:169–73.

- Satake S, Yamada K, Melo LL, Barbosa Silva R. Effects of microinjections of apomorphine and haloperidol into the inferior colliculus on prepulse inhibition of the acoustic startle reflex in rat. *Neurosci Lett*. 2012;509:60–3.
- Saucier D, Hargreaves EL, Boon F, Vanderwolf CH, Cain DP. Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under systemic NMDA or muscarinic antagonism: nonspatial pretraining eliminates spatial learning deficits. *Behav Neurosci*. 1996;110:103–16.
- Schäfer I, Harfst T, Aderhold V, Briken P, Lehmann M, Moritz S, et al. Childhood trauma and dissociation in female patients with schizophrenia spectrum disorders: an exploratory study. *J Nerv Ment Dis*. 2006;194:135–8.
- Schulz B, Fendt M, Pedersen V, Koch M. Sensitization of prepulse inhibition deficits by repeated administration of dizocilpine. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001;156:177–81.
- Seeman P. Dopamine receptor sequences. Therapeutic levels of neuroleptics occupy D2 receptors, clozapine occupies D4. *Neuropsychopharmacology*. 1992;7:261–84.
- Seeman P. Schizophrenia and dopamine receptors. *Eur. Neuropsychopharmacol*. 2013; 999–1009.
- Seibt KJ, Piato AL, da Luz Oliveira R, Capiotti KM, Vianna MR, Bonan CD. Antipsychotic drugs reverse MK-801-induced cognitive and social interaction deficits in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*. 2011;224:135–9.
- Seillier A, Giuffrida A. Evaluation of NMDA receptor models of schizophrenia: Divergences in the behavioral effects of sub-chronic PCP and MK-801. *Behav Brain Res*. 2009;204:410–5.
- Selemon LD, Goldman-Rakic PS. Common cortical and subcortical targets of the dorsolateral prefrontal and posterior parietal cortices in the rhesus monkey: evidence for a distributed neural network subserving spatially guided behavior. *J Neurosci*. 1988;8:4049–68.
- Selvaraj S, Arnone D, Cappai A, Howes O. Alterations in the serotonin system in schizophrenia: A systematic review and meta-analysis of postmortem and molecular imaging studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;45:233–45.
- Semple DM, McIntosh AM, Lawrie SM. Cannabis as a risk factor for psychosis: systematic review. *J Psychopharmacol*. 2005;19:187–94.

- Shapiro ML, O'Connor C. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 and spatial memory representation: working memory is impaired in an unfamiliar environment but not in a familiar environment. *Behav Neurosci.* 1992;106:604–12.
- Shepherd AM, Laurens KR, Matheson SL, Carr VJ, Green MJ. Systematic meta-review and quality assessment of the structural brain alterations in schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev.* 2012;36:1342–56.
- Short S, Coe CL. Population variation in behavioral inhibition and neuroendocrine activity is associated with hemispheric structure in young rhesus monkeys. 2014;56–67.
- Silva RCB, Sandner G, Brandão ML. Unilateral electrical stimulation of the inferior colliculus of rats modifies the prepulse modulation of the startle response (IPP): Effects of ketamine and diazepam. *Behav Brain Res.* 2005;160:323–30.
- Sparks DL, Nelson IS. Sensory and motor maps in the mammalian superior colliculus. *Trends Neurosci.* 1987;312–7.
- Stefani MR, Moghaddam B. Effects of repeated treatment with amphetamine or phencyclidine on working memory in the rat. *Behav Brain Res.* 2002;134:267–74.
- Stein BE, Magalhaes-Castro B, Kruger L. Superior colliculus: visuotopic-somatotopic overlap. *Science.* 1975;189:224–6.
- Stepniewska I, Qi HX, Kaas JH. Projections of the superior colliculus to subdivisions of the inferior pulvinar in New World and Old World monkeys. *Vis Neurosci.* 2000;17(4):529–49.
- Stevens CF. Quantal release of neurotransmitter and long-term potentiation. *Cell.* 1993;72 Suppl:55–63.
- Stevens JR. Schizophrenia and dopamine regulation in the mesolimbic system. 1979;102–5.
- Sun L, Li Q, Li Q, Zhang Y, Liu D, Jiang H, et al. Chronic ketamine exposure induces permanent impairment of brain functions in adolescent cynomolgus monkeys. *Addict Biol.* 2014;19:185–94.
- Swerdlow NR, Benbow CH, Zisook S, Geyer MA, Braff DL. A preliminary assessment of sensorimotor gating in patients with obsessive compulsive disorder. *Biol Psychiatry.* 1993;33:298–301.

- Swerdlow NR, Caine SB, Braff DL, Geyer MA. The neural substrates of sensorimotor gating of the startle reflex: a review of recent findings and their implications. *J. Psychopharmacol.* 1992;176–90.
- Swerdlow NR, Geyer MA. Clozapine and haloperidol in an animal model of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993;44:741–4.
- Swerdlow NR, Hanlon FM, Henning L, Kim YK, Gaudet I, Halim ND. Regulation of sensorimotor gating in rats by hippocampal NMDA: Anatomical localization. *Brain Res.* 2001a;898:195–203.
- Swerdlow NR, Karban B, Ploum Y, Sharp R, Geyer MA, Eastvold A. Tactile prepuff inhibition of startle in children with Tourette's syndrome: In search of an "fMRI-friendly" startle paradigm. *Biol Psychiatry.* 2001b;50:578–85.
- Swerdlow NR, Keith VA, Braff DL, Geyer MA. Effects of spiperone, raclopride, SCH 23390 and clozapine on apomorphine inhibition of sensorimotor gating of the startle response in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;256:530–6.
- Tamir I, Mechoulam R, Meyer AY. Cannabidiol and phenytoin: a structural comparison. *J Med Chem.* 1980;23:220–3.
- Tamminga CA. Schizophrenia and glutamatergic transmission. *Crit Rev Neurobiol.* 1998;12:21–36.
- Tanabe Y, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Nakanishi S. A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron.* 1992;169–79.
- Tandon R, Keshavan M, Nasrallah H. Schizophrenia, "Just the Facts" What we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophr Res.* 2008;102:1–18.
- Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol.* 2007;150:613–23.
- Thompson RF. Habituation: A history. *Neurobiol Learn Mem.* 2009;92:127–34.
- Tsuang M. Schizophrenia: Genes and environment. *Biol. Psychiatry.* 2000;210–20.

