

NEUROBIOLOGIA APLICADA DOS TESTES COMPORTAMENTAIS EM ROEDORES



GISLEI FROTA ARAGÃO
ORGANIZADOR

NEUROBIOLOGIA APLICADA DOS TESTES COMPORTAMENTAIS EM ROEDORES



GISLEI FROTA ARAGÃO
ORGANIZADOR



2026 - Amplla Editora

Copyright da Edição © Amplla Editora

Copyright do Texto © Os autores

Editor Chefe: Leonardo Tavares

Design da Capa: Amplla Editora

Revisão: Os autores

Tiragem: 1^a Edição – versão impressa

Neurobiologia aplicada dos testes comportamentais em roedores está licenciado sob CC BY-NC 4.0.



Essa licença permite que outros remixem, adaptem e desenvolvam seu trabalho para fins não comerciais e, embora os novos trabalhos devam ser creditados e não possam ser usados para fins comerciais, os usuários não precisam licenciar esses trabalhos derivados sob os mesmos termos. O conteúdo da obra e sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores e não representam a posição oficial da Amplla Editora. O download e o compartilhamento da obra são permitidos, desde que os autores sejam reconhecidos. Todos os direitos desta edição foram cedidos à Amplla Editora.

ISBN: 978-65-5381-308-3

DOI: 10.51859/amplla.nat298.1126-0

Amplla Editora

Campina Grande – PB – Brasil

[contato@ampllaeditora.com.br](mailto: contato@ampllaeditora.com.br)

www.ampllaeditora.com.br



2026

CONSELHO EDITORIAL

- Adilson Tadeu Basquerote – Centro Universitário para o Desenvolvimento do Alto Vale do Itajaí
- Alexander Josef Sá Tobias da Costa – Universidade do Estado do Rio de Janeiro
- Andréa Cátia Leal Badaró – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
- Andréia Monique Lermen – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- Antoniele Silvana de Melo Souza – Universidade Estadual do Ceará
- Aryane de Azevedo Pinheiro – Universidade Federal do Ceará
- Bergson Rodrigo Siqueira de Melo – Universidade Estadual do Ceará
- Bruna Beatriz da Rocha – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais
- Bruno Ferreira – Universidade Federal da Bahia
- Caio Augusto Martins Aires – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
- Caio César Costa Santos – Universidade Federal de Sergipe
- Carina Alexandra Rondini – Universidade Estadual Paulista
- Carla Caroline Alves Carvalho – Universidade Federal de Campina Grande
- Carlos Augusto Trojaner – Prefeitura de Venâncio Aires
- Carolina Carbonell Demori – Universidade Federal de Pelotas
- Caroline Barbosa Vieira – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul
- Christiano Henrique Rezende – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
- Cícero Batista do Nascimento Filho – Universidade Federal do Ceará
- Clécio Danilo Dias da Silva – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
- Dandara Scarlet Sousa Gomes Bacelar – Universidade Federal do Piauí
- Daniela de Freitas Lima – Universidade Federal de Campina Grande
- Darlei Gutierrez Dantas Bernardo Oliveira – Universidade Estadual da Paraíba
- Denilson Paulo Souza dos Santos – Universidade Estadual Paulista
- Denise Barguil Nepomuceno – Universidade Federal de Minas Gerais
- Dinara das Graças Carvalho Costa – Universidade Estadual da Paraíba
- Diogo Lopes de Oliveira – Universidade Federal de Campina Grande
- Dylan Ávila Alves – Instituto Federal Goiano
- Edson Lourenço da Silva – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí
- Elane da Silva Barbosa – Universidade Estadual do Ceará
- Érica Rios de Carvalho – Universidade Católica do Salvador
- Fábio Ronaldo da Silva – Universidade do Estado da Bahia
- Fernanda Beatriz Pereira Cavalcanti – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
- Fredson Pereira da Silva – Universidade Estadual do Ceará
- Gabriel Gomes de Oliveira – Universidade Estadual de Campinas
- Gilberto de Melo Junior – Instituto Federal do Pará
- Givanildo de Oliveira Santos – Instituto Brasileiro de Educação e Cultura
- Glécia Morgana da Silva Marinho – Pontifícia Universidad Católica Argentina Santa María de Buenos Aires (UCA)
- Higor Costa de Brito – Universidade Federal de Campina Grande
- Hugo José Coelho Corrêa de Azevedo – Fundação Oswaldo Cruz
- Igor Lima Soares – Universidade Federal do Ceará
- Isabel Fontgalland – Universidade Federal de Campina Grande
- Isane Vera Karsburg – Universidade do Estado de Mato Grosso
- Israel Gondres Torné – Universidade do Estado do Amazonas
- Ivo Batista Conde – Universidade Estadual do Ceará

- Jaqueleine Rocha Borges dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
- Jessica Wanderley Souza do Nascimento – Instituto de Especialização do Amazonas
- João Henrques de Sousa Júnior – Universidade Federal de Santa Catarina
- João Manoel Da Silva – Universidade Federal de Alagoas
- João Vitor Andrade – Universidade de São Paulo
- Joilson Silva de Sousa – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
- José Cândido Rodrigues Neto – Universidade Estadual da Paraíba
- Jose Henrique de Lacerda Furtado – Instituto Federal do Rio de Janeiro
- Josenita Luiz da Silva – Faculdade Frassinetti do Recife
- Josiney Farias de Araújo – Universidade Federal do Pará
- Karina de Araújo Dias – SME/Prefeitura Municipal de Florianópolis
- Katia Fernanda Alves Moreira – Universidade Federal de Rondônia
- Laís Portugal Rios da Costa Pereira – Universidade Federal de São Carlos
- Laíze Lantyer Luz – Universidade Católica do Salvador
- Lara Luiza Oliveira Amaral – Universidade Estadual de Campinas
- Lindon Johnson Pontes Portela – Universidade Federal do Oeste do Pará
- Lisiane Silva das Neves – Universidade Federal do Rio Grande
- Lucas Araújo Ferreira – Universidade Federal do Pará
- Lucas Capita Quarto – Universidade Federal do Oeste do Pará
- Lúcia Magnólia Albuquerque Soares de Camargo – Unifacisa Centro Universitário
- Luciana de Jesus Botelho Sodré dos Santos – Universidade Estadual do Maranhão
- Luís Miguel Silva Vieira – Universidade da Madeira
- Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
- Luiza Catarina Sobreira de Souza – Faculdade de Ciências Humanas do Sertão Central
- Manoel Mariano Neto da Silva – Universidade Federal de Campina Grande
- Marcelo Alves Pereira Eufrasio – Centro Universitário Unifacisa
- Marcelo Henrique Torres de Medeiros – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
- Marcelo Williams Oliveira de Souza – Universidade Federal do Pará
- Marcos Pereira dos Santos – Faculdade Rachel de Queiroz
- Marcus Vinicius Peralva Santos – Universidade Federal da Bahia
- Maria Carolina da Silva Costa – Universidade Federal do Piauí
- Maria José de Holanda Leite – Universidade Federal de Alagoas
- Marina Magalhães de Moraes – Universidade Federal do Amazonas
- Mário Cézar de Oliveira – Universidade Federal de Uberlândia
- Michele Antunes – Universidade Feevale
- Michele Aparecida Cerqueira Rodrigues – Logos University International
- Miguel Ysrrael Ramírez-Sánchez – Universidade Autônoma do Estado do México
- Milena Roberta Freire da Silva – Universidade Federal de Pernambuco
- Nadja Maria Mourão – Universidade do Estado de Minas Gerais
- Natan Galves Santana – Universidade Paranaense
- Nathalia Bezerra da Silva Ferreira – Universidade do Estado do Rio Grande do Norte
- Neide Kazue Sakugawa Shinohara – Universidade Federal Rural de Pernambuco
- Neudson Johnson Martinho – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso
- Patrícia Appelt – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
- Paula Milena Melo Casais – Universidade Federal da Bahia
- Paulo Henrique Matos de Jesus – Universidade Federal do Maranhão
- Rafael Rodrigues Gomides – Faculdade de Quatro Marcos
- Ramôn da Silva Santos – Universidade Federal Rural de Pernambuco
- Reângela Cíntia Rodrigues de Oliveira Lima – Universidade Federal do Ceará
- Rebeca Freitas Ivanicska – Universidade Federal de Lavras

- Renan Gustavo Pacheco Soares – Autarquia do Ensino Superior de Garanhuns
- Renan Monteiro do Nascimento – Universidade de Brasília
- Ricardo Leoni Gonçalves Bastos – Universidade Federal do Ceará
- Rodrigo da Rosa Pereira – Universidade Federal do Rio Grande
- Rubia Katia Azevedo Montenegro – Universidade Estadual Vale do Acaraú
- Sabrynnna Brito Oliveira – Universidade Federal de Minas Gerais
- Samuel Miranda Mattos – Universidade Estadual do Ceará
- Selma Maria da Silva Andrade – Universidade Norte do Paraná
- Shirley Santos Nascimento – Universidade Estadual Do Sudoeste Da Bahia
- Silvana Carloto Andres – Universidade Federal de Santa Maria
- Silvio de Almeida Junior – Universidade de Franca
- Tatiana Paschoalette R. Bachur – Universidade Estadual do Ceará | Centro Universitário Christus
- Telma Regina Stroparo – Universidade Estadual do Centro-Oeste
- Thayla Amorim Santino – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
- Thiago Sebastião Reis Contarato – Universidade Federal do Rio de Janeiro
- Tiago Silveira Machado – Universidade de Pernambuco
- Valvenarg Pereira da Silva – Universidade do Estado de Mato Grosso
- Vinícius Queiroz Oliveira – Universidade Federal de Uberlândia
- Virgínia Maia de Araújo Oliveira – Instituto Federal da Paraíba
- Virginia Tomaz Machado – Faculdade Santa Maria de Cajazeiras
- Walmir Fernandes Pereira – Miami University of Science and Technology
- Wanessa Dunga de Assis – Universidade Federal de Campina Grande
- Wellington Alves Silva – Universidade Estadual de Roraima
- William Roslindo Paranhos – Universidade Federal de Santa Catarina
- Yáscara Maia Araújo de Brito – Universidade Federal de Campina Grande
- Yasmin da Silva Santos – Fundação Oswaldo Cruz
- Yuciara Barbosa Costa Ferreira – Universidade Federal de Campina Grande



2026 - Amplia Editora

Copyright da Edição © Amplia Editora

Copyright do Texto © Os autores

Editor Chefe: Leonardo Tavares

Design da Capa: Amplia Editora

Revisão: Os autores

Catalogação na publicação
Elaborada por Bibliotecária Janaina Ramos - CRB-8/9166

N494

Neurobiologia aplicada dos testes comportamentais em roedores /
Organização de Gislei Frota Aragão. – Campina Grande/PB: Amplia, 2026.

Livro em PDF

ISBN 978-65-5381-329-8

DOI 10.51859/ampulla.nat298.1126-0

1. Neurobiologia - Roedores. I. Aragão, Gislei Frota (Organizador). II. Título.

CDD 616.89

Índice para catálogo sistemático

I. Neurobiologia - Roedores

Amplia Editora
Campina Grande – PB – Brasil
contato@ampullaeditora.com.br
www.ampullaeditora.com.br



2026

PREFÁCIO

Ao longo da minha trajetória como pesquisador em farmacologia e neurociências, uma certeza sempre se confirmou: não existe pesquisa pré-clínica consistente sem uma compreensão sólida dos testes comportamentais em roedores. É no comportamento que as alterações neurobiológicas ganham expressão concreta. É ali que se traduzem, em movimento, exploração, ansiedade, depressão, memória, interação social, aquilo que, mais tarde, buscamos correlacionar com doenças, alvos terapêuticos e novos fármacos.

Apesar dessa importância central, quem trabalha diariamente com modelos animais sabe o quanto ainda é difícil encontrar, em um único material, uma visão organizada, didática e aplicada dos principais testes comportamentais utilizados em pesquisa pré-clínica. A literatura está dispersa, muitas vezes restrita a artigos em inglês, com descrições metodológicas sucintas, que não contemplam detalhes práticos fundamentais. Esses “detalhes” – iluminação da sala, horário do teste, tempo de habituação, forma de manipular o animal, ruídos ambientais, posição do experimentador – acabam se tornando uma fonte silenciosa, mas poderosa, de variação e falta de reproduzibilidade.

Pequenas diferenças individuais na condução dos experimentos, associadas à ausência de um guia que oriente a padronização dos testes, contribuem para resultados inconsistentes, comparações difíceis e, por vezes, conclusões equivocadas. Não raro, o problema não está no modelo em si, mas na forma como ele é executado. Daí nasce a necessidade de um material que vá além da simples descrição de protocolos e ofereça, de forma organizada, a ponte entre a neurobiologia e a prática experimental: o “por quê” e o “como” caminham juntos.

Este livro, “Neurobiologia aplicada dos testes comportamentais em roedores”, surge exatamente para preencher essa lacuna. Ele reúne, em uma coletânea abrangente, os principais e mais importantes testes comportamentais empregados em pesquisas pré-clínicas experimentais. Mais do que listar aparelhos e sequências de passos, os capítulos dialogam com as bases neurobiológicas que justificam cada parâmetro observado, ajudando o leitor a entender o que realmente

está sendo medido, o que cada alteração comportamental pode significar e quais são os limites de interpretação de cada modelo.

Um aspecto que considero particularmente valioso é que este livro foi escrito por profissionais que efetivamente vivenciam estes modelos no cotidiano: mestrando e doutorando que atuam diretamente na condução dos experimentos, na coleta e análise de dados, na resolução dos problemas práticos que não aparecem nos métodos dos artigos. Os capítulos foram elaborados por pós-graduandos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará, sob orientação e discussão contínua, o que confere à obra um caráter profundamente aplicado, sem perder o rigor conceitual.

A aplicação de protocolos corretamente desenhados e executados tem duas consequências fundamentais. Em primeiro lugar, aumenta a exatidão e a confiabilidade dos experimentos, diminuindo o risco de viés e fortalecendo a robustez dos resultados. Em segundo, e não menos importante, garante melhores condições de bem-estar para os animais de laboratório. A padronização, nesse contexto, não é mera formalidade técnica: é também um compromisso ético. Procedimentos claros, tempos adequados, manejo cuidadoso e redução de estresse repercutem tanto na qualidade dos dados quanto na dignidade com que esses animais são tratados.

Este livro foi pensado para servir de base a todos aqueles que desejam aprender e aplicar testes comportamentais em roedores com maior segurança, precisão e consciência. Seja para o estudante de graduação que está tendo o primeiro contato com a pesquisa experimental, seja para o pós-graduando que precisa estruturar um projeto de mestrado ou doutorado, seja para o pesquisador que deseja revisar ou atualizar protocolos, a obra se propõe a ser uma referência prática, acessível e confiável.

Tive o prazer de organizar este livro e acompanhar o processo de construção de cada capítulo. Acredito que este trabalho coletivo reflete não apenas o empenho individual dos autores, mas também a maturidade científica de um programa de pós-graduação comprometido com a formação de pesquisadores críticos, éticos e tecnicamente preparados para a pesquisa pré-clínica.

Por fim, é essencial registrar a quem este livro é, de forma muito especial, dedicado: aos animais de laboratório. São eles que, silenciosamente, permitem que

avancemos na compreensão de doenças, na avaliação de novos tratamentos e na busca por intervenções mais eficazes e seguras. Reconhecer essa contribuição é reafirmar nosso dever de zelar por seu bem-estar, de minimizar seu sofrimento e de justificar, com seriedade e responsabilidade, cada procedimento realizado.

Que esta obra possa orientar, inspirar e fortalecer a prática da pesquisa pré-clínica em nosso meio, contribuindo para experimentos mais padronizados, reproduutíveis, éticos e cientificamente relevantes.

Fortaleza, 2025

Gislei Frota Aragão

SUMÁRIO

CAPÍTULO I. TESTE DE ESQUIVA PASSIVA: FUNDAMENTOS, MÉTODOS E APLICAÇÕES.....	16
RESUMO	16
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. PROTOCOLOS.....	17
3. BASES NEUROBIOLÓGICAS.....	20
4. APLICAÇÃO CLÍNICAS.....	23
5. LIMITES E DESAFIOS.....	24
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
REFERÊNCIAS.....	24
CAPÍTULO II. ASPECTOS NEUROFISIOLÓGICOS DO MODELO COMPORTAMENTAL CLÁSSICO PAVLOVIANO E AS CONTRIBUIÇÕES PARA A DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS.....	29
RESUMO	29
ABSTRACT	29
1. INTRODUÇÃO.....	30
2. FUNDAMENTOS DO TESTE DE CONDICIONAMENTO CLÁSSICO PAVLOVIANO (CCP)	31
3. BASES NEUROANATÔMICAS DO TESTE.....	33
4. BASES NEUROQUÍMICAS DO TESTE.....	35
5. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS.....	38
6. LIMITES E DESAFIOS METODOLÓGICOS	40
REFERÊNCIAS.....	40
CAPÍTULO III. TESTE DO NADO FORÇADO: RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS, NEUROBIOLOGIA E LIMITAÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS.....	46
RESUMO	46
ABSTRACT	46
1. INTRODUÇÃO.....	47
2. DESCRIÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DO TESTE DO NADO FORÇADO EM RATOS	49
3. PROCEDIMENTO.....	49
4. TESTE DO NADO FORÇADO	49
5. AVALIAÇÃO DE FÁRMACOS POR MEIO DO MODELO	50
6. FINALIZAÇÃO	51
7. RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E NEUROBIOLOGIA.....	51
8. LIMITAÇÕES CIENTÍFICAS	54
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES FUTURAS.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
CAPÍTULO IV. VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS (USVS) EM MODELOS DE TRANSTORNOS DO NEURODESENVOLVIMENTO: MECANISMOS E APLICAÇÕES.....	58
RESUMO	58

ABSTRACT	59
1. INTRODUÇÃO.....	59
2. BASES NEUROBIOLÓGICAS DAS USVS NO NEURODESENVOLVIMENTO	60
3. MODELOS ANIMAIS DE TRANSTORNOS DO NEURODESENVOLVIMENTO	61
4. METODOLOGIA PARA ESTUDO DE USVS EM NEURODESENVOLVIMENTO	62
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
AGRADECIMENTOS.....	64
REFERÊNCIAS.....	64

CAPÍTULO V. CAIXA DE SKINNER: DESENVOLVIMENTO DO CONDICIONAMENTO OPERANTE E AS APLICAÇÕES CLÍNICAS ATUAIS	68
RESUMO	68
ABSTRACT	68
1. DOGMAS CENTRAIS DE SKINNER	69
2. CAIXA DE SKINNER.....	70
3. BASES NEUROANATÔMICAS E NEUROQUÍMICAS	71
4. INFLUÊNCIA DA NEUROPLASTICIDADE	73
5. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS.....	74
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS, LIMITES E DESAFIOS PARA ABORDAGEM	76
REFERÊNCIAS.....	78

CAPÍTULO VI. TESTE DE CAMPO ABERTO: AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL EM ROEDORES	81
RESUMO	81
ABSTRACT	81
1. INTRODUÇÃO.....	82
2. PROTOCOLO DO TESTE	82
3. BASE NEUROANATÔMICA E NEUROQUÍMICA.....	84
4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS.....	85
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS, LIMITES E DESAFIOS METODOLÓGICOS	86
REFERÊNCIAS.....	86

CAPÍTULO VII. ABORDAGEM NEUROFUNCIONAL E TRANSLACIONAL DO TESTE DE ESQUIVA ATIVA EM MODELOS COMPORTAMENTAIS.....	90
RESUMO	90
ABSTRACT	90
1. INTRODUÇÃO.....	91
2. FUNDAMENTOS E PROTOCOLOS DO TESTE DE ESQUIVA ATIVA.....	93
3. BASES NEUROANATÔMICAS E NEUROQUÍMICAS DO TESTE DE ESQUIVA ATIVA	98
4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS	100
5. LIMITAÇÕES E DESAFIOS METODOLÓGICOS	101
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	102
REFERÊNCIAS.....	102

CAPÍTULO VIII. O MODELO DE KINDLING NA PESQUISA PRÉ-CLÍNICA EM EPILEPSIA: APLICAÇÕES, LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	105
RESUMO	105
ABSTRACT	105
1. INTRODUÇÃO.....	106
2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	107
3. BASES NEUROLÓGICAS DO KINDLING.....	108
4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS.....	109
5. LIMITAÇÕES E DESAFIOS METODOLÓGICOS.....	111
REFERÊNCIAS.....	112
CAPÍTULO IX. TESTE DE CONVULSÃO INDUZIDA POR AGENTES QUÍMICOS	114
RESUMO	114
ABSTRACT	114
1. INTRODUÇÃO.....	115
2. PROTOCOLOS PADRONIZADOS	116
3. BASES NEUROANATÔMICAS E NEUROQUÍMICAS DAS CRISES CONVULSIVAS E DA EPILEPSIA.....	117
4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS.....	118
5. LIMITAÇÕES E DESAFIOS METODOLÓGICOS.....	119
REFERÊNCIAS.....	120
CAPÍTULO X. O TESTE DO ROTA-ROD EM ANIMAIS.....	123
RESUMO	123
ABSTRACT	123
1. INTRODUÇÃO.....	124
2. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	124
3. METODOLOGIA DO TESTE	127
4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	128
5. PARÂMETROS AVALIADOS	129
6. APLICAÇÕES EM PESQUISAS.....	129
7. VANTAGENS E LIMITAÇÕES.....	130
8. CONSIDERAÇÕES GERAIS	130
REFERÊNCIAS.....	131
CAPÍTULO XI. COMO MEDIR O PRAZER? ASPECTOS NEUROBIOLÓGICOS DO TESTE DE ANEDONIA EM ANIMAIS.....	133
RESUMO	133
ABSTRACT	133
1. INTRODUÇÃO.....	134
2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL DO TESTE DE PREFERÊNCIA POR SACAROSE (TPS).....	135
3. BASE NEUROANATÔMICA E NEUROQUÍMICA DO TESTE DE PREFERÊNCIA POR SACAROSE	137
4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS DO TESTE DE PREFERÊNCIA POR SACAROSE	140
5. LIMITES E DESAFIOS METODOLÓGICOS	140
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	141
REFERÊNCIAS.....	141

CAPÍTULO XII. ASPECTOS NEUROFISIOLÓGICOS E TRANSLACIONAIS DO TESTE DE PLACA QUENTE EM MODELOS ANIMAIS DE NOCICEPÇÃO	144
RESUMO	144
ABSTRACT	144
1. INTRODUÇÃO.....	145
2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL DO TESTE DE PLACA QUENTE	145
3. BASE NEUROANATÔMICA E NEUROQUÍMICA DO TESTE DE PLACA QUENTE	147
4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS DO TESTE DE PLACA QUENTE	151
5. LIMITES E DESAFIOS METODOLÓGICOS	152
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	153
REFERÊNCIAS.....	153
CAPÍTULO XIII. BASES NEUROBIOLÓGICAS DO TESTE DE HABITUAÇÃO/DESABITUAÇÃO OLFATIVA EM ROEDORES.....	158
RESUMO	158
ABSTRACT	158
1. INTRODUÇÃO.....	159
2. TESTE DE HABITUAÇÃO/DESABITUAÇÃO OLFATIVA	160
3. BASES NEUROBIOLÓGICAS DO TESTE DE HABITUAÇÃO/DESABITUAÇÃO OLFATIVA.....	162
4. LIMITAÇÕES.....	164
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	164
REFERÊNCIAS.....	164
CAPÍTULO XIV. TESTE DAS TRÊS CÂMARAS: DESENVOLVIMENTO, ATUALIZAÇÕES, E APLICAÇÕES EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE AUTISMO	167
RESUMO	167
ABSTRACT	167
1. INTRODUÇÃO.....	168
2. PROTOCOLO TESTE DAS TRÊS CÂMARAS	169
3. BASES NEUROANATÔMICA E NEUROQUÍMICA.....	171
4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS.....	175
5. LIMITES E DESAFIOS METODOLÓGICOS	176
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	177
REFERÊNCIAS.....	178
CAPÍTULO XV. MODELO DE DEPRESSÃO CONSEQUENTE AO ESTRESSE GESTACIONAL INDUZIDO POR CORTICOSTERONA EM CAMUNDONGOS.....	183
RESUMO	183
ABSTRACT	183
1. INTRODUÇÃO.....	184
2. MODELO EXPERIMENTAL.....	185
3. BASES NEUROANATÔMICA E NEUROQUÍMICA.....	186
4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS.....	187
5. LIMITES E DESAFIOS METODOLÓGICOS	188
REFERÊNCIAS.....	189

CAPÍTULO XVI. TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO: BASES NEUROBIOLÓGICAS.....	191
RESUMO	191
ABSTRACT	191
1. INTRODUÇÃO.....	192
2. PROTOCOLO DO TESTE	193
3. BASE NEUROANATÔMICA E NEUROQUÍMICA.....	196
4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS.....	198
5. LIMITES E DESAFIOS METODOLÓGICOS	199
REFERÊNCIAS.....	200
CAPÍTULO XVII. TESTE DE SUSPENSÃO DE CAUDA: MODELO COMPORTAMENTAL EM MURINOS	203
RESUMO	203
ABSTRACT	203
1. INTRODUÇÃO.....	204
2. O TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA (TST)	205
3. BASES NEUROBIOLÓGICAS DO TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA.....	208
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	209
REFERÊNCIAS.....	210
CAPÍTULO XVIII. ASPECTOS NEUROBIOLÓGICOS E TRANSLACIONAIS DO TESTE DE MARBLE BURYING EM MODELOS COMPORTAMENTAIS.....	213
RESUMO	213
ABSTRACT	213
1. INTRODUÇÃO.....	214
2. PROTOCOLO E FUNDAMENTOS DO TESTE DE <i>MARBLE BURYING</i>	216
3. BASES NEUROANATÔMICAS E NEUROQUÍMICAS DO TESTE DE <i>MARBLE BURYING</i>	220
4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS DO TESTE DE <i>MARBLE BURYING</i>	224
5. LIMITAÇÕES E DESAFIOS METODOLÓGICOS DO TESTE DE <i>MARBLE BURYING</i>	226
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	228
REFERÊNCIAS.....	228
CAPÍTULO XIX. BASES NEUROBIOLÓGICAS DO TESTE COMPORTAMENTAL DE PLACA PERFORADA (HOLE BOARD).....	231
RESUMO	231
ABSTRACT	231
1. INTRODUÇÃO.....	232
2. PROTOCOLOS DO TESTE.....	232
3. BASES NEUROANATÔMICAS E NEUROQUÍMICAS	234
4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS	236
5. LIMITAÇÕES E DESAFIOS METODOLÓGICOS	237
REFERÊNCIAS.....	238

CAPÍTULO XX. ASPECTOS NEUROFISIOLÓGICOS DO TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS.....	240
RESUMO	240
ABSTRACT	240
1. INTRODUÇÃO.....	241
2. MODELO EXPERIMENTAL.....	241
3. BASES NEUROANATÔMICAS E NEUROQUÍMICAS DO TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS.....	243
4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS.....	245
5. LIMITES E DESAFIOS METODOLÓGICOS	246
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	247
REFERÊNCIAS.....	247
CAPÍTULO XXI. TESTE DE INDUÇÃO DE CATATONIA COM ANTIPSICÓTICOS EM ROEDORES.....	250
RESUMO	250
ABSTRACT	250
1. INTRODUÇÃO.....	251
2. MODELOS EXPERIMENTAIS	252
3. BASES NEUROANATÔMICAS E NEUROQUÍMICAS	256
4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS.....	257
5. LIMITAÇÕES E DESAFIOS METODOLÓGICOS	257
AGRADECIMENTOS.....	258
REFERÊNCIAS.....	258
CAPÍTULO XXII. TESTE DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO: UM MODELO CLÁSSICO PARA AVALIAÇÃO DE ANALGÉSICOS E MECANISMOS DE DOR VISCERAL	261
RESUMO	261
ABSTRACT	261
1. INTRODUÇÃO.....	262
2. PROTOCOLO DO TESTE	263
3. BASE NEUROANATOMICA E NEUROQUÍMICA.....	265
4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS.....	266
5. LIMITES E DESAFIOS METODOLÓGICOS	267
REFERÊNCIAS.....	268

CAPÍTULO I

TESTE DE ESQUIVA PASSIVA: FUNDAMENTOS, MÉTODOS E APLICAÇÕES

PASSIVE AVOIDANCE TEST: FUNDAMENTALS, METHODS, AND APPLICATIONS

DOI: 10.51859/amplia.nat298.1126-1

Alice Brito Martins ¹
Alana de Freitas Pires ²

¹ Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

² Professora do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

RESUMO

O teste de esquiva passiva é um modelo amplamente utilizado em estudos comportamentais para investigar mecanismos de aprendizado aversivo. Baseia-se na inibição de um comportamento inato. Os principais protocolos incluem os paradigmas *step-through* e *step-down*, que permitem avaliar diferentes fases da memória, como aquisição, consolidação e evocação. A esquiva passiva envolve circuitos cerebrais como o tálamo, hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal. Diversos neurotransmissores participam da modulação dessa tarefa, como o glutamato, GABA, acetilcolina e dopamina. Esse teste tem aplicação translacional em modelos de aprendizado, neurotoxicidade, distúrbios como Alzheimer e estresse pós-traumático. Apesar de sua utilidade, apresenta limitações relacionadas à influência de fatores emocionais, variabilidade metodológica e restrições éticas. Ainda assim, quando bem controlado, representa uma ferramenta confiável para a investigação de processos cognitivos e emocionais.

Palavras-chave: Modelos animais. Memória aversiva. Bases neurobiológicas.

ABSTRACT

The passive avoidance test is a widely used model in behavioral studies to investigate mechanisms of aversive learning. It is based on the inhibition of an innate behavior. The main protocols include the step-through and step-down paradigms, which allow the evaluation of different memory phases, such as acquisition, consolidation, and retrieval. Passive avoidance involves brain circuits such as the thalamus, hippocampus, amygdala and prefrontal cortex. Several neurotransmitters participate in the modulation of this task, including glutamate, GABA, acetylcholine, and dopamine. This test has translational applications in models of learning, neurotoxicity, and disorders such as Alzheimer's disease and post-traumatic stress disorder. Despite its usefulness, it presents limitations related to the influence of emotional factors, methodological variability, and ethical constraints. Nevertheless, when properly controlled, it represents a reliable tool for investigating cognitive and emotional processes.

Keywords: Animal models. Aversive memory. Neurobiological bases.

1. INTRODUÇÃO

A esquiva passiva ou esquiva inibitória é um teste comportamental utilizado para avaliar a memória e o aprendizado emocional. Baseia-se em um paradigma de aprendizagem pavloviano, no qual um estímulo condicionado inicialmente neutro é associado a um estímulo não condicionado e aversivo, como choque elétrico e jato de ar (Ögren, Stiedl, 2010; Ghafarimoghadam *et al.*, 2022).

Diversos protocolos foram desenvolvidos ao longo do tempo com o objetivo de estudar os mecanismos de aprendizagem e memória. O teste de esquiva passiva envolve apenas inibir um comportamento, o que difere do teste esquiva ativa que exige que o animal realize uma ação para evitar o choque (Ghafarimoghadam *et al.*, 2022). A esquiva passiva surgiu durante o período de consolidação das teorias de condicionamento na psicologia comportamental. Em 1967 Jarvik e Kopp adaptaram o teste, estabelecendo o protocolo que se tornou o mais amplamente utilizado até os dias atuais para a esquiva passiva (Ögren, Stiedl, 2010; LeDoux *et al.*, 2017; D'Isa *et al.*, 2023).

2. PROTOCOLOS

O teste de esquiva passiva pode ser utilizado em diferentes modelos animais e tipos de estímulos aversivos, com protocolos que variam em duração, sendo aplicáveis tanto em paradigmas de curto quanto de longo prazo. O princípio do teste é baseado na instintiva preferência por ambientes escuros (*Step-Through*) e exploração (*Step-Down*), essa ação inata é fundamental para o teste, pois vai induzir o comportamento espontâneo que será punido, levando à inibição do comportamento, evidenciando memória contextual e aversiva (Ghafarimoghadam *et al.*, 2022).

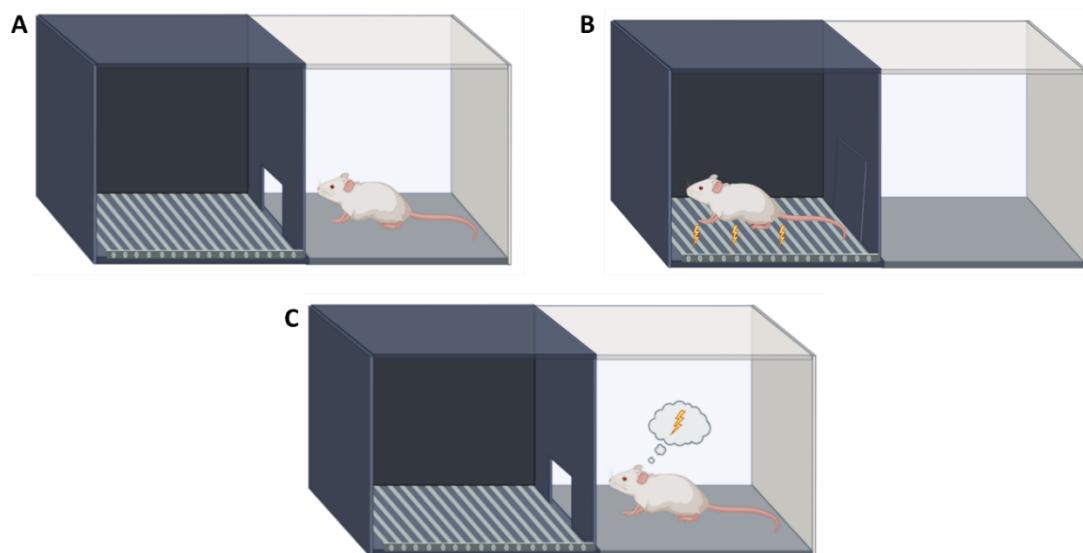
2.1. TESTE EM ROEDORES

Em roedores há estudos com camundongos (Singh *et al.*, 2024), ratos (Kokova, Apostolova 2023) e esquilos da Mongólia (Silveira *et al.*, 2018). Na *Step-Through*, primeiro é realizada a sessão de aprendizagem onde o roedor é colocado no compartimento claro. Após um tempo fixo (pode variar entre 5s), a porta é aberta, e o tempo até o animal entrar completamente na caixa escura, chamado latência (100s), é mensurado. O animal que não passar para o compartimento escuro deve ser descartado do teste. Após, o roedor entrar completamente com as quatro patas no compartimento escuro, a porta é fechada e lhe é aplicado um choque elétrico leve (Figura 1A). O animal é mantido por pelo menos 15 - 20s no compartimento escuro antes de ser removido, para

consolidar a associação entre o local e o estímulo aversivo. Esta fase é denominada sessão de aprendizagem, que é repetida até que o roedor entenda que ao passar para o compartimento escuro levará um choque (Paing *et al.*, 2024) (Figura 1B).