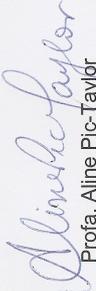
- Tsukada H, Nishiyama S, Fukumoto D, Sato K, Kakiuchi T, Domino EF. Chronic NMDA antagonism impairs working memory, decreases extracellular dopamine, and increases D1 receptor binding in prefrontal cortex of conscious monkeys. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30:1861–9.
- Uekita T, Okaichi H. NMDA antagonist MK-801 does not interfere with the use of spatial representation in a familiar environment. *Behav Neurosci*. 2005;119:548–56.
- Vianna DML, Brandão ML. Anatomical connections of the periaqueductal gray: Specific neural substrates for different kinds of fear. *Brazilian J Med Biol Res*. 2003;36:557–66.
- Vigano D, Guidali C, Petrosino S, Realini N, Rubino T, Di Marzo V, et al. Involvement of the endocannabinoid system in phencyclidine-induced cognitive deficits modelling schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009;12:599–614.
- Volk DW, Lewis DA. The role of endocannabinoid signaling in cortical inhibitory neuron dysfunction in schizophrenia. *Biological Psychiatry*. 2015, no prelo.
- Wang J, Chen Y, Carlson S, Li L, Hu X, Ma Y. Interactive effects of morphine and scopolamine, MK-801, propranolol on spatial working memory in rhesus monkeys. *Neurosci Lett*. 2012;523:119–24.
- Weike AI, Bauer U, Hamm AO. Effective neuroleptic medication removes prepulse inhibition deficits in schizophrenia patients. *Biol Psychiatry*. 2000;47:61–70.
- White PF, Way WL, Trevor anthony J. Ketamine—Its Pharmacology and Therapeutic Uses. *Anesthesiology*. 1982;119–36.
- Williams LE, Blackford JU, Luksik A, Gauthier I, Heckers S. Reduced habituation in patients with schizophrenia. *Schizophr Res*. 2013;151:124–32.
- Winslow JT, Noble PL, Davis M. Modulation of Fear-Potentiated Startle and Vocalizations in Juvenile Rhesus Monkeys by Morphine, Diazepam, and Buspirone. *Biol Psychiatry*. 2007;61:389–95.
- Winslow JT, Parr L a, Davis M. Fear-Potentiated Startle Measured in Rhesus Monkeys. *Soc Biol Psychiatry*. 2002;3223.

- Wolf R, Dobrowolny H, Matzke K, Paelchen K, Bogerts B, Schwegler H. Prepulse inhibition is different in two inbred mouse strains (CPB-K and BALB/cJ) with different hippocampal NMDA receptor densities. *Behav Brain Res.* 2006;166:78–84.
- Wong EH, Kemp JA, Priestley T, Knight AR, Woodruff GN, Iversen LL. The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:7104–8.
- Woods BT, Ward KE, Johnson EH. Meta-analysis of the time-course of brain volume reduction in schizophrenia: Implications for pathogenesis and early treatment. *Schizophr Res.* 2005;73:221–8.
- Wright IC, Rabe-Hesketh S, Woodruff PWR, David AS, Murray RM, Bullmore ET. Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 2000;157:16–25.
- Xing J, Li J. TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) neurons. *J Neurophysiol.* 2007;97:503–11.
- Y. Meltzer H, W. Massey B, Horiguchi M. Serotonin Receptors as Targets for Drugs Useful to Treat Psychosis and Cognitive Impairment in Schizophrenia. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13:1572–86.
- Yang T, Bavley RL, Fomalont K, Blomstrom KJ, Mitz AR, Turchi J, et al. Contributions of the hippocampus and entorhinal cortex to rapid visuomotor learning in rhesus monkeys. *Hippocampus.* 2014.
- Yeomans JS, Lee J, Yeomans MH, Steidl S, Li L. Midbrain pathways for prepulse inhibition and startle activation in rat. *Neuroscience.* 2006;142:921–9.
- Yokel RA, Wise RA. Increased lever pressing for amphetamine after pimozide in rats: implications for a dopamine theory of reward. *Science.* 1975;187:547–9.
- Yoshimi N, Futamura T, Hashimoto K. Improvement of dizocilpine-induced social recognition deficits in mice by brexpiprazole, a novel serotonin – dopamine activity modulator. 2015;356–64.

- Zavitsanou K, Garrick T, Huang XF. Selective antagonist [3H]SR141716A binding to cannabinoid CB1 receptors is increased in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2004;28:355–60.
- Zuardi A, Alexandre S, Crippa J, E.C. Hallak J, Bhattacharyya S, Atakan Z, Martin-Santos R, et al. A Critical Review of the Antipsychotic Effects of Cannabidiol: 30 Years of a Translational Investigation. *Curr Pharm Des*. 2012;18:5131–40.
- Zuardi a W, Moreira F a, Farmacologia D, Neurologia D. Constituent , As an Antipsychotic Drug. *Brazilian J Med Biol Res*. 2006;39:421–9.
- Zuardi a. W, Antunes Rodrigues J, Cunha JM. Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. *Psychopharmacology (Berl)*. 1991;104:260–4.
- Zuardi AW, Morais SL, Guimaraes FS, Mechoulam R. Antipsychotic effect of cannabidiol. *J. Clin. Psychiatry*. 1995;485–6.
- Zuardi AW, Shirakawa I, Finkelfarb E, Karniol IG. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by Δ 9-THC in normal subjects. *Psychopharmacology (Berl)*. 1982;76:245–50.

ANEXO

Anexo A – Declaração da Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA)

| | | | | |
|---|--|--|---|--|
|  <p>Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas Comitê de Ética no Uso Animal</p> | <p>Brasília, 1º de dezembro de 2011.</p> |  <p style="text-align: center;">DECLARAÇÃO</p> | <p>Declaramos que o projeto intitulado "INIBIÇÃO DA RESPOSTA DE SOBRESSALTO POR PAPEL DO COLÍCULO SUPERIOR NA HABILITUAÇÃO EMOCIONAL: UM ESTUDO DE PRÉ-PULSO ACÚSTICO EM CEBUS LIBIDINOSUS", UnBDOC n.º 128181/2011, sob responsabilidade do Prof. Carlos Alberto Bezerra Tomaz, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.</p> |  <p style="text-align: center;"> Prof. Aline Pic-Taylor Coordenadora do CEUA</p> |
|---|--|--|---|--|

Anexo B – Declaração da Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA)



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 29 de outubro de 2013.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “**INIBIÇÃO POR PRÉ-PULSO DA RESPOSTA DE SOBRESSALTO ACÚSTICO: UM NOVO TESTE PARA SELEÇÃO DE DROGAS ANTIPSICÓTICAS EM PRIMATAS NÃO-HUMANOS (CEBUS SPP)**”, UnBDOC n.º 131791/2013, sob responsabilidade do Professor CARLOS ALBERTO BEZERRA TOMAZ foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.


Prof. Fernando Pacheco Rodrigues
Coordenador da CEUA

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

Whole-Body Prepulse Inhibition Protocol to Test Sensorymotor Gating Mechanisms in Monkeys

Patricia G. Saletti¹, Rafael S. Maior¹, Etsuro Hori², Ricardo Miyasaka de Almeida³, Hisao Nishijo², Carlos Tomaz^{1*}

1 Primate Center and Laboratory of Neurosciences and Behavior, Department of Physiological Sciences, Institute of Biology, University of Brasilia, Brasilia, Brazil, **2** System Emotional Science, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, Toyama, Japan, **3** Large Animal Teaching Hospital, Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

Abstract

Prepulse inhibition (PPI) is the decrease of startle reflex amplitude when a slight stimulus is previously generated. This paradigm may provide valuable information about sensorimotor gating functionality. Here we aimed at determining the inhibited and uninhibited startle response of capuchin monkeys (*Sapajus spp.*), and to evaluate the role of the superior colliculus in PPI. Capuchin monkeys were tested in a whole-body protocol, to determine the best startle amplitude and interstimuli interval. Additionally we tested two subjects with bilateral superior colliculus damage in this protocol. Results show that 115 dB auditory pulse has induced the best startle response. In contrast to reports in other species, no habituation to the auditory stimuli was observed here in capuchins. Also, startle reflex inhibition was optimal after 120 msec interstimuli interval. Finally, there was a downward tendency of percentage inhibition in superior colliculus-lesioned monkeys. Our data provides the possibility of further studies with whole-body protocol in capuchin monkeys and reinforces the importance of the superior colliculus in PPI.

Citation: Saletti PG, Maior RS, Hori E, Almeida RMD, Nishijo H, et al. (2014) Whole-Body Prepulse Inhibition Protocol to Test Sensorymotor Gating Mechanisms in Monkeys. PLoS ONE 9(8): e105551. doi:10.1371/journal.pone.0105551

Editor: Brenton G. Cooper, Texas Christian University, United States of America

Received: March 21, 2014; **Accepted:** July 23, 2014; **Published:** August 21, 2014

Copyright: © 2014 Saletti et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This research was supported in part by the JSPS Asian Core Program and the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture, Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (25290005); and Research Support Foundation, FAP-DF, Brazil (2010/00154-0). PGS was recipient of a doctoral fellowship from CAPES and CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: ctomaz@unb.br

Introduction

Acoustic startle reflex (ASR) is an innate response that causes a rapid contraction of facial and bodily muscles provoked by an intense and sharp noise [1,2]. ASR can be used as an experimental model for the study of sensitization, habituation, prepulse inhibition, fear potentiated startle, as well as to test the effects of drugs on behaviour [3–6]. Prepulse inhibition (PPI) paradigm is the decrease of ASR when a slight acoustic stimulus is previously generated [2,7,8]. PPI depends on some stimulus-related variables, chiefly: intensity, duration, and interstimuli interval. This behavioural paradigm may provide valuable information about sensorimotor gating functionality. Understanding the neural circuitry underlying PPI may provide important insights into neurological disorders, such as schizophrenia [9]. Indeed, PPI test is generally used as a screening procedure for substances with potential antipsychotic effects [10,11]. In this sense, tests in nonhuman primates are crucial since their results may be more readily extrapolated to humans due to brain and behavioural similarities between monkeys and human beings. Some PPI paradigm-studies have identified interstimuli intervals, as well as stimuli intensities and duration for some nonhuman primates [5,6,12].

Midbrain is essential for PPI [3,13]. In an experiment with rats Yeomans *et al* [13] suggested that the mesencephalic

pathways are involved in acoustic PPI. They found that a fast auditory pathway from cochlear nucleus starting from inferior colliculus to the intercollicular nucleus, then it reaches intermediate layers of the superior colliculus (SC) and proceeds to tegmental pedunculopontine nucleus, which in turn projects to the basal ganglia and into the spinal cord. Yeomans *et al* [13] also emphasized a slower multisensory pathway started in SC intermediate layers. These results support previous studies that demonstrated the importance of such structures in PPI [3,14]. Although SC is involved in responses to visual stimuli, including detection of salient stimuli, head and eyes orientation, saccadic movements and shifts of attention [15–20], this subcortical structure is strongly implicated in defensive behaviours [21–24]. In addition, SC receives auditory inputs from inferior colliculus [25] that must be related to PPI [13]. Therefore, SC is an important center of multisensory integration that receives visual, auditory, and somatosensory information from several cortical and subcortical areas [26–28].

The present study aimed to determine the pattern of startle response of individuals of *Sapajus spp.* using whole-body protocol, to determine the best intensity and PPI interstimuli interval as well as to evaluate the role of the SC in capuchin monkeys in PPI.

Materials and Methods

Ethics Statement

All procedures involving animals had been conducted according to guidelines of the Brazilian Society of Animal Experimentation (COBEA) and followed the Principles of Laboratory Animal Care (NIH publication no. 85-23, revised 1996). This study was approved by the Animal Ethics Committee of the Institute of Biology, University of Brasilia (UnBDOC no 128181/2011). All experiments were conducted at Primate Center at University of Brasilia, Brazil.