Posteriormente, é realizado o Teste de Recuperação de Memória, que é um teste de tentativa única, na qual o roedor é colocado no compartimento claro, e a porta é aberta após 20s. Analisa-se o tempo de latência de passagem (tempo para entrar no compartimento escuro), por até 300s, bem como, em alguns protocolos, o tempo total de permanência no compartilhamento escuro. Não é necessário o uso de choque nessa etapa do teste (Figura 1C) (Paing *et al.*, 2024; Ghafarimoghadam *et al.*, 2022; Vafaei *et al.*, 2024).

Figura 1- Representação esquemática do protocolo de *Step-Through* em roedores



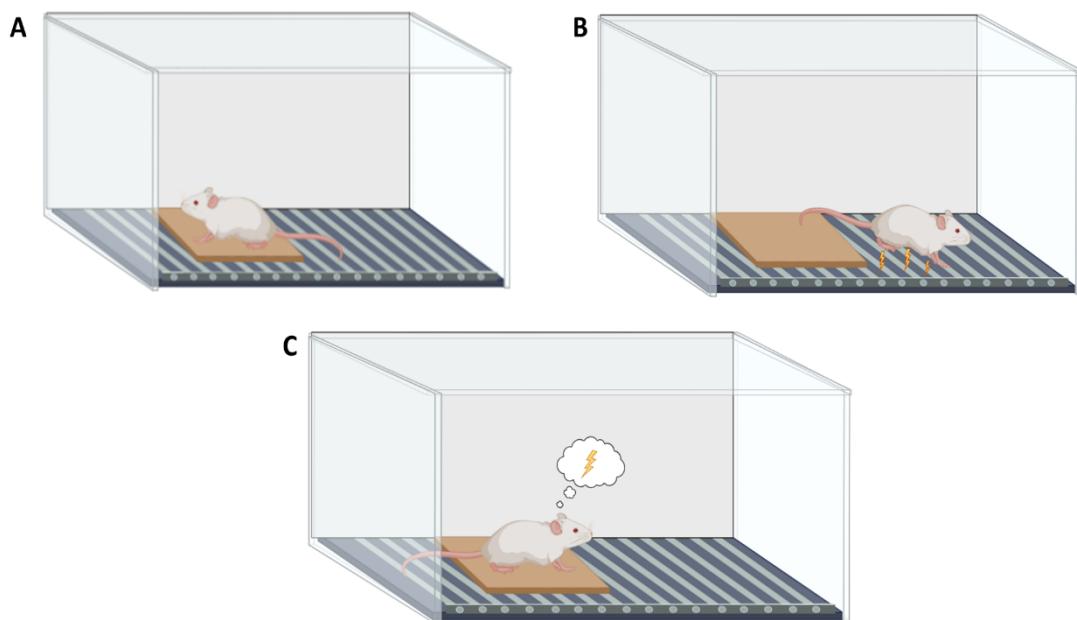
Fonte: Autoria própria feita pelo Biorender, 2025. Legenda: (A) O roedor é colocado inicialmente no compartimento claro. (B) Ao entrar no compartimento escuro, o roedor recebe um estímulo aversivo (choque leve nas patas). (C) Teste de Recuperação de Memória, o roedor é novamente colocado no compartimento claro, o tempo que ele demora para entrar no compartimento escuro (latência de entrada) é registrado como medida de memória aversiva.

Outro estímulo aversivo que pode ser utilizado é o jato de ar, quando a sensibilidade do animal está alterada, como em alguns modelos de dor neuropática e inflamatória crônica, e o estímulo de choque pode não ser o mais adequado. Diante disso, o protocolo segue o mesmo princípio e etapas do compartimento claro e escuro, porém ao roedor passar completamente para o compartimento escuro e ficar de frente para a parede oposta à porta, é liberado um único e breve jato de ar (por aproximadamente 1s) (Moriarty *et al.*, 2012).

Outro protocolo utilizado é o *Step-Down*, que é o teste de inibição por degrau, cujo equipamento consiste em uma caixa com piso de grade que emite choques e uma plataforma elevada central. Primeiro é realizado sessão de aprendizagem onde o animal é colocado na

plataforma central, e quando o roedor desce da plataforma com as quatro patas no chão recebe um choque (Paing *et al.*, 2024; Ghafarimoghadam *et al.*, 2022) (Figura 2). Após a aprendizagem é realizado o Teste de Recuperação de Memória, na qual os animais são novamente posicionados sobre a plataforma, desta vez sem a necessidade da aplicação de choque. O teste é considerado concluído quando o animal desce na plataforma ou se ocorrer a retenção da memória aversiva ele permanecerá na plataforma (com um tempo máximo de 300 s) (Paing *et al.*, 2024; Ghafarimoghadam *et al.*, 2022).

Figura 2- Representação esquemática do protocolo de *Step-Down* em roedores



Fonte: Autoria própria feita pelo Biorender, 2025. Legenda: (A) O roedor é colocado inicialmente na plataforma isolada do choque. (B) Ao descer completamente da plataforma, o roedor recebe um estímulo aversivo (choque leve nas patas). (C) Teste de Recuperação de Memória, o roedor é novamente colocado na plataforma, o tempo que ele demora para descer (latência de entrada) é registrado como medida de memória aversiva.

Há variações metodológicas no estímulo aversivo, na intensidade do choque e no tempo de aplicação. Em alguns estudos, o teste é analisado em 1 hora, e em outros, o prazo dos testes podem chegar até 16 dias (Nagy *et al.*, 1977) (Tabela 1). A habituação antes de iniciar a aprendizagem também pode variar. Em alguns trabalhos, o animal não receberá nenhum choque e pode andar livremente entre os dois compartimentos (Jafari-Sabet *et al.*, 2018; Tabassum, Haider, 2018).

Tabela 1- Diferentes protocolos de esquiva-passiva

Modelo animal	Modelo de teste	Estímulo aversivo e tempo	Duração	Referências
Camundongo	<i>Step-Through</i>	Choque 0,4 mA, 60 Hz por 2s ou 0,3 mA, 60 Hz por 1s	1 dia	Lin <i>et al.</i> , 2021
	<i>Step-Through</i>	Choque 0,3 mA por 3s	1 dia	Paing <i>et al.</i> , 2024
	<i>Step-Down</i>	Choque 0,4 mA por 9s	1, 2 e 3 dias	Paing et al., 2024
	<i>Step-Through</i>	Choque 2 mA por 2s ou 3s	1, 4, 8 e 16 dias	Nagy <i>et al.</i> , 1977
Rato	<i>Step-Through</i>	Choque 0,5 mA, 50 Hz por 2s	1, 4 e 7 dias	HosseiniMardi <i>et al.</i> , 2020
	<i>Step-Through</i>	Jato de ar	1 dia	Moriarty <i>et al.</i> , 2012
	<i>Step-Through</i>	Choque 25 V, 3 mA por 3s	1h e 1 dia	Tabassum, Haider, 2018
	<i>Step-Down</i>	Choque 0,4 mA por 10s	3 e 7 dias	Kokova, Apostolova, 2023

Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: Miliamperes(mA); Hertz (Hz); Segundos(s); Horas (h).

2.2. TESTE EM ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

O zebrafish vem sendo uma alternativa ao uso dos roedores devido a algumas vantagens como sua similaridade genética com humanos, alta reprodutibilidade, baixo custo e embriões e larvas transparentes (Tan *et al.*, 2022).

Alguns estudos utilizam o zebrafish, com o mesmo princípio do protocolo dos roedores, na qual o peixe fica em um aquário dividido em zona clara e zona escura, por uma porta deslizante vertical, quando o peixe passa para a lado escuro a porta é fechada e ele leva um choque de $3 \pm 0,2$ V por cinco segundos (Nabinger *et al.*, 2021). Existem outros protocolos com diferentes estímulos aversivos na parte escura como um peso jogado no aquário (Bernardi, Dias, Barbosa, 2013) e movimentação da água utilizando um agitador rotativo (Rajesh *et al.*, 2018). Por ser um teste de tentativa única, assim como os roedores, a latência para entrar no compartimento escuro é considerada a retenção da memória (Tan, *et al.*, 2022).

3. BASES NEUROBIOLÓGICAS

O comportamento de esquiva passiva envolve a supressão condicionada de uma ação diante de um estímulo previamente associado a uma consequência aversiva (Ögren, Stiedl, 2010). Esse tipo de resposta depende da formação de memória, que envolve diferentes etapas interdependentes, incluindo a codificação (processo pelo qual as informações recebidas são registradas e integradas), o armazenamento (manutenção dessas informações) e a recuperação

da memória (acesso e utilização das informações previamente armazenadas) (Ghafarimoghadam *et al.*, 2022).

Os animais apresentam uma tendência natural de explorar ambientes novos e de buscar locais escuros, considerados mais seguros. No protocolo clássico de esquiva passiva, o animal é colocado em uma caixa com dois compartimentos (um claro e outro escuro), ele instintivamente, tende a ir para o compartimento escuro. No entanto, ao receber um estímulo aversivo nesse ambiente, o animal aprende a associá-lo a uma consequência negativa. Esse processo envolve a formação e o armazenamento da memória aversiva. Assim, ao ser exposto novamente à mesma situação, o animal inibe seu comportamento instintivo de entrar no compartimento escuro, demonstrando aprendizado e evocação da memória adquirida (Ögren, Stiedl, 2010; Ghafarimoghadam *et al.*, 2022)

Para que isso ocorra requer a integração de informações sensoriais e contextuais por diferentes circuitos neurais, que processam a memória do medo. Diversas estruturas cerebrais participam desse processo, como o tálamo, amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal que atuam de forma coordenada na aquisição, consolidação e expressão da memória aversiva (Ögren, Stiedl, 2010; Flores *et al.*, 2017).

3.1. TÁLAMO

O tálamo é um importante estrutura no processamento de informações relacionadas ao aprendizado e à memória, especialmente por sua atuação como uma estação integradora e retransmissora de sinais sensoriais aversivos (Barsy *et al.*, 2020).

Essa estrutura do diencéfalo está conectada com o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal, formando circuitos que sustentam a formação, consolidação e recuperação da memória aversiva (Davoodi *et al.*, 2011). Um estudo utilizando lidocaína para inativar os núcleos anteriores do tálamo demonstrou que os núcleos anteroventral e anteromedial estão envolvidos na codificação de informações, impactando diretamente o desempenho no teste de esquiva passiva, já o anterodorsal não afeta nenhuma da etapa do teste (Safari *et al.*, 2020). A investigação do núcleo reuniens (RE) demonstrou que esta estrutura não é essencial para adquirir o comportamento contextual da esquiva passiva, mas é importante para consolidar a memória nas primeiras horas após o aprendizado e para recuperá-la na fase de teste (Davoodi *et al.*, 2011).

Khesmakh e colaboradores (2024) constataram que os receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) no núcleo mediodorsal do tálamo são moduladores cruciais na consolidação da memória em tarefas de esquiva passiva, especialmente em condições de déficit colinérgico induzido por escopolamina.

3.2. AMÍGDALA

A amígdala é considerada o principal *locus* onde memórias de medo são adquiridas e consolidadas, devido a seu papel na codificação e processamento de estímulos negativos dos sinais sensoriais. Os neurônios da amígdala central (CeA) e basolateral (BLA) participam ativamente na formação da memória aversiva (Orsini, Maren, 2012; Khakpoor *et al.*, 2021).

Durante o condicionamento de medo, estímulos aversivos e estímulos condicionados convergem nos núcleos da amígdala, levando a um refinamento sensorial de informações negativas através dessas estruturas (Plas *et al.*, 2024). Um estudo demonstrou que lesões na amígdala prejudicam o desempenho em testes de esquiva passiva, indicando que a amígdala é essencial para formar e reter memórias aversivas (Russo *et al.*, 1976).

No condicionamento do medo temos a ativação dos receptores de glutamato NMDA na BLA (HosseiniMardi *et al.*, 2020), sendo essencial na memória de evitação passiva, que pode ser inibido e modulado pelo receptor GABA-B (Khakpoor *et al.*, 2021). Além disso, a dopamina liberada na amígdala está ligada ao condicionamento e aprendizado do medo humano (Frick *et al.*, 2022), assim como em roedores, desde que a infusão de dopamina na amígdala de ratos corroborou com a consolidação da memória (Lalumiere, Nguyen, McGaugh, 2004).

3.3. HIPOCAMPO

O hipocampo tem a função na consolidação de memórias declarativas, no qual destaca-se o hipocampo dorsal que mapeia o ambiente por disparos das “células de lugar” (Roesler *et al.*, 2021). Estudos demonstram que danos ao hipocampo prejudicam o condicionamento ao medo (Broadbent, Clark 2013) e a memória aversiva, pois injeções nas regiões CA1 do hipocampo dorsal com antagonista e agonista de receptores NMDA de glutamato causou alterações na retenção da memória aversiva (Jafari-Sabet *et al.*, 2018). A utilização de um antagonista do receptor de peptídeo-3 aplicado sobre o giro dentado ventral do hipocampo ocasionou uma falha na retenção e consolidação da memória do medo em ratos (Vafaei *et al.*, 2024).

No hipocampo, à axônios colinérgicos distribuídos por diferentes regiões, provenientes da área septal medial, de modo que a acetilcolina (ACh) exerce um papel no aprendizado e na consolidação da memória, em grande parte por modular a excitabilidade neuronal e a plasticidade sináptica via receptores muscarínicos e nicotínicos (Hasselmo, 2006; Dobryakova *et al.*, 2025). Em um estudo que foi administrado por via intraperitoneal glicose e a colina que são precursores da síntese de Ach, demonstrou que ocorreu a melhora da retenção de latência no teste de esquiva passiva (Kopf, *et al.*, 2001).

3.4. CÓRTEX PRÉ-FRONTAL

O CórTEX Pré-frontal (CPF) é responsável pelo controle dos impulsos, realizando o controle inibitório, principalmente os neurônios piramidais (Li *et al.*, 2020). Além disso, o CPF está envolvido no sistema de recompensa, na aprendizagem e na memória (Sheynikhovich *et al.*, 2023).

A inibição dos receptores NMDA com o antagonista cetamina na região medial do córtex pré-frontal (mCPF) causou danos à memória, com latência do camundongo na esquiva passiva. Entretanto, os animais tratados com agonistas dopaminérgicos do receptor D1 e D2 melhoraram o tempo de latência, sugerindo que a dopamina no mPFC tem papel protetor na consolidação da memória (Farahmandfar *et al.*, 2016).

4. APLICAÇÃO CLÍNICAS

O teste de esquiva passiva tem aplicações clínicas indiretas, devido à avaliação da memória e aprendizagem (Chitakwa *et al.*, 2025). O teste é utilizado para investigação pré-clínica dos efeitos de fármacos (Padhy *et al.*, 2025) e das alterações comportamentais associadas a doenças neurológicas e psiquiátricas, como Alzheimer (Kaur *et al.*, 2025), e transtorno pós-traumático (Koyuncuoğlu *et al.*, 2021).

De fato, para estudos de mimetização de alteração na memória no teste de esquiva passiva, são utilizados alguns fármacos empregados na clínica. Entre eles, destaca-se o donepezil e rivastigmina, usado no tratamento da doença de Alzheimer e de demências leves a moderadas, que atua como controle positivo no teste de esquiva passiva (Kruk-Slomka *et al.*, 2024). Por outro lado, medicamentos como a escopolamina e agonistas do receptor GABA são frequentemente utilizadas para induzir déficits de memória (Khesmakhhi *et al.*, 2024; Kruk-Slomka, Slomka, Biala, 2024) (Tabela 3).

Tabela 3 - Fármacos utilizados para o controle e indução de alteração na memória de esquiva passiva.

Medicamento	Classe	Efeito no teste	Referência
Escopolamina	Antagonista muscarínico	Prejudica consolidação e evocação da memória aversiva	Khesmakhhi <i>et al.</i> , 2024 Singh <i>et al.</i> , 2024
Diazepam Lorazepam Midazolam	Agonistas de GABA Benzodiazepínicos	Prejudica a aquisição e consolidação memória	Kokova, Apostolova 2023; Dickinson-Anson, McGaugh, 1993
MK-801 (Dizocilpina)	Antagonista não competitivo do receptor N-metil-[D]-aspartato (NMDA)	Diminui a consolidação da memória	Khakpoor <i>et al.</i> , 2021
Donepezil Rivastigmina	Inibidor da acetilcolinesterase	Melhora a memória	Singh <i>et al.</i> , 2024 Kruk-Slomka <i>et al.</i> , 2024

Fonte: Elaborado pelo autor

5. LIMITES E DESAFIOS

Devido à variabilidade de protocolos com parâmetros do choque (intensidade e duração), torna difícil a comparação entre os estudos. As reações comportamentais e o tempo de hesitação do roedor diante do estímulo elétrico podem variar de acordo com a intensidade da corrente aplicada, com a sensibilidade individual de cada animal experimental e a linhagem do animal. Além disso, é importante evitar a aplicação de choques muito intensos, pois podem induzir paralisia temporária ou congelamento, o que compromete a interpretação dos dados e levanta preocupações éticas quanto ao bem-estar animal (Ghafarimoghadam *et al.*, 2022; Ögren, Stiedl, 2010).

Um estudo comparou grupos de ratos para a consolidação da memória com número de repetições de treinamento diferentes, e constatou-se que 16 repetições foi prejudicial pois aumenta o cortisol, estresse oxidativo e diminui serotonina, levando a um estresse e afetando a consolidação de memória em ratos (Tabassum, Haider, 2018).

Assim como alguns outros testes de memória aversiva, a utilização de fármacos que possam interferir na atividade motora e a percepção da dor podem afetar o desempenho do teste (Sousa *et al.*, 2006; Ögren, Stiedl, 2010). Entretanto, o uso do jato de ar pode ser uma alternativa para animais com alteração na percepção da dor (Moriarty *et al.*, 2012).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O modelo de esquiva passiva é um teste para investigar os mecanismos neurais da memória aversiva, envolvendo estruturas como a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal. Seu protocolo permite estudar processos como aquisição e consolidação da memória aversiva, com 24 horas e até de longa duração como 16 dias. Além disso, é um teste ideal para estudo da memória, como no caso de doença de Alzheimer e outros transtornos. Apesar de apresentar limitações como qualquer teste comportamental, quando utilizado de forma criteriosa e integrado a outros testes, o modelo de esquiva passiva pode contribuir significativamente para a compreensão dos circuitos do medo, comportamento aversivo e memória.

REFERÊNCIAS

BARSY, B. et al. Associative and plastic thalamic signaling to the lateral amygdala controls fear behavior. **Nature Neuroscience**, v. 23, n. 5, p. 625–637, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0620-z>.

BERNARDI, M. M.; DIAS, S. G.; BARBOSA, V. E. Neurotoxicity of neem commercial formulation (*Azadirachta indica* A. Juss) in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology and**

Pharmacology, v. 36, n. 3, p. 1276–1282, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.10.002>.

BROADBENT, N. J.; CLARK, R. E. Remote context fear conditioning remains hippocampus-dependent irrespective of training protocol, training-surgery interval, lesion size, and lesion method. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 106, p. 300–308, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.08.008>.

CHITAKWA, N.; CHEN, N.; CHEN, C.; LI, Y.; WU, D. Prenatal sleep restriction altered learning ability and memory behaviour by decreasing hippocampal synaptic plasticity in offspring mice. **Sleep Medicine**, v. 131, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2025.106500>.

D'ISA, R.; GERLAI, R. Designing animal-friendly behavioral tests for neuroscience research: The importance of an ethological approach. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 16, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.1090248>.

DAVOODI, F. G.; MOTAMEDI, F.; AKBARI, E.; GHANBARIAN, E.; JILA, B. Effect of reversible inactivation of reunions nucleus on memory processing in passive avoidance task. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 1, p. 1–6, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.02.020>.

DICKINSON-ANSON, H.; MCGAUGH, J. L. Midazolam administered into the amygdala impairs retention of an inhibitory avoidance task. **Behavioral and Neural Biology**, v. 60, n. 1, p. 84–87, 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0163-1047\(93\)90781-C](https://doi.org/10.1016/0163-1047(93)90781-C).

DOBRYAKOVA, Y. V.; BOLSHAKOV, A. P.; KOROTKOVA, T.; ROZOV, A. V. Acetylcholine in the hippocampus: problems and achievements. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 19, p. 1491820, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fncir.2025.1491820>

FARAHMANDFAR, M.; BAKHTAZAD, A.; AKBARABADI, A.; ZARRINDAST, M. R. The influence of dopaminergic system in medial prefrontal cortex on ketamine-induced amnesia in passive avoidance task in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 781, p. 45–52, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.03.060>.

FLORES, Á.; FULLANA, M. À.; SORIANO-MAS, C.; ANDERO, R. Lost in translation: how to upgrade fear memory research. **Molecular Psychiatry**, v. 23, n. 11, p. 2122–2132, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41380-017-0006-0>.

FRICK, A.; BJÖRKSTRAND, J.; LUBBERINK, M.; ERIKSSON, A.; FREDRIKSON, M., & ÅHS, F. Dopamine and fear memory formation in the human amygdala. **Molecular Psychiatry**, v. 27, p. 1704–1711, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01400-x>.

GHAFARIMOGHADAM, M.; MASHAYEKH, R.; GHOLAMI, M.; FEREYDANI, P.; SHELLEY-TREMBLAY, J.; KANDEZI, N.; SABOURI, E.; MOTAGHINEJAD, M. A review of behavioral methods for the evaluation of cognitive performance in animal models: Current techniques and links to human cognition. **Physiology & Behavior**, v. 244, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113652>.

HASSELMO, M. E. The role of acetylcholine in learning and memory. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 16, n. 6, p. 710–715, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.09.002>

HOSSEINMARDI, F.; KERMANI, M.; TALEBI, H.; RAHIMI, S.; SHABANI, M. Effects of $\beta 1$ -adrenoceptors in the basolateral amygdala on spatial memory, passive avoidance, long-term

potentiation and neuronal arborization in the hippocampal CA1 region in response to unavoidable stress. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020190113>.

JAFARI-SABET, M.; MOFIDI, H.; ATTARIAN-KHOSROSHAH, M. S.; NMDA receptors in the dorsal hippocampal area are involved in tramadol state-dependent memory of passive avoidance learning in mice. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 96, n. 1, p. 45–50, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjpp-2017-0228>.

KAUR, A.; KAUR, S.; KHURANA, N.; DHAWAN, R. K.; SINGH, S.; SINGH, M.; MANNAN, A.; MAHMOUD, M. H.; ALEXIOU, A.; PAPADAKIS, M.; BATIHA, G. E. S.; SINGH, T. G. Synergistic approach of alpha-Asarone (α -asarone) with donepezil in mitigating Alzheimer's disease induced by Aluminium chloride in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 129, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2025.106847>.

KHAKPOOR, M.; VASEGHI, S.; MOHAMMADI-MAHDIABADI-HASANI, M. H.; NASEHI, M. The effect of GABA-B receptors in the basolateral amygdala on passive avoidance memory impairment induced by MK-801 in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 409, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113313>.

KHESMAKHI, M. V.; SALIMI, Z.; POURMOTABBED, A.; MORADPOUR, F.; REZAYOF, A.; NEDAEI, S. E. The role of glutamate NMDA receptors of the mediodorsal thalamus in scopolamine-induced amnesia in rats. **Neuroscience Letters**, v. 820, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2023.137595>.

KOKOVA, V.; APOSTOLOVA, E. Effect of Etifoxine on locomotor activity and passive learning in rats with diazepam-induced cognitive deficit. **Scientia Pharmaceutica**, v. 91, n. 2, p. 25, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/scipharm91020025>.

KOPF, S. R.; BUCHHOLZER, M. L.; HILGERT, M.; LÖFFELHOLZ, K.; KLEIN, J. Glucose plus choline improve passive avoidance behaviour and increase hippocampal acetylcholine release in mice. **Neuroscience**, v. 103, n. 2, p. 365–371, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00007-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00007-0)

KOYUNCUOĞLU, T.; SEVİM, H.; ÇETREZ, N.; MERAL, Z.; GÖNENÇ, B.; KUNTSAL DERTSİZ, E.; AKAKIN, D.; YÜKSEL, M.; KASIMAY ÇAKIR, Ö. High intensity interval training protects from Post Traumatic Stress Disorder induced cognitive impairment. **Behavioural Brain Research**, v. 397, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112923>.

KRUK-SLOMKA, M.; SLOMKA, T.; BIALA, G. The influence of an acute administration of cannabidiol or rivastigmine, alone and in combination, on scopolamine-provoked memory impairment in the passive avoidance test in mice. **Pharmaceuticals** (Basel, Switzerland), v. 17, n. 6, p. 809, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph17060809>

LALUMIERE, R. T.; NGUYEN, L. T.; MCGAUGH, J. L. Post-training intrabasolateral amygdala infusions of dopamine modulate consolidation of inhibitory avoidance memory: involvement of noradrenergic and cholinergic systems. **The European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 10, p. 2804–2810, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03744.x>.

LEDOUX, J. E.; MOSCARELLO, J.; SEARS, R.; CAMPESE, V. The birth, death and resurrection of avoidance: a reconceptualization of a troubled paradigm. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n. 1, p. 24–36, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/mp.2016.166>.

LI, B.; NGUYEN, T. P.; MA, C.; DAN, Y. Inhibition of impulsive action by projection-defined prefrontal pyramidal neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 29, p. 17278–17287, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2000523117>.

LIN, Y. H.; YAMAHASHI, Y.; KURODA, K.; FARUK, M. O.; ZHANG, X.; YAMADA, K.; YAMANAKA, A.; NAGAI, T.; KAIBUCHI, K. Accumbal D2R-medium spiny neurons regulate aversive behaviors through PKA-Rap1 pathway. **Neurochemistry International**, v. 143, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104935>.

MORIARTY, O.; ROCHE, M.; MCGUIRE, B. E.; FINN, D. P. Validation of an air-puff passive-avoidance paradigm for assessment of aversive learning and memory in rat models of chronic pain. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 204, n. 1, p. 1–8, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.10.024>.

NABINGER, D. D.; ALTENHOFEN, S.; PEIXOTO, J. V.; DA SILVA, J. M. K.; BONAN, C. D. Long-lasting behavioral effects of quinpirole exposure on zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 88, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2021.107034>.

ÖGREN, S. O.; STIEDL, O. Passive avoidance. In: STOLERMAN, I. P. (ed.). **Encyclopedia of Psychopharmacology**. Berlin: Springer, 2010. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-540-68706-1_160.

ORSINI, C. A.; MAREN, S. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 7, p. 1773–1802, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.12.014>.

PADHY, D. S.; VESMAKER, K.; BANERJEE, S. Neuroprotective potential of tranilast in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease model targeting TXNIP-NLRP3 inflammasome pathway. **International Immunopharmacology**, v. 156, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2025.114691>.

PAING, Y. M. M.; EOM, Y.; SONG, G. B.; KIM, B.; CHOI, M. G.; HONG, S.; LEE, S. H. Neurotoxic effects of polystyrene nanoplastics on memory and microglial activation: Insights from in vivo and in vitro studies. **Science of the Total Environment**, v. 924, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171681>.

PLAS, S. L.; TUNA, T.; BAYER, H.; JULIANO, V. A. L.; SWECK, S. O.; ARELLANO PEREZ, A. D.; HASSELL, J. E.; MAREN, S. Neural circuits for the adaptive regulation of fear and extinction memory. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 18, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2024.1352797>.

RAJESH, V.; MRIDHULMOHAN, M.; JAYASEELAN, S.; SIVAKUMAR, P.; GANESAN, V. Mefenamic acid attenuates chronic alcohol induced cognitive impairment in zebrafish: Possible role of cholinergic pathway. **Neurochemical Research**, v. 43, n. 7, p. 1392–1404, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2554-3>.

ROESLER, R.; PARENT, M. B.; LALUMIERE, R. T.; MCINTYRE, C. K. Amygdala-hippocampal interactions in synaptic plasticity and memory formation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 184, p., 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2021.107490>.

RUSSO, N. J.; KAPP, B. S.; HOLMQUIST, B. K.; MUSTY, R. E. Passive avoidance and amygdala lesions: relationship with pituitary-adrenal system. **Physiology & Behavior**, v. 16, n. 2, p. 191–198, 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(76\)90304-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(76)90304-8).

SAFARI, V.; NATEGH, M.; DARGAHI, L.; ZIBAII, M. E.; KHODAGHOLI, F.; RAFIEI, S.; KHATAMI, L.; MOTAMED, F. Individual subnuclei of the rat anterior thalamic nuclei differently affect spatial memory and passive avoidance tasks. **Neuroscience**, v. 444, p. 19–32, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.07.046>.

SHEYNIKHOVICH, D.; OTANI, S.; BAI, J.; ARLEO, A. Long-term memory, synaptic plasticity and dopamine in rodent medial prefrontal cortex: Role in executive functions. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 16, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.1068271>.

SILVEIRA, A. P. C.; KITABATAKE, T. T.; PANTALEO, V. M.; ZANGROSSI, H., JÚNIOR; BERTOLINO, G.; DE OLIVEIRA GUIRRO, E. C.; DE SOUZA, H. C. D.; DE ARAUJO, J. E. Continuous and not continuous 2-week treadmill training enhances the performance in the passive avoidance test in ischemic gerbils. **Neuroscience Letters**, v. 665, p. 170–175, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.12.012>.

SINGH, K.; MURTI, Y.; SHARMA, A. K.; DHARAMVEER; VED, A.; YADAV, S.; KULSHRESHTHA, M. Pharmacological investigation of Achras sapota against scopolamine induce amnesia and cognitive impairment in laboratory animals. **Toxicology Reports**, v. 13, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2024.101813>.

SOUSA, N.; ALMEIDA, O. F.; WOTJAK, C. T. A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. **Genes, Brain and Behavior**, v. 5, suppl. 2, p. 5–24, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00228.x>.

TABASSUM, S.; HAIDER, S. Extensive but not limited repeated trials in passive avoidance task induce stress-like symptoms and affect memory function in rats. **Neuroscience**, v. 371, p. 495–505, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.12.022>.

TAN, J. K.; NAZAR, F. H.; MAKPOL, S.; TEOH, S. L. Zebrafish: A pharmacological model for learning and memory research. **Molecules**, v. 27, n. 21, p. 7374, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27217374>.

VAFAEI, Z.; KHODAGHOLI, F.; NATEGH, M.; NIKSERESHT, S.; HASHEMIRAD, S. R.; RAISE-ABDULLAHI, P.; VAFAEI, A. A.; MOTAMED, F. Involvement of relaxin-family peptide-3 receptor (RXFP3) in the ventral dentate gyrus of the hippocampus in spatial and fear memory in rats. **Peptides**, v. 178, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2024.171244>.

CAPÍTULO II

ASPECTOS NEUROFISIOLÓGICOS DO MODELO COMPORTAMENTAL CLÁSSICO PAVLOVIANO E AS CONTRIBUIÇÕES PARA A DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS

NEUROPHYSIOLOGICAL ASPECTS OF THE CLASSICAL PAVLOVIAN BEHAVIORAL MODEL AND CONTRIBUTIONS TO DRUG DISCOVERY

DOI: 10.51859/amplla.nat298.1126-2

André Nogueira Cardeal dos Santos ¹
João Henrique Andrade de Menezes ²
Marcus Vinícius Vieira Torquato ²
Cecilia Bessa Freitas ²
Savyo Mikael Lacerda Gomes ³
Andrelina Noronha Coelho de Souza ⁴

¹ Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará – Brasil.

² Granduando em Medicina da Universidade Estadual do Ceará – Brasil.

³ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará – Brasil.

⁴ Professora do Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará – ISCB/UECE – Brasil.

RESUMO

Este capítulo apresenta uma síntese das bases neurobiológicas e fisiológicas do Condicionamento Clássico Pavloviano. Inicialmente, revisa-se a trajetória científica de Ivan P. Pavlov e sua contribuição para a sistematização do paradigma experimental que fundamenta o estudo da aprendizagem associativa. Em seguida, são descritos os elementos centrais do modelo, estímulos e respostas condicionados e incondicionados, bem como os principais circuitos neurais implicados na formação e expressão dessas associações. Destacam-se os papéis específicos de estruturas como a amígdala, hipocampo, córtex pré-frontal, núcleo *accumbens* e hipotálamo, bem como os mecanismos neuroquímicos subjacentes, envolvendo neurotransmissores como glutamato, dopamina, serotonina e GABA. Por fim, o capítulo discute como esses processos integrados sustentam a plasticidade sináptica, a

modulação motivacional e o controle autonômico característicos do condicionamento clássico.

Palavras-chave: Condicionamento Clássico. Neurofisiologia do Comportamento. Modelos Experimentais. Bases Biológicas do Comportamento. Aprendizagem Associativa.

ABSTRACT

This chapter presents a synthesis of the neurobiological and physiological foundations of Pavlovian Classical Conditioning. It begins by reviewing the scientific trajectory of Ivan P. Pavlov and his contribution to the systematization of the experimental paradigm that underpins the study of associative learning. Subsequently, the core elements of the model—conditioned and unconditioned stimuli and responses—are described, along with the main neural circuits involved in the formation and expression of these associations. The specific roles of structures such as the amygdala,

hippocampus, prefrontal cortex, nucleus accumbens, and hypothalamus are highlighted, as well as the underlying neurochemical mechanisms involving neurotransmitters such as glutamate, dopamine, serotonin, and GABA. Finally, the chapter discusses how these integrated processes support synaptic plasticity,

motivational modulation, and autonomic control, which are characteristic of classical conditioning.

Keywords: Classical Conditioning; Behavioral Neurophysiology; Experimental Models; Biological Bases of Behavior; Associative Learning.

1. INTRODUÇÃO



Figura 1 – Quadrinho adaptado do 2º capítulo do *Admirável Mundo Novo* (Feito pelos Autores com auxílio de IA)

limites da Fisiologia, Psicologia e Neurociências, impactando também a Arte, Literatura e os Estudos Sociais (Riva, 2012). De fato, Huxley reconheceu que o método científico do condicionamento poderia, extrapolado, ser instrumentalizado como uma ferramenta de controle social e manipulação de desejos, como vemos nos reels e nas curtidas das fotos divulgadas nas redes sociais contemporâneas, transformando o condicionamento pavloviano em uma metáfora perturbadora do destino humano em sociedades tecnocráticas (Santos; Amorim Neto; Góes, 2013).