Animals were pair-housed in cages with natural substrate, with rope swings and nest boxes, measuring 3×3×1.8 m, under natural conditions of lightness and temperature. Animals were given access to food and water *ad libitum*. New supply of food was offered twice daily, early morning and late in the day, and water was offered by automatic drinking fountain. Animals were under constant environmental enriching tasks as usual in our Primate Center. No animal was submitted to any kind of suffering. In order to minimize stress during experiments, animals were submitted to acclimation sessions (see below), in which they received fruits reward for quiet standing in test equipment. Since animals are still under behavioural studies, no individual has been euthanized after the present study.

Subjects

A total of 12 capuchin monkeys (*Sapajus spp.*), 8 females and 4 males, weighing between 2 and 5 kg were employed in this study. Animals were submitted to test sessions after feed time between 8–12 am, five days a week.

Subjects were placed inside the experimental chamber (see description below) by an experimenter and were submitted to 5–8 sessions for acclimation. Animals remained for 60 min per day inside the chamber with 65 dB white noise on. During this period the monkeys received fruits reward for quiet standing. Similar procedure was used for 10 min before every test session.

Procedures

Three different tests were performed in the following sequence: startle response amplitude, prepulse inhibition and superior colliculus lesion. In startle response amplitude test, 6 animals (4 females and 2 males) were employed. In prepulse inhibition test, all the same 6 subjects were employed and we added 2 females. The 8 subjects used in prepulse inhibition test were also employed in the SC-lesion test as a control group. Beyond these 8 subjects, we employed 2 females as the sham-group and 2 males as the lesion-group. All those tests are detailed below at next sections.

Tests were conducted in a room next to the house cage inside an acoustically isolated compartment (140×100×170 cm), with a permanent white noise of approximately 65 dB. A bottomless chamber measuring 60×30×30 cm was built in transparent acrylic material of 15 mm thick and placed above a wooden box measuring 45×40×40 cm (Fig. 1). This wooden box was built to keep the animal away from the ground improving the welfare of the subjects during tests. Subjects were placed inside the acrylic chamber with its head out. The top of the chamber had an adjustable hole that held the subjects neck. A device (30×30×25 cm) equipped with two speakers (Foster Model FT96H Frequency band; 4 KHz~30 KHz) was placed above subject's head, whereas each speaker was 10 cm away from the head. Speakers were connected to a sound generator (O'Hara & Co., Ltd., Tokyo) and a video camera (Model Clone #1004124), which allowed continuous monitoring of the subject by an external computer during the procedure. Subject's whole-body movement

were captured by an accelerometer (Inntechno Japan Co.ltd., Model: BDK3) located on the bottom of chamber and connected to an amplifier (O'Hara & Co., Ltd.). The whole system was connected to a recording software (Animal Startle – PCI 6024E, developed by O'Hara & Co., Ltd.), interfaced with Windows XP operational system, which allowed adjustment of some recording features.

Startle response amplitude

Six animals (two males and four females) were employed in this experiment. The startle amplitude was measured in a single session with 10 equal and consecutive blocks of 5 pseudorandom white noise stimuli each (90, 95, 100, 115, 120 dB). Inter-stimulus interval was 60 sec and the duration of each stimulus was 40 msec. Startle response was defined as the maximum peak voltage amplitude of the accelerometer over 400 msec after stimulus presentation. Basal activity was defined as the maximum peak voltage over 400 msec before stimulus presentation.

Prepulse inhibition

Eight animals (two males and six females) were employed on a single session of 7 equal and consecutive blocks of 7 pseudorandom trials each (pulse-alone, prepulse-alone and 5 prepulse-pulse trials ranging inter-stimulus intervals: 45, 70, 120, 520, 1020 msec). Pulse and prepulse were 115 dB and 80 dB white noise stimuli respectively and inter-trial interval was 60 sec. Startle response was recorded over 1800 msec after each presentation.

Superior colliculus lesion

PPI was conducted in two males submitted to bilateral neurotoxic lesions of the SC and two females that were submitted to SC-sham surgery. Ibotenic acid (IBO) was infused in four injection sites, two in each SC (10 mg/kg in phosphate-buffered saline (PBS); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a rate of 1 µl/5 min not to cause mechanical damages on those structures. In each site 0.4–0.8 µl IBO was delivered and the glass pipette was left inside the brain for 2 min to allow the dispersion and to avoid reflux during removal. Injection sites were determined by means of a stereotaxic atlas for *Sapajus* [29]. The SC-sham group was submitted to the same overall procedure, but instead IBO, the same volume of PBS vehicle was infused. For more details about surgery and evaluation of extent of injury, see Maior *et al* [23]. We also submitted the same eight animals (control group) cited above to the PPI test described in this session. Animals were employed on a single session of 10 equal and consecutive blocks of 3 pseudorandom stimuli each (pulse-alone, 115 dB, 40 msec duration; prepulse-alone, 80 dB, 20 msec duration and pulse-prepulse, 120 msec interval). Startle response was recorded as maximum peak amplitude over 600 msec after each presentation.

Statistical Analysis

Startle response amplitude. One-factor repeated-measures analysis of variance (ANOVA) and *post hoc* Bonferroni test were performed to examine the effects of stimulus intensity on startle amplitude relative to basal activity, the startle response to different stimulus intensities and the mean startle response for all intensities along trial blocks.

Prepulse inhibition. The percent inhibition of the startle response was calculated for each subject by the following formula: $100 \times ([\text{pulse-alone}] - [\text{prepulse-pulse}]) / [\text{pulse-alone}]$ as done in previous PPI studies [5,6]. One-factor ANOVA was performed using prepulse interval and trial block as within-subjects factors.