Ivan Petrovich Pavlov (1849–1936) foi um fisiologista russo reconhecido internacionalmente por suas contribuições à ciência experimental (Rehman et al., 2025). A sua descoberta dos reflexos condicionados constituiu um marco na fisiologia digestiva, pela qual foi laureado com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1904, e também, sobretudo, na

“Observem — disse triunfante o Diretor — observem. Os livros e os ruídos aterradores, as flores e as descargas elétricas formavam já no espírito das crianças pares ligados de maneira comprometedora; ao fim de duzentas repetições da mesma lição ou de outra semelhante, estariam ligados indissoluvelmente. Aquilo que o homem uniu, a Natureza é impotente para separar. Eles crescerão com aquilo que os psicólogos chamam de um ódio ‘instintivo’ aos livros e às flores. Reflexos inalteravelmente condicionados. Nada quererão com a literatura e com a botânica durante toda a vida.”

(Huxley, A., *Admirável Mundo Novo*, Capítulo Segundo, 1932.)

O livro *Admirável Mundo Novo* consolidou-se como uma das mais influentes obras distópicas do século XX. Publicado em 1932, Aldous Huxley foi diretamente influenciado pelas descobertas de Ivan Petrovich Pavlov (Ver Figura 1), cujas ideias, publicadas cinco anos antes, extrapolaram os

fundação de uma nova metodologia científica: a observação objetiva e a quantificação rigorosa do comportamento animal como vias para a compreensão da mente (Olatunji; Tomarken, 2023). Respeitado em seu país natal, por ser o primeiro russo a ganhar o Nobel, Pavlov viveu três das fases mais marcantes da história russa: o Império Russo, a Revolução de 1917 e a consolidação da União Soviética (Gao, 2016).

O ambiente político, social e científico que o cercou foi tanto um motor quanto uma barreira à sua produção científica. Embora tenha criticado veementemente os rumos políticos tomados após a Revolução, com declarações públicas contra o totalitarismo, ele recebeu de Lenin tratamento excepcional, sendo poupado das censuras impostas a outros intelectuais russos como descrito por Daniel Todes no livro *“Ivan Pavlov: A Russian Life in Science”*. Diversos países chegaram a convidar Pavlov para estabelecer sua pesquisa no exterior; contudo, sua resposta expressou patriotismo e, também, profunda devoção ao seu método experimental: “Sou um artista da ciência. A Rússia é minha oficina.” Este posicionamento revela o ethos pavloviano: uma concepção quase artesanal da ciência, baseada no rigor técnico, na disciplina e na imersão absoluta no laboratório, que ele via como extensão de si mesmo. Essa devoção à experimentação rigorosa seria decisiva para as suas descobertas e para a constituição do paradigma experimental que influenciou diretamente o behaviorismo norte-americano, sobretudo nas obras de John B. Watson e B.F. Skinner, que viam nos experimentos pavlovianos a base empírica para o estudo sistemático do comportamento (Catania; Laties, 1999).

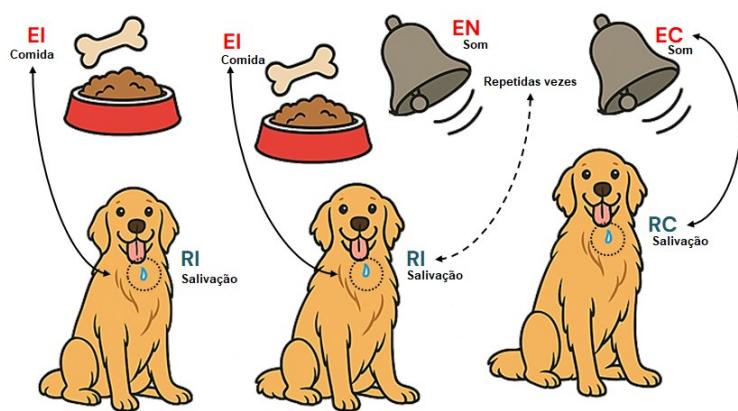
2. FUNDAMENTOS DO TESTE DE CONDICIONAMENTO CLÁSSICO PAVLOVIANO (CCP)

Nosso gênio russo estabeleceu os fundamentos da teoria clássica do condicionamento, denominada Condicionamento Pavloviano, que se tornou uma das bases da compreensão moderna sobre os processos de aprendizagem comportamental (Pavlov, 1927). Sua descoberta foi, curiosamente, fruto de um acaso experimental. Enquanto investigava os mecanismos fisiológicos da digestão em cães, Pavlov observou que as respostas fisiológicas desses animais à comida modificavam-se gradualmente. Inicialmente, os cães salivavam exclusivamente quando a comida lhes era apresentada diretamente, uma resposta que ele denominou de Resposta Incondicionada (RI), evocada por um Estímulo Incondicionado (EI) — no caso, a própria comida. No entanto, ele notou que, com o tempo, os cães começavam a salivar antes da apresentação do alimento, ao simples som do carrinho de comida ou à visão de seu assistente de laboratório, que regularmente trazia o alimento. Esses estímulos, inicialmente irrelevantes, passaram a provocar

respostas fisiológicas antecipatórias, sugerindo um fenômeno de aprendizagem associativa: os cães estavam formando novas conexões entre estímulos previamente neutros e respostas inatas.

Para testar sistematicamente essa hipótese, o fisiologista conduziu uma série de experimentos controlados com grupos de cães. Em tais experimentos, introduziu um Estímulo Neutro (EN) — como o som de uma campainha — imediatamente antes da apresentação do alimento. No início, o som não provocava qualquer resposta salivar. No entanto, após sucessivas associações entre o som (EN) e a comida (EI), os cães passaram a salivar apenas ao ouvir o som, sem que fosse necessária a presença do alimento. O som, portanto, deixou de ser um estímulo neutro e passou a ser um Estímulo Condicionado (EC), capaz de eliciar uma Resposta Condicionada (RC) — neste caso, a salivação (Ver Figura 2).

Figura 2 – Esquema ilustrativo sobre o CCP.



Fonte: Feito pelos autores.

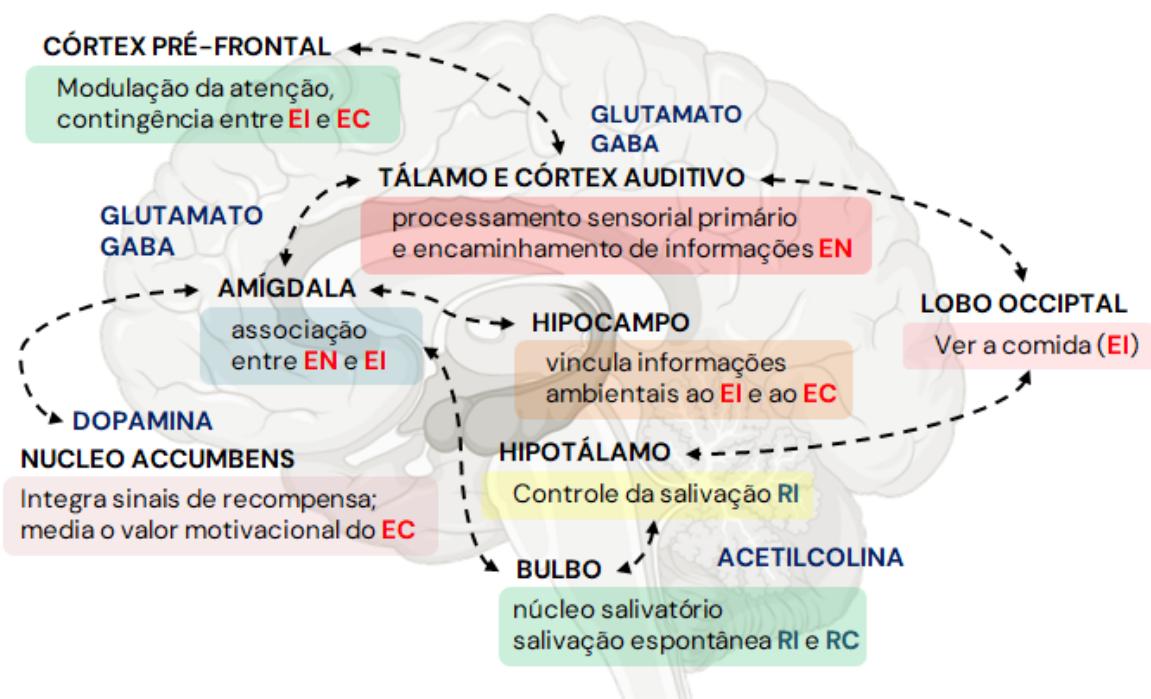
Em síntese, um EI é aquele que, de forma natural e automática, desencadeia uma RI. No experimento clássico do russo, a comida atuou como EI e a salivação foi a RI, uma resposta fisiológica automática. Por outro lado, um EN, que inicialmente não provoca qualquer resposta relevante, pode, mediante associação sistemática com um EI, transformar-se em um EC, capaz de gerar uma RC. Assim, no experimento, o toque do sino evoluiu de EN para EC, passando a provocar salivação — agora, uma RC (Watanabe; Mizunami, 2007). É importante destacar que, embora a RI e a RC sejam fisiologicamente idênticas — ambas manifestando-se como salivação —, elas diferem quanto ao estímulo que as desencadeia: a RI é eliciada pelo EI (comida), enquanto a RC é desencadeada pelo EC (som). O paradigma pavloviano, portanto, demonstrou que não apenas respostas digestivas, mas também uma ampla gama de reações fisiológicas e comportamentais, como respostas emocionais de medo ou reflexos motores como o piscar de olhos, podem ser classicamente condicionadas. Desde então, incontáveis estudos demonstraram a robustez e

generalidade desse modelo, tornando o condicionamento clássico um dos pilares das ciências do comportamento e da neurobiologia da aprendizagem (Olatunji; Tomarken, 2023).

3. BASES NEUROANATÔMICAS DO TESTE

O paradigma do Condicionamento Clássico pressupõe que a associação entre estímulos e respostas não ocorre de maneira difusa no sistema nervoso, mas envolve circuitos neurais específicos capazes de detectar, processar e integrar sinais ambientais relevantes com respostas fisiológicas apropriadas (Galaj; Ranaldi, 2021). Cada um dos elementos desse paradigma está associado às estruturas cerebrais e processos neurofisiológicos, cuja integração é mediada por mecanismos de plasticidade sináptica e modulação neuroquímica (Raybuck; Lattal, 2014). Essa integração entre múltiplos sistemas cerebrais que, articulados, permitem um estímulo inicialmente EN passe a ser associado a um EI, resultando em uma RC (Ver Figura 3). A seguir, será descrito como cada componente funcional deste modelo se relaciona às principais estruturas neuroanatômicas.

Figura 3 – Áreas cerebrais acionadas durante o CCP. Legenda: EI - Estímulo Incondicionado, EC - Estímulo Condicionado, EN - Estímulo Neutro, RI - Resposta Incondicionada, RC - Resposta Condicionada.



Fonte: Imagem feita pelos autores.

3.1. PERCEPÇÃO SENSORIAL PRIMÁRIA E ENCAMINHAMENTO DE INFORMAÇÕES (EN E EI)

O EN, como um som, é inicialmente processado pelo córtex auditivo e tálamo (Romaniuk et al., 2019). O tálamo atua como uma estação de retransmissão sensorial, conduzindo informações acústicas até o córtex auditivo primário, onde ocorre a decodificação inicial das características físicas do som (Chang; Debiec, 2016). Da mesma forma, o EI — como a visão da comida — é processado pelo lobo occipital, que interpreta os estímulos visuais associados ao alimento, desencadeando o reconhecimento sensorial inato. Essas informações sensoriais são codificadas através de neurotransmissores excitatórios e inibitórios, permitindo a modulação dos sinais antes de sua integração com sistemas associativos.

3.2. ASSOCIAÇÃO ENTRE ESTÍMULOS (EN → EI)

A amígdala desempenha o papel na associação entre o EN e o EI. Ela atua como núcleo integrador entre as entradas sensoriais e as respostas emocionais e autonômicas, sendo responsável pela formação inicial da memória associativa que transformará o EN em um EC (Šimić et al., 2021). Esta associação é dependente de mecanismos de plasticidade sináptica mediados por neurotransmissores como o glutamato e o GABA, garantindo a estabilização das conexões entre estímulos sensoriais e as respostas fisiológicas apropriadas (Cardinal et al., 2002).

3.3. MODULAÇÃO MOTIVACIONAL E ATRIBUIÇÃO DE VALOR AO ESTÍMULO (EC)

A partir da formação do EC, a área tegumentar ventral e o núcleo accumbens entram em ação, integrando sinais de recompensa e mediando o valor motivacional do EC (Burns et al., 1996). Esse núcleo, componente do sistema de recompensa dopaminérgico, responde à liberação de dopamina, que reforça a aprendizagem associativa, promovendo a saliência comportamental do EC (Stuber et al., 2011). Assim, o som previamente neutro adquire significado motivacional, preparando o organismo para emitir uma RC frente à sua apresentação (Romaniuk et al., 2019).

3.4. PROCESSAMENTO CONTEXTUAL E MEMÓRIA ASSOCIATIVA

O hipocampo é responsável por vincular informações ambientais ao EI e ao EC, conferindo contextualização espacial e temporal à memória associativa (Sanders; Wiltgen; Fanselow, 2003). Sua participação é fundamental na modulação das respostas condicionadas em função do contexto em que as associações foram aprendidas (Bouton; Maren; McNally, 2021). Esse sistema permite que a salivação condicionada ocorra pela presença isolada do EC e, também, quando este é percebido em um ambiente previamente associado ao EI.

3.5. MODULAÇÃO DA ATENÇÃO E CONTINGÊNCIA ESTÍMULO-ESTÍMULO

O córtex pré-frontal regula a modulação da atenção e a avaliação da contingência entre o EI e o EC (Cardinal et al., 2002). Ele participa do monitoramento e ajuste da aprendizagem associativa, garantindo que o organismo responda de forma adaptativa à frequência e previsibilidade das associações. Por meio de interações com o sistema dopaminérgico e glutamatérgico, o córtex pré-frontal também influencia a decisão de emitir ou inibir a RC com base no contexto e na expectativa de recompensa (Burns et al., 1996).

3.6. CONTROLE AUTONÔMICO DA RESPOSTA (RI E RC)

A execução da RI e da RC — no caso clássico, a salivação — é mediada por centros autonômicos do hipotálamo e do tronco encefálico (Bortolini et al., 2021). O hipotálamo atua no controle da salivação, integrando sinais hormonais e autonômicos, enquanto o bulbo abriga os núcleos salivatórios, responsáveis pela atividade reflexa que produz a salivação espontânea, tanto na RI quanto na RC. O neurotransmissor predominante neste sistema é a acetilcolina, que promove a ativação parassimpática das glândulas salivares. Assim, tanto a RI quanto a RC compartilham os mesmos circuitos autonômicos, diferenciando-se apenas pela origem do estímulo que as desencadeia.

4. BASES NEUROQUÍMICAS DO TESTE

A formação da associação entre EC e RC no CCP depende de mecanismos neurobiológicos que integram plasticidade sináptica, reforço motivacional e modulação emocional (Zheng; Sabirzhanov; Keifer, 2012). O processamento dos estímulos e a expressão das respostas são mediados pelos principais sistemas de neurotransmissores: glutamatérgico, dopaminérgico, serotoninérgico, gabaérgico, colinérgico e adrenérgico.

4.1. PLASTICIDADE GLUTAMATÉRGICA E A CODIFICAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO (EN → EI → EC)

A transição do EN para EC ocorre via processos de plasticidade sináptica, essencialmente mediados pelo glutamato (Lominac et al., 2016). A repetida exposição do EN seguido do EI promove um aumento sustentado na liberação de glutamato em estruturas como o giro denteadoo hipocampo, potencializando a eficiência sináptica entre as representações sensoriais do EN e os circuitos motores que eliciam a RI (Mamounas et al., 1984). O glutamato, ao atuar sobre receptores NMDA e AMPA, facilita a LTP, assegurando que a ativação subsequente do EC, mesmo na ausência do EI, seja suficiente para desencadear a RC (Kelley, 2004; Zheng; Sabirzhanov; Keifer,

2012). Além disso, a ativação de vias secundárias, como a hidrólise do PIP₂, promove cascatas intracelulares que consolidam a associação funcional entre EC e RC, assegurando a estabilidade do traço mnêmico (Lynch et al., 1990).

4.2. DOPAMINA E A ATRIBUIÇÃO DE VALOR AO EC NA EVOCAÇÃO DA RC

A modulação dopaminérgica é fundamental na atribuição de saliência ao EC (Hamati et al., 2024; Yoshizawa; Funahashi, 2025). A apresentação repetida do EN junto ao EI provoca liberação de dopamina, inicialmente apenas frente ao EI, mas que, com o fortalecimento da associação, passa a ser desencadeada também pelo EC (Abe et al., 2024). Essa liberação dopaminérgica, especialmente no núcleo accumbens e nas projeções do VTA, reforça a associação entre EC e RC, facilitando a expressão da resposta aprendida (Stuber et al., 2011). O disparo em rajada de neurônios dopaminérgicos promove a LTP entre as vias sensoriais do EC e os núcleos motores autonômicos responsáveis pela emissão da RC, consolidando o comportamento condicionado (Wise; Jordan, 2021). Assim, a dopamina atua não apenas como reforçador da aprendizagem associativa, mas como modulador da motivação necessária para a execução da RC em função da previsibilidade do EC (Volkow; Wise; Baler, 2017).

4.3. SEROTONINA E A MODULAÇÃO EMOCIONAL E MOTIVACIONAL DA ASSOCIAÇÃO EC → RC

A serotonina exerce papel modulador tanto na formação quanto na manutenção da associação EC → RC, especialmente em contextos em que a RC envolve componentes emocionais ou motivacionais significativos (Sahley, 1994). A extensa projeção serotoninérgica do núcleo da rafe regula o processamento sensorial, afetando a sensibilidade ao EC e modulando a intensidade da RC (Hebart; Gläscher, 2015). Além disso, a serotonina influencia processos de reconsolidação, possibilitando a modificação da força da associação EC → RC mesmo após sua estabilização (Kim, 2008). Essa plasticidade tardia permite que intervenções farmacológicas serotoninérgicas alterem memórias condicionadas, sendo particularmente relevante em modelos experimentais de condicionamento com substâncias psicoativas (Åhs et al., 2015; Carey; Damianopoulos, 2015).

4.4. GABA: REGULAÇÃO INIBITÓRIA DA EXCITABILIDADE SINÁPTICA E CONTROLE DA RC

O sistema GABAérgico atua como principal regulador inibitório do circuito neural envolvido no CCP (Omoumi et al., 2024). Durante a formação da associação entre EC e RC, interneurônios GABAérgicos ajustam a excitabilidade dos circuitos glutamatérgicos, prevenindo a ativação excessiva e garantindo a precisão temporal da resposta condicionada (Heaney; Kinney,

2016). Na expressão da RC, o GABA modula a atividade de núcleos motores autonômicos, como os do tronco encefálico, assegurando que a resposta não seja emitida de forma desproporcional ou inadequada ao contexto (Kaushik et al., 2022). Além disso, o sistema GABAérgico regula a extinção do comportamento condicionado, promovendo a supressão da RC quando o EC deixa de ser preditional (Yamanaka; Waki, 2022).

4.5. ACETILCOLINA: FACILITAÇÃO DA CODIFICAÇÃO SENSORIAL E EXECUÇÃO AUTONÔMICA DA RC

A acetilcolina (ACh) desempenha papel duplo no CCP: Nos circuitos corticais, especialmente no córtex pré-frontal e no hipocampo, a ACh aumenta a saliência do EC, facilitando a atenção seletiva necessária para a consolidação da associação (Lorenzetti; Baxter; Byrne, 2011). Nos circuitos autonômicos, a ACh é o neurotransmissor chave da via parassimpática, responsável pela execução da RC, como no caso da salivação condicionada (Raybuck; Gould, 2010). A ativação colinérgica nos núcleos salivatórios do bulbo assegura a emissão eficiente da resposta motora reflexa (Flesher; Butt; Kinney-Hurd, 2011). Assim, a acetilcolina integra a modulação cognitiva e a execução fisiológica da resposta aprendida (Chalke et al., 2023).

4.6. NORADRENALINA: MODULAÇÃO DA VIGILÂNCIA E REFORÇO DA ASSOCIAÇÃO EC → RC

A noradrenalina (NE), liberada principalmente pelo *locus coeruleus*, regula a vigilância e a responsividade do sistema nervoso frente aos estímulos ambientais (Mingote; De Bruin; Feenstra, 2004). Durante o CCP, a NE facilita a detecção do EC, aumentando a sensibilidade cortical e promovendo a consolidação da associação EC → RC em condições de elevada relevância adaptativa (Paredes et al., 2009). Além disso, a NE atua na modulação do estresse e do arousal, estados que potencializam a formação de memórias associativas robustas, especialmente quando o EI possui carga emocional significativa (Guzmán-Ramos et al., 2012; Luksys; Gerstner; Sandi, 2009; Pantoni et al., 2020).

4.7. INTEGRAÇÃO NEUROQUÍMICA

A formação e expressão da associação EC → RC no CCP emerge de um sistema neuroquímico integrado. A plasticidade glutamatérgica constitui o substrato primário da codificação associativa, fortalecendo as conexões sensoriais e motoras via mecanismos como a LTP. A dopamina atribui valor motivacional ao EC, reforçando a probabilidade de emissão da RC, enquanto a serotonina regula a flexibilidade emocional e a persistência da associação aprendida. Complementarmente, o sistema GABAérgico atua como um modulador inibitório, assegurando o controle da excitabilidade

sináptica e prevenindo respostas excessivas, sendo também fundamental nos processos de extinção da RC. A acetilcolina facilita a codificação atencional do EC e promove a execução autonômica da RC, como nas respostas secretomotoras clássicas. Por fim, a noradrenalina ajusta o estado de vigilância e a responsividade ao EC, favorecendo a consolidação da associação em contextos de alta saliência adaptativa. Esse arranjo evidencia que o condicionamento clássico não se resume a um simples arco reflexo, mas sim a um sistema multifacetado, capaz de integrar múltiplos domínios — sensoriais, motores, emocionais e autonômicos — para garantir uma resposta comportamental eficiente e adaptativa.

5. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS

Os estudos experimentais sobre o CCP frequentemente utilizam intervenções farmacológicas para validar os mecanismos neurobiológicos subjacentes e estabelecer controles positivos e negativos, fundamentais para a interpretação causal das associações entre estímulos e respostas (Laing et al., 2022). Essas manipulações permitem identificar a participação específica de neurotransmissores e vias sinápticas na formação, consolidação e expressão das associações EC → RC.

5.1. CONTROLES POSITIVOS: FACILITAÇÃO OU INDUÇÃO EXPERIMENTAL DA ASSOCIAÇÃO EC → RC

Os controles positivos são utilizados para confirmar a funcionalidade dos circuitos associativos. No contexto do CCP, isso pode incluir: Administração de agonistas glutamatérgicos — como NMDA ou AMPA — que potencializam a plasticidade sináptica e facilitam a formação da associação entre EC e RC, reforçando a importância da LTP no processo (Cain, 1998; Newman et al., 2012; Sasaki et al., 2015). Estímulo dopamínérgetico — agonistas dopamínérgeticos ou a estimulação elétrica do VTA podem intensificar a atribuição de valor motivacional ao EC, acelerando a aquisição da RC e aumentando a resistência da associação à extinção (Braun; Laruelle; Mouradian, 1997; Hicks et al., 2018; Stuber et al., 2011). Modulação colinérgica — injeção de agonistas muscarínicos ou nicotínicos pode melhorar a atenção seletiva ao EC e potencializar a formação da associação, especialmente em tarefas que demandam processamento sensorial complexo (Athnaiel et al., 2022; Benowitz, 2009; Chalkeia et al., 2023). Tais intervenções confirmam a participação dos sistemas neuroquímicos na facilitação da associação e sustentam a robustez do modelo experimental.

5.2. CONTROLES NEGATIVOS: BLOQUEIO OU INIBIÇÃO DAS VIAS ASSOCIATIVAS

Os controles negativos são essenciais para demonstrar a necessidade de determinados componentes neuroquímicos ou circuitos no processo de condicionamento. As abordagens mais comuns incluem: Antagonistas glutamatérgicos — bloqueadores de receptores NMDA, como a ketamine, podem impedir a indução de LTP, bloqueando a transformação do EN em EC e, consequentemente, a emissão da RC (Collison et al., 2016; Ivan Ezquerra-Romano et al., 2018; Newman et al., 2012). Inibição dopaminérgica — bloqueio dos receptores D1/D2 ou lesões no sistema mesolímbico abolirem a liberação de dopamina impedem a atribuição de valor ao EC, resultando em falhas na aquisição ou manutenção da RC (Braun; Laruelle; Mouradian, 1997; Farzinpour et al., 2018; Hicks et al., 2018; Mirmohammadi et al., 2024; Nguyen et al., 2019; Ringel et al., 2013). Antagonistas colinérgicos — como a escopolamina, podem reduzir a capacidade atencional necessária para a codificação do EC, prejudicando a aprendizagem associativa (Cain, 1998; Chalkea et al., 2023; Lorenzetti; Baxter; Byrne, 2011; Sharp, 2019). Potencialização GABAérgica — agentes como benzodiazepínicos, que amplificam a inibição GABAérgica, podem reduzir a excitabilidade neural global, atenuando a formação ou a expressão da RC (Yanpallear et al., 2022; Sanger, 1985; Rassnick et al., 1993; Stanley et al., 2011). Bloqueio adrenérgico — antagonistas β -adrenérgicos podem atenuar os efeitos da noradrenalina na consolidação de memórias associativas, especialmente em contextos de elevado estresse ou saliência emocional (Guzmán-Ramos et al., 2012; Luksys; Gerstner; Sandi, 2009).

5.3. MODELOS EXPERIMENTAIS: APLICAÇÃO DOS CONTROLES NO DELINEAMENTO DO CCP

Em modelos animais de CCP, a aplicação combinada de controles positivos e negativos permite: Isolar os mecanismos necessários e suficientes para a formação da associação. Diferenciar efeitos na aquisição (formação inicial da associação) versus na expressão (emissão da RC). Investigar a participação de cada sistema neuroquímico na modulação do comportamento condicionado. Por exemplo, experimentos que bloqueiam receptores NMDA antes do treino impedem a formação da associação EC \rightarrow RC, enquanto o bloqueio posterior não afeta sua expressão, sugerindo uma participação importante do glutamato na codificação, mas não necessariamente na execução da resposta (Colomb; Brembs, 2010).

6. LIMITES E DESAFIOS METODOLÓGICOS

Embora o teste de condicionamento clássico pavloviano seja amplamente utilizado para investigar mecanismos de aprendizagem associativa, ele apresenta limitações metodológicas relevantes (Treanor; Rosenberg; Craske, 2021). A variabilidade interindividual é um dos principais problemas, influenciada por fatores como idade, sexo, estado fisiológico e experiências prévias, o que pode comprometer a reproduzibilidade dos resultados, independentemente do modelo utilizado. Além disso, o sucesso do condicionamento depende de uma janela temporal precisa entre os EC e EI. Pequenas variações na intensidade ou na latência desses estímulos podem afetar a aquisição da RC (Dalla; Shors, 2009). A escolha dos estímulos também representa um desafio, uma vez que diferentes modalidades sensoriais apresentam eficiências distintas conforme a espécie e o contexto experimental. A interpretação da RC exige cautela, pois respostas espontâneas ou não condicionadas podem ser erroneamente classificadas como aprendizagem. Estados emocionais e fisiológicos do organismo, como estresse, ansiedade ou fadiga, também interferem diretamente na expressão da RC (Wiggert et al., 2017). Adicionalmente, os fenômenos de extinção e recuperação espontânea dificultam a avaliação da estabilidade da memória associativa ao longo do tempo. Soma-se a isso a dificuldade de isolar o condicionamento clássico de outros processos de aprendizagem, como o condicionamento operante. Por fim, há uma considerável heterogeneidade nos protocolos empregados entre diferentes grupos de pesquisa, o que compromete a comparabilidade dos dados. Esses limites destacam a necessidade de padronização metodológica e de estratégias complementares de validação para garantir maior robustez e translação dos achados obtidos (Rescorla, 2004).

REFERÊNCIAS

- ABE, Kenta *et al.* Functional Diversity of Dopamine Axons in Prefrontal Cortex During Classical Conditioning. **bioRxiv: The Preprint Server for Biology**, p. 2023.08.23.554475, 4 mar. 2024.
- ÅHS, Fredrik *et al.* Human serotonin transporter availability predicts fear conditioning. **International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology**, v. 98, n. 3 Pt 2, p. 515–519, dez. 2015.
- ATHNAIEL, Onella *et al.* Effects of the Partial M1 Muscarinic Cholinergic Receptor Agonist CDD-0102A on Stereotyped Motor Behaviors and Reversal Learning in the BTBR Mouse Model of Autism. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 64–74, 12 jan. 2022.
- BENOWITZ, Neal L. Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 49, p. 57–71, 2009.

BORTOLINI, Tiago *et al.* Striatal and septo-hypothalamic responses to anticipation and outcome of affiliative rewards. **NeuroImage**, v. 243, p. 118474, nov. 2021.

BOUTON, Mark E.; MAREN, Stephen; MCNALLY, Gavan P. Behavioral and neurobiological mechanisms of pavlovian and instrumental extinction learning. **Physiological Reviews**, v. 101, n. 2, p. 611–681, abr. 2021.

BRAUN, A. R.; LARUELLE, M.; MOURADIAN, M. M. Interactions between D1 and D2 dopamine receptor family agonists and antagonists: the effects of chronic exposure on behavior and receptor binding in rats and their clinical implications. **Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)**, v. 104, n. 4–5, p. 341–362, 1997.

BURNS, L. H. *et al.* Effects of lesions to amygdala, ventral subiculum, medial prefrontal cortex, and nucleus accumbens on the reaction to novelty: implication for limbic-striatal interactions. **Behavioral Neuroscience**, v. 110, n. 1, p. 60–73, fev. 1996.

CAIN, D. P. Testing the NMDA, long-term potentiation, and cholinergic hypotheses of spatial learning. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 22, n. 2, p. 181–193, mar. 1998.

CARDINAL, Rudolf N. *et al.* Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 3, p. 321–352, maio 2002.

CAREY, Robert J.; DAMIANOPOULOS, Ernest N. Serotonin and conditioning: focus on Pavlovian psychostimulant drug conditioning. **Behavioural Brain Research**, v. 282, p. 227–236, 1 abr. 2015.

CATANIA, A.; LATIES, V. Pavlov And Skinner: Two Lives In Science (An Introduction To B. F. Skinner's "Some Responses To The Stimulus 'Pavlov' "). **Journal of the Experimental Analysis of Behavior**, v. 72, n. 3, p. 455–461, nov. 1999.

CHALKEA, Zinovia Stavroula *et al.* Fear Conditioning by Proxy: The Role of High Affinity Nicotinic Acetylcholine Receptors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 20, p. 15143, 13 out. 2023.

CHANG, Da-Jeong; DEBIEC, Jacek. Neural correlates of the mother-to-infant social transmission of fear. **Journal of Neuroscience Research**, v. 94, n. 6, p. 526–534, jun. 2016.

COLLISON, Kate S. *et al.* Differential effects of early-life NMDA receptor antagonism on aspartame-impaired insulin tolerance and behavior. **Physiology & Behavior**, v. 167, p. 209–221, 1 dez. 2016.

DALLA, Christina; SHORS, Tracey J. Sex differences in learning processes of classical and operant conditioning. **Physiology & Behavior**, v. 97, n. 2, p. 229–238, 25 maio 2009.

FARZINPOUR, Zahra *et al.* Antagonism of the D1- and D2-like dopamine receptors in the nucleus accumbens attenuates forced swim stress- and morphine priming-induced reinstatement of extinguished rats. **Behavioural Brain Research**, v. 341, p. 16–25, 2 abr. 2018.

FLESHER, M. Melissa; BUTT, Allen E.; KINNEY-HURD, Brandee L. Differential acetylcholine release in the prefrontal cortex and hippocampus during pavlovian trace and delay conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 96, n. 2, p. 181–191, set. 2011.

GALAJ, Ewa; RANALDI, Robert. Neurobiology of reward-related learning. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 124, p. 224–234, maio 2021.

GAO, Zhipeng. Daniel P. Todes. Ivan Pavlov: A Russian Life in Science. New York: Oxford University Press, 2014. 880 pp. \$41.95 (hardcover). ISBN 978-0-19-992519-3. **Journal of the History of the Behavioral Sciences**, v. 52, n. 2, p. 196–198, 2016.

GUZMÁN-RAMOS, Kioko *et al.* Post-acquisition release of glutamate and norepinephrine in the amygdala is involved in taste-aversion memory consolidation. **Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 19, n. 6, p. 231–238, 15 maio 2012.

HAMATI, Rami *et al.* 65 years of research on dopamine's role in classical fear conditioning and extinction: A systematic review. **The European Journal of Neuroscience**, v. 59, n. 6, p. 1099–1140, mar. 2024.

HEANEY, Chelcie F.; KINNEY, Jefferson W. Role of GABA(B) receptors in learning and memory and neurological disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 63, p. 1–28, abr. 2016.

HEBART, Martin N.; GLÄSCHER, Jan. Serotonin and dopamine differentially affect appetitive and aversive general Pavlovian-to-instrumental transfer. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 2, p. 437–451, jan. 2015.

HICKS, Callum *et al.* Dopamine D1-Like Receptor Agonist and D2-Like Receptor Antagonist (-)-Stepholidine Reduces Reinstatement of Drug-Seeking Behavior for 3,4-Methylenedioxypyrovalerone (MDPV) in Rats. **ACS chemical neuroscience**, v. 9, n. 6, p. 1327–1337, 20 jun. 2018.

IVAN EZQUERRA-ROMANO, I. *et al.* Ketamine for the treatment of addiction: Evidence and potential mechanisms. **Neuropharmacology**, v. 142, p. 72–82, nov. 2018.

KAUSHIK, Pramod *et al.* A VTA GABAergic computational model of dissociated reward prediction error computation in classical conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 193, p. 107653, set. 2022.

KELLEY, Ann E. Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 8, p. 765–776, jan. 2004.