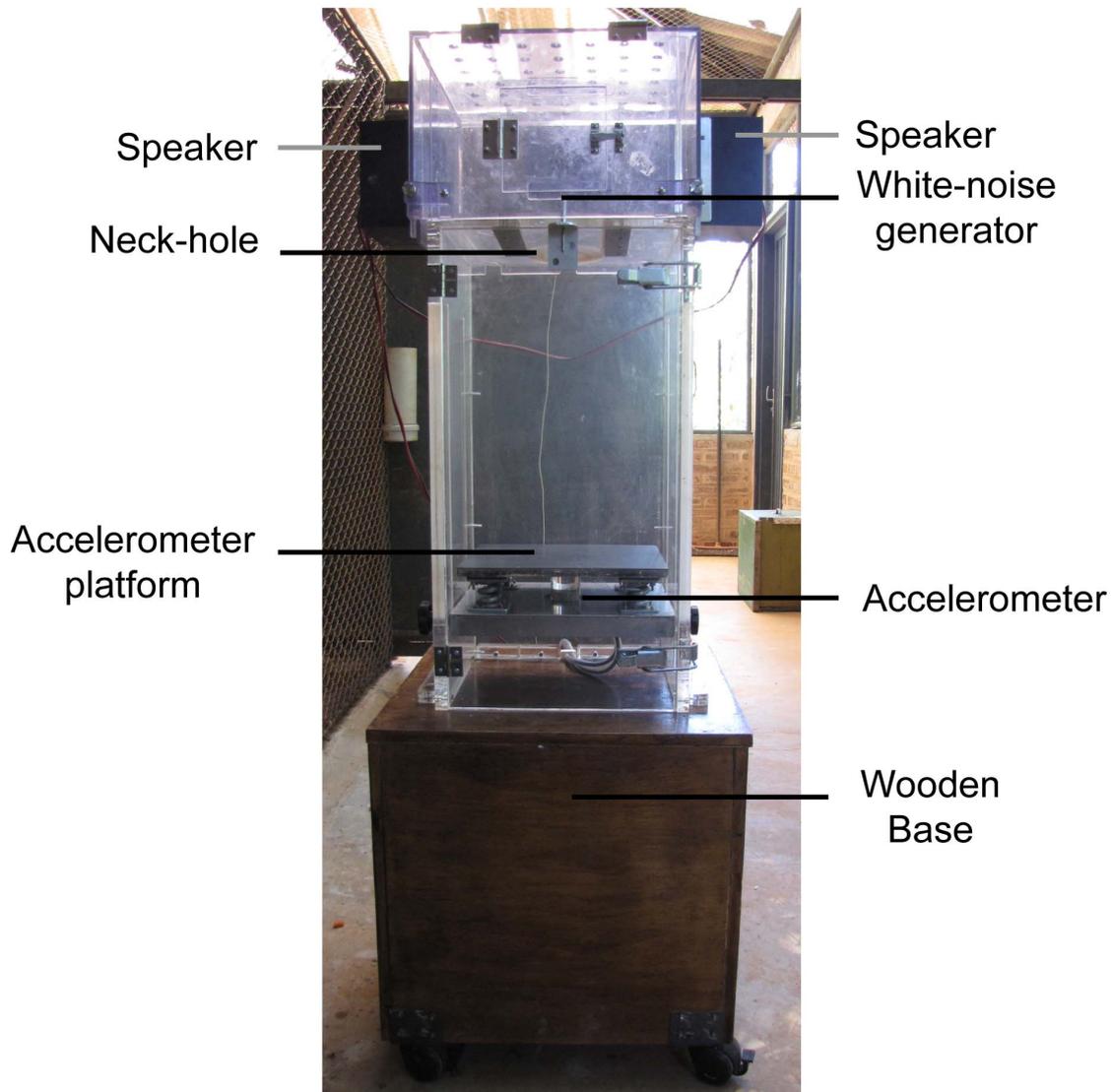


Figure 1. Primate test chamber. Monkeys were positioned with the neck at the neck-hole in a standing position on the accelerometer platform. doi:10.1371/journal.pone.0105551.g001

Also a *post hoc* Bonferroni test was performed to examine individual main and interaction effects.

Superior colliculus lesion. The details of the lesion were published elsewhere [23]. IBO injections resulted in circumscribed bilateral lesions, characterized by cell loss filled with gliosis, identified as hypersignal in T-2weighted and FLAIR scans (2-mm thick images). The lesions encompassed all SC layers down to inferior colliculus and central gray and extended two-thirds of the rostrocaudal SC axis in all subjects. No discernible damage was found in the tissues above SC due to IBO leaking during cannula retraction. Percent inhibition was calculated as explained in session 2.6.2. A Kruskal-Wallis analysis comparing the means for each group was performed to compare the percentage inhibition of the startle response among lesion, sham-lesion and control groups.

Results

Raw data of the three tests (startle response amplitude, prepulse inhibition and superior colliculus lesion) are available in table S1, table S2 and table S3 respectively.

Startle response amplitude

Acoustic startle response amplitude showed a gradual increase with increasing of stimulus intensity in the control monkeys. No difference was found in basal activity [$F(0.81)$; $p = 0.51$]. There was no statistical difference over the course of 10 repeated trial blocks, showing that there was no habituation during the test trial [$F(0.862)$; $p = 0.55$] (Fig. 2-A). Figure 2-B shows the mean amplitude startle response relative to baseline activity. All intensities caused greater startle responses than the basal activity ($p < 0.05$). ANOVA followed by *post hoc* Bonferroni test indicated