KIM, Jeansok J. Serotonin, stress, and conditioning. **Biological Psychiatry**, v. 63, n. 9, p. 819–820, 1 maio 2008.

LAING, Patrick A. F. *et al.* The neurobiology of Pavlovian safety learning: Towards an acquisition-expression framework. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 142, p. 104882, nov. 2022.

LOMINAC, Kevin D. *et al.* Prefrontal glutamate correlates of methamphetamine sensitization and preference. **The European Journal of Neuroscience**, v. 43, n. 5, p. 689–702, mar. 2016.

LORENZETTI, Fred D.; BAXTER, Douglas A.; BYRNE, John H. Classical conditioning analog enhanced acetylcholine responses but reduced excitability of an identified neuron. **The Journal**

of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, v. 31, n. 41, p. 14789–14793, 12 out. 2011.

LUKSYS, Gediminas; GERSTNER, Wulfram; SANDI, Carmen. Stress, genotype and norepinephrine in the prediction of mouse behavior using reinforcement learning. **Nature Neuroscience**, v. 12, n. 9, p. 1180–1186, set. 2009.

LYNCH, M. A. *et al.* Increases in glutamate release and phosphoinositide metabolism associated with long-term potentiation and classical conditioning. **Progress in Brain Research**, v. 83, p. 251–256, 1990.

MAMOUNAS, L. A. *et al.* Classical conditioning of the rabbit eyelid response increases glutamate receptor binding in hippocampal synaptic membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 8, p. 2548–2552, abr. 1984.

MINGOTE, Susana; DE BRUIN, Jan P. C.; FEENSTRA, Matthijs G. P. Noradrenaline and dopamine efflux in the prefrontal cortex in relation to appetitive classical conditioning. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 10, p. 2475–2480, 10 mar. 2004.

MIRMOHAMMADI, Mahboobeh *et al.* Intra-Accumbal D1- But not D2-Like Dopamine Receptor Antagonism Reverses the Inhibitory Effects of Cannabidiol on Extinction and Reinstatement of Methamphetamine Seeking Behavior in Rats. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 9, n. 1, p. 89–110, fev. 2024.

NEWMAN, Emily L. *et al.* NMDA receptor antagonism: escalation of aggressive behavior in alcohol-drinking mice. **Psychopharmacology**, v. 224, n. 1, p. 167–177, nov. 2012.

NGUYEN, David *et al.* Dissociative effects of dorsomedial striatum D1 and D2 receptor antagonism in the regulation of anxiety and learned approach-avoidance conflict decision-making. **Neuropharmacology**, v. 146, p. 222–230, 1 mar. 2019.

OLATUNJI, Bunmi O.; TOMARKEN, Andrew. Pavlovian Disgust Conditioning and Generalization: Specificity and Associations With Individual Differences. **Behavior Therapy**, v. 54, n. 1, p. 1–13, jan. 2023.

OMOUMI, Samira *et al.* Systemic corticosterone enhances fear memory extinction in rats: Involvement of the infralimbic medial prefrontal cortex GABA_A and GABA_B receptors. **Brain and Behavior**, v. 14, n. 10, p. e70043, out. 2024.

PANTONI, Madeline M. *et al.* Dopamine and norepinephrine transporter inhibition for long-term fear memory enhancement. **Behavioural Brain Research**, v. 378, p. 112266, 27 jan. 2020.

PAREDES, D. A. *et al.* Neurotransmitter release during delay eyeblink classical conditioning: role of norepinephrine in consolidation and effect of age. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 92, n. 3, p. 267–282, out. 2009.

PAVLOV, P. Ivan. Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. **Annals of Neurosciences**, v. 17, n. 3, p. 136–141, 1927.

RASSNICK, S. *et al.* GABA antagonist and benzodiazepine partial inverse agonist reduce motivated responding for ethanol. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v. 17, n. 1, p. 124–130, fev. 1993.

RAYBUCK, J. D.; GOULD, T. J. The role of nicotinic acetylcholine receptors in the medial prefrontal cortex and hippocampus in trace fear conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 94, n. 3, p. 353–363, out. 2010.

RAYBUCK, Jonathan D.; LATTAL, K. Matthew. Bridging the interval: theory and neurobiology of trace conditioning. **Behavioural Processes**, v. 101, p. 103–111, jan. 2014.

REHMAN, Ibraheem *et al.* Classical Conditioning. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025.

RESCORLA, Robert A. Spontaneous recovery varies inversely with the training-extinction interval. **Learning & Behavior**, v. 32, n. 4, p. 401–408, 1 nov. 2004.

RINGEL, Lauren E. *et al.* Dopamine D1 and D2 receptor antagonism effects on rat ultrasonic vocalizations. **Behavioural Brain Research**, v. 252, p. 252–259, 1 set. 2013.

RIVA, Huélinton Cassiano. O CONDICIONAMENTO CLÁSSICO DE IVAN PAVLOV PRESENTE NO LIVRO ADMIRÁVEL MUNDO NOVO, DE ALDOUS HUXLEY. **Revista Mediação (ISSN 1980-556X)**, v. 7, n. 7, 2012.

ROMANIUK, Liana *et al.* The Neurobiology of Personal Control During Reward Learning and Its Relationship to Mood. **Biological Psychiatry. Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, v. 4, n. 2, p. 190–199, fev. 2019.

SAHLEY, C. L. Serotonin depletion impairs but does not eliminate classical conditioning in the leech *Hirudo medicinalis*. **Behavioral Neuroscience**, v. 108, n. 6, p. 1043–1052, dez. 1994.

SANDERS, Matthew J.; WILTGEN, Brian J.; FANSELOW, Michael S. The place of the hippocampus in fear conditioning. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 217–223, 28 fev. 2003.

SANGER, D. J. GABA and the behavioral effects of anxiolytic drugs. **Life Sciences**, v. 36, n. 16, p. 1503–1513, 22 abr. 1985.

SANTOS, Ana Carolina Clemente dos; AMORIM NETO, Thomaz Pereira de; GÓES, Andréa Carla de Souza. Ficção científica e o *Admirável mundo novo*: previsões concretizadas no atual século e considerações bioéticas. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 20, p. 653–674, 20 maio 2013.

SASAKI, Keita *et al.* NMDA receptor agonists reverse impaired psychomotor and cognitive functions associated with hippocampal Hbegf-deficiency in mice. **Molecular Brain**, v. 8, n. 1, p. 83, 4 dez. 2015.

SHARP, Burt M. Basolateral amygdala, nicotinic cholinergic receptors, and nicotine: Pharmacological effects and addiction in animal models and humans. **The European Journal of Neuroscience**, v. 50, n. 3, p. 2247–2254, ago. 2019.

ŠIMIĆ, Goran *et al.* Understanding Emotions: Origins and Roles of the Amygdala. **Biomolecules**, v. 11, n. 6, p. 823, 31 maio 2021.

STANLEY, B. G. *et al.* Glutamate and GABA in lateral hypothalamic mechanisms controlling food intake. **Physiology & Behavior**, v. 104, n. 1, p. 40–46, 25 jul. 2011.

STUBER, Garret D. *et al.* Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 377–380, 29 jun. 2011.

TREANOR, Michael; ROSENBERG, Benjamin M.; CRASKE, Michelle G. Pavlovian Learning Processes in Pediatric Anxiety Disorders: A Critical Review. **Biological Psychiatry**, v. 89, n. 7, p. 690–696, 1 abr. 2021.

VOLKOW, Nora D.; WISE, Roy A.; BALER, Ruben. The dopamine motive system: implications for drug and food addiction. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 18, n. 12, p. 741–752, 16 nov. 2017.

WATANABE, Hidehiro; MIZUNAMI, Makoto. Pavlov's cockroach: classical conditioning of salivation in an insect. **PloS One**, v. 2, n. 6, p. e529, 13 jun. 2007.

WIGGERT, Nicole *et al.* Social Pavlovian conditioning: Short- and long-term effects and the role of anxiety and depressive symptoms. **Social Cognitive and Affective Neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 329–339, 1 fev. 2017.

WISE, Roy A.; JORDAN, Chloe J. Dopamine, behavior, and addiction. **Journal of Biomedical Science**, v. 28, n. 1, p. 83, 2 dez. 2021.

YAMANAKA, Ko; WAKI, Hidefumi. Conditional Regulation of Blood Pressure in Response to Emotional Stimuli by the Central Nucleus of the Amygdala in Rats. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 820112, 2022.

YANPALLEWAR, Sudhirkumar *et al.* TrkB-cholinergic signaling modulates fear encoding and extinction learning in PTSD-like behavior. **Translational Psychiatry**, v. 12, n. 1, p. 111, 17 mar. 2022.

YOSHIZAWA, Tomohiko; FUNAHASHI, Makoto. Dopamine release in striatal striosome compartments in response to rewards and aversive outcomes during classical conditioning in mice. **Neuroscience Research**, v. 212, p. 61–68, mar. 2025.

ZHENG, Zhaoqing; SABIRZHANOV, Boris; KEIFER, Joyce. Two-stage AMPA receptor trafficking in classical conditioning and selective role for glutamate receptor subunit 4 (tGluA4) flop splice variant. **Journal of Neurophysiology**, v. 108, n. 1, p. 101–111, jul. 2012.

CAPÍTULO III

TESTE DO NADO FORÇADO: RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS, NEUROBIOLOGIA E LIMITAÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

FORCED SWIMMING TEST: BEHAVIORAL RESPONSES, NEUROBIOLOGY, AND LIMITATIONS FOR THE DEVELOPMENT OF NEW DRUGS

DOI: 10.51859/ampilla.nat298.1126-3

Caio José Florêncio dos Anjos ¹

¹ Mestrando em Ciências fisiológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – UECE.

RESUMO

O teste do nado forçado fundamenta-se na indução de um estado de desesperança comportamental, provocado pela exposição do animal a uma situação de aparente inescapabilidade. Esse modelo é essencial para a compreensão dos processos neuroquímicos relacionados à ligação de diferentes fármacos, com base na resposta de cada animal dentro de um cilindro. Trata-se de um método científico validado para avaliar estratégias terapêuticas voltadas ao tratamento da depressão, bem como o desenvolvimento e uso de fármacos antidepressivos. Neste capítulo, discutiremos os fundamentos da depressão, suas características clínicas, a aplicação do teste comportamental, as bases neurobiológicas envolvidas, além dos principais desafios e limitações encontrados até o momento. Também serão apresentadas sugestões de ajustes e acréscimos metodológicos, com o intuito de ampliar a compreensão sobre o estado depressivo avaliado nesse modelo experimental.

Palavras-chave: Depressão. Neurobiologia. Receptores de Serotonina. Receptores Dopaminérgicos.

ABSTRACT

The test described is based on inducing a state of behavioral hopelessness, provoked by exposing the animal to a seemingly inescapable situation. This model is essential for understanding the neurochemical processes related to the binding of different drugs, based on the response of each animal within a cylinder. It is a scientific method used to evaluate therapeutic strategies for treating depression, as well as the development and use of antidepressants. In this chapter, we will discuss the fundamentals of depression, its clinical characteristics, the application of the behavioral test, the neurobiological underpinnings involved, and the main challenges and limitations encountered to date. Suggestions for methodological adjustments and additions will also be presented, aiming to broaden the understanding of the depressive state assessed in this experimental model.

Keywords: Depression. Neurobiology. Serotonin Receptors. Dopaminergic Receptors.

1. INTRODUÇÃO

A depressão, também denominada transtorno depressivo maior, é uma condição psiquiátrica prevalente e debilitante, caracterizada por humor deprimido persistente, anedonia, fadiga, alterações cognitivas e somáticas, como distúrbios do sono e do apetite. A etiologia da depressão é multifatorial, envolvendo desequilíbrios neuroquímicos, predisposição genética, disfunções no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), e fatores psicossociais (Chen *et al.*, 2025; Zhou *et al.*, 2025; Wang *et al.*, 2024).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 280 milhões de pessoas no mundo são afetadas por essa condição, sendo a depressão considerada a principal causa de incapacidade global e uma das doenças que mais contribuem para incapacidade (OMS, 2023). Estudos epidemiológicos apontam que a prevalência ao longo da vida pode atingir até 20% da população em alguns países, com maior incidência entre mulheres e indivíduos em situação de vulnerabilidade socioeconômica (Kessler *et al.*, 2003; WHO, 2017; Wang *et al.*, 2024; Amanda *et al.*, 2023). Além disso, a depressão está associada a um risco aumentado de morbidade geral, suicídio e redução significativa da qualidade de vida, o que reforça a importância de estratégias de prevenção, diagnóstico precoce e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Malhi; Mann, 2018; Chen *et al.*, 2025; Zhou *et al.*, 2025).

Frente ao tema, o sistema serotoninérgico desempenha um papel fundamental nessa condição, atuando sobre a regulação do humor, sono, apetite e cognição, sendo amplamente envolvido na fisiopatologia da depressão. Evidências recentes indicam que indivíduos com depressão apresentam disfunção na transmissão monoaminérgica (noradrenalina, serotonina e/ou dopamina) em certos locais do cérebro, particularmente em áreas corticais e do sistema límbico, sugerindo um déficit funcional (Rang *et al.*, 2011; Scholz *et al.*, 2023). Além disso, estudos demonstraram que diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos — como 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} e 5-HT₄ — estão implicados nos efeitos antidepressivos rápidos observados com agentes como a cetamina, atuando na modulação da plasticidade sináptica e na inibição de vias intracelulares como a Glicogênio Sintase Beta 3 (GSK-3β) (Guo *et al.*, 2022; Amanda *et al.*, 2023).

Ademais, estudos têm destacado a participação das proteínas β-arrestinas na regulação fina dos receptores serotoninérgicos, impactando a neurogênese hipocampal e a sinalização intracelular, mecanismos que parecem estar associados à eficácia terapêutica dos antidepressivos de nova geração (Hinkle *et al.*, 2024). Tais achados reforçam a relevância do sistema serotoninérgico como alvo terapêutico e sua complexa atuação para além da simples elevação da disponibilidade sináptica de 5-HT.

Nesse contexto, o uso de modelos experimentais em animais tem sido fundamental para o avanço na compreensão dos mecanismos neurobiológicos da depressão e na avaliação da eficácia de novos tratamentos e alvos farmacológicos. O teste de nado forçado (Forced Swim Test – FST), desenvolvido por Porsolt e colaboradores em 1977, é amplamente utilizado como modelo experimental para avaliar comportamentos relacionados à depressão em roedores. Este teste baseia-se na exposição do animal a uma situação de aparente inescapabilidade, o que leva à adoção progressiva de um comportamento de imobilidade. A partir desse paradigma, interpreta-se que a redução de movimentos voluntários representa um estado de desespero comportamental ou desmotivação, sendo sensível à administração de antidepressivos (Porsolt *et al.*, 1977; Raez *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2022).

Ao longo das últimas décadas, o FST consolidou-se como uma ferramenta fundamental na triagem de compostos com potencial efeito antidepressivo, além de permitir a investigação dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nos transtornos afetivos. Modificações no protocolo original, como o tempo de exposição, o volume de água e a inclusão de sessões de pré-teste, vêm sendo propostas com o objetivo de aumentar a reproduzibilidade e a validade dos resultados obtidos (Porsolt *et al.*, 1977; Wang *et al.*, 2024; Amanda *et al.*, 2023).

O protocolo tradicional do FST é composto por duas sessões: uma de pré-teste, geralmente com duração de 15 minutos, e uma sessão teste, realizada 24 horas depois, com duração de 5 a 6 minutos. A imobilidade é definida como a ausência de movimentos vigorosos, sendo permitidos apenas os mínimos necessários para manter a cabeça fora da água. A análise pode incluir variáveis como tempo de imobilidade, tempo de natação e tempo de escalada (Cryan; Markou; Lucki, 2002).

Modificações metodológicas vêm sendo propostas para aumentar a sensibilidade do modelo, como o ajuste do tempo de teste, volume da lâmina de água do cilindro, e a omissão da sessão de pré-teste em estudos com tratamentos crônicos. Essas mudanças visam reduzir a variabilidade e evitar interferências comportamentais não relacionadas ao protocolo experimental (Yamamoto *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2024; Amanda *et al.*, 2023; Armario, 2021).

A seguir descreveremos detalhadamente o modelo do teste do nado forçado em ratos Wistar.

2. DESCRIÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DO TESTE DO NADO FORÇADO EM RATOS

2.1. ANIMAIS

Para este modelo são utilizados Ratos *Wistar*, com o peso aproximadamente de 200-300g, sendo divididos em dois grupos principais, um grupo controle e um grupo em estado depressivo (induzido por jejum intermitente):

- Grupo controle (sem privações);
- Grupo em estado depressivo (privado de alimento - jejum intermitente).

2.2. MATERIAIS NECESSÁRIOS PARA O EXPERIMENTO:

- Cilindro com água, a 25°C, em uma profundidade de 15 cm;
- Acrílico com adesivo, caso realizem testes simultâneos com cilindros- camundongos mudam seu comportamento por imitação de outros indivíduos (Ueno *et al.*, 2022);
- Ração comercial comum;
- Medicamentos conforme protocolo do pesquisador.

3. PROCEDIMENTO

3.1. PRIVAÇÃO DE ALIMENTO

Inicialmente os animais são pesados e divididos em dois grupos: controle e privado.

A privação de alimento consiste na retirada total da ração por 24h, mantendo-se água livre, *ad libitum*.

Ao final das 24h, os animais voltam a ter acesso normal à ração. O grupo privado é exposto a sucessivas privações de ração com intervalo de 48h entre cada uma das privações, tendo sempre a água disponível. O número de privações varia de acordo com os grupos experimentais e com o protocolo fundamentado do pesquisador, sendo eles: quatro, oito, dez ou doze privações.

O grupo controle não é submetido a nenhuma privação tendo durante o protocolo de nado forçado.

4. TESTE DO NADO FORÇADO

O procedimento clássico para ratos é realizado em dois dias (1º dia sessão pré-teste e 2º dia sessão teste)

Sessão pré-teste: o protocolo consiste em colocar o animal em um cilindro com água, a 25°C, em uma profundidade de lâmina de água de 15 cm, sem chance de escape por 15 minutos. O

pré-teste é interpretado como uma sessão estressora ou uma sessão de sensibilização, com o objetivo de provocar um estado de desesperança comportamental. Durante esse processo, os animais tendem a ficar progressivamente mais imóveis.

Como resultado dessa sensibilização, os animais que passam pelo pré-teste demonstram uma latência reduzida até a imobilidade e permanecem imóveis por um período mais prolongado, em comparação com aqueles que não foram submetidos a essa etapa.

Sessão teste: após 24 horas dessa sessão, o animal é exposto à mesma condição por um período de cinco minutos. Na segunda exposição ao teste, os ratos permanecem em imobilidade por aproximadamente 75% do tempo total de cinco minutos. Esse comportamento é interpretado como um indicativo de desespero comportamental ou de um estado análogo ao humor depressivo, caracterizado pela interrupção dos esforços para escapar de uma situação percebida como inescapável.

Considera-se que o animal se encontra em imobilidade quando realiza apenas movimentos mínimos, suficientes para manter a cabeça acima da superfície da água (Porsolt *et al.*, 1977).

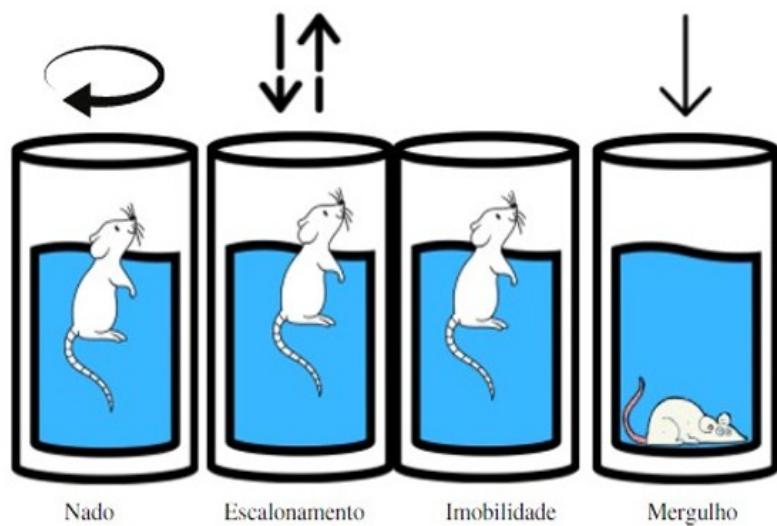
5. AVALIAÇÃO DE FÁRMACOS POR MEIO DO MODELO

Os fármacos antidepressivos são comumente administrados entre as sessões de pré-teste e teste, caracterizando um protocolo de tratamento subagudo, no qual as doses são aplicadas, em geral, cinco e uma hora antes do teste final. A administração dessas substâncias tem como efeito a redução do tempo de imobilidade durante o teste, o que sugere um aumento da atividade motora e uma possível reversão do comportamento tipo depressivo nos animais. A análise comportamental é realizada especificamente na sessão de teste, momento no qual é possível observar distintos padrões de resposta dos animais, conforme ilustrado na **Figura 1**.

Comportamentos observados:

- Nado em círculos;
- Nado com escalonamento;
- Imobilidade;
- Mergulho;

Figura 1 – Representação ilustrativa dos comportamentos observados durante a sessão de teste no modelo de nado forçado. Os parâmetros analisados incluem: imobilidade, natação e escalada, os quais são utilizados para inferir os efeitos de fármacos antidepressivos.



Fonte: Portes, 2021.

Para a análise dos comportamentos motores, o tempo total do teste, com duração de 10 minutos, é segmentado em diferentes intervalos:

1º intervalo: 0 a 2 minutos, correspondente ao período de aclimatação;

2º intervalo: 0 a 5 minutos, considerado o intervalo convencionalmente utilizado para análise;

3º intervalo: 0 a 10 minutos, referente ao tempo total de teste;

4º intervalo: 2 a 7 minutos, período intermediário entre o fim da aclimatação e o início da possível exaustão, excluindo-se, portanto, o início e o fim do teste;

5º intervalo: 7 a 10 minutos, intervalo no qual o animal possivelmente já tem atingido um estado de exaustão, argumentado por Cryan *et al.* (2005).

6. FINALIZAÇÃO

Após os testes, os animais utilizados são submetidos a eutanásia, respeitando os princípios éticos estabelecidos pela legislação vigente (CONCEA, 2013).

7. RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E NEUROBIOLOGIA

A eficácia de fármacos antidepressivos no FST está bem documentada. Compostos como inibidores seletivos da recuperação de serotonina (ISRS), tricíclicos, e noradrenérgicos reduzem o tempo de imobilidade e aumentam o tempo de natação ou escalada, como mostra a **figura 3**,

dependendo do mecanismo de ação. Esse padrão de resposta validou o FST como um modelo preditivo útil na triagem de novos compostos com potencial antidepressivo (Bortoloto *et al.*, 2018).

Figura 3 – Comportamento de escalada.



Fonte: Maneira, 2014.

O teste de nado forçado (FST) é amplamente utilizado na triagem farmacológica de substâncias com potencial efeito antidepressivo. A sensibilidade do modelo permite a identificação de alterações comportamentais em resposta a diferentes classes de antidepressivos, o que tem contribuído para a validação do teste como ferramenta preditiva.

Antidepressivos clássicos, como a imipramina e a desipramina, representantes dos tricíclicos, foram os primeiros a demonstrar eficácia na redução da imobilidade no FST (Porsolt *et al.*, 1977; Ueno *et al.*, 2022). A administração aguda dessas substâncias resulta no aumento de comportamentos ativos, como a natação (figura 4) ou escalada (figura 3), dependendo do perfil de ligação neuroquímico de cada fármaco.

Os ISRS, como a fluoxetina, agem predominantemente aumentando os níveis de serotonina nas sinapses. Em modelos murinos, esses fármacos tendem a aumentar o tempo de natação (figura 4), o que é interpretado como uma reversão do comportamento tipo depressivo. Já antidepressivos noradrenérgicos, como a reboxetina ou a desipramina, tendem a aumentar o tempo de escalada, indicando uma possível diferenciação entre mecanismos serotoninérgicos e noradrenérgicos com base no tipo de comportamento promovido (Deakin, 2000; Detke *et al.*, 1995).

O comportamento de imobilidade (figura 5) é geralmente associado a um estado de desesperança ou de cessação da tentativa de fuga diante de uma situação inescapável. A redução dessa imobilidade após o uso de antidepressivos sugere uma restauração da motivação e da

responsividade ao estresse. O aumento do tempo de natação ou escalada é interpretado como uma reação ativa frente ao estressor, indicando melhora no estado comportamental do animal (Cryan; Markou; Lucki, 2002).

Figura 4 – Comportamento de natação



Fonte: Maneira, 2014.

Figura 5 – Demonstração do comportamento de imobilidade.



Fonte: Maneira, 2014.

Além disso, estudos indicam que os efeitos comportamentais dos antidepressivos no FST estão relacionados a adaptações neuroquímicas, como aumento da neurotransmissão monoaminérgica (serotonina, noradrenalina e dopamina), modulação do eixo HPA (hipotálamo-

hipófise-adrenal) e aumento de fatores neurotróficos como o BDNF (brain-derived neurotrophic factor) (Duarte *et al.*, 2020).

8. LIMITAÇÕES CIENTÍFICAS

A interpretação do comportamento de imobilidade no teste do nado forçado como desespero tem sido contestada, com autores sugerindo que essa resposta pode refletir uma estratégia adaptativa de economia de energia diante de um ambiente incontrolável (West; Michael, 2020; Molendijk; Kloet, 2023).

Apesar de sua ampla utilização, o FST não é isento de críticas. Um dos principais questionamentos diz respeito à validade do modelo enquanto analogia à depressão humana. Como se trata de um teste agudo e de curta duração, muitos argumentam que ele não representa a complexidade dos transtornos afetivos crônicos. Além disso, fármacos ansiolíticos ou estimulantes, que não têm efeito antidepressivo clínico, também podem reduzir a imobilidade, comprometendo a especificidade do modelo (Willner, 1984).

Questões éticas também são levantadas, especialmente relacionadas ao estresse imposto aos animais. Por isso, recomenda-se o uso do FST em conjunto com outros testes comportamentais para uma avaliação mais ampla.

Para superar as limitações do FST, testes complementares têm sido empregados, como o splash test (teste de respingo), que avalia o comportamento de autocuidado e motivação em roedores. Nesse modelo, a redução do tempo de limpeza é interpretada como um indicativo de comportamento tipo depressivo. Outros testes, como o tail suspension test (teste de suspensão traseira) e o open field test (teste de campo aberto), também podem ser utilizados para avaliar variáveis como apatia, anedonia, ansiedade e atividade locomotora, fornecendo uma visão mais abrangente do estado comportamental e depressivo do animal (Cryan; Holmes, 2005; Armario, 2021; Jiang *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2024).

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES FUTURAS

O teste do nado forçado constitui-se em um modelo experimental amplamente empregado na investigação de comportamentos tipo depressivos e na triagem de compostos com potencial efeito antidepressivo. Sua utilidade reside na capacidade de detectar alterações comportamentais associadas à modulação de diferentes sistemas neurotransmissores, fornecendo subsídios relevantes para a compreensão dos mecanismos neurobiológicos da depressão e para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas.

Todavia, a validade do modelo apresenta limitações que merecem destaque. A interpretação da imobilidade como expressão de desesperança comportamental permanece controversa, e a natureza aguda do protocolo não contempla a complexidade e a cronicidade dos transtornos depressivos em humanos. Além disso, a responsividade do teste a fármacos não classificados como antidepressivos compromete parcialmente sua especificidade preditiva.

Diante dessas questões, o emprego do FST deve ser realizado de forma criteriosa, preferencialmente em associação com outros testes comportamentais e análises complementares, de modo a ampliar a robustez e a confiabilidade dos achados. Sugere-se, ainda, a incorporação de adaptações metodológicas e a integração com ferramentas contemporâneas, como análises moleculares, neuroquímicas, a fim de refinar a interpretação dos resultados e favorecer a identificação de novos alvos terapêuticos.

Assim, embora não represente isoladamente um modelo completo da depressão, o teste do nado forçado mantém-se como instrumento de grande relevância científica, desde que aplicado com rigor metodológico, integrado a abordagens complementares e orientado por princípios éticos no uso de animais de experimentação.

REFERÊNCIAS

AMADA. N.; HIROSE. T.; SUZUKI M, KAKUMOTO Y, FUTAMURA T, MAEDA K, KIKUCHI T. Efeito antidepressivo sinérgico do tratamento combinado de Brexpiprazol e inibidores seletivos da recaptação da serotonina no teste de natação forçada em camundongos. **Rep. Neuropsicofarmacol**, v. 43(1):132-136, 2023.

ARMARIO A. O teste de nado forçado: considerações históricas, conceituais e metodológicas e sua relação com traços comportamentais individuais. **Neurosci Biobehav Ver**, v. 128, p. 74-86., 2021.

BORTOLOTO, V. C. et al. Behavioral effects of antidepressant drugs in rodents. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 170, p. 35-45, 2018.

CHEN, X. D.; LI, F.; ZUO, H.; ZHU, F. (2025). Trends in Prevalent Cases and Disability-Adjusted Life-Years of Depressive Disorders Worldwide: Findings From the Global Burden of Disease Study From 1990 to 2021. **Depression and anxiety**, v. 2025, 5553491, 2025.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos**. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2013.

CRYAN, J. F.; HOLMES, A. Model organisms: the ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 775-790, 2005.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 238–245, 2002.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 238–245, 2002.

GUO, M. et al. Rapid antidepressant effects of ketamine are mediated by 5-HT receptor modulation and downstream signaling. **Neuropharmacology**, v. 217, p. 109323, 2022.

HINKLE, L. M. et al. β -arrestins and serotonin receptors: emerging roles in depression and neuroplasticity. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 45, n. 1, p. 12–25, 2024.

JIANG, X. et al. Asperosaponin VI ameliorates the CMS-induced depressive-like behaviors by inducing a neuroprotective microglial phenotype in hippocampus via PPAR- γ pathway. **J Neuroinflamação**. 24 de maio de 2022; v. 19(1):115, 2022.

KESSLER, R. C. et al. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). **JAMA**, v. 289, n. 23, p. 3095–3105, 2003.

MALHI, G. S.; MANN, J. J. Depression. **The Lancet**, v. 392, n. 10161, p. 2299–2312, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Depressão**. Genebra: OMS, 2023.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 229, n. 2, p. 327–336, 1977.

RÁEZ, A. et al. Um elo perdido entre os modelos de depressão: teste de natação forçada, desamparo e enfrentamento passivo em ratos NIH-HS geneticamente heterogêneos. **Processos de comportamento**, v. 177:104142, 2020.

RANG, H. P; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale: farmacologia**. 7 edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. Seção 4: O sistema nervoso, p. 564-582.

SCHOLZ, J. et al. Altered serotonin release capacity in the human brain in depression. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 2345, 2023.

WANG, M. et al. A querçetina alivia o comportamento semelhante à depressão induzida por estresse leve imprevisível crônico, inibindo NMDAR1 com α 2 δ -1 em ratos. **CNS Neurosci Ther**. Abril de 2024; v. 30(4):e14724, 2024.

WEST, C. P.; MICHAEL, R. H. The limits of animal models: reconsidering behavior in forced swim test. **Psychopharmacology**, v. 237, p. 1251–1260, 2020.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, v. 83, n. 1, p. 1–16, 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression and other common mental disorders: global health estimates**. Geneva: WHO, 2017.

YAMAMOTO, T. et al. Experimental modifications of the forced swim test in rats: effects of pretest, water temperature and repeated test. **Behavioural Brain Research**, v. 272, p. 152-158, 2014.

ZHOU, J.; ZHANG, Y.; HE, S.; XU, S.; SUN, Q.; ZHAO, T.; DAI, Y. Accelerated global burden of depressive disorders during the COVID-19 pandemic from 2019 to 2021. **Scientific reports**, 15(1), 9529, 2025.

UENO, H.; TAKAHASHI, Y.; MURAKAMI, S.; WANI, K.; MATSUMOTO, Y.; OKAMOTO, M.; ISHIHARA, T.; Efeito do teste simultâneo de dois camundongos no teste de suspensão da cauda e teste de nado forçado. **Sci Rep**, v. 12(1):9224, 2022.

DOMINGUES, M.; CASARIL, A. M.; SMANIOTTO, T. Â.; BIRMAN, P. T.; LOURENÇO, D. A.; BAMPI, S. R.; VIEIRA, B.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L. Selanylimidazopyridine abolishes inflammation- and stress-induced depressive-like behaviors by modulating the oxido-nitrosative system. **Eur J Pharmacol**. 2022 Jan 5;914:174570, 2022.

DEBLER, R. A.; MADISON, C. A.; HILLBRICK, L.; GALLEGOS, P.; SAFE, S.; CHAPKIN, R. S.; EITAN, S.; Selective aryl hydrocarbon receptor modulators can act as antidepressants in obese female mice. **J Affect Disord**, 2023 Jul 15;333:409-419, 2023.

MOLENDIJK, M. L.; DE KLOET ER. Estressor de nado forçado: tendências de uso e consideração mecanicista. **Eur J Neurosci**. Maio de 2022; v. 55(9-10):2813-2831, 2022.

CAPÍTULO IV

VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS (USVS) EM MODELOS DE TRANSTORNOS DO NEURODESENVOLVIMENTO: MECANISMOS E APLICAÇÕES

ULTRASONIC VOCALIZATIONS (USVS) IN MODELS OF NEURODEVELOPMENTAL DISORDERS: MECHANISMS AND APPLICATIONS

DOI: 10.51859/ampilla.nat298.1126-4

Camila Nogueira Dos Santos ¹

Gerllanny Mara De Souza Lopes ²

Vitória Emily Guimarães Do Nascimento ¹

Yury Nascimento Abreu ³

Gislei Frota Aragão autor ⁴

¹ Mestranda em Medicina Translacional. Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional- UFC

² Doutoranda em Medicina Translacional. Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional- UFC

³ Graduando do curso de Biotecnologia. Universidade Federal do Ceará – UFC

⁴ Professor Adjunto do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) - Universidade Federal do Ceará – UFC.

RESUMO

As vocalizações ultrassônicas (USVs) em roedores (20-100 kHz) constituem um sistema comportamental fundamental para investigação translacional em transtornos do neurodesenvolvimento. Este estudo revisa criticamente os avanços recentes em três eixos principais: (1) bases neurobiológicas, demonstrando o papel dos circuitos dopaminérgicos mesolímbicos na modulação de USVs sociais (50 kHz) e dos circuitos amigdalianos nas vocalizações aversivas (22 kHz); (2) características fenotípicas em modelos animais, incluindo a redução quantitativa em Shank3 KO (autismo), a desorganização progressiva em Mecp2 KO (síndrome de Rett) e a variabilidade acústica em Fmr1 KO (X Frágil); e (3) metodologias de análise, com destaque para os softwares DeepSqueak e MUPET que permitem avaliação automatizada de parâmetros como duração, frequência e complexidade silábica. Os resultados evidenciam que as alterações nas USVs podem preceder outros déficits

comportamentais, apresentando alta sensibilidade como biomarcadores precoces. A análise comparativa revela padrões específicos para cada transtorno, correlacionando-se com disfunções em circuitos neurais distintos. Além disso, intervenções farmacológicas direcionadas demonstram capacidade de normalização parcial desses padrões vocais. Conclui-se que as USVs oferecem vantagens metodológicas únicas para pesquisa pré-clínica, combinando objetividade quantitativa com relevância translacional. Recomenda-se a padronização interlaboratorial e a integração com técnicas de neuroimagem para potencializar aplicações no desenvolvimento de terapias inovadoras.

Palavras-chave: Vocalizações ultrassônicas. Transtornos do neurodesenvolvimento. Biomarcadores. Modelos animais. Análise comportamental.

ABSTRACT

Ultrasonic vocalizations (USVs) in rodents (20–100 kHz) constitute a fundamental behavioral system for translational research in neurodevelopmental disorders. This study critically reviews recent advances along three main axes: (1) neurobiological bases, demonstrating the role of mesolimbic dopaminergic circuits in the modulation of social USVs (50 kHz) and of amygdala circuits in aversive vocalizations (22 kHz); (2) phenotypic characteristics in animal models, including the quantitative reduction in *Shank3* KO (autism), the progressive disorganization in *Mecp2* KO (Rett syndrome), and the acoustic variability in *Fmr1* KO (Fragile X); and (3) analysis methodologies, highlighting the DeepSqueak and MUPET software programs that allow automatic evaluation of parameters such as duration,

frequency, and syllabic complexity. The results demonstrate that changes in USVs can precede other behavioral deficits, demonstrating high sensitivity as early biomarkers. A comparative analysis reveals specific patterns for each disorder, correlating with dysfunctions in distinct neural circuits. Furthermore, targeted pharmacological disciplines demonstrate the ability to normalize these vocal patterns. It is concluded that USVs offer unique methodological advantages for preclinical research, combining quantitative objectivity with translational relevance. Interlaboratory standardization and integration with neuroimaging techniques are recommended to enhance applications in the development of innovative therapies.

Keywords: Ultrasonic vocalizations. Neurodevelopmental disorders. Biomarkers. Animal models. Behavioral analysis.

1. INTRODUÇÃO

As vocalizações ultrassônicas (USVs) em roedores têm se consolidado como uma ferramenta valiosa para investigar os mecanismos neurobiológicos subjacentes a transtornos do neurodesenvolvimento, como o Transtorno do Espectro Autista (TEA), a síndrome de Rett e a esquizofrenia (Scattoni et al., 2009; Wöhr & Schwarting, 2013). Esses sons, emitidos na faixa de 20–100 kHz, são análogos funcionalmente às vocalizações humanas precoces, como o choro e o balbucio, servindo como indicadores de comunicação, estresse e interação social (Portfors, 2007).

Estudo de Branchi et al. (2001) demonstrou que filhotes de camundongos emitem USVs quando separados da mãe, um comportamento que reflete a dependência do cuidado parental, semelhante ao observado em bebês humanos. Em adultos, as USVs são moduladas por contextos sociais e emocionais, com chamados de 50 kHz associados a recompensa e interação, enquanto os de 22 kHz estão ligados a respostas aversivas (Knutson et al., 2002). Essa dicotomia permite explorar tanto déficits sociais quanto comportamentos do tipo ansioso-depressivos em modelos animais.

Alterações nas USVs têm sido documentadas em diversos modelos genéticos e ambientais de transtornos do neurodesenvolvimento. Por exemplo, camundongos *Shank3* knockout (KO), um modelo de autismo, apresentam redução significativa de USVs sociais, refletindo prejuízos na comunicação (Scattoni et al., 2011). Da mesma forma, mutações no gene *Mecp2* (síndrome de Rett) levam a padrões vocais desorganizados e perda progressiva de vocalizações (Ehret et al.,

1987). Esses achados reforçam a utilidade das USVs como biomarcadores precoces de disfunções neurodesenvolvimentais.

Além disso, avanços metodológicos, como o uso de ferramentas de machine learning (DeepSqueak, MUPET), têm permitido a análise automatizada e precisa de milhares de chamados, identificando padrões sutis associados a fenótipos específicos (Coffey et al., 2019). A integração dessas abordagens com técnicas de neurociência de circuitos (optogenética, registros eletrofisiológicos) abre novas perspectivas para entender como alterações em vias dopaminérgicas, serotoninérgicas e oxitocinérgicas influenciam a comunicação vocal (Hammerschmidt et al., 2015).

2. BASES NEUROBIOLÓGICAS DAS USVS NO NEURODESENVOLVIMENTO

As vocalizações ultrassônicas (USVs) em roedores representam um sistema complexo de comunicação que envolve múltiplos circuitos neurais e sistemas neurotransmissores. Estudos pioneiros de Ehret e Haack (1982) demonstraram que filhotes de camundongos emitem USVs na faixa de 70 kHz quando separados da mãe, estabelecendo este comportamento como um modelo para estudos de comunicação precoce no neurodesenvolvimento.

O sistema dopaminérgico desempenha um papel crucial na modulação das USVs associadas a comportamentos sociais positivos. De acordo com o estudo de Knutson et al. (1998) mostrou que a antecipação de interações sociais elicitava USVs de 50 kHz em ratos jovens, um efeito mediado pela atividade dopaminérgica no núcleo accumbens. Estudos farmacológicos posteriores (Burgdorf et al., 2007) confirmaram que agonistas dopaminérgicos aumentam significativamente a produção dessas vocalizações sociais.

Em contraste, as USVs de 22 kHz, associadas a respostas aversivas, são reguladas pelo sistema da amígdala. Miczek et al. (1995) demonstraram que lesões nesta região reduzem drasticamente a emissão de chamados ultrassônicos em situações de ameaça. O equilíbrio entre esses sistemas é fundamental para o desenvolvimento normal da comunicação, como evidenciado por Scattoni et al. (2011) em estudos com modelos animais de transtornos do neurodesenvolvimento.

O córtex auditivo e áreas pré-frontais desempenham um papel integrador nesses processos. Hammerschmidt et al. (2015) identificaram que o desenvolvimento cortical é essencial para a modulação contextual das USVs, com alterações nessas regiões levando a padrões vocais desorganizados em modelos de síndromes neurogenéticas.

A modulação neuroquímica das USVs envolve múltiplos sistemas de neurotransmissores. Wöhr e Schwarting (2007) estabeleceram o papel da serotonina na regulação das respostas vocais ao estresse, enquanto estudos mais recentes têm destacado a importância da oxitocina na comunicação social (Portfors, 2007). Esses achados sugerem que as USVs representam um valioso biomarcador para estudos translacionais em neurodesenvolvimento.

3. MODELOS ANIMAIS DE TRANSTORNOS DO NEURODESENVOLVIMENTO

Estudos utilizando modelos animais têm demonstrado consistentemente o valor das USVs como biomarcadores comportamentais válidos para transtornos do neurodesenvolvimento (Scattoni et al., 2009; Ey et al., 2020). Pesquisas empregando diversos modelos experimentais, tanto genéticos quanto ambientais, revelaram alterações significativas e específicas nos padrões de USVs, que se correlacionam com fenótipos neurocomportamentais característicos de diferentes condições (Wöhr et al., 2013; Silverman et al., 2010).

No contexto do Transtorno do Espectro Autista (TEA), modelos animais têm fornecido insights valiosos. Pesquisas com camundongos Shank3 knockout (KO) mostraram redução significativa na emissão de USVs em filhotes durante isolamento materno e em adultos durante interações sociais (Scattoni et al., 2011; Wang et al., 2016). Estudos de resgate genético demonstraram que a restauração de Shank3 especificamente no núcleo accumbens melhora esses déficits, sugerindo o envolvimento da via dopaminérgica VTA-núcleo accumbens (Bey et al., 2018; Peça et al., 2011).

Camundongos modelo da síndrome do X frágil (Fmr1 KO) apresentam padrões vocais alterados, caracterizados por maior variabilidade acústica, sendo que o tratamento com antagonistas de mGluR5 mostrou efeitos normalizadores (Rotschafer et al., 2015; Gantois et al., 2013). Modelos ambientais, como a exposição pré-natal ao ácido valproico, reproduzem fenótipos vocais específicos, incluindo redução de USVs de isolamento e aumento de vocalizações de 22 kHz em contextos sociais (Kataoka et al., 2013; Kim et al., 2014).

Para a síndrome de Rett, pesquisas com camundongos Mecp2 KO revelaram trajetórias desenvolvimentais distintas nas USVs, com padrões desorganizados em filhotes e perda progressiva na idade adulta (Shahbazian et al., 2002; Gogliotti et al., 2016). Intervenções genéticas direcionadas a neurônios GABAérgicos demonstraram efeitos de resgate nesses déficits vocais (Ure et al., 2016; Blue et al., 2019).

Modelos de esquizofrenia, incluindo exposição pré-natal a Poly I:C e mutações em DISC1, apresentam alterações características nas USVs, com redução de vocalizações sociais de 50 kHz e

aumento de chamados de 22 kHz em contextos neutros (Meyer et al., 2006; Clapcote et al., 2007). Esses achados sugerem desregulação nos circuitos pré-frontais envolvidos no processamento emocional.

O avanço nas técnicas de análise vocal, incluindo algoritmos de machine learning, tem permitido caracterização mais precisa desses fenótipos (Van Segbroeck et al., 2017). Paralelamente, abordagens como optogenética têm elucidado os circuitos neurais subjacentes à emissão de USVs (Tschida et al., 2019). Esses desenvolvimentos metodológicos abrem novas perspectivas para pesquisas translacionais comparando padrões vocais em roedores e humanos (Esposito et al., 2013; Lahvis et al., 2011).

4. METODOLOGIA PARA ESTUDO DE USVS EM NEURODESENVOLVIMENTO

A USVs em roedores tornou-se uma ferramenta fundamental para investigar os mecanismos neurobiológicos subjacentes aos transtornos do neurodesenvolvimento. Os protocolos experimentais são divididos principalmente em estudos com filhotes e adultos, cada um com abordagens específicas para avaliar diferentes aspectos da comunicação e comportamento social (Scattoni et al., 2009).

Em filhotes, o teste de isolamento materno é amplamente utilizado para avaliar respostas de stress. Neste protocolo, o filhote é separado da mãe e colocado em uma câmara termorregulada a 32-34°C, onde suas vocalizações são gravadas por 3-5 minutos usando microfones ultrassônicos especializados (Avisoft UltraSoundGate). Estudos demonstram que filhotes de modelos de autismo, como os camundongos Shank3 KO, apresentam redução significativa na emissão de USVs neste teste (Scattoni et al., 2011). Paralelamente, a resposta a estímulos térmicos de exposição a 22°C ou táticos de escovação suave permite avaliar alterações sensoriais, particularmente relevante em modelos como Mecp2 KO para Síndrome de Rett (Kataoka et al., 2013).

Para animais adultos, os protocolos focam na interação social. O teste padrão envolve a exposição a um coespecífico desconhecido em arena neutra, com gravação simultânea das USVs. Camundongos normalmente emitem chamados de 50 kHz durante interações positivas e 22 kHz em situações aversivas (Wöhr et al., 2013). Modelos como Fmr1 KO (Síndrome do X Frágil) mostram padrões alterados, com redução das USVs sociais de 50 kHz (Rotschafer et al., 2015). O teste de preferência social, que avalia a escolha entre um coespecífico e objeto inanimado, correlaciona diretamente o tempo de interação com a quantidade e tipo de USVs emitidas.

A análise dos dados é realizada através de softwares especializados. O DeepSqueak (Coffey et al., 2019), que utiliza redes neurais convolucionais, permite a classificação automática dos

diferentes tipos de USVs, identificando padrões complexos como sílabas harmônicas. Já o MUPET (Van Segbroeck et al., 2017) extrai mais de 100 parâmetros acústicos, incluindo duração, frequência máxima e modulação, essenciais para comparações entre grupos experimentais.

Os principais parâmetros analisados incluem: Número de chamados, que avalia a quantidade total de vocalizações reduzido no modelo Shank3 KO; Duração, relacionada à complexidade do chamado; Frequência de pico, indicativa do tom e complexidade silábica, que reflete a diversidade do repertório vocal frequentemente reduzida em modelos de Síndrome de Rett (Gigliotti et al., 2016; Ure et al., 2016).

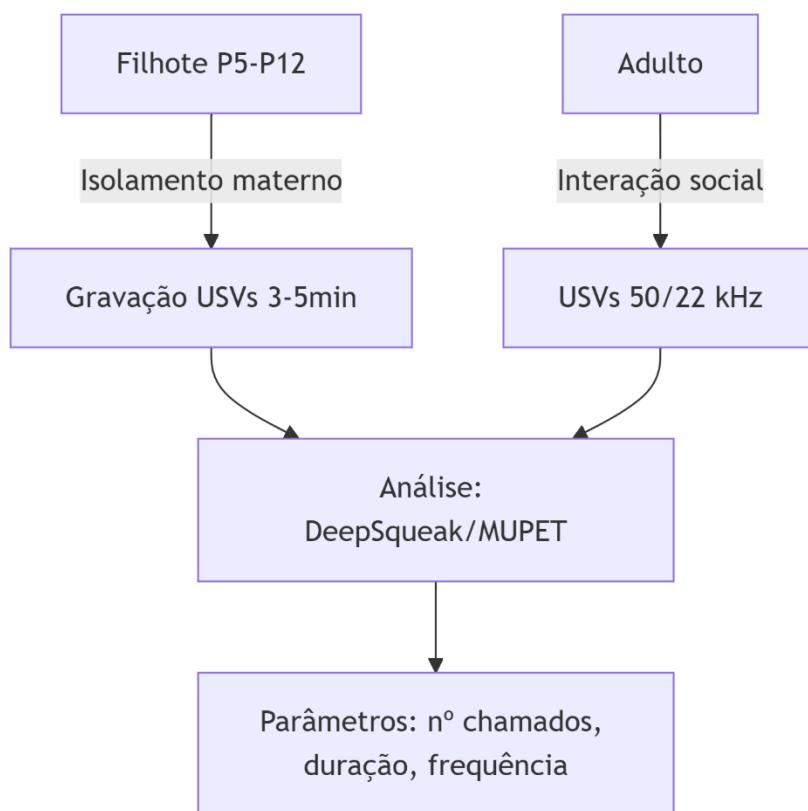


Imagen criada pelo autor.

Para garantir a reproduzibilidade dos estudos, é essencial controlar fatores ambientais como ruídos acima de 20 kHz e manter temperatura constante durante os experimentos. Além disso, questões éticas devem ser consideradas, limitando o tempo de isolamento para no máximo 5 minutos em filhotes (Lahvis et al., 2011). A padronização rigorosa dos protocolos e parâmetros de análise é fundamental para permitir comparações entre estudos.

Recentemente, avanços metodológicos têm permitido a integração de técnicas como optogenética com a gravação de USVs, abrindo novas perspectivas para a compreensão dos circuitos neurais envolvidos na comunicação vocal (Tschida et al., 2019). Esses desenvolvimentos, combinados com abordagens computacionais mais sofisticadas, estão transformando as USVs em

biomarcadores cada vez mais valiosos para estudos pré-clínicos de transtornos do neurodesenvolvimento.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As vocalizações ultrassônicas em roedores representam uma ferramenta valiosa e objetiva para avaliação de transtornos do neurodesenvolvimento, oferecendo protocolos padronizados que permitem a quantificação precisa de alterações na comunicação através de parâmetros acústicos como frequência, duração e padrão de chamados. A análise automatizada por softwares especializados proporciona dados confiáveis e reproduzíveis, tornando os testes com USVs particularmente úteis para triagem farmacológica e validação de modelos animais, com vantagens como baixo custo, alta sensibilidade e aplicação longitudinal não-invasiva. Embora apresentem limitações quanto à variabilidade entre linhagens, essas metodologias se consolidaram como abordagens eficientes para estudos pré-clínicos, permitindo correlacionar alterações comportamentais com mecanismos neurobiológicos e acelerando o desenvolvimento de novas terapias para distúrbios como autismo, síndrome de Rett e esquizofrenia.

AGRADECIMENTOS

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico

REFERÊNCIAS

- Bey, A. L., et al. Brain region-specific disruption of Shank3 in mice reveals a dissociation for cortical and striatal circuits in autism-related behaviors. *Translational Psychiatry*, v. 8, n. 1, p. 94. 2018.
- Burgdorf, J; Wood, P. L; Kroes, R. A; Moskal, J. R; Panksepp, J. Neurobiology of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: Electrode mapping, lesion, and pharmacology studies. **Behavioural Brain Research**, v. 182, n. 2, p. 274-283, 2007.
- Clapcote, S. J. et al. Behavioral phenotypes of Disc1 missense mutations in mice. **Neuron**, v. 54, n. 3, p. 387-402. 2007.
- Coffey, K. R; Marx, R. G; Neumaier, J. F. DeepSqueak: A deep learning-based system for detection and analysis of ultrasonic vocalizations. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 5, p. 859-868. 2019.
- Coffey, K.R; Marx, R.E; Neumaier, J.F. DeepSqueak: a deep learning-based system for detection and analysis of ultrasonic vocalizations. **Neuropsychopharmacol.** v. 44, p. 859-868. 2019.
- Ehret G. Infant rodent ultrasounds a gate to the understanding of sound communication. **Behav Genet.** v. 35, n. 1, p. 19-29, 2005.

- Ehret, G; Haack, B. Ultrasound recognition in house mice: Key-stimulus configuration and recognition mechanism. **Journal of Comparative Physiology**, v. 148, n. 2, p. 245-251. 1982.
- Enard W, et al. A humanized version of Foxp2 affects cortico-basal ganglia circuits in mice. **Cell**. v. 29, n. 137, p. 961-71, 2009 doi: 10.1016/j.cell.2009.03.041.
- Esposito, G. et al. Newborns' cry development. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 37, n. 8, p. 1738-1750. 2013.
- Ey, E. et al. The Autism ProSAP1/Shank2 mouse model displays quantitative and structural abnormalities in ultrasonic vocalisations. **Behavioural Brain Research**, v. 368. 2020.
- Gantois, I. et al. Chronic administration of AFQ056/Mavoglurant restores social behavior in Fmr1 knockout mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 8, p. 1600-1609. 2013.
- Gogliotti, R. G. et al. mGlu7 potentiation rescues cognitive, social, and respiratory phenotypes in a mouse model of Rett syndrome. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 349, p. 349. 2016.
- Gogliotti, R. G. et al. mGlu7 potentiation rescues cognitive, social, and respiratory phenotypes in a mouse model of Rett syndrome. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 349, 2016.
- Hammerschmidt, K. et al. Mice lacking the cerebral cortex develop normal song: Insights into the foundations of vocal learning. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8808. 2015.
- Kataoka, S. et al. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 1, p. 91-103. 2013.
- Kataoka, S. et al. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 1, p. 91-103. 2013.
- Kim, K. C. et al. MeCP2 modulates sex differences in the postsynaptic development of the valproate animal model of autism. **Molecular Neurobiology**, v. 49, n. 1, p. 40-56. 2014.
- Knutson B, Burgdorf J, Panksepp J. Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. **Psychol Bull**. v. 128, n. 6, p. 961-77, 2002. doi: 10.1037/0033-2909.128.6.961.
- Knutson, B; Burgdorf, J; Panksepp, J. Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. **Journal of Comparative Psychology**, v. 112, n. 1, p. 65-73. 1998.
- Lahvis, G. P; Alleva, E; Scattoni, M. L. Translational mouse models of autism: Advancing toward pharmacological therapeutics. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 7, p. 139-162. 2011.
- Lahvis, G. P; Alleva, E; Scattoni, M. L. Translational mouse models of autism: Advancing toward pharmacological therapeutics. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 7, n. 139-162. 2011.
- Meyer, U. et al. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 18, p. 4752-4762. 2006.

Miczek, K. A; Weerts, E. M; Vivian, J. A; Barros, H. M. Aggression, anxiety and vocalizations in animals: GABA_A and 5-HT anxiolytics. **Psychopharmacology**, v. 121, n. 1, p. 38-56, 1995.

Peça, J., et al. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. **Nature**, v. 472, n. 7344, p. 437-442. 2011.

Portfors CV. Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. **J Am Assoc Lab Anim Sci**. v. 46, n. 1, p. 28-34, 2007.

Portfors, C. V. Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 46, n. 1, p. 28-34. 2007.

Rotschafer, S. E. et al Prolonged reduction of cortical auditory evoked potential amplitude in a mouse model of Fragile X Syndrome. **Autism Research**, v. 8, n. 5, p. 507-521. 2015.

Rotschafer, S. E. et al. Prolonged reduction of cortical auditory evoked potential amplitude in a mouse model of Fragile X Syndrome. **Autism Research**, v. 8, n. 5, p. 507-521. 2015.

Scattoni, M. L. et al. Unusual repertoire of vocalizations in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. **Behavioural Brain Research**, v. 216, n. 1, p. 108-114. 2011.

Scattoni, M. L; Crawley, J; Ricceri, L. Ultrasonic vocalizations: A tool for behavioural phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 33, n. 4, p. 508-515, 2009.

Scattoni, M. L; Crawley, J; Ricceri, L. Ultrasonic vocalizations: a tool for behavioural phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 4, p. 508-515. 2009.

Scattoni, M.L; Ricceri, L; Crawley, J.N. Unusual repertoire of vocalizations in adult BTBR T+tf/J mice during three types of social encounters. **Genes Brain Behav.** n. 10, v. 1, p. 44-56. 2011.

Shahbazian, M. D. et al. Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. **Neuron**, v. 35, n. 2, p. 243-254. 2002.

Silverman, J. L. et al. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 490-502. 2010.

Tschida, K. et al. A specialized neural circuit gates social vocalizations in the mouse. **Neuron**, v. 103, n. 3, p. 459-472. 2019.

Tschida, K. et al. A specialized neural circuit gates social vocalizations in the mouse. **Neuron**, v. 103, n. 3, p. 459-472. 2019.

Ure, K. et al. Restoration of Mecp2 expression in GABAergic neurons is sufficient to rescue multiple disease features in a mouse model of Rett syndrome. **eLife**, v. 5, 2016.

Van Segbroeck, M. et al. MUPET-Mouse Ultrasonic Profile ExTraction: A signal processing tool for rapid and unsupervised analysis of ultrasonic vocalizations. **Neuron**, v. 94, n. 3, p. 465-485. 2017.

Wang, X., et al. Synaptic dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of Shank3. **Human Molecular Genetics**, v.25, n. 15, p. 3263-3277. 2016.

Wöhr, M; Schwarting, R. K. Ultrasonic communication in rats: Effects of morphine and naloxone on vocal and behavioral responses to playback of 50-kHz vocalizations. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 88, n. 1, p. 1-7. 2007.

Wöhr, M; Schwarting, R.K. Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. **Cell Tissue Res.** v. 354, n. 1, p. 81-97 2013. doi: 10.1007/s00441-013-1607-9.

CAPÍTULO V

CAIXA DE SKINNER: DESENVOLVIMENTO DO CONDICIONAMENTO OPERANTE E AS APLICAÇÕES CLÍNICAS ATUAIS

SKINNER BOX: DEVELOPMENT OF OPERANT CONDITIONING AND CURRENT CLINICAL APPLICATIONS

DOI: 10.51859/ampilla.nat298.1126-5

Savyo Mikael Lacerda Gomes ¹

Maria Clara Albuquerque Pereira ²

Yasmin Gomes Cavalcante ²

Cleisla Costa Barbosa ³

André Cardeal Nogueira dos Santos ⁴

Andrelina Noronha Coelho de Souza ⁵

¹ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará – Brasil.

² Granduando em Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Ceará – Brasil.

³ Granduando em Enfermagem da Universidade Estadual do Ceará – Brasil.

⁴ Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará – Brasil.

⁵ Professora do Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará – ISCB/UECE – Brasil.

RESUMO

A Caixa de Skinner ou Câmara de Condicionamento Operante, foi criada pelo psicólogo behaviorista Burrhus Frederic Skinner, sendo um importante precursor para o entendimento do condicionamento operante. Ainda nos dias de hoje os achados do teste influenciam em terapias comportamentais e servem como parâmetro avaliativo significativo para desenvolvimento de novos fármacos. Este capítulo tem como objetivos contribuir com as explicações que envolvem o método de skinner, influência neuroanatômica e descrever algumas das contribuições e aplicações clínicas usadas nos dias de hoje. A técnica de skinner busca determinar que o comportamento animal pode ser condicionado pela consequência. Algumas regiões cerebrais são recrutadas para que haja a aprendizagem desde a percepção do estímulo até o alcance da recompensa, são elas: Tálamo, Cortex sensorial (auditivo, visual e somatossensorial), Cortex Pré-frontal, Hipocampo, Núcleos da Base, Cerebelo, Área Tegmental Ventral e Amígdala. Atualmente, o

condicionamento operante é inserido de diversas formas nas aplicações terapêuticas incluindo tratamentos de transtornos psiquiátricos e até mesmo para dependentes químicos. A influência da via dopaminérgica no sistema de recompensa da Caixa de Skinner faz que o teste seja um método de avaliação importante no desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-chave: Condicionamento Operante, Neurofisiologia do Comportamento, Modelos Experimentais. Bases Biológicas do Comportamento. Aprendizagem Associativa.

ABSTRACT

The Skinner Box, or Operant Conditioning Chamber, was created by behaviorist psychologist Burrhus Frederic Skinner and is an important precursor to the understanding of operant conditioning. Even today, the test findings influence behavioral therapies and serve as a significant evaluative parameter for the development of new drugs. This chapter aims to contribute to the explanations involving the

Skinner method, neuroanatomical influence, and describe some of the contributions and clinical applications used today. The Skinner technique seeks to determine that animal behavior can be conditioned by consequence. Some brain regions are recruited so that learning occurs from the perception of the stimulus to the achievement of the reward, they are: Thalamus, Sensory Cortex (auditory, visual and somatosensory), Prefrontal Cortex, Hippocampus, Basal Nuclei, Cerebellum, Ventral Tegmental Area and Amygdala. Currently, operant conditioning is inserted in various forms

in therapeutic applications, including treatments for psychiatric disorders and even for drug addiction. The influence of the dopaminergic pathway on the Skinner Box reward system makes the test an important evaluation method in the development of new drugs.

Keywords: Operant Conditioning; Behavioral Neurophysiology; Experimental Models; Biological Bases of Behavior; Associative Learning.

1. DOGMAS CENTRAIS DE SKINNER

Burrhus Frederic Skinner (B.F. Skinner) foi um psicólogo nascido nos Estados Unidos reconhecido por sua contribuição no desenvolvimento da ciência comportamental, especialmente por meio do behaviorismo radical e da criação da análise do comportamento. Sua contribuição no método comportamental trouxe avanços no que conhecemos hoje nas áreas de psicologia, educação, terapia comportamental e até na filosofia da mente (MOORE, 2011; SAMPAIO, 2005).

Sobre o Behaviorismo, Skinner atribuiu propostas radicais quando comparado com as propostas de John B. Watson, conhecido como o "pai do behaviorismo" (MOORE, 2011; SKINNER, 1953). Inspirado pelo condicionamento clássico, Watson acreditava que a psicologia deveria estudar apenas o comportamento observável, deixando de lado a mente, emoções e pensamentos (não observáveis) (WATSON, 1913). No experimento com o "Pequeno Albert", Watson condicionou uma criança a sentir medo de um rato ao associá-lo com um barulho alto. Apesar de controverso, o experimento mostrou que emoções poderiam ser aprendidas por meio de estímulos externos (WATSON; RAYNER, 1920).

Figura 1- Fotografia do Teste "Pequeno Albert" Fonte: WATSON; RAYNER, 1920



"Dê-me uma dúzia de crianças saudáveis, bem formadas, e um mundo propriamente especificado por mim para criá-las, e eu garanto que posso pegar qualquer uma aleatoriamente e treiná-la para se tornar qualquer tipo de especialista que eu selecionar – médico, advogado, artista, gerente e, sim, até mendigo ou ladrão, independentemente de seus talentos, gostos, tendências, habilidades, vocações e raça de seus ancestrais. Estou indo além dos meus fatos e admito, mas os advogados do contrário também fazem isso e o têm feito por muitos milhares de anos." - John B. Watson (1930).

Skinner desenvolveu o behaviorismo radical utilizando o condicionamento operante como dogma. Ele acreditava que o comportamento era moldado por reforços e punições (SKINNER, 1938). Skinner defendia que os pensamentos e sentimentos também faziam parte do comportamento e, portanto, poderiam ser estudados cientificamente, desde que fossem embasados em metodologias adequadas para avaliar emoções específicas. Para provar seus conceitos, Skinner criou a Caixa de Skinner utilizando animais como método de avaliação (COOPER; HERON; HEWARD, 2020).

Tabela 1 - Comparaçāo Dogmáticas entre Watson e Skinner

Aspecto	Watson	Skinner
Tipo de behaviorismo	Clássico	Radical
Método de estudo	Estímulo → Resposta	Comportamento → Consequência
Foco do condicionamento	Respondente (estímulo-estímulo)	Operante (ação-consequência)
Experimento	Pequeno Albert	Caixa de Skinner
Visão do comportamento	Determinado pelo ambiente	Modelado por consequências

Fonte: WATSON; RAYNER, 1920; SKINNER, 1938)

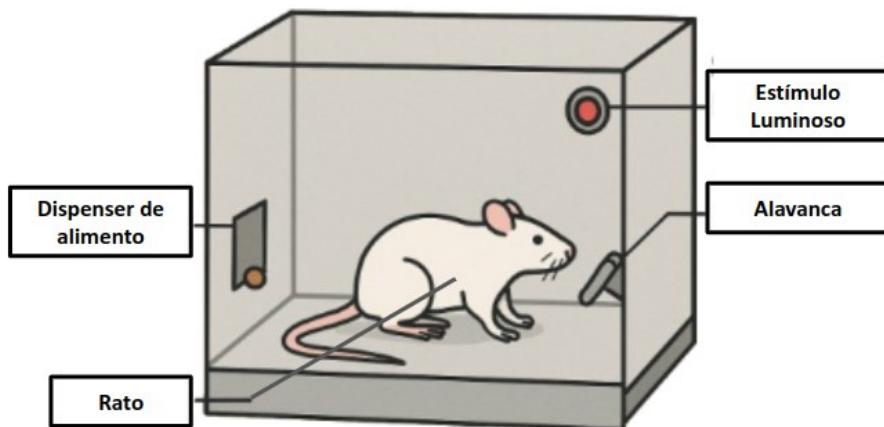
2. CAIXA DE SKINNER

Também chamada de Câmara de Condicionamento Operante, a caixa de skinner é um teste que tem como objetivo mapear o comportamento animal por meio da teoria do condicionamento operante (SKINNER, 1953). No teste convencional de Skinner, são utilizados ratos ou pombos colocados em uma caixa de material resistente, compostas por uma alavanca, um dispensador de alimento e uma luz sinalizadora, conforme a Figura 2. Ao acessar a alavanca, como recompensa, o animal recebe uma porção de comida, que é automaticamente liberada por um dispensador. O ato de pressionar a alavanca é denominado comportamento operante, ou seja, uma ação voluntária e mensurável. Ao perceber que a ação voluntária inicial gera recompensa (alimento), ocorre o aumento da frequência desse comportamento (SHACKELFORD; VONK, 2017).

Outro modulador comportamental utilizado no teste é a sinalização com a luz dentro da caixa. Com a luz ligada a recompensa é dada ao animal quando a alavanca é acionada, quando a luz estiver desligada o animal não receberá o alimento. Sendo assim, o animal não acionará a alavanca sem a sinalização luminosa, modulando a frequência do comportamento animal (SKINNER, 1938).

Além disso, em outras versões da caixa também pode ser utilizado o condicionamento aversivo, quando o comportamento animal é modulado pela aplicação de punições, muitas das vezes choques elétricos que enfraquecem o comportamento por conta da consequência desagradável (SKINNER, 1953).

Figura 2 - Caixa de Skinner.



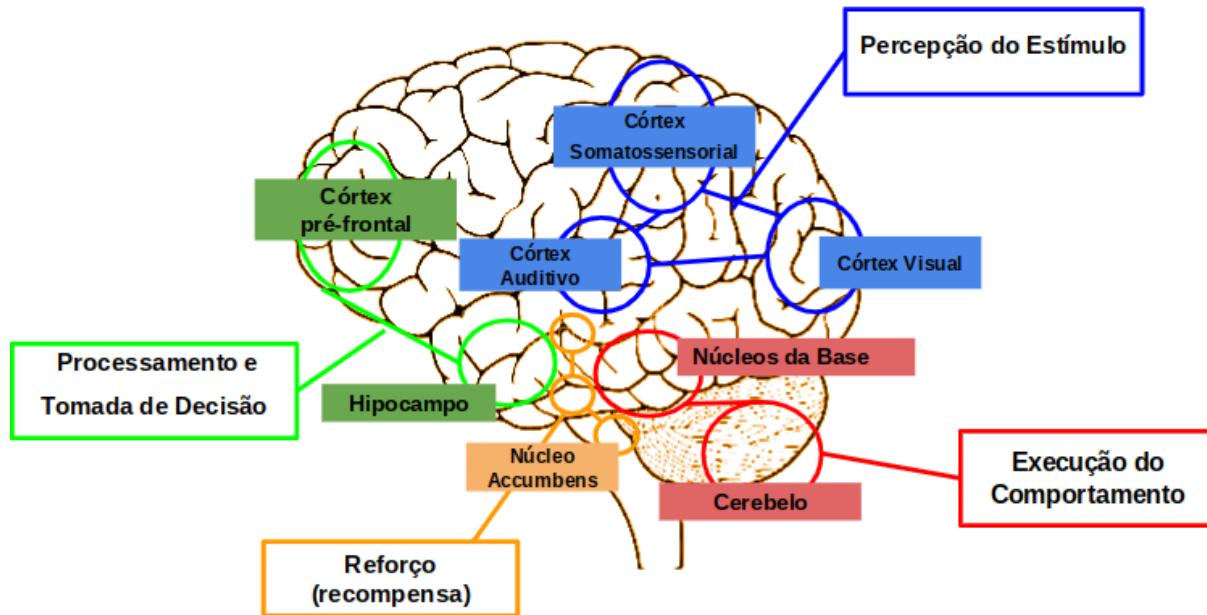
Fonte: Feito pelos Autores com auxílio da IA.