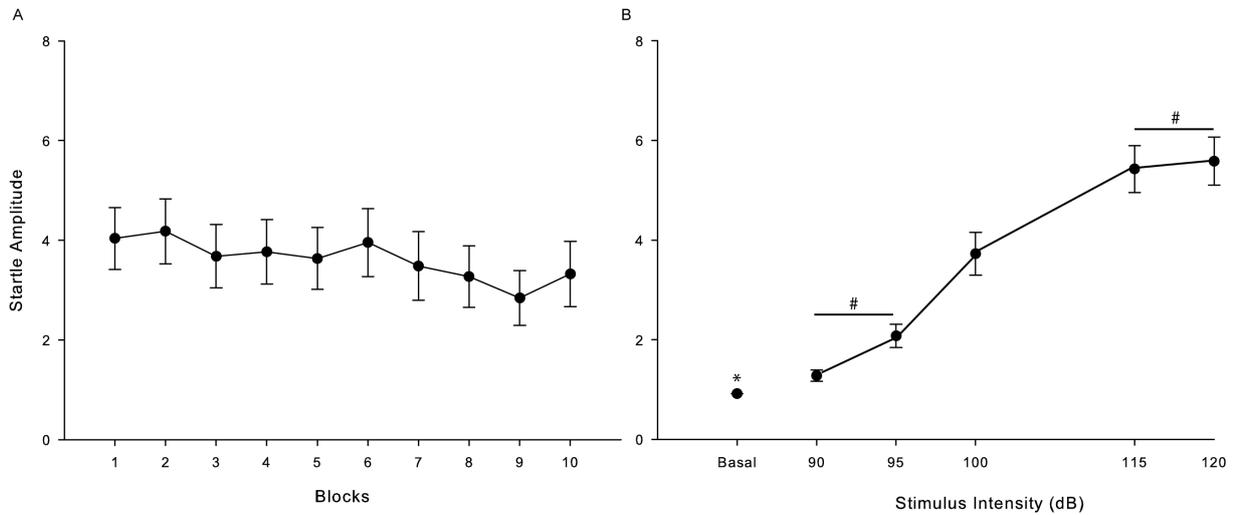


Figure 2. Monkeys startle response amplitude. A – Mean relative startle responses, collapsed across stimulus intensities, across repeated blocks of test trials. B – Mean relative startle responses across repeated blocks. * basal activity vs. all acoustic intensities (90–120 dB); # no statistical difference. (n = 6).

doi:10.1371/journal.pone.0105551.g002

that only 90×95 dB and 115×120 dB intensities had no significant difference between themselves ($p > 0.05$).

Prepulse inhibition

There was no habituation over the course of 7 trial blocks in the control monkeys [$F(0.99)$; $p = 0.43$] (Fig. 3-A). ANOVA followed by post hoc Bonferroni test indicated that only in prepulse-pulse 120 msec-interval trial mean amplitude was different of pulse-alone trial amplitude ($p = 0.01$). In all others cases, prepulse-pulse trials had the same response amplitude as pulse-alone trials ($p > 0.17$). Also, prepulse-alone was different of pulse-alone response ($p < 0.01$) (Fig. 3-B). Figure 3-C shows percentage of inhibition of startle response of each interstimulus interval tested.

Superior colliculus lesions

There was no habituation over the course of 10 trial blocks for any of the groups [control: $F(1.11)$; $p = 0.15$, sham: $F(0.86)$; $p = 0.57$, lesion: $F(1.19)$; $p = 0.31$] (Fig. 4-A). As seen in Fig. 4-B, Kruskal-Wallis analyses yielded no significant difference on

percent inhibition between the three groups despite a tendency to deficit of prepulse inhibition in SC-lesion animals ($\chi^2 = 2.965$; $p = 0.227$).

Discussion

In the present study, we demonstrated startle response in *Sapajus spp.* in a whole-body paradigm. Our findings are consistent with the study accomplished by Winslow *et al.* [5] in rhesus monkeys, which revealed the possibility to evaluate *Macaca* startle pattern with the measurement of whole-body activity. Now we demonstrated that with the same protocol, capuchin and rhesus monkeys exhibit the same pattern of startle and PPI responses. To our knowledge there is only one previous report of PPI in capuchin monkeys. Linn and Javitt [12] adapted an eyeblink protocol apparatus for testing in humans and found similar results as the present study.

The pattern of PPI response followed expectations. We found that 115 dB and 120 dB were equally good to cause startle response. Considering that 115 dB was capable of inducing the

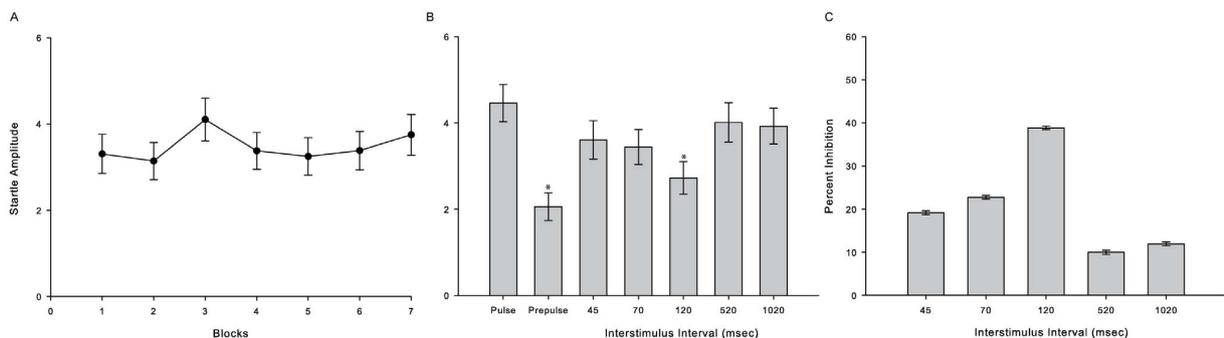


Figure 3. Monkeys startle response with and without prepulse stimuli. A – Mean relative startle responses, collapsed across interstimulus intervals, across 7 blocks of test trials. B – Mean relative startle responses in each test situation. * difference of pulse-alone response ($p < 0.05$). C – Mean relative percent of startle inhibition provoked by each interval between prepulse and pulse stimuli. (n = 8).

doi:10.1371/journal.pone.0105551.g003

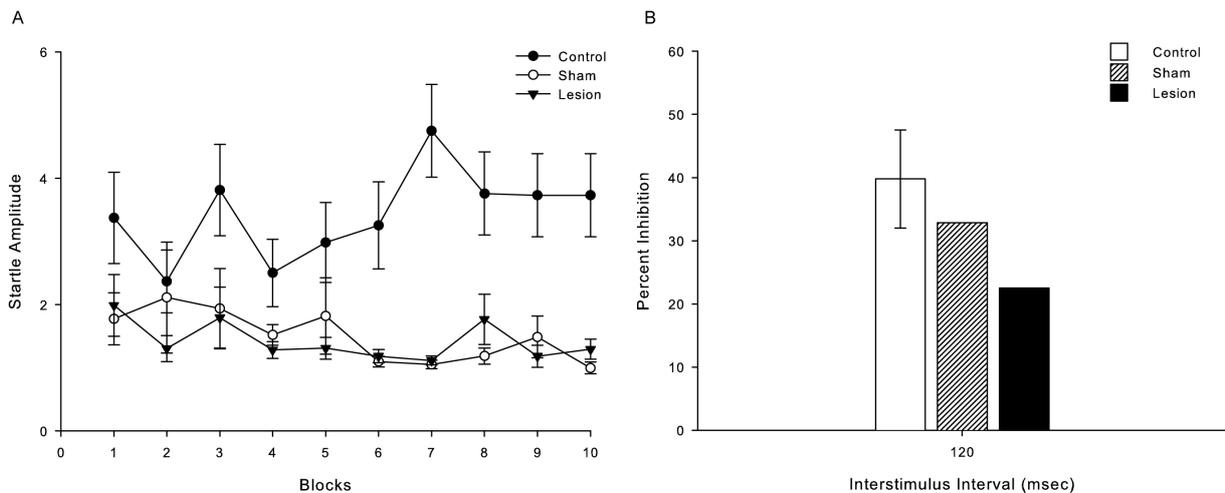


Figure 4. SC-lesion, sham and control monkeys startle response. A – Mean relative startle responses, collapsed across the three test trials, across 10 blocks. B – Mean relative percent inhibition of startle response in control (n=8), sham (n=2) and lesion (n=2) groups in prepulse-pulse 120 msec-interval protocol.

doi:10.1371/journal.pone.0105551.g004

expected response in our subjects and that it is also the same intensity found in literature for other primates [5,6,12,30], this intensity was selected as startle intensity for the subsequent tests. As in other nonhuman primate species, a prepulse intensity of 80 dB was ideal to inhibit the startle response generated by an 115 dB pulse. Also, the interstimulus interval that best inhibited startle response was 120 msec, in keeping with previous reports in other nonhuman primates [5,6,12,30].

In the SC-lesion test, we intended to evaluate our experimental protocol and test the role of SC on PPI response in primates. Thus, it was possible to show that there is a downward tendency of prepulse inhibition in animals with SC damage as well as demonstrated in rats [14,31]. Although caution should be taken when analysing this tentative study, the percentage inhibition found was not significant across the experimental groups. SC is an important and well-known structure related to visual information (for review [22]), however SC also receives multisensory information, such as tactile and auditory [26,32,33]. SC deep layers are also related to defensive behaviours such as freezing, darting and shift of attention in rodents [20,34,35], as well as prey-predator behaviour in primates [23,24]. Therefore, further testing might lead to a better understanding of SC's role in nonhuman primate PPI.

Habituation is a learning process whereby behavioural responses decrease after repeated stimulations [36,37]. As seen in Figs. 2-A and 3-A, we observe a non-significant reduction of the startle amplitude during the session test, i.e., no habituation was observed. In humans, 13 trials are optimal to reduce behavioural responses with a 100 dB startle stimulus [38] and in rhesus monkeys a small decrease in startle amplitude has been observed after 5 blocks of stimuli presentation within session [5]. Interestingly, deficits in startle habituation have been observed in schizophrenic patients [39,40]. Habituation in subjects with damage to the superior colliculus was also not observed (Fig. 4-A). Nevertheless, it is known that schizophrenia patients show deficits in habituation due to dysfunction on the hippocampus, which indicates that this reduction of behavioural response may be correlated with memory performance [41] and perhaps there is no relation with the superior colliculus. Regardless, the lack of

habituation in observed here suggests that PPI testing on this species may help understand the habituation patterns seen in schizophrenic patients.

The validation of the PPI test with whole-body experimental protocol using capuchin monkeys enables new preclinical studies to test potential antipsychotic substances. Many studies have been conducted with rodents [42–44], but due to *Sapajus* phylogenetic proximity with humans, the use of these animals as experimental models for drug testing may yield more reliable results.

Conclusions

The present study validates the PPI paradigm for testing in capuchin monkeys. Habituation to auditory stimuli was not seen here in *Sapajus* as reported in humans and rhesus. This was the first study that shows PPI responses of SC-lesioned primates, thus the results might be relevant to understand the role of the SC in humans' neurological disorders with impairment in sensorimotor gating mechanisms, as schizophrenia. Further validation of our experimental protocol enables future studies in order to find new antipsychotic drugs.

Supporting Information

Checklist S1 ARRIVE guidelines checklist.

(PDF)

Table S1 Startle response of animals in Startle response amplitude test.

(PDF)

Table S2 Startle response of animals in Prepulse inhibition test.

(PDF)

Table S3 Startle response of animals in Superior colliculus lesions test.

(PDF)

Acknowledgments

We thank G.V. da Silva, A. Araujo, R.S. Oliveira and C.D. Azevedo for excellent animal care.