A Caixa de Skinner também foi usada para estudar variações na frequência e previsibilidade com que a recompensa. Por exemplo, o reforço pode ser contínuo (toda vez que o animal aciona o dispositivo, recebe comida) ou intermitente (a recompensa é fornecida apenas em alguns casos, de forma regular ou aleatória) (MACDONALD et al., 2013). Skinner descobriu que o reforço intermitente gera comportamentos mais persistentes, algo que tem grande valor prático na educação, no treinamento e em diversos contextos humanos (MARTIN, 2019).

3. BASES NEUROANATÔMICAS E NEUROQUÍMICAS

O comportamento aprendido por meio do condicionamento operante depende de estruturas cerebrais específicas e de neurotransmissores que regulam motivação, aprendizado e recompensa. O circuito é composto por áreas de diferentes regiões do Sistema Nervoso Central, onde envolve a percepção do estímulo, seguindo para processamento e tomada de decisão, para que haja a execução do comportamento (ação) e finalmente o reforço (recompensa) (GRILLNER; ROBINSON, 2019; SCHULTZ, 2016).

Figura 3 - Recrutamento do Circuito Neural Envolvidos no Condicionamento Operante.



Fonte: Feito pelos Autores.

3.1. PERCEPÇÃO DO ESTÍMULO

No teste, a percepção do estímulo é um fator crucial para a sinalização de que naquele momento o animal deve utilizar a alavanca e receber a recompensa. Essa percepção nasce dos estímulos externos dentro do condicionamento operante (som ou luz) ou condicionamento aversivo (choque elétrico). Para que essa informação seja captada ela passa pelo tálamo e é distribuída por diferentes áreas do córtex sensorial (auditivo, visual e somatossensorial) para que a informação seja traduzida em sinal associativo (MAIR; FRANCOEUR, 2022; TYE et al., 2008).

3.2. PROCESSAMENTO E TOMADA DE DECISÃO

Após a percepção, o animal processa as informações recebidas para executar as ações subsequentes. A informação passa pelo córtex, especialmente o córtex pré-frontal, que participa do planejamento e tomada de decisões ao associar com a consequência (recompensa). Na prática, o córtex ajuda o indivíduo (ou o animal) a avaliar quando é mais vantajoso repetir determinada ação com base na experiência anterior (MAIR; FRANCOEUR, 2022).. O hipocampo participa desse processo, atuando na memória associativa, ou seja, permite com que o animal memorize o sinal e associe com as experiências anteriores dentro da caixa (JUNG et al., 2024).

3.3. EXECUÇÃO DO COMPORTAMENTO

Uma vez tomada a decisão, as áreas responsáveis pela execução do comportamento são ativadas. Para o início do movimento voluntário, como pressionar a alavanca, essa informação

deve ser destinada primordialmente aos gânglios da base. Os gânglios da base (núcleos da base) constituem uma estrutura essencial no controle dos movimentos voluntários, atuando como um centro de processamento que regula e ajusta os comandos motores originados no cérebro. Sua função inclui selecionar os sinais motores necessários e inibir aqueles que são desnecessários ou inadequados. O cerebelo também detém papel fundamental na garantia da execução do movimento preciso e coordenado. O movimento (ação motora) é conduzido pelo sistema nervoso periférico somático, que ativa os músculos esqueléticos envolvidos na resposta comportamental (YOSHIDA et al., 2022).

3.4. REFORÇO (RECOMPENSA)

Quando o comportamento é recompensado, entram em cena as estruturas do sistema de recompensa cerebral. A área tegmental ventral (VTA) libera dopamina, neurotransmissor ligado à sensação de prazer. Essa dopamina é projetada para o núcleo accumbens, que está diretamente relacionado à motivação e ao reforço do comportamento. A amígdala também participa desse circuito, associando o estímulo à resposta emocional, seja de prazer (quando há recompensa) ou de aversão (quando há punição). Além disso, o sistema nervoso autônomo pode ser ativado durante o processo, modulando reações fisiológicas involuntárias como alterações na frequência cardíaca, salivação ou tensão muscular, dependendo da expectativa de reforço (JONES et al., 2010; XU et al., 2024).

4. INFLUÊNCIA DA NEUROPLASTICIDADE

A neuroplasticidade é a capacidade do cérebro desenvolver sua estrutura e função diante de novas aprendizagens. Isso inclui a formação de novas conexões sinápticas, o fortalecimento ou enfraquecimento de conexões existentes e neurogênese (formação de novos neurônios). Na Caixa de Skinner, a neuroplasticidade é um evento fisiológico necessário para associação da ação com a recompensa, formação de potenciação a longo prazo (reforço sináptico), comportamento eficiente e formação de hábitos comportamentais no animal (TSETSENIS; BROUSSARD; DANI, 2023).

De modo prático, no início do experimento, o rato explora aleatoriamente o ambiente, algo pertencente ao extinto exploratório natural. Ao pressionar a alavanca durante a ação voluntária inicial, imediatamente o dispensador libera o alimento, consequentemente, o sistema de recompensa faz com que ocorra a liberação de dopamina. Por meio disso, ocorre o reforço dos circuitos ligados a motivação, reforçando a associação que ligam o ato de pressionar a alavanca com a recompensa (alimento) (FUCHSBERGER et al., 2025).

Com cada nova tentativa bem-sucedida, essas conexões se tornam mais fortes. Graças à neuroplasticidade, o cérebro relaciona que pressionar a alavancas é útil, e o comportamento se torna cada vez mais frequente, até se consolidar como um hábito.

5. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS

Apesar de ser inicialmente utilizada para avaliar e investigar os princípios básicos do condicionamento operante em animais, a Caixa de Skinner contribui significativamente em aplicações clínicas, desenvolvimentos de terapias e avaliação farmacológicas amplamente conhecidas na psicologia, psiquiatria e neurociência (HILL et al., 2022; HU, 2024). No campo clínico, os conhecimentos derivados desses experimentos são fundamentais para o desenvolvimento de terapias comportamentais utilizadas no tratamento de transtornos como fobias, ansiedade, transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), dependência química e autismo. Técnicas como o reforço positivo e o condicionamento operante são aplicadas em programas terapêuticos estruturados, como o Treinamento de Habilidades Sociais e a Análise do Comportamento Aplicada (ABA), especialmente eficaz em crianças com Transtorno do Espectro Autista (TEA) (DYMOND et al., 2019 ; WOLF et al., 1967; YANG et al., 2024).

No âmbito translacional, a caixa de Skinner tem papel crucial na avaliação dos efeitos de fármacos sobre o comportamento, sendo amplamente utilizada em pesquisas pré-clínicas com modelos animais para estudar os mecanismos neurobiológicos da recompensa. Utilizando as respostas comportamentais frente a reforços e punições, é possível identificar os efeitos de substâncias psicoativas, testar tratamentos para doenças neuropsiquiátricas e investigar distúrbios associados à dopamina, como a doença de Parkinson, esquizofrenia e depressão. Além disso, modelos baseados na caixa de Skinner contribuem para o entendimento de comportamentos compulsivos e da tomada de decisão, sendo uma ponte valiosa entre estudos básicos e intervenções terapêuticas em humanos (CASTAGNÉ; MOSER; PORSOLT, 2009; DICHTER; DAMIANO; ALLEN, 2012; SALAMONE, 1995).

5.1. INFLUÊNCIA DO CONDICIONAMENTO OPERANTE NA TERAPIA PARA DEPENDÊNCIA QUÍMICA

No contexto da dependência química, o uso repetido de drogas está frequentemente associado a reforços positivos (euforia, prazer imediato) e negativos (alívio de ansiedade, estresse ou sintomas de abstinência). O condicionamento operante proposto por Skinner exerce uma influência significativa no tratamento de dependentes químicos, servindo como base para várias abordagens terapêuticas comportamentais que buscam modificar os padrões de reforço positivo

e promover comportamentos mais saudáveis (SILVERMAN, 2004; SILVERMAN; ROLL; HIGGINS, 2008).

Uma abordagem vantajosa é o modelo da Reforçamento Contingente ou Terapia de Reforço Comunitário. Nos programas, os pacientes recebem recompensas tangíveis (como vales, pontos ou privilégios) quando apresentam comportamentos desejados, como testes toxicológicos negativos, comparecimento a sessões de terapia ou participação em atividades produtivas. O reforço positivo aumenta a probabilidade de manutenção desses comportamentos ao longo do tempo. Esse tipo de abordagem apresenta resultados positivos significativos com dependentes químicos (CRAIG; SHAHAN, 2022; ROOZEN et al., 2004).

5.2. ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA O TEA

No Transtorno do Espectro Autista (TEA), uma condição neurodesenvolvimental com aumento crescente de diagnóstico nos últimos anos, muitas crianças apresentam déficits na comunicação, interação social e comportamento adaptativo. O condicionamento operante permite que essas habilidades sejam ensinadas de forma sistemática, por meio do reforço de comportamentos desejáveis (ISAKSEN; HOLTH, 2009). Quando uma criança aponta corretamente para um objeto após uma solicitação verbal, ela pode receber um reforço positivo. Esse reforço aumenta a probabilidade de que o comportamento se repita (COLÓN et al., 2012).

Além disso, o condicionamento operante também é usado para reduzir comportamentos inadequados, como crises de agressividade, auto estimulação excessiva ou recusa de atividades. Nesses casos, o comportamento indesejado pode ser seguido de extinção (não reforço) ou reforço diferencial, que promove comportamentos alternativos mais apropriados (MACNAUL; NEELY, 2017).

5.3. ABORDAGENS EM TESTES FARMACOLÓGICAS

Os modelos de condicionamento operante ainda são amplamente utilizados na pesquisa farmacológica, pois permite avaliar os efeitos de novos fármacos no comportamento, na aprendizagem, e na cognição. O princípio da câmara de condicionamento operante se baseia no reforço positivo e negativo de respostas comportamentais, permitindo testar antidepressivos, ansiolíticos e psicoestimulantes, fornecendo dados para medir a eficácia, segurança, efeitos adversos e colaterais de novos fármacos em desenvolvimento (CHOW et al., 2024).

Nos estudos com psicoestimulantes observa-se que o indivíduo se torna mais propenso a repetir comportamentos operantes. Esse efeito está diretamente relacionado à ativação do sistema dopaminérgico mesolímbico, especificamente na via neural que conecta a área tegmental

ventral ao núcleo accumbens (NAc) e ao córtex pré-frontal. Dessa forma, essas substâncias potencializam a liberação de dopamina no NAc, intensificando de forma significativa a sensação de recompensa e reforçando a motivação para repetição do comportamento. Esse mecanismo vai explicar tanto a aplicação terapêutica desses compostos quanto seu elevado potencial de abuso. Sendo, o reconhecimento desses aspectos crucial para o desenvolvimento de medicamentos mais seguros e eficazes, pois no desenvolvimento de novos fármacos permite identificar, avaliar tanto os efeitos terapêuticos desejados quanto os efeitos adversos, e riscos de dependência associados (KOOB; VOLKOW, 2016; WILSON; HANNAN; THIBAULT RENOIR, 2023)

Nesse sentido, o estudo dos ansiolíticos e antidepressivos tem sido amplamente explorado por meio de testes baseados em comportamento, pois revelam mecanismos de ação e efeitos terapêuticos distintos. Os ansiolíticos, em específico os que atuam no sistema GABAérgico, vão promover inibição neural rápida via receptores GABA-A, modulando a atividade em regiões límbicas. Assim, em situações onde há uma hesitação do indivíduo entre buscar uma recompensa e evitar uma punição, esses medicamentos ajudam a retomar o comportamento normal que normalmente seria bloqueado pelas emoções, como o medo (RUDOLPH; KNOFLACH, 2011). Por outro lado, os antidepressivos, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), atuam em sistemas serotoninérgicos e noradrenérgicos, promovendo efeitos progressivos. Em testes que simulam situações de desespero, onde os animais deixam de tentar escapar mesmo quando possível, esses medicamentos conseguem reverter esse comportamento de desistência. Além disso, eles também ajudam a regular respostas impulsivas em tarefas que exigem paciência e um tempo preciso. A integração desses modelos comportamentais com técnicas modernas têm aprofundado o entendimento sobre os transtornos de ansiedade e depressão, contribuindo para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS, LIMITES E DESAFIOS PARA ABORDAGEM

Apesar das contribuições notáveis para o estudo da psicologia e fisiologia, há controvérsias éticas e teóricas sobre os métodos utilizados para a experimentação da caixa de Skinner. Suas principais críticas envolvem questões éticas sobre o reducionismo na análise do comportamento humano, preocupações com o uso de animais em experimentos e a desconsideração dos processos internos e biológicos. Ao apresentar suas ideias em 1930, Skinner recebeu contestações por parte de outros psicólogos como Hull e Tolman quanto à concepção de comportamento e a relevância dos processos mentais em suas análises. Hull, apesar de estar dentro dos paradigmas do behaviorismo, desenvolveu uma abordagem fundamentada em teorias e cálculos matemáticos

para explicar o aprendizado, enquanto Skinner utilizava métodos mais descritivos e menos teóricos focando no comportamento observável desconsiderando processos internos. Tolman, por sua vez, defendia um behaviorismo intencional, acreditando que o comportamento é motivado por objetivos (CRUZ, 2011).

6.1. O REDUCTIONISMO DA ANÁLISE DO COMPORTAMENTO HUMANO

Segundo Skinner, o comportamento humano é uma resposta às recompensas do meio externo. Uma das críticas feita sobre os métodos utilizados por Skinner foi a "robotização" do ser humano, onde Skinner reduzia o comportamento humano a estímulos mecânicos e negligenciava fatores internos como as emoções, pensamentos e desejos na explicação do comportamento focando apenas no comportamento observável. Ao focar apenas em respostas observáveis, o behaviorismo radical de Skinner é acusado de ignorar a complexidade da mente humana simplificando demais a explicação do comportamento limitando assim seus experimentos que observavam o comportamento humano.

6.2. PREOCUPAÇÕES ÉTICAS COM O USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTOS

A utilização da caixa de Skinner para experimentos com animais gera discussões éticas sobre possíveis abusos e maus-tratos e sofrimento dos animais utilizados. Embora o seu uso seja valioso para estudos comportamentais, críticos argumentam que a aplicação de reforços e punições condicionadas a um ambiente artificial podem configurar práticas eticamente questionáveis. Diante disso um dos desafios para a abordagem da caixa de Skinner é adotar os protocolos que sigam de acordo com a Lei CONCEA, ou Lei nº 11.794\2008, a qual estabelece a necessidade de Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs) em instituições de ensino e pesquisa para assegurar o cumprimento das normas de bem-estar animal.

6.3. A DESCONSIDERAÇÃO DOS PROCESSOS INTERNOS E FISIOLÓGICOS

Skinner possuía muitas críticas à fisiologia por considerar a mesma como uma abordagem inadequada para o estudo do comportamento humano, o mesmo acreditava que a fisiologia não possuía capacidade de explicar a complexidade do comportamento e da interação organismo-ambiente e apenas o comportamento observável possuiria tal capacidade. Ao desconsiderar tais processos, negligenciar os processos internos como o sistema nervoso para explicar o comportamento e se basear somente no comportamento observável os resultados da caixa de Skinner poderiam ser limitados. Apesar de ter sido acusado de defender um posicionamento antifisiológico, as críticas de Skinner à fisiologia possuem relevância para estudos atuais.

REFERÊNCIAS

- WATSON, J. B.; RAYNER, R. Conditioned Emotional reactions. *American Psychologist*, v. 55, n. 3, p. 313–317, fev. 1920.
- SAMPAIO, A. A. S. Skinner: sobre ciência e comportamento humano. *Psicologia: Ciência e Profissão*, v. 25, n. 3, p. 370–383, 2005.
- MOORE, J. Behaviorism. *The Psychological Record*, v. 61, n. 3, p. 449–463, jul. 2011.
- WATSON, J. B. Psychology as the behaviorist views it. *Psychological Review*, v. 20, n. 2, p. 158–177, 1913.
- COOPER, J.; HERON, T.; HEWARD, W. *Applied Behavior Analysis*. 3. ed. [s.l.] Pearson, 2020.
- SKINNER, B. F. *Science and human behavior*. Delran, N.J.: Classics Of Medicine Library Division Of Gryphon Editions, 1953.
- SKINNER, B. F. *The Behavior of Organisms: An Experimental Analysis*. New York: Appleton-Century-Crofts, 1938.
- SHACKELFORD, T. K.; VONK, J. *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*. Springer eBooks, 1 jan. 2017.
- MACDONALD, J. M. et al. PERSISTENCE DURING EXTINCTION: EXAMINING THE EFFECTS OF CONTINUOUS AND INTERMITTENT REINFORCEMENT ON PROBLEM BEHAVIOR. *Journal of Applied Behavior Analysis*, v. 46, n. 1, p. 333–338, 20 fev. 2013.
- MARTIN, G. P., JOSEPH J. *BEHAVIOR MODIFICATION : what it is and how to do it*. CRC Press, 2019.
- SCHULTZ, W. Dopamine reward prediction error coding. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, v. 18, n. 1, p. 23–32, 2016.
- GRILLNER, S.; ROBERTSON, B. The Basal Ganglia Over 500 Million Years. *Current Biology*, v. 26, n. 20, p. R1088–R1100, out. 2016.
- TYE, K. M. et al. Rapid strengthening of thalamo-amygdala synapses mediates cue–reward learning. *Nature*, v. 453, n. 7199, p. 1253–1257, 11 maio 2008.
- JUNG, K. et al. Dopamine-mediated formation of a memory module in the nucleus accumbens for goal-directed navigation. *Nature Neuroscience*, 27 set. 2024.
- YOSHIDA, J. et al. Cerebellar Contributions to the Basal Ganglia Influence Motor Coordination, Reward Processing, and Movement Vigor. *Journal of Neuroscience*, v. 42, n. 45, p. 8406–8415, 9 nov. 2022.
- XU, Y. et al. The nucleus accumbens in reward and aversion processing: insights and implications. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 18, 9 ago. 2024.
- JONES, J. L. et al. Basolateral Amygdala Modulates Terminal Dopamine Release in the Nucleus Accumbens and Conditioned Responding. *Biological Psychiatry*, v. 67, n. 8, p. 737–744, abr. 2010.

FUCHSBERGER, T. et al. Dopamine increases protein synthesis in hippocampal neurons enabling dopamine-dependent LTP. *eLife*, v. 13, 10 mar. 2025a.

HILL, N. J. et al. The Evoked Potential Operant Conditioning System (EPOCS): A Research Tool and an Emerging Therapy for Chronic Neuromuscular Disorders. *Journal of Visualized Experiments*, n. 186, 25 ago. 2022.

DYMOND, S. Overcoming avoidance in anxiety disorders: The contributions of Pavlovian and operant avoidance extinction methods. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 98, p. 61–70, mar. 2019.

WOLF, M. et al. Application of operant conditioning procedures to the behavior problems of an autistic child: A follow-up and extension. *Behaviour Research and Therapy*, v. 5, n. 2, p. 103–111, maio 1967.

YANG, X. et al. Financial incentive interventions for smoking cessation among Chinese smokers: study protocol for a cluster randomised controlled trial. *BMJ Open*, v. 14, n. 4, p. e080344–e080344, 1 abr. 2024.

DICHTER, G. S.; DAMIANO, C. A.; ALLEN, J. A. Reward circuitry dysfunction in psychiatric and neurodevelopmental disorders and genetic syndromes: animal models and clinical findings. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, v. 4, n. 1, 6 jul. 2012.

SALAMONE, J. The effects of nucleus accumbens dopamine depletions on continuously reinforced operant responding: Contrasts with the effects of extinction. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 50, n. 3, p. 437–443, mar. 1995.

CASTAGNÉ, V.; MOSER, P. K.; PORSOLT, R. D. Preclinical Behavioral Models for Predicting Antipsychotic Activity. *Advances in pharmacology*, p. 381–418, 1 jan. 2009.

SILVERMAN, K.; ROLL, J. M.; HIGGINS, S. T. Introduction to The Special Issue on The Behavior Analysis and Treatment of Drug Addiction. *Journal of Applied Behavior Analysis*, v. 41, n. 4, p. 471–480, 2008.

SILVERMAN, K. Exploring the limits and utility of operant conditioning in the treatment of drug addiction. *The Behavior Analyst*, v. 27, n. 2, p. 209–230, out. 2004.

CRAIG, A. R.; SHAHAN, T. A. Nondrug reinforcers contingent on alternative behavior or abstinence increase resistance to extinction and reinstatement of ethanol-maintained behavior. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 23 set. 2022.

ROOZEN, H. G. et al. A systematic review of the effectiveness of the community reinforcement approach in alcohol, cocaine and opioid addiction. *Drug and Alcohol Dependence*, v. 74, n. 1, p. 1–13, abr. 2004.

ISAKSEN, J.; HOLTH, P. An operant approach to teaching joint attention skills to children with autism. *Behavioral Interventions*, v. 24, n. 4, p. 215–236, nov. 2009.

MACNAUL, H. L.; NEELY, L. C. Systematic Review of Differential Reinforcement of Alternative Behavior Without Extinction for Individuals With Autism. *Behavior Modification*, v. 42, n. 3, p. 398–421, 8 nov. 2017.

CHOW, J. J. et al. A rat model of operant negative reinforcement in opioid-dependent males and females. *Psychopharmacology*, v. 241, n. 9, p. 1791–1813, 20 abr. 2024.

SHANAHAN, N. A.; VELEZ, L. P.; DULAWA, S. C. Serotonergic modulation and adolescent stress induce operant-based reversal learning deficits in mice: implications for OCD-spectrum disorders. *Biological Psychiatry*, v. 93, p. 123–131, jan. 2023.

WILSON, C.; HANNAN, A. J.; THIBAULT RENOIR. Serotonergic agonism and pharmacologically-induced adolescent stress cause operant-based learning deficits in mice. *Neuropharmacology*, v. 244, p. 109801–109801, 29 nov. 2023.

CRUZ, R. N. DA. Percalços na história da ciência: B. F. Skinner e a aceitação inicial da Análise Experimental do comportamento entre as décadas de 1930 e 1940. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, v. 27, n. 4, p. 545–554, dez.

CAPÍTULO VI

TESTE DE CAMPO ABERTO: AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL EM ROEDORES

OPEN FIELD TEST: BEHAVIORAL EVALUATION IN RODENTS

DOI: 10.51859/ampilla.nat298.1126-6

Francisco Sávio Pitombeira de Lima ¹

Emanuel Adenilton Teixeira Barbosa ²

Alana de Freitas Pires ³

Edna Maria Camelo Chaves ⁴

¹ Mestre e Doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Laboratório de Fisiofarmacologia da Inflamação, Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza

² Mestre em Ciências Fisiológicas, Laboratório de Fisiofarmacologia da Inflamação, Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza

³ Professora assistente do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Laboratório de Fisiofarmacologia da Inflamação, Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza

⁴ Professora adjunta do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Laboratório de Fisiofarmacologia da Inflamação, Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza

RESUMO

O teste de campo aberto é um dos paradigmas comportamentais mais empregados em pesquisas pré-clínicas para investigar a base neurobiológica de transtornos psiquiátricos e avaliar novos alvos farmacológicos. Trata-se de um método simples e versátil que expõe roedores a um ambiente novo e controlado, permitindo observar respostas espontâneas relacionadas à locomoção e ao estado emocional. A análise dos dados pode ser realizada por softwares de rastreamento ou manualmente, possibilitando mensurações objetivas. O aparato é dividido em zonas centrais e periféricas para avaliar padrões exploratórios e indicadores de ansiedade. Entre os parâmetros avaliados destacam-se distância percorrida, velocidade, tempo e frequência de entradas na zona central, rearing, grooming, defecação e freezing. Esses indicadores fornecem informações sobre atividade locomotora, habituação e comportamentos de ansiedade ou depressão frente a diferentes protocolos experimentais e intervenções farmacológicas.

Palavras-chaves: Ansiedade. Depressão. Disfunção de neurotransmissores. Roedores.

ABSTRACT

The open field test is one of the most widely used behavioral paradigms in preclinical research to investigate the neurobiological basis of psychiatric disorders and to evaluate new pharmacological targets. It is a simple and versatile method that exposes rodents to a novel and controlled environment, allowing the observation of spontaneous responses related to locomotion and emotional state. Data analysis can be performed using tracking software or manually, enabling objective measurements. The apparatus is divided into central and peripheral zones to assess exploratory patterns and indicators of anxiety. Among the parameters evaluated are distance traveled, velocity, time and frequency of entries into the central zone, rearing, grooming, defecation, and freezing. These indicators provide information on locomotor activity, habituation, and anxiety- or depression-related behaviors under different experimental protocols and pharmacological interventions.

Keywords: Anxiety. Depression. Neurotransmitter dysfunction. Rodents.

1. INTRODUÇÃO

Os transtornos de ansiedade constituem uma das principais categorias de distúrbios psiquiátricos, caracterizando-se por ansiedade psicogênica persistente, manifestações somáticas e distúrbios do sono. Estimativas de prevalência apontam taxas de até 28,0%, sendo classificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como o sexto maior fator contribuinte global para doenças incapacitantes (Gong *et al.*, 2020). Além disso, esta morbidade associada à depressão acomete taxas maiores de 40% nestes pacientes (Choi *et al.*, 2020).

Ansiedade e depressão são transtornos psiquiátricos, compartilhando aspectos clínicos e neurobiológicos, mas com sintomas e mecanismos distintos. Enquanto a ansiedade é marcada por preocupação excessiva e medo do futuro, associando-se a um desequilíbrio de neurotransmissores como GABA e glutamato, alterações em canais iônicos, mitofagia exacerbada na amígdala e disfunção de circuitos neurais, a depressão envolve humor deprimido persistente e sensação de impotência, relacionada à deficiência de monoaminas como serotonina e noradrenalina (Zhao *et al.*, 2024; Saiz-Masvidal *et al.*, 2024).

No contexto experimental, esses transtornos podem ser avaliados por testes comportamentais como o de teste de campo aberto, onde foi descrito pela primeira vez por Hall e Ballachey (1932), permitindo analisar como um “screening” inicial nas reações emocionais por meio da exploração do ambiente.

2. PROTOCOLO DO TESTE

Neste protocolo, os mais utilizados são camundongos e ratos, que são postos para avaliação de comportamento autônomo e exploratório em um ambiente novo. O experimento é realizado em uma arena de campo aberto simples, com a superfície inferior dividida em quadrantes de tamanho igual, os quadrados inferiores escurecidos, os quadrados ao longo das paredes como área periférica e o restante como área central (Suarez; Gallup, 1981). Além de paredes opacas de cerca de 30 a 40 cm de altura para evitar a fuga dos roedores do teste.

O aparato do campo aberto consiste geralmente em uma caixa quadrada ou circular, no caso de ratos, a arena costuma medir aproximadamente 100 cm x 100 cm, enquanto para camundongos, dimensões menores são utilizadas (cerca de 40 a 50 cm de lado) (Eilam, 2003).

Os parâmetros principais de avaliação são: atividade locomotora (cruzamentos ou *crossing*), levantamentos (*rearing*), autolimpezas (*grooming*), número de entradas e tempo de permanência no centro, número de entradas e tempo nas áreas periféricas (próximo às paredes)

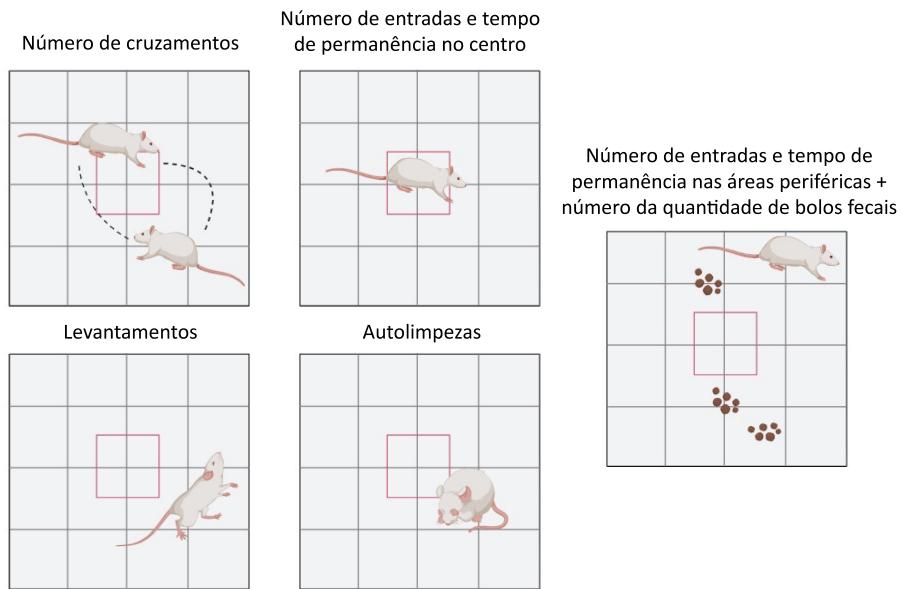
e o número da quantidade de bolos fecais (Zhou *et al.*, 2022; Snyder; Brown; Buffalari, 2021; Knight *et al.*, 2021; Kraeuter; Guest; Sarnyai, 2019) (Figura 1).

Durante o procedimento, o animal é suavemente colocado no centro da arena ou na área periférica e podendo ser analisado e/ou filmado por um período de 5 a 15 minutos (conforme metodologia adotada) bem como higienização da arena entre cada animal com álcool 70% ou solução neutra para eliminar odores que possam interferir no comportamento. De fato, é importante salientar que a habituação não é obrigatória, mas pode ser recomendada dependendo do objetivo experimental, como nos casos de avaliar ansiedade ou reações/respostas ao um ambiente novo (Kraeuter; Guest; Sarnyai, 2019).

Na análise dos parâmetros, existem algumas considerações a serem abordadas como, nos cruzamentos (crossings), é correspondente apenas ao animal que atravessar de um quadrante a outro com as quatro patas, os levantamentos (rearing) quando o animal se ergue sobre as patas traseiras, com ou sem apoio nas paredes, a autolimpeza (grooming) quando o animal inicia uma sequência de comportamentos de higiene, como lamber-se ou esfregar o focinho (podendo apresentar estereotipias); exploração da área central e periférica da arena (considerando apenas quando o animal entra com as quatro patas) quanto pelo tempo total de permanência nestas regiões, cronometrando-se cada episódio em que o animal permanece nas zonas. Esses parâmetros são sensíveis à ansiedade, uma vez que roedores naturalmente evitam espaços abertos; portanto, menor tempo e menor frequência de entradas no centro sugerem maior comportamento ansioso (Zhou *et al.*, 2022; Snyder; Brown; Buffalari, 2021; Knight *et al.*, 2021; Kraeuter; Guest; Sarnyai, 2019).

No caso, de estarem próximo às paredes da arena, como preferência por essa região é denominada de tigmotaxia, sendo característica comum em animais ansiosos. Por fim, o número de bolos fecais deixados durante o teste é contabilizado após a retirada do animal da arena, sendo considerado um marcador fisiológico de estresse emocional. Para garantir a precisão e confiabilidade, a avaliação deverá ser realizada por dois observadores cegos ao grupo experimental (Lamprea *et al.*, 2008).

Figura 1 – Parâmetro avaliados no teste de campo aberto



Fonte: Elaborado pelo próprio autor. Ano: 2025.

3. BASE NEUROANATÔMICA E NEUROQUÍMICA

O comportamento dos roedores no teste de campo aberto reflete a integração funcional de diferentes estruturas cerebrais e sistemas neurotransmissores associados à regulação da ansiedade, depressão, exploração e resposta ao estresse. Dentre as principais regiões envolvidas está a amígdala, que desempenha papel central na avaliação de ameaças e modulação do medo; sua hiperatividade está relacionada a comportamentos de evitação, como a preferência pelas bordas da arena (Jones *et al.*, 2022). A redução da inibição GABAérgica nessa região está associada ao aumento da ansiedade, enquanto a ação da serotonina pode modular negativamente essa reatividade emocional. O glutamato, por sua vez, participa da excitabilidade sináptica, e seu excesso contribui para a amplificação de respostas de medo e evitação (Lalonde; Strazielle, 2017).

O hipocampo também exerce papel crucial, especialmente no processamento espacial e na avaliação contextual, influenciando a exploração do ambiente. A serotonina nessa região tem efeito ansiolítico, e sua deficiência aumenta a reatividade ao ambiente. O GABA atua reduzindo a excitabilidade neuronal, enquanto o excesso de glutamato pode intensificar a ansiedade e comprometer a adaptação a novos estímulos (Wojtas *et al.*, 2023).

O córtex pré-frontal medial, por sua vez, está envolvido na regulação da resposta emocional e no controle inibitório de comportamentos impulsivos, sendo que sua hipoatividade está associada à maior ansiedade e à redução da exploração da região central da arena (Sotoudeh *et al.*, 2022). O estriado e o núcleo accumbens participam da motivação e do controle da atividade locomotora, influenciando diretamente parâmetros como o número de cruzamentos entre

quadrantes e episódios de rearing (Snyder; Brown; Buffalari, 2021; Sturman; Germain; Bohacek, 2018).

Outro neurotransmissor relevante é a noradrenalina, envolvida na vigilância e na resposta fisiológica ao estresse. Sua liberação pode induzir comportamentos de congelamento, hiperlocomoção, aumento da quantidade de excrementos ou reatividade exagerada ao ambiente (estereotipias), dependendo do perfil do modelo experimental utilizado (Wiersielis *et al.*, 2024).

Essas regiões formam circuitos interconectados, como o eixo amígdala-hipocampo-córtex pré-frontal, modulando respostas comportamentais frente a estímulos ameaçadores ou ambientes novos (Lalonde; Strazielle, 2017). Dessa forma, o teste de campo aberto constitui uma ferramenta útil para detectar alterações comportamentais na avaliação de modelos experimentais de transtornos neuropsiquiátricos e no teste de intervenções farmacológicas.

4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS

Na pesquisa pré-clínica, teste de campo aberto é utilizado para triagem de novos compostos com potencial ansiolítico, antidepressivo ou antipsicótico, além de auxiliar na caracterização do perfil comportamental de modelos genéticos de doenças como Alzheimer, Parkinson, Autismo e Esquizofrenia (Sheppard *et al.*, 2022; Zahova *et al.*, 2021). A resposta comportamental no campo aberto, como redução da locomoção, aumento da evitação do centro ou presença de estereotipias, pode indicar disfunções nos circuitos cerebrais e nos sistemas neurotransmissores que também são alterados em humanos, como os sistemas serotoninérgico, dopaminérgico, noradrenérgico e GABAérgico (Zhao *et al.*, 2023). Assim, o teste contribui para prever a eficácia de tratamentos e validar biomarcadores neuroquímicos, funcionando como uma ponte entre a pesquisa básica e a prática clínica.

Quadro 1 – Principais fármacos utilizados na avaliação da atividade locomotora

Fármaco	Classe	Efeito esperado	Referências
Diazepam	Benzodiazepínicos	Aumenta a exploração; reduz a evitação e a ansiedade	Rex; Stephens; Fink, 1996; Mehrhoff <i>et al.</i> , 2023.
Fluoxetina	Inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS)	Aumenta a permanência no centro	Mar; Spreekmeester; Rochford, 2002; Zhang <i>et al.</i> , 2022.
Haloperidol	Butirofenonas	Reduz drasticamente a locomoção	Saldívar-González; Campos-Rodriguez; Cano-Cruz, 2009; Mohammad <i>et al.</i> , 2023.
Clorodiazepóxido	Benzodiazepínicos	Aumenta a atividade e o tempo na zona central	Gentsch; Lichtsteiner; Feer, 1987; Wehrmeister <i>et al.</i> , 2010.

Fármaco	Classe	Efeito esperado	Referências
Imipramina	Tricíclico (antidepressivo)	Aumenta a exploração e atividade locomotora	Wesołowska; Kowalska, 2008; Valvassori <i>et al.</i> , 2022.
Anfetamina	Fenetilaminas (psicoestimulante)	Estimula a atividade locomotora e impulsividade	Müdüroğlu Kirmizibekmez; Mengi; Yurdakoş, 2016; Chestnykh <i>et al.</i> , 2023.
Metilfenidato	Fenetilaminas (psicoestimulante)	Aumenta a atividade locomotora e impulsividade	Souza <i>et al.</i> , 2016; Carias <i>et al.</i> , 2019.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor. Ano: 2025.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS, LIMITES E DESAFIOS METODOLÓGICOS

O teste de campo aberto apresenta limitações como baixa especificidade, já que alterações na atividade locomotora podem indicar tanto ansiedade quanto sedação ou estimulação motora entre as zonas, dificultando a interpretação isolada (Zhang *et al.*, 2023). Os fatores como iluminação, ruído, horário do experimento e manuseio prévio também influenciam o comportamento, exigindo rigorosa padronização além das diferenças de sexo, linhagem, idade e histórico de manipulação podem gerar variabilidade (Knight *et al.*, 2021). A análise manual, por sua vez, pode gerar viés, sendo ideal o uso de avaliadores cegos ou softwares de rastreamento. Portanto, o campo aberto deve ser adotado como “screening” associado a outros testes comportamentais complementares.

REFERÊNCIAS

CARIAS, E., FRICKE, D., VIJAYASHANTHAR, A., SMITH, L., SOMANESAN, R., MARTIN, C., KALINOWSKI, L., POPOOLA, D., HADJIARGYROU, M., KOMATSU, D. E., & THANOS, P. K. (2019). Weekday-only chronic oral methylphenidate self-administration in male rats: Reversibility of the behavioral and physiological effects. **Behavioural brain research**, v. 356, p. 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.08.014>.

CHESTNYKH, D., GRAßL, F., PFEIFER, C., DÜLK, J., EBNER, C., WALTERS, M., VON HÖRSTEN, S., KORNHUBER, J., KALINICHENKO, L. S., HEINRICH, M., & MÜLLER, C. P. (2023). Behavioural effects of APH199, a selective dopamine D4 receptor agonist, in animal models. **Psychopharmacology**, v. 240, n. 4, p. 1011–1031. <https://doi.org/10.1007/s00213-023-06347-1>.

CHOI, K. W., KIM, Y. K., & JEON, H. J. (2020). Comorbid Anxiety and Depression: Clinical and Conceptual Consideration and Transdiagnostic Treatment. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1191, p. 219–235. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9705-0_14.

EILAM D. (2003). Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. **Behavioural brain research**, v. 142, n. 1-2, p. 53–62. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(02\)00382-0](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(02)00382-0)

GENTSCH, C., LICHTSTEINER, M., & FEER, H. (1987). Open field and elevated plus-maze: a behavioural comparison between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY)

rats and the effects of chlordiazepoxide. **Behavioural brain research**, v. 25, n. 2, p. 101–107. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(87\)90003-9](https://doi.org/10.1016/0166-4328(87)90003-9).

GONG, M., DONG, H., TANG, Y., HUANG, W., & LU, F. (2020). Effects of aromatherapy on anxiety: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of affective disorders**, v. 274, p. 1028–1040. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.05.118>.

HALL, C., & BALLACHEY, E. L. (1932). A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. **University of California Publications in Psychology**, v. 6, n. 1, p. 1–12.

JONES, S. K., MCCARTHY, D. M., VIED, C., STANWOOD, G. D., SCHATSCHNEIDER, C., & BHIDE, P. G. (2022). Transgenerational transmission of aspartame-induced anxiety and changes in glutamate-GABA signaling and gene expression in the amygdala. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 119, n. 49, p. e2213120119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2213120119>.

KNIGHT, P., CHELLIAN, R., WILSON, R., BEHNOOD-ROD, A., PANUNZIO, S., & BRUIJNZEEL, A. W. (2021). Sex differences in the elevated plus-maze test and large open field test in adult Wistar rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 204, p. 173168. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2021.173168>.

KRAEUTER, A. K., GUEST, P. C., & SARNYAI, Z. (2019). The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1916, p. 99–103. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_9.

LALONDE, R., & STRAZIELLE, C. (2017). Neuroanatomical pathways underlying the effects of hypothalamo-hypophysial-adrenal hormones on exploratory activity. **Reviews in the neurosciences**, v. 28, n. 6, p. 617–648. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2016-0075>.

LAMPREA, M. R., CARDENAS, F. P., SETEM, J., & MORATO, S. (2008). Thigmotactic responses in an open-field. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 41, n. 2, p. 135–140. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2008000200010>.

MAR, A., SPREEKMEESTER, E., & ROCHFORD, J. (2002). Fluoxetine-induced increases in open-field habituation in the olfactory bulbectomized rat depend on test aversiveness but not on anxiety. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 73, n. 3, p. 703–712. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(02\)00881-x](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(02)00881-x).

MEHRHOFF, E. A., BOOHER, W. C., HUTCHINSON, J., SCHUMACHER, G., BORSKI, C., LOWRY, C. A., HOEFFER, C. A., & EHRINGER, M. A. (2023). Diazepam effects on anxiety-related defensive behavior of male and female high and low open-field activity inbred mouse strains. **Physiology & behavior**, v. 271, p. 114343. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2023.114343>.

MOHAMMAD, KHAN, U. A., WARSI, M. H., ALKREATHY, H. M., KARIM, S., JAIN, G. K., & ALI, A. (2023). Intranasal cerium oxide nanoparticles improves locomotor activity and reduces oxidative stress and neuroinflammation in haloperidol-induced parkinsonism in rats. **Frontiers in pharmacology**, v. 14, p. 1188470. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1188470>.

MÜDÜROĞLU KIRMIZIBEKMEZ, A., MENGI, M., & YURDAKOŞ, E. (2016). Interaction of Cocaine- and Amphetamine-regulated Transcript and Neuropeptide Y on Behavior in the Central Nervous System. *Noro psikiyatri arsivi*, v. 53, n. 2, p. 136–143. <https://doi.org/10.5152/npa.2015.9952>.

REX, A., STEPHENS, D. N., & FINK, H. (1996). "Anxiolytic" action of diazepam and abecarnil in a modified open field test. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, v. 53, n. 4, p. 1005–1011. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)02121-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)02121-3).

SAIZ-MASVIDAL, C., DE LA PEÑA-ARTEAGA, V., BERTOLÍN, S., MARTÍNEZ-ZALACAÍN, I., JUANEDA-SEGÚÍ, A., CHAVARRÍA-ELIZONDO, P., SUBIRÀ, M., MENCHÓN, J. M., FULLANA, M. A., & SORIANO-MAS, C. (2024). Uncovering the correlation between neurotransmitter-specific functional connectivity and multidimensional anxiety in a non-clinical cohort. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 10.1007/s00406-024-01879-9. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s00406-024-01879-9>.

SALDÍVAR-GONZÁLEZ, J. A., CAMPOS-RODRIGUEZ, U. E., & CANO-CRUZ, M. A. (2009). Differential effect of clozapine and haloperidol on rats treated with methylphenidate in the open field test. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, v. 52, p. 63–66. 22128426.

SHEPPARD, K., GARDIN, J., SABNIS, G. S., PEER, A., DARRELL, M., DEATS, S., GEUTHER, B., LUTZ, C. M., & KUMAR, V. (2022). Stride-level analysis of mouse open field behavior using deep-learning-based pose estimation. *Cell reports*, v. 38, n. 2, p. 110231. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110231>.

SNYDER, C. N., BROWN, A. R., & BUFFALARI, D. (2021). Similar tests of anxiety-like behavior yield different results: comparison of the open field and free exploratory rodent procedures. *Physiology & behavior*, v. 230, p. 113246. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113246>.

SOTOUDEH, N., NAMAVAR, M. R., BAGHERI, F., & ZARIFKAR, A. (2022). The medial prefrontal cortex to the medial amygdala connections may affect the anxiety level in aged rats. *Brain and behavior*, v. 12, n. 7, p. e2616. <https://doi.org/10.1002/brb3.2616>.

SOUZA, L. S., SILVA, E. F., SANTOS, W. B., ASTH, L., LOBÃO-SOARES, B., SOARES-RACHETTI, V. P., MEDEIROS, I. U., & GAVIOLI, E. C. (2016). Lithium and valproate prevent methylphenidate-induced mania-like behaviors in the hole board test. *Neuroscience letters*, v. 629, p. 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.06.044>.

STURMAN, O., GERMAIN, P. L., & BOHACEK, J. (2018). Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, v. 21, n. 5, p. 443–452. <https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1438405>.

SUAREZ, S. D., & GALLUP, G. G. (1981). An ethological analysis of open-field behavior in rats and mice. *Learning and Motivation*, v. 12, n. 3, p. 342-363. [https://doi.org/10.1016/0023-9690\(81\)90013-8](https://doi.org/10.1016/0023-9690(81)90013-8).

VALVASSORI, S. S., CARARO, J. H., MARINO, C. A. P., POSSAMAI-DELLA, T., FERREIRA, C. L., AGUIAR-GERALDO, J. M., DAL-PONT, G. C., & QUEVEDO, J. (2022). Imipramine induces hyperactivity in rats pretreated with ouabain: Implications to the mania switch induced by antidepressants. *Journal of affective disorders*, v. 299, p. 425–434. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2021.12.021>.

WEHRMEISTER, T. D., IZÍDIO, G. S., PEREIRA, E., IZÍDIO, G., & RAMOS, A. (2010). Absence of repeated-trial tolerance to the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide in the rat triple test. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 97, n. 2, p. 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.08.014>.

WESOŁOWSKA, A., & KOWALSKA, M. (2008). Influence of serotonin 5-HT(7) receptor blockade on the behavioral and neurochemical effects of imipramine in rats. **Pharmacological reports: PR**, v. 60, n. 4, p. 464–474. 18799814.

WIERSIELIS, K., YASREBI, A., DEGROAT, T. J., KNOX, N., ROJAS, C., FELTRI, S., & ROEPKE, T. A. (2024). Intermittent fasting disrupts hippocampal-dependent memory and norepinephrine content in aged male and female mice. **Physiology & behavior**, v. 275, p. 114431. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2023.114431>

WOJTAS, A., BYSIEK, A., WAWRZCZAK-BARGIELA, A., MAĆKOWIAK, M., & GOŁEMBIOWSKA, K. (2023). Limbic System Response to Psilocybin and Ketamine Administration in Rats: A Neurochemical and Behavioral Study. **International journal of molecular sciences**, v. 25, n. 1, p. 100. <https://doi.org/10.3390/ijms25010100>.

ZAHOVA, S. K., HUMBY, T., DAVIES, J. R., MORGAN, J. E., & ISLES, A. R. (2021). Comparison of mouse models reveals a molecular distinction between psychotic illness in PWS and schizophrenia. **Translational psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 433. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01561-x>.

ZHANG, J., ZHANG, N., LEI, J., JING, B., LI, M., TIAN, H., XUE, B., & LI, X. (2022). Fluoxetine shows neuroprotective effects against LPS-induced neuroinflammation via the Notch signaling pathway. **International immunopharmacology**, v. 113(Pt A), p. 109417. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109417>.

ZHANG, X. Y., DIAZ-DELCASTILLO, M., KONG, L., DANIELS, N., MACINTOSH-SMITH, W., ABDALLAH, A., DOMANSKI, D., SOFRENOVIC, D., YEUNG, T. P. S., VALIENTE, D., VOLLERT, J., SENA, E., RICE, A. S., & SOLIMAN, N. (2023). A systematic review and meta-analysis of thigmotactic behaviour in the open field test in rodent models associated with persistent pain. **PloS one**, v. 18, n. 9, p. e0290382. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0290382>.

ZHAO, H., ZHOU, M., LIU, Y., JIANG, J., & WANG, Y. (2023). Recent advances in anxiety disorders: Focus on animal models and pathological mechanisms. **Animal models and experimental medicine**, v. 6, n. 6, p. 559–572. <https://doi.org/10.1002/ame2.12360>.

ZHAO, T., LIU, T., WANG, L., XIE, K., TANG, H., & TANG, M. (2024). Dysfunction of neurotransmitter metabolism is associated with the severity of depression in first-diagnosed, drug-naïve depressed patients. **Journal of affective disorders**, v. 349, p. 332–341. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2024.01.023>.

ZHOU, F., JIANG, H., KONG, N., LIN, J., ZHANG, F., MAI, T., CAO, Z., & XU, M. (2022). Electroacupuncture Attenuated Anxiety and Depression-Like Behavior via Inhibition of Hippocampal Inflammatory Response and Metabolic Disorders in TNBS-Induced IBD Rats. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2022, p. 8295580. <https://doi.org/10.1155/2022/8295580>.

CAPÍTULO VII

ABORDAGEM NEUROFUNCIONAL E TRANSLACIONAL DO TESTE DE ESQUIVA ATIVA EM MODELOS COMPORTAMENTAIS

NEUROFUNCTIONAL AND TRANSLATIONAL APPROACH OF THE ACTIVE AVOIDANCE TEST IN BEHAVIORAL MODELS

DOI: 10.51859/amplia.nat298.1126-7

Iara Késsila Milhome Vasconcelos ¹
Gislei Frota Aragão ²

¹ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – PPGCF. Universidade Estadual do Ceará – UECE.

² Professor Adjunto do Curso de Medicina. Universidade Estadual do Ceará – UECE.

RESUMO

O teste de esquiva ativa tem se consolidado como ferramenta translacional relevante na investigação de circuitos neurais envolvidos na resposta defensiva, sendo amplamente utilizado em modelos pré-clínicos de transtornos afetivos, ansiedade e estresse pós-traumático. O paradigma permite avaliar o aprendizado de evitação frente a estímulos aversivos previsíveis, integrando aspectos de cognição, motivação e controle inibitório. Estudos demonstram a participação crítica de estruturas como amígdala, córtex pré-frontal, hipocampo e núcleo *accumbens* na expressão e extinção da esquiva. A sensibilidade do modelo a manipulações farmacológicas amplia sua aplicabilidade na triagem de fármacos ansiolíticos, antidepressivos e moduladores dopaminérgicos. Compostos como benzodiazepínicos, agonistas serotoninérgicos, beta-bloqueadores e psicoestimulantes têm seus efeitos caracterizados por alterações na performance da esquiva. Abordagens recentes incorporam contextos sociais e estímulos de recompensa ao paradigma, permitindo explorar dimensões como anedonia, tomada de decisão e cognição social. Dessa forma, o teste de esquiva ativa representa um modelo robusto para compreender mecanismos neurais e testar intervenções terapêuticas em condições neuropsiquiátricas

caracterizadas por respostas de evitação excessiva ou desadaptativa.

Palavras-chave: Esquiva ativa. Comportamento defensivo. Modelos neuropsiquiátricos.

ABSTRACT

The active avoidance test has emerged as a relevant translational tool for investigating neural circuits involved in defensive responses and is widely applied in preclinical models of affective disorders, anxiety, and post-traumatic stress disorder (PTSD). This paradigm enables the assessment of avoidance learning in response to predictable aversive stimuli, integrating aspects of cognition, motivation, and inhibitory control. Studies highlight the critical involvement of brain regions such as the amygdala, prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in the expression and extinction of avoidance behavior. The model's sensitivity to pharmacological manipulations expands its applicability for screening anxiolytic, antidepressant, and dopaminergic modulators. Compounds such as benzodiazepines, serotonergic agonists, beta-blockers, and psychostimulants exhibit measurable effects on avoidance performance. Recent adaptations have incorporated social contexts and reward-based stimuli into the paradigm, allowing the exploration of dimensions such as anhedonia,

decision-making, and social cognition. Thus, the active avoidance test represents a robust model for understanding the neural mechanisms underlying defensive behavior and for evaluating therapeutic interventions in neuropsychiatric

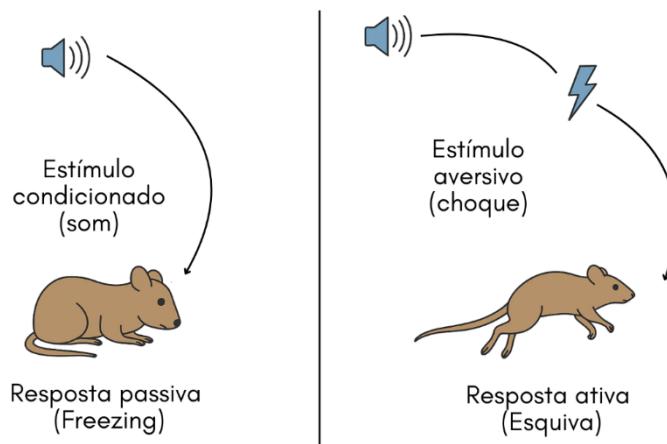
conditions marked by excessive or maladaptive avoidance responses.

Keywords: Active avoidance. Defensive behavior. Neuropsychiatric models.

1. INTRODUÇÃO

O teste de esquiva ativa é um modelo experimental importante na neurociência comportamental e na psicofarmacologia para o estudo dos mecanismos neurais e cognitivos relacionados à aprendizagem associativa, regulação emocional e tomada de decisão em situações de ameaça. Diferente dos modelos de medo condicionado passivo, como o teste de congelamento (*freezing*), esse protocolo requer que o animal execute uma ação motora específica para evitar um estímulo aversivo previsível, como um choque elétrico, previamente sinalizado por um estímulo condicionado (EC) (por exemplo, um som ou luz). Trata-se, portanto, de um modelo sensível à dinâmica entre reatividade emocional e controle proativo, sendo amplamente utilizado para investigar padrões de evitação, plasticidade neural e efeitos de intervenções farmacológicas em modelos animais (Diehl *et al.*, 2018; Bravo-Rivera *et al.*, 2014; Moscarello; LeDoux, 2013) (Figura 1).

Figura 1 – Respostas defensivas passiva e ativa diante de estímulo condicionado.



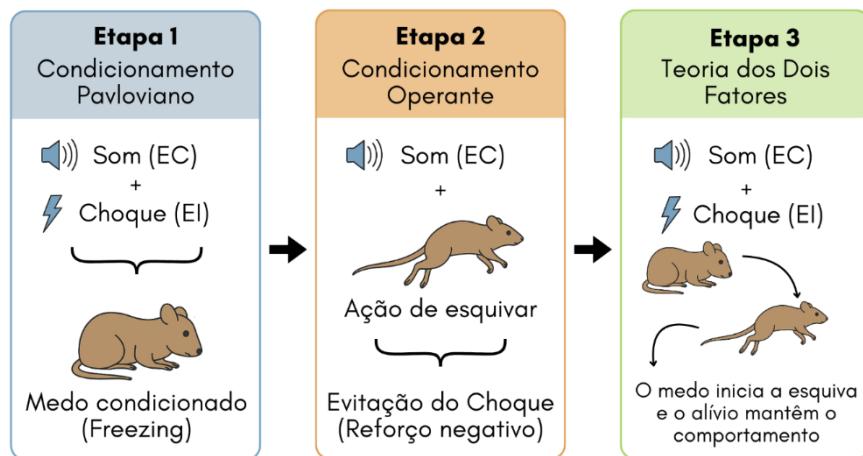
Fonte: Autoria própria. Ano 2025.

Representação comparativa entre respostas defensivas passiva (*freezing*) e ativa (esquiva) frente a um estímulo condicionado (som) que prediz um estímulo aversivo (choque).

Esse teste tem sido interpretado como um modelo comportamental que envolve tanto mecanismos pavlovianos quanto operantes. Inicialmente, conforme descrito por Pavlov (1927), um estímulo neutro, como um som, pode adquirir a capacidade de evocar respostas condicionadas após ser repetidamente emparelhado com um estímulo incondicionado (EI). Em um segundo momento, de acordo com os princípios do condicionamento operante propostos por Skinner

(1938), o comportamento passou a ser compreendido como sendo moldado pelas consequências que o seguem. Skinner destacou que respostas seguidas por eventos reforçadores se tornam mais prováveis de ocorrer no futuro, enfatizando o papel do reforço na aprendizagem. A relação entre esses dois processos foi teorizada por Mowrer (1939, 1951), na chamada Teoria dos Dois Fatores, que propõe que o medo condicionado (pavloviano) impulsiona inicialmente a esquiva, mas sua manutenção depende do reforço negativo associado à evitação bem-sucedida (operante). Esse modelo foi posteriormente validado experimentalmente por Solomon e Wynne (1953), que demonstraram a transição do congelamento para a esquiva ativa em cães. Ao longo do treinamento, o comportamento do animal evoluiu de uma resposta passiva (*freezing*) para uma ação adaptativa (esquiva).

Figura 2 – Etapas do processo de aprendizagem no teste de esquiva ativa.



Fonte: Autoria própria. Ano 2025.

Na Etapa 1, o animal aprende a associar um estímulo condicionado (som) a um estímulo aversivo (choque), desenvolvendo medo condicionado expresso como *freezing*. Na Etapa 2, o animal aprende a emitir uma resposta ativa durante o sinal para evitar o choque, comportamento mantido por reforço negativo. Na Etapa 3, a Teoria da Dupla Motivação integra os dois processos: o medo inicia a resposta de esquiva e o alívio gerado pela evitação bem-sucedida reforça a manutenção do comportamento.

Além de sua base conceitual sólida, o teste de esquiva ativa é valorizado por sua versatilidade metodológica. Diversas variações foram desenvolvidas ao longo das últimas décadas, incluindo modelos que envolvem travessia entre compartimentos, manipulação de alavancas, corrida em roda ou situações de conflito motivacional, como na esquiva mediada por plataforma (Iso *et al.*, 1988; LeDoux *et al.*, 2017; Bravo-Rivera *et al.*, 2014). Cada uma dessas abordagens oferece vantagens específicas para a investigação de diferentes domínios do comportamento de evitação, como controle motor, motivação, supressão de respostas concorrentes e aprendizagem instrumental.

Assim, o teste de esquiva ativa permanece como uma ferramenta experimental de alta relevância e sofisticação, inserindo elementos clássicos da teoria da aprendizagem com recursos modernos de análise comportamental, neurobiológica e farmacológica. Sua aplicabilidade em diferentes contextos experimentais o torna indispensável para a compreensão das respostas defensivas adaptativas e de seus desvios em modelos pré-clínicos de disfunção emocional e cognitiva.

2. FUNDAMENTOS E PROTOCOLOS DO TESTE DE ESQUIVA ATIVA

2.1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS E HISTÓRICOS

O teste de esquiva ativa tem sua base na psicologia experimental do século XX. Sua fundamentação teórica se fundamenta na Teoria dos Dois Fatores, proposta por Mowrer (1939, 1951), que integrou os princípios do condicionamento pavloviano e operante para explicar o surgimento e a manutenção das respostas de esquiva. Segundo essa teoria, a aprendizagem da esquiva ocorre em duas etapas interdependentes: a primeira se refere a um estímulo inicialmente neutro (como um som) que adquire valor aversivo ao ser repetidamente pareado com um EI nocivo (como um choque), gerando uma resposta emocional condicionada, como o *freezing*. E a segunda onde uma ação instrumental emitida durante o EC (como atravessar um compartimento) é reforçada, pois evita a ocorrência do estímulo aversivo e promove alívio.

Mas essa teoria só foi confirmada experimentalmente por Solomon e Wynne (1953), em estudos com cães submetidos ao teste de *shuttle box*. Eles demonstraram que, com o treinamento, os animais substituíam progressivamente a resposta reflexa de congelamento por comportamentos ativos de esquiva, mesmo quando o estímulo aversivo deixava de ocorrer. Esses achados deram suporte empírico à ideia de que o comportamento é mantido por reforçamento negativo antecipado, consolidando a validade da Teoria dos Dois Fatores no contexto da psicologia da aprendizagem.

Com os avanços nas neurociências, as formulações comportamentais clássicas da esquiva foram ampliadas por modelos que incorporam fatores motivacionais, cognitivos e neurobiológicos. LeDoux *et al.* (2017) argumentam que a esquiva não pode ser reduzida a simples associações estímulo-resposta, sendo um fenômeno multifacetado que envolve estratégias reflexas e deliberadas, moduladas por processos como expectativa, controle e tomada de decisão. Estruturas como a amígdala central, o núcleo accumbens e o córtex pré-frontal medial participam dinamicamente do aprendizado e da expressão da esquiva, especialmente em contextos que exigem avaliação de riscos e consequências.

2.2. VARIAÇÕES DE PROTOCOLO

O teste de esquiva ativa apresenta diversas variações metodológicas, que visa atender a diferentes objetivos experimentais e hipóteses neurobiológicas. Dentre elas, quatro configurações se destacam como as mais consolidadas na literatura: a esquiva em caixa de vaivém (*shuttle box*), a esquiva por corrida em roda, a esquiva por pressão de alavanca e a esquiva mediada por plataforma. Cada uma dessas variações possui características operacionais específicas, envolvendo diferenças nos estímulos utilizados, no tipo de resposta esperada e nos parâmetros temporais empregados durante o treinamento e teste.

2.2.1. Esquiva em caixa de vaivém

O teste de esquiva ativa em caixa de vaivém é um modelo clássico de aprendizagem aversiva em roedores, no qual o animal aprende a evitar um estímulo nocivo emitindo uma resposta locomotora simples: atravessar de um compartimento para o outro. O aparato é composto por uma câmara dividida em dois compartimentos idênticos, conectados por uma abertura central, com piso de barras metálicas por onde é administrado o choque (Figura 3A). Cada ensaio se inicia com a apresentação de um EC, geralmente um som contínuo ou uma luz intermitente, com duração média de 10 segundos. Caso o animal atravesse durante o EC, o choque é evitado (resposta de esquiva); se não houver resposta nesse intervalo, aplica-se um estímulo aversivo, geralmente um choque de 0,3 a 0,6 mA por até 10 segundos, que cessa caso o animal se desloque após seu início (resposta de fuga). Os experimentos variam de 20 a 50 ensaios por sessão, com intervalos inter-ensaio (ITIs) fixos entre 30 e 60 segundos. Durante os ITIs, o animal pode circular livremente entre os compartimentos, e essas respostas são frequentemente registradas como indicativas de impulsividade, habituação ou conflito motivacional. A aprendizagem é avaliada pela frequência de respostas de esquiva e pela redução progressiva nas latências de travessia. Trata-se de um modelo amplamente utilizado para o estudo de aprendizagem aversiva, regulação emocional e modulação farmacológica de comportamentos defensivos (Berezhnov; Zamorina; Inozemtsev, 2020; Blatt, 1976; Everss; Parra, 1998).

2.2.2. Esquiva por corrida em roda

A esquiva ativa por corrida em roda é uma variação menos convencional, na qual a resposta de evitação consiste na movimentação da roda giratória. O aparato utilizado consiste em uma roda metálica de cerca de 36 cm de diâmetro, com piso formado por barras condutoras de latão, conectadas a um sistema de aplicação de choque elétrico (0,25 mA em corrente alternada). A roda é acoplada a sensores magnéticos dispostos em intervalos de 90°, permitindo o registro

automatizado das respostas válidas, que exigem uma rotação contínua mínima de um quarto de volta. O animal é colocado individualmente dentro da roda, instalada em uma câmara isolada acusticamente e visualmente, com iluminação controlada (Figura 3B).

O protocolo inicia com uma fase de habituação, na qual o EC, geralmente luz intermitente por 5 segundos, é apresentado isoladamente por múltiplas tentativas, até que o animal deixe de responder espontaneamente ao EC. Uma resposta durante o EC (giro mínimo de 90° na roda) termina o estímulo e inicia o intervalo ITI, fixado em 60 segundos. Na fase de treino, o EC continua a ser apresentado por 5 segundos, sendo seguido de um choque elétrico (0,25 mA por corrente alternada) administrado pelas barras da roda caso o animal não realize a resposta de esquiva no tempo estipulado. O choque cessa quando o animal inicia o movimento rotacional, caracterizando a resposta de fuga (Blatt, 1976).

A tarefa pode ser executada sob duas condições distintas: com ou sem punição das respostas ITRs. Quando ITRs são punidas (condição PUN), cada quarto de volta realizado durante o ITI resulta na aplicação de um breve choque de 0,25 mA, criando um conflito comportamental adicional e aumentando a exigência da tarefa. Já na condição sem punição (UNPUN), as respostas durante o ITI não têm consequências aversivas. O desempenho é avaliado pela proporção de respostas de esquiva e pelo número de tentativas necessárias para atingir critérios progressivos de aprendizagem. A resposta é registrada apenas quando há rotação contínua de pelo menos um quarto de volta, garantindo que pequenos movimentos ou oscilações da roda não sejam considerados (Blatt, 1976).

2.2.3. Esquiva por pressão de alavanca

A esquiva ativa por pressão de alavanca é um modelo amplamente utilizado para investigar aprendizagem instrumental de evitação de estímulos aversivos. Nesse modelo, o animal aprende a pressionar uma alavanca para evitar (esquiva) ou interromper (fuga) a administração de um estímulo negativo, usualmente um choque elétrico aplicado ao piso da câmara experimental (Figura 3C). Por não envolver respostas inatas de defesa, como correr ou pular, esse modelo exige uma aprendizagem mais elaborada e é sensível a intervenções farmacológicas e manipulações motivacionais (Brennan; Beck; Servatius, 2003).

No estudo conduzido por Brennan *et al.* (2003), ratos foram treinados em um protocolo de esquiva com ensaio discreto (*discrete-trial*). O experimento consistia na apresentação de um tom contínuo de 1000 Hz com duração de 60 segundos, servindo como EC. Se o animal pressionasse a alavanca durante esse intervalo, o choque era evitado e iniciava-se um período de segurança sinalizado por uma luz piscante. Caso não houvesse resposta durante o tom, eram aplicados

choques elétricos intermitentes (1 mA, 1 s) até que a alavanca fosse pressionada, caracterizando uma resposta de fuga. O protocolo foi conduzido em sessões de duas horas diárias, por quatro dias consecutivos, com grupos de animais submetidos a diferentes durações fixas do sinal de segurança (1, 2, 4 ou 6 minutos). Os autores observaram que todas as durações do sinal permitiram aquisição eficiente da resposta de esquiva, mas durações mais curtas foram associadas a maior frequência de pressões de alavanca durante o período seguro, possivelmente indicando maior estado de ansiedade residual.

Por outro lado, Fernando *et al.* (2014) empregaram um modelo de esquiva por alavanca em regime de operação livre (*free-operant avoidance*), no qual o animal podia emitir a resposta instrumental a qualquer momento, sem delimitação por tentativas discretas. Neste protocolo, a resposta de alavanca evitava a aplicação do choque e era seguida pela apresentação de um sinal de segurança auditivo de 5 segundos (ruído branco ou tom de 2900 Hz). As respostas realizadas durante o sinal de segurança não produziam qualquer consequência, o que permitia avaliar seu possível efeito inibitório sobre o comportamento instrumental. Os autores demonstraram que a retirada desse sinal de segurança resultava em aumento das respostas durante o período de segurança não sinalizado, sugerindo que o sinal possuía propriedades inibitórias condicionadas. Além disso, foi observado que o sinal de segurança funcionava como um reforçador condicionado da resposta de esquiva, mantendo a emissão da resposta mesmo na ausência do estímulo aversivo primário (choque).

2.2.4. Esquiva mediada por plataforma

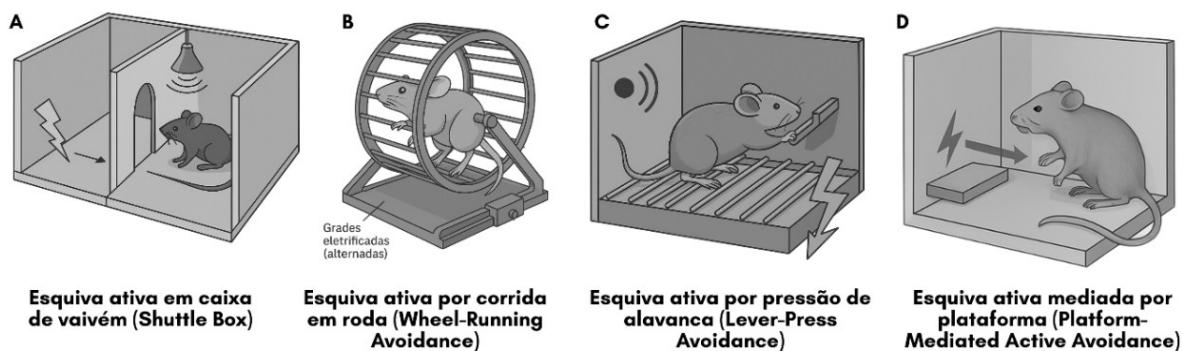
A esquiva ativa mediada por plataforma é um modelo experimental que avalia a aprendizagem aversiva sinalizada em situações de conflito entre a busca por recompensas e a evitação de estímulos ameaçadores. Nesse modelo, o animal aprende a evitar um choque previsto por um estímulo auditivo condicionado ao se posicionar sobre uma plataforma elevada situada dentro da mesma câmara onde ocorrem os eventos aversivos. Ao contrário dos testes tradicionais de esquiva ativa, em que o animal precisa locomover-se para outro compartimento, nessa variação o comportamento de esquiva se dá pela permanência do animal sobre a plataforma, mesmo com a presença de reforçadores positivos em outra área da câmara, o que caracteriza uma situação de decisão baseada em custo-benefício (Kramer *et al.*, 2025) (Figura 4D).