References

- Lang PJ, Bradley MM, Cuthbert BN (1990) Emotion, attention, and the startle reflex. *Psychol Rev* 97: 377–395.
- Braff DL, Geyer MA, Swerdlow NR (2001) Humans studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology* 156: 234–258.
- Li L, Korngut LM, Frost BJ, Beninger RJ (1998) Prepulse inhibition following lesions of the inferior colliculus: prepulse intensity functions. *Physiol Behav* 65: 133–139.
- Koch M (1999) The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol* 59: 107–128.
- Winslow JT, Parr LA, Davis M (2002) Acoustic startle, prepulse inhibition, and fear-potentiated startle measured in rhesus monkeys. *Biol Psychiatry* 51: 859–866.
- Winslow JT, Noble PL, Davis M (2007) Modulation of fear-potentiated startle and vocalizations in juvenile rhesus monkeys by morphine, diazepam, and buspirone. *Biol Psychiatry* 61: 389–395.
- Hoffman HS, Ison JR (1980) Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. *Psychol Rev* 87: 175–189.
- Graham FK (1975) The more or less startling effects of weak prestimulation. *Psychophysiology* 12: 238–248.
- Braff DL, Geyer MA, Light GA, Sprock J, Perry W, et al. (2001) Impact of prepulse characteristics on the detection of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. *Schizophr Res* 49: 171–178.
- Rigdon GC, Viik K (1991) Prepulse inhibition as a screening test for potential antipsychotics. *Drug Develop Res* 23: 91–99.
- Swerdlow NR, Geyer MA (1993) Clozapine and haloperidol in an animal model of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. *Pharmacol Biochem Behav* 44: 741–744.
- Linn GS, Javitt DC (2001) Phencyclidine (PCP)-induced deficits of prepulse inhibition in monkeys. *Neuroreport* 12: 117–120.
- Yeomans JS, Lee J, Yeomans MH, Steidl S, Li L (2006) Midbrain pathways for prepulse inhibition and startle activation in rats. *Neuroscience* 142: 921–929.
- Fendt M, Koch M, Schmitz HU (1994) Sensorimotor gating deficit after lesions of the superior colliculus. *Neuroreport* 5: 1725–1738.
- Cynader M, Berman N (1972) Receptive-field organization of monkey superior colliculus. *J Neurophysiol* 35: 187–201.
- Robinson DA (1972) Eye movements evoked by collicular stimulation in the alert monkey. *Vision Res* 12: 1795–1808.
- Sparks DL (1986) Translation of sensory signals into commands for control of saccadic eye movements: role of primate superior colliculus. *Physiol Rev* 66: 118–171.
- Isa T (2002) Intrinsic processing in the mammalian superior colliculus. *Curr Opin Neurobiol* 12: 668–677.
- Doubell TP, Skaliara I, Baron J, King AJ (2003) Functional connectivity between the superficial and deeper layers of the superior colliculus: an anatomical substrate for sensorimotor integration. *J Neurosci* 23: 6596–6607.
- Ignashchenkova A, Dicke PW, Haarmeier T, Theier P (2004) Neuron specific contribution of the superior colliculus to overt and covert shifts of attention. *Nat Neurosci* 7: 56–64.
- Coimbra NC, Oliveira R, Freitas RL, Ribeiro SJ, Borelli KG, et al. (2006) Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray matter involved in the elaboration of the defensive behavior and fear-induced analgesia. *Exp Neurol* 197: 93–112.
- Isbell LA (2006) Snakes as agents of evolutionary change in primate brains. *J Hum Evol* 51: 1–35.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CT RSM PGS HN EH. Performed the experiments: PGS RSM EH. Analyzed the data: PGS CT RSM HN EH. Contributed reagents/materials/analysis tools: CT RSM PGS HN EH RMA. Contributed to the writing of the manuscript: CT RSM PGS HN EH RMA.

- Maiores RS, Hori E, Barros M, Teixeira DS, Tavares MCH, et al. (2011) Superior colliculus lesions impair threat responsiveness in infant capuchin monkeys. *Neurosci Lett* 504: 257–260.
- Maiores RS, Hori E, Uribe CE, Saletti PG, Ono T, et al. (2012) A role for the superior colliculus in the modulation of threat responsiveness in primates: toward the ontogenesis of the social brain. *Rev Neurosci* 23: 697–706.
- Harting JK, Van Lieshout DP (2000) Projections from the rostral pole of the inferior colliculus to the cat superior colliculus. *Brain Res* 881: 244–247.
- Stein BE, Magalhães-Castro B, Kruger L (1976) Relationship between visual and tactile representations in cat superior colliculus. *J Neurophysiol* 39: 410–419.
- Bell AH, Meredith MA, Opstal AJV, Munoz DP (2005) Crossmodal integration in the primate superior colliculus underlying the preparation and initiation of saccadic eye movements. *J Neurophysiol* 93: 3659–3673.
- Maravita A, Bolognini N, Bricolo E, Marzi CA, Savazzi S (2008) Is audiovisual integration subserved by the superior colliculus in humans? *Neuroreport* 19: 271–275.
- Manocha SL, Shantha TR, Bourne GH (1968) A stereotaxic atlas of the brain of the Cebus monkey (*Cebus apella*). Oxford: Clarendon Press. 97 p.
- Linn GS, Negi SS, Gerum SV, Javitt DC (2003) Reversal of phencyclidine-induced prepulse inhibition deficits by clozapine in monkeys. *Psychopharmacology* 169: 234–239.
- Fendt M (1999) Enhancement of prepulse inhibition after blockade of GABA activity within the superior colliculus. *Brain Res* 833: 81–85.
- King AJ, Hutchings ME (1987) Spatial response properties of acoustically responsive neurons in the superior colliculus of the ferret: a map of auditory space. *J Neurophysiol* 57: 596–624.
- Jay MF, Sparks DL (1987) Sensorimotor integration in the primate superior colliculus. II. Coordinates of auditory signals. *J Neurophysiol* 57: 35–55.
- Northmore OPM, Levine ES, Schneider GE (1988) Behavior evoked by electrical stimulation of the hamster superior colliculus. *Exp Brain Res* 73: 595–605.
- Brandão ML, Troncoso AC, de Souza Silva MA, Huston JP (2003) The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. *Eur J Pharmacol* 463: 225–233.
- Thompson RF (2009) Habituation: a history. *Neurobiol Learn Mem* 92: 127–134.
- Rankin CH, Abrams T, Barry RJ, Bhatnagar S, Clayton DF, et al. (2009) Habituation revisited: An updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiol Learn Mem* 92: 135–138.
- Lane ST, Franklin JC, Curran PJ (2013) Clarifying the nature of startle habituation using latent curve modelling. *Int J Psychophysiol* 88: 55–63.
- Geyer MA, Braff DL (1987) Startle habituation and sensorimotor gating in schizophrenia and related animals. *Schizophr Bull* 13: 643–668.
- Braff DL, Grillon C, Geyer MA (1992) Gating and habituation of the startle reflex in schizophrenic patients. *Arch Gen Psych* 49: 206–215.
- Williams LE, Blackford JU, Luksik A, Gauthier I, Heckers S (2013) Reduced habituation in patients with schizophrenia. *Schizophr Res* 151: 124–132.
- Feifel D, Reza TL, Wustrow DJ, Duff-Davis M (1999) Antipsychotic-like effects on prepulse inhibition of startle produced by a neurotensin agonist. *J Pharm Exp Ther* 288: 710–713.
- Ballmaier M, Bortolato M, Rizzetti C, Zoli M, Gessa G, et al. (2007) Cannabinoid receptor antagonists counteract sensorimotor gating deficits in the phencyclidine model of psychosis. *Neuropsychopharmacology* 32: 2098–2107.
- Gacályi I, Nagy K, Pallagi K, Lévy G, Hársing LG Jr, et al. (2013) Egis-11150: a candidate antipsychotic compound with procognitive efficacy in rodents. *Neuropharmacol* 64: 254–263.