O protocolo padrão é estruturado em diferentes fases. Inicialmente, os animais passam por um período de condicionamento operante, durante o qual aprendem a pressionar uma alavanca para receber recompensas alimentares. Em seguida, são submetidos à fase de aquisição da esquiva, que compreende sessões diárias de apresentação de um EC, geralmente um som puro de

4 a 6 kHz com intensidade de 75 dB e duração de 30 segundos, imediatamente seguido por um EI, um choque breve (0,4–0,5 mA por 1–2 segundos), aplicado pela grade do piso. Durante o EC, os animais podem evitar o choque ao se posicionarem voluntariamente sobre a plataforma, localizada no canto oposto à alavanca e ao comedouro, o que implica interromper o comportamento de busca por recompensa (López-Moraga; Luyten; Beckers, 2025; Kramer *et al.*, 2025).

Adaptações recentes do modelo incorporaram o contexto social à tarefa. Kramer *et al.* (2025) propuseram uma variação denominada *Social Partner PMA*, na qual dois ratos são colocados em lados opostos de uma câmara dividida por uma barreira translúcida e perfurada. Ambos os animais passam pelo mesmo protocolo de condicionamento, mas com acesso visual, olfativo e auditivo ao seu par. Essa modificação permitiu investigar como a presença de outro animal da mesma espécie influencia a aquisição e expressão das respostas de esquiva, congelamento e supressão da alavanca. Os autores observaram que, embora os índices comportamentais básicos de esquiva não diferissem entre os contextos social e solitário, os animais no contexto social apresentaram maior *freezing* ao final do treinamento, sugerindo um impacto modulador da presença social sobre a expressão emocional do medo (Kramer *et al.*, 2025).

Figura 3 – Variações do Teste de Esquiva Ativa em Roedores



Fonte: Autoria própria. Ano 2025.

(A) Caixa de vaivém (*Shuttle Box*). (B) Modelo de corrida em roda. (C) Modelo por ressão de alavanca. (D) Modelo de plataforma.

3. BASES NEUROANATÔMICAS E NEUROQUÍMICAS DO TESTE DE ESQUIVA ATIVA

3.1. AMÍGDALA: CODIFICAÇÃO EMOCIONAL E EXPRESSÃO DE MEDO

A amígdala, especialmente seu núcleo lateral (LA), desempenha papel central na aquisição de respostas defensivas aprendidas, como o comportamento de esquiva ativa. Durante o condicionamento, EC, como sinais auditivos, e EI, como choques elétricos, são associados no LA, favorecendo o aprendizado aversivo por meio de mecanismos pavlovianos. Este núcleo integra o complexo basolateral da amígdala (BLA), que projeta para estruturas envolvidas na execução de respostas defensivas, incluindo o núcleo central da amígdala (CeA), uma via crítica para a expressão do medo condicionado (Bravo-Rivera *et al.*, 2014; LeDoux *et al.*, 2017).

Estudos com inativação farmacológica demonstram que o BLA é essencial para a expressão da esquiva ativa, e sua inibição reduz esse comportamento (Bravo-Rivera *et al.*, 2014).

A CeA, por sua vez, é fortemente envolvida na expressão de respostas reflexas passivas, como o congelamento, mediadas por vias pavlovianas. Em contrapartida, o aprendizado instrumental requerido para a esquiva ativa depende da inibição funcional dessas respostas reflexas. Essa modulação ocorre por meio de circuitos corticais, como o córtex pré-frontal infralímbico, que atua inibindo a atividade da CeA e permitindo a expressão de comportamentos proativos frente à ameaça (Moscarello & LeDoux, 2013).

Além disso, neuromoduladores como a norepinefrina exercem papel importante na aquisição da memória emocional. Estudos demonstram que os receptores β -adrenérgicos na amígdala lateral são necessários para a formação da memória do medo condicionado auditivo, especialmente quando ativados durante o treinamento (Bush *et al.*, 2010).

3.2. CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL: INTEGRAÇÃO E CONTROLE EXECUTIVO

O córtex pré-frontal medial (CPFm) é uma estrutura fundamental para a regulação da expressão de comportamentos defensivos, integrando informações contextuais e emocionais para modular a seleção entre respostas passivas e ativas. Suas principais subáreas, o córtex pré-límbico (PL) e o córtex infralímbico (IL), apresentam papéis funcionalmente distintos nesse processo. O PL está diretamente envolvido na expressão da esquiva ativa. Dados experimentais demonstram que sua inibição farmacológica reduz significativamente o número de respostas de esquiva em roedores, sem afetar o comportamento de congelamento, o que indica um papel específico dessa região na emissão de respostas proativas frente à ameaça (Bravo-Rivera *et al.*, 2014).

Por outro lado, o IL atua predominantemente na inibição de respostas defensivas previamente aprendidas, desempenhando papel importante no processo de extinção do medo. Sua ativação está associada à supressão da esquiva após a retirada do estímulo aversivo, favorecendo a transição para comportamentos adaptativos em contextos seguros (LeDoux *et al.*, 2017).

Do ponto de vista neuroquímico, o CPFm recebe projeções serotoninérgicas do núcleo da rafe dorsal, e a serotonina exerce papel relevante na modulação de respostas de ansiedade e esquiva inibitória. De acordo com o modelo funcional proposto por Graeff e Zangrossi, a serotonina no CPFm promove comportamentos de evitação passiva, estando associada ao controle da ansiedade diante de ameaças distais ou potenciais (Graeff; Zangrossi, 2010).

3.3. HIPOCAMPO: CODIFICAÇÃO CONTEXTUAL E GENERALIZAÇÃO

O hipocampo, especialmente sua porção dorsal, desempenha papel fundamental na codificação contextual de experiências aversivas. Essa estrutura permite ao organismo distinguir entre ambientes seguros e ameaçadores, modulando a expressão de comportamentos defensivos de forma adaptativa. Lesões hipocampais comprometem a capacidade de discriminar esses contextos, favorecendo a generalização do medo e resultando em prejuízos na esquiva adaptativa (Blanchard; Blanchard, 2001).

A participação do hipocampo na modulação do medo e da esquiva envolve mecanismos de plasticidade sináptica mediados por receptores de glutamato e glicocorticoides, altamente sensíveis ao estresse. Fatores moleculares como o BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) e a CREB (proteína ligadora do elemento de resposta ao AMPc) também desempenham papel essencial na consolidação das memórias associativas relacionadas ao contexto, sendo especialmente relevantes na regulação da generalização do medo (Zelikowsky *et al.*, 2013).

3.4. ESTRIADO VENTRAL (NÚCLEO ACCUMBENS): VALÊNCIA E SELEÇÃO DE RESPOSTAS AVERSIVAS

O núcleo accumbens (NAc) atua como uma estrutura central na integração de sinais relacionados à valência motivacional de estímulos ambientais, mediando o equilíbrio entre comportamentos de aproximação e esquiva. Ele recebe aferências do córtex pré-frontal medial, hipocampo e amígdala, sendo uma interface crítica entre os sistemas de recompensa e aversão, modulada principalmente pela dopamina mesolímbica (Bravo-Rivera *et al.*, 2014).

Estudos demonstraram que a liberação de dopamina no NAc durante tarefas de esquiva é dinâmica e preditiva: em modelos de esquiva sinalizada, surtos de liberação dopaminérgica de

curta duração (subsegundos) ocorrem na apresentação do sinal de aviso, antecipando com sucesso a resposta de esquiva e prevenindo o choque (Oleson *et al.*, 2012).

Esses achados sugerem que a dopamina no NAc não apenas codifica recompensas, mas também reforça a evitação bem-sucedida, funcionando como um sinal de aprendizado para evitar consequências negativas (Oleson *et al.*, 2012; Bravo-Rivera *et al.*, 2014).

4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAS

Modelos baseados em esquiva ativa têm sido empregados para estudar transtornos nos quais a evitação excessiva ou disfuncional é uma característica marcante. LeDoux *et al.* (2017) e Moscarello e LeDoux (2013) discutem como a esquiva ativa oferece uma abordagem translacional relevante para entender os circuitos que governam respostas defensivas em situações de ameaça previsível, como nos transtornos de ansiedade.

Zelikowsky *et al.* (2013) reforçam a aplicabilidade do teste de esquiva para a investigação do transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), ao demonstrar que a perda da função hipocampal promove uma generalização do medo, prejudicando a modulação contextual do comportamento defensivo. Essa falha em discriminar contextos seguros de perigosos é uma característica fundamental do TEPT.

Mais recentemente, Kramer *et al.* (2025) utilizaram uma versão adaptada do paradigma de esquiva mediada por plataforma, inserindo elementos de recompensa e tomada de decisão em ambiente social. Os autores observaram que o conflito entre evitação de um estímulo aversivo e a busca por reforçadores positivos permite investigar comportamentos compatíveis com sintomas de anedonia e disfunção motivacional observados em quadros depressivos.

A sensibilidade do teste de esquiva ativa a manipulações farmacológicas tem permitido sua aplicação como plataforma de triagem de compostos com potencial efeito ansiolítico ou ansiogênico. Graeff e Zangrossi (2010) relatam que benzodiazepínicos como o diazepam, assim como agonistas 5-HT1A, como a buspirona, promovem redução da esquiva, atuando sobre circuitos de defesa mediados por GABA e serotonina, respectivamente.

Bush *et al.* (2010) demonstraram que a administração intra-amigdalar de propranolol, um antagonista β -adrenérgico, inibe a aquisição de respostas condicionadas de medo auditivo, embora não interfira em sua consolidação. Esses achados ressaltam o papel da norepinefrina na facilitação da aprendizagem aversiva e destacam a utilidade do teste de esquiva para avaliação de fármacos que atuam sobre esse sistema.

No polo oposto, Fernando *et al.* (2014) utilizaram um paradigma de esquiva por alavanca em regime de operação livre para estudar os efeitos da sinalização de segurança sobre o

comportamento de evitação. Os autores observaram que a retirada do estímulo de segurança aumentava a emissão de respostas, indicando um papel inibitório condicionado do sinal. Esse modelo tem sido útil para avaliar substâncias ansiogênicas ou desorganizadoras da inibição comportamental, como os psicoestimulantes.

No campo da farmacologia experimental, Oleson *et al.* (2012) demonstraram que a liberação física de dopamina no núcleo accumbens shell prediz com precisão tanto o evitamento bem-sucedido de um estímulo aversivo quanto a resposta ao castigo condicionado. Esses dados sustentam o uso da esquiva ativa como modelo para estudar a modulação dopaminérgica da motivação e da ação dirigida à evitação.

Além disso, Kramer *et al.* (2025) propuseram uma versão social do teste de esquiva mediada por plataforma, observando que a presença de um congênere modula a expressão de respostas defensivas como *freezing*, mesmo quando a performance de esquiva ativa permanece inalterada. Isso abre espaço para a investigação de compostos que afetam a cognição social e os comportamentos afiliativos no contexto da evitação.

Bravo-Rivera *et al.* (2014), por sua vez, identificaram que a ativação da via BLA-NAc shell é necessária e suficiente para a expressão da esquiva ativa, reforçando a relevância do circuito dopaminérgico e da avaliação da valência emocional na seleção da resposta defensiva.

5. LIMITAÇÕES E DESAFIOS METODOLÓGICOS

Embora o teste de esquiva ativa seja amplamente utilizado em neurociência comportamental e psicofarmacologia, ele apresenta limitações metodológicas e conceituais que devem ser consideradas na sua interpretação e aplicação translacional.

Uma das principais dificuldades envolve a distinção entre respostas de esquiva ativa e congelamento, que podem competir entre si ao longo do treinamento. Estudos de Moscarello e LeDoux (2013) e Bravo-Rivera *et al.* (2014) mostram que, nas fases iniciais do condicionamento, o animal tende a exibir respostas passivas como o congelamento, especialmente quando a ameaça é inesperada ou pouco controlável. Apenas após certo aprendizado, a esquiva se consolida como estratégia dominante, modulada pelo córtex pré-frontal medial. No entanto, essa transição pode variar amplamente entre indivíduos, linhagens e condições experimentais.

Outra limitação envolve a variabilidade entre protocolos. Existem diversas versões do teste de esquiva ativa (caixa de vaivém, alavanca, corrida em roda, plataforma), cada uma com características distintas quanto à natureza da resposta exigida, o tipo de reforço e a complexidade da tarefa. Essa diversidade metodológica dificulta a comparação direta entre estudos e pode

comprometer a reprodutibilidade dos achados, como apontado por Fernando *et al.* (2014) ao discutir os efeitos da presença ou ausência de sinais de segurança na esquiva instrumental.

Do ponto de vista técnico, o teste exige aparelhagem específica, habituação cuidadosa dos animais e controle preciso de variáveis como intensidade do choque, duração do estímulo condicionado e tempo entre tentativas. Pequenas variações nesses parâmetros podem impactar significativamente a aquisição da resposta, como relatado por Blatt (1976) e Brennan *et al.* (2003).

Em relação à validade translacional, embora muitos fármacos com eficácia clínica demonstrem efeitos previsíveis no modelo (como ansiolíticos que reduzem esquiva), nem sempre os comportamentos observados são diretamente equivalentes aos sintomas humanos. Por exemplo, o comportamento de esquiva pode representar tanto um sinal de medo adaptativo quanto uma estratégia motivacional baseada em reforço negativo, o que levanta questões sobre sua especificidade diagnóstica (LeDoux *et al.*, 2017).

Por fim, estudos como os de Kramer *et al.* (2025) e Zelikowsky *et al.* (2013) apontam para a influência de fatores contextuais e sociais na expressão do comportamento de esquiva. A presença de outros animais, a familiaridade com o ambiente e o histórico de reforço podem alterar substancialmente os resultados, sugerindo que interpretações simplistas devem ser evitadas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste de esquiva ativa é uma ferramenta valiosa na investigação dos mecanismos neurais e comportamentais relacionados à aprendizagem aversiva, regulação emocional e tomada de decisão. Sua sensibilidade a manipulações farmacológicas e circuitos cerebrais específicos o torna útil no desenvolvimento de novos fármacos para transtornos psiquiátricos.

Apesar de sua robustez, o modelo apresenta limitações metodológicas e exige padronização cuidadosa e interpretação criteriosa dos dados. Ainda assim, sua versatilidade e validade translacional reforçam seu papel central na neurociência comportamental e na psicofarmacologia pré-clínica.

REFERÊNCIAS

BEREZHNOY, D. S.; ZAMORINA, T. A.; INOZEMTSEV, A. N. Appetitive conditioning task in a shuttle box and its comparison with the active avoidance paradigm. *Learning & Behavior*, v. 48, p. 364-372, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3758/s13420-020-00422-9>.

BLATT, R. C. Facilitation and nonfacilitation of active avoidance behavior of rats with septal lesions in the shuttle box and running wheel. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, v. 90, n. 7, p. 704-713, 1976. DOI: <https://doi.org/10.1037/h0077276>.

BRAVO-RIVERA, C.; ROMAN-ORTIZ, C.; BRIGNONI-PEREZ, E.; SOTRES-BAYON, F.; QUIRK, G. J. Neural structures mediating expression and extinction of platform-mediated avoidance. **The Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 29, p. 9736–9742, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0191-14.2014>.

BRENNAN, F. X.; BECK, K. D.; SERVATIUS, R. J. Leverpress escape/avoidance conditioning in rats: safety signal length and avoidance performance. **Integrative Physiological and Behavioral Science**, v. 38, n. 1, p. 36–44, 2003.

BUSH, D. E. A.; CAPAROSA, E. M.; GEKKER, A.; LEDOUX, J. E. Beta-adrenergic receptors in the lateral nucleus of the amygdala contribute to the acquisition but not the consolidation of auditory fear conditioning. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 4, p. 154, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00154>.

DIEHL, M. M.; BRAVO-RIVERA, C.; RODRIGUEZ-ROMAGUERA, J.; PAGAN-RIVERA, P. A.; BURGOS-ROBLES, A.; ROMAN-ORTIZ, C.; QUIRK, G. J. Active avoidance requires inhibitory signaling in the rodent prelimbic prefrontal cortex. **eLife**, v. 7, e34657, 2018. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34657>.

EVERSS, E.; PARRA, A. Inhibitory avoidance with a two-way shuttle-box. **Psicothema**, v. 10, n. 2, p. 387–391, 1998. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=72710212>. Acesso em: 13 jul. 2025.

FERNANDO, A. B. P.; MAR, A. C.; URCELAY, G. P.; DICKINSON, A.; ROBBINS, T. W. Avoidance behavior: a free-operant lever-press avoidance task for the assessment of the effects of safety signals. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 70, p. 8.32.1–8.32.12, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0832s70>.

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI, H. The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, 2010.

ISO, H.; BRUSH, F. R.; FUJII, M.; SHIMAZAKI, M. Running-wheel avoidance learning in rats (*Rattus norvegicus*): effects of contingencies and comparisons of different strains. **Journal of Comparative Psychology**, v. 102, n. 4, p. 350–371, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1037/0735-7036.102.4.350>.

KRAMER, C.; RUBLE, S.; FORT, T. D.; WEST, L.; DIEHL, M. M. Modifying the platform-mediated avoidance task: a new protocol to study active avoidance within a social context in rats. **PLOS ONE**, v. 20, n. 4, e0321776, 29 abr. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0321776>.

LEDOUX, J. E.; MOSCARELLO, J. M.; SEARS, R. M.; CAMPENSE, V. D. The birth, death and resurrection of avoidance: a reconceptualization of a troubled paradigm. **Molecular Psychiatry**, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/mp.2016.166>.

LÓPEZ-MORAGA, A.; LUYTEN, L.; BECKERS, T. Generalization and extinction of platform-mediated avoidance in male and female rats. **Scientific Reports**, v. 15, n. 9730, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-94265-x>.

MOSCARELLO, J. M.; LEDOUX, J. E. Active avoidance learning requires prefrontal suppression of amygdala-mediated defensive reactions. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 9, p. 3815–3823, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2596-12.2013>.

MOWRER, O. H. A stimulus-response analysis of anxiety and its role as a reinforcing agent. **Psychological Review**, v. 46, n. 6, p. 553–565, 1939. DOI: <https://doi.org/10.1037/h0056753>.

MOWRER, O. H. **Learning theory and behavior**. New York: Wiley, 1951.

OLESON, E. B.; NICHOLSON, S. P.; GREENE, A. J.; GRILLON, C.; CARELLI, R. M. Subsecond dopamine release in the nucleus accumbens predicts conditioned punishment and its successful avoidance. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 42, p. 14804–14808, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3087-12.2012>.

PAVLOV, I. P. **Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex**. Oxford: Oxford University Press, 1927.

SKINNER, B. F. **The behavior of organisms: an experimental analysis**. New York: Appleton-Century-Crofts, 1938.

SOLOMON, R. L.; WYNNE, L. C. Traumatic avoidance learning: the outcomes of several extinction procedures with dogs. **Journal of Abnormal and Social Psychology**, v. 47, n. 3, p. 291–302, 1953. DOI: <https://doi.org/10.1037/h0060881>.

CAPÍTULO VIII

O MODELO DE KINDLING NA PESQUISA PRÉ-CLÍNICA EM EPILEPSIA: APLICAÇÕES, LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

THE KINDLING MODEL IN PRECLINICAL EPILEPSY RESEARCH: APPLICATIONS, LIMITATIONS, AND PERSPECTIVES

DOI: 10.51859/ampilla.nat298.1126-8

Isadora Porto de Andrade ¹

David Ribeiro Fontenele ²

Jean Lucas Ibiapina de Sousa ³

Ana Karoline Lourenço de Menezes ⁴

¹ Mestranda em Ciências Fisiológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - UECE

² Graduando do curso de Ciências Biológicas. Universidade Estadual do Ceará - UECE

³ Graduando do curso de Fisioterapia. Centro Universitário Christus - Unichristus

⁴ Graduanda do curso de Medicina Veterinária. Universidade Estadual do Ceará - UECE

RESUMO

O modelo de *kindling* é amplamente utilizado na pesquisa pré-clínica em epilepsia, permitindo a investigação dos mecanismos neurobiológicos subjacentes à epileptogênese. A indução repetida de estímulos sub convulsivos em áreas específicas do cérebro resulta em crises progressivas, proporcionando uma plataforma para estudar a evolução da doença e testar potenciais terapias. Este modelo tem sido fundamental na compreensão da resistência farmacológica, afetando até 40% dos pacientes com epilepsia refratária, e na análise de comorbidades psiquiátricas associadas, como a depressão, que compartilham substratos neurobiológicos semelhantes entre humanos e animais. Além disso, o *kindling* tem sido essencial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, incluindo a avaliação de fármacos antiepilépticos e modificadores da doença. Apesar de suas contribuições significativas, o modelo apresenta limitações, como a variabilidade na resposta dos animais e a necessidade de protocolos rigorosos para garantir a reprodutibilidade dos resultados. Contudo, quando aplicado corretamente, o *kindling* continua sendo uma ferramenta valiosa na pesquisa de epilepsia, fornecendo insights

cruciais para o avanço do entendimento da doença e o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes.

Palavras-chave: Kindling. Epilepsia. Pré-clínico. Translacional.

ABSTRACT

The kindling model is widely used in preclinical epilepsy research, allowing the investigation of the neurobiological mechanisms underlying epileptogenesis. Repeated induction of subconvulsive stimuli in specific brain regions results in progressive seizures, providing a platform to study disease progression and test potential therapies. This model has been fundamental in understanding pharmacoresistance, which affects up to 40% of patients with refractory epilepsy, as well as in the analysis of associated psychiatric comorbidities, such as depression, which share similar neurobiological substrates in humans and animals. Furthermore, kindling has been essential for the development of new therapeutic approaches, including the evaluation of antiepileptic drugs and disease-modifying interventions. Despite its significant contributions, the model presents limitations,

such as variability in animal responses and the need for rigorous protocols to ensure reproducibility of results. However, when applied correctly, kindling remains a valuable tool in epilepsy research, providing crucial insights for

advancing the understanding of the disease and the development of more effective treatments.

Keywords: Kindling. Epilepsy. Preclinical. Translational.

1. INTRODUÇÃO

O método de indução a epilepsia *kindling* é um modelo convulsivo caracterizado pela suscetibilidade da ocorrência de convulsões devido à aplicação constante de estímulos elétricos em regiões específicas no cérebro de mamíferos (*kindling* elétrico), ou por indução química constante, com drogas em doses subconvulsivantes (*kindling* químico). No *kindling*, ocorrem alterações estruturais e funcionais de neurônios, no qual a sinapses glutamatérgicas excitatórias e GABAérgicas apresentam desequilíbrio eletrofisiológico (Schreber, 2001). Seu principal objetivo é simular o processo de epileptogênese em um cérebro saudável, a fim de compreender seus mecanismos fisiopatológicos e permitir o desenvolvimento de novos fármacos anticonvulsivantes e neuroprotetores.

O conceito foi introduzido por Goddard e seus colaboradores (1967, 1969), que observaram que ao aplicar estímulos elétricos em cérebros de ratos, gatos e macacos, a primeira estimulação apresentou pouco efeito comportamental e não desencadeou descargas eletrográficas. Entretanto, com a repetição constante das descargas, ocorreu alterações nas respostas aos estímulos, tornando-se mais intenso. Essa alteração foi caracterizada por descargas epilépticas, automatismos comportamentais e, consequentemente, convulsões clônicas bilaterais. Foi denominado de “*kindling effect*” o conjunto de alterações neurológicas graduais resultado dessa estimulação elétrica repetitiva. Os estudos realizados por Goddard evidenciou que a quantidade de estimulações necessárias para provocar crises motoras presentes no “*kindling*” foi ideal em intervalos de 24 horas ou mais.

Em 1972, Mason e Cooper criaram um método de indução química *kindling* utilizando o pentilenotetrazol (PTZ). A administração de PTZ (20mg/kg) a cada 48 horas causou crises mioclônicas que evoluíram para crises tônico-clônicas generalizadas em ratos (Mason e Cooper, 1972). Posteriormente, estudos realizados por Karler, que reproduziu o modelo em camundongos utilizando doses crescentes de PTZ, concluiu que a administração de PTZ (50mg/kg) a cada 24 ou 48 horas induziu em torno de 80% dos animais, após a aplicação da droga em 15 injeções (Karler et al., 1989).

A partir deste modelo, é possível avaliar uma gama de alterações comportamentais complexas que mimetizam a condição humana. Os pesquisadores analisam desde a progressão das

crises, observando estágios como inquietação e espasmos (Shahpari, 2019), até déficits cognitivos, como falhas de memória espacial e de reconhecimento (Mortazavi et al., 2005). Além disso, o modelo permite o estudo de alterações emocionais, como comportamento análogos à depressão e à ansiedade, que são quantificados por meio de testes específicos como o nado forçado e o labirinto cruz elevado (Godlevsky et al, 2014; Zhu et al., 2017)

Este capítulo detalha como modelos como o *kindling* são usados para desenvolver fármacos mais eficazes, conectando os resultados dos testes à melhoria do tratamento e da qualidade de vida de pacientes com epilepsia.

2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O princípio do modelo reside na indução gradativa da excitabilidade neuronal, permitindo o estudo dos mecanismos de plasticidade sináptica e das alterações comportamentais associadas à cronificação das crises. A resposta convulsiva evolui de forma previsível, partindo de manifestações discretas até crises tônico-clônicas generalizadas, o que confere ao método alta reproduzibilidade e sensibilidade à ação de fármacos anticonvulsivantes (Mao et al., 2019).

Para a condução do protocolo, é essencial a disponibilidade e o uso adequado de materiais e equipamentos laboratoriais. Entre os itens básicos, inclui-se aparato transparente para observação comportamental dos animais (40 × 40 × 30 cm) e cronômetro. Alguns recursos adicionais, como sistemas de vídeo e softwares de análise comportamental, podem ser empregados para registro e quantificação das crises.

O modelo pode ser conduzido por dois métodos principais: indução química e indução elétrica. No kindling químico, o agente mais amplamente utilizado é o pentilenotetrazol (PTZ), considerado o padrão ouro para indução de convulsões subclínicas. O PTZ é geralmente administrado por via intraperitoneal na dose de 35 mg/kg. A administração é realizada de forma intermitente, a cada dois ou três dias, durante um período de três a quatro semanas, ou até que o animal desenvolva crises recorrentes e previsíveis. A progressão das respostas convulsivas pode ser quantificada pela Escala de Racine Modificada, apresentada na Tabela 1, que permite classificar a gravidade dos episódios de acordo com parâmetros motores e comportamentais (Erum et al., 2019).

Tabela 1 – Parâmetros utilizados nos testes de convulsão

ESCALA DE RACINE MODIFICADA	
GRAU	COMPORTAMENTO
0	Ausência de manifestações clínicas visíveis
1	Tremores nas vibrissas e movimentos faciais simples
2	Clônicas unilaterais nos membros anteriores ou cauda
3	Clônicas bilaterais intensas com espasmos musculares
4	“Rearing” (quando o animal se ergue sobre as patas traseiras) com clônicas generalizadas
5	Convulsões tônico-clônicas generalizadas
6	Extensão tônica dos membros posteriores, podendo levar o animal a morte
7	Convulsão fatal

Fonte: (Erum *et al.*, 2019)

No kindling elétrico, a sensibilização neuronal é obtida por meio de estimulação direta de estruturas cerebrais específicas, como a amígdala ou o hipocampo. Para esse procedimento, o animal é anestesiado com xilazina e cetamina, e posicionado em aparelho estereotáxico. Eletrodos bipolares de nicromo (100 µm) são implantados na região alvo e fixados com cimento acrílico e parafusos de aço inoxidável. Após um período de recuperação de aproximadamente dez dias, inicia-se o protocolo de estimulação com pulsos elétricos (60 Hz, 2 s de duração, pulsos bifásicos de 1 ms a 2 V) até a determinação do limiar de pós-descarga (AD). Esse valor serve como referência para as estimulações subsequentes, aplicadas de forma regular até o estabelecimento do quadro epiléptico. Assim como no modelo químico, a severidade das crises é monitorada pela Escala de Racine (Chmielewska *et al.*, 2020).

Diversos parâmetros podem ser analisados ao longo de ambos protocolos, incluindo a latência para o início das convulsões, o número e a duração das crises, a progressão da gravidade e o tempo total necessário para o estabelecimento do estado epiléptico. Avaliações complementares, como análises imuno-histoquímicas e comportamentais, podem ser empregadas para investigar os efeitos do tratamento e os mecanismos neurobiológicos subjacentes.

3. BASES NEUROLÓGICAS DO KINDLING

A compreensão sobre os mecanismos que originam as crises epilépticas é um dos objetivos centrais da epileptologia. Para avançar nesse conhecimento, diversos modelos experimentais foram propostos, mas entre os que se dedicam à epilepsia focal crônica, o modelo de kindling (Goddard *et al.*, 1969) estabeleceu-se como um dos mais relevantes. Sua importância perdura, sendo ainda hoje um paradigma fundamental para investigar a epilepsia do lobo temporal e para a triagem de novos fármacos antiepilepticos (Löscher, 2017).

O fenômeno de kindling pode ser definido como um processo de epileptogênese gradual, no qual a aplicação repetida de um estímulo de baixa intensidade, inicialmente ineficaz, passa a deflagrar crises progressivamente mais severas. Essa evolução é classicamente documentada pela Escala de Racine (1972), que descreve a transição desde manifestações motoras focais (estágios 1 e 2) até uma crise tônico-clônica generalizada (estágio 5). O aspecto mais notável do modelo é a indução de alterações neuroplásticas permanentes. Uma vez que o cérebro atinge o estágio completo de kindling, ele desenvolve uma suscetibilidade crônica a crises, de modo que um único estímulo, mesmo meses depois, pode evocar uma convulsão generalizada (Goddard et al., 1969; Wada e Sato, 1974). É essa permanência que o torna um modelo tão valioso para o estudo da epilepsia como uma condição crônica (Bertram, 2007).

A base neurobiológica para esta transformação duradoura está em alterações na eficácia da comunicação sináptica, um processo que compartilha mecanismos com a Potenciação de Longo Prazo (PLP) (Schwartzkroin e Wyler, 1980). Pesquisas mais recentes aprofundaram essa compreensão, revelando que o kindling envolve uma complexa cascata de eventos moleculares, como a modulação de receptores (NMDA e AMPA), alterações na expressão gênica, reorganização de circuitos e até processos de neuroinflamação (Scorza et al., 2009; Löscher, 2017). No nível celular, essa hiperexcitabilidade se manifesta como despolarizações de grande amplitude que sustentam salvas de potenciais de ação. As pós-descargas (afterdischarges) geradas no foco primário são cruciais para o recrutamento de neurônios vizinhos, impulsionando a potenciação sináptica que "acende" o circuito epiléptico (Racine, 1972).

O fortalecimento sináptico não se restringe ao sítio de estimulação primário. Como já observado por Racine (1972), as vias que conectam o foco principal a áreas secundárias também são potencializadas. A neurociência contemporânea reinterpreta este fenômeno sob a ótica da teoria de redes, propondo que o kindling promova a organização de uma rede neuronal epiléptica distribuída. Com o tempo, essa rede se fortalece e torna-se mais facilmente ativável, o que oferece uma explicação plausível para a propagação da atividade convulsiva e a cronificação da epilepsia (Bertram, 2007; Löscher & Schmidt, 2011).

4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS

O kindling apresenta grande relevância na neurociência experimental, permitindo investigar alterações anatômicas e moleculares decorrentes de eventos epileptogênicos, incluindo neurodegeneração generalizada, neuroinflamação, desregulação de canais iônicos, estresse oxidativo e reorganização de circuitos neurais (Dabrowska et al., 2019). Tanto a abordagem

química quanto a elétrica possibilitam a análise dessas alterações de forma controlada, oferecendo insights sobre os mecanismos de epileptogênese e a plasticidade neuronal.

Entre suas aplicações práticas, destaca-se o estudo e desenvolvimento de novas moléculas capazes de reduzir a progressão do kindling, possibilitando a identificação de fármacos antiepilépticos ou modificadores da doença. Estudos recentes demonstraram que intervenções farmacológicas com compostos moduladores de canais iônicos ou agentes antioxidantes podem retardar o aparecimento de crises ou reduzir sua severidade em animais submetidos a essa estratégia experimental (Li et al., 2021).

Além disso, o kindling é fundamental para investigar os mecanismos moleculares envolvidos na resistência a medicamentos em pacientes com epilepsia refratária, condição que afeta até 40% dos indivíduos tratados com dois ou mais anticonvulsivantes e que não respondem adequadamente aos fármacos disponíveis (Löscher; Brand, 2010; Welzel et al., 2020). Essa abordagem permite explorar novas estratégias terapêuticas e avaliar intervenções capazes de contornar a resistência, fornecendo dados valiosos para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes.

A metodologia também possibilita o estudo de comorbidades psiquiátricas frequentemente associadas à epilepsia, como a depressão, cujo substrato neurobiológico apresenta semelhanças entre animais e humanos (Welzel et al., 2020; Marazati et al., 2017). Animais submetidos ao kindling frequentemente apresentam alterações comportamentais e cognitivas que refletem déficits semelhantes aos encontrados em pacientes com epilepsia e comorbidades psiquiátricas, reforçando a relevância translacional dessa ferramenta.

Apesar dessas vantagens, é importante reconhecer suas limitações. Nem todas as formas de epilepsia humana podem ser reproduzidas, e nem todos os animais submetidos ao protocolo desenvolvem convulsões progressivas, o que gera variabilidade experimental. Além disso, essa estratégia experimental exige acompanhamento prolongado e cuidadoso, aumentando o trabalho necessário e demandando rigor ético e técnico na manipulação dos animais (Erkül; Arihan, 2015; Moshé et al., 1981).

Por permitir análises anatômicas, moleculares e comportamentais, o kindling continua sendo um recurso essencial na pesquisa pré-clínica, fornecendo subsídios para estratégias terapêuticas e para a compreensão de complicações associadas à epilepsia, como a resistência a fármacos e comorbilidades psiquiátricas (Löscher; Brand, 2010; Welzel et al., 2020; Marazati et al., 2017).

5. LIMITAÇÕES E DESAFIOS METODOLÓGICOS

Apesar de amplamente reconhecido pela sua relevância na investigação dos mecanismos de epileptogênese e na avaliação de potenciais agentes anticonvulsivantes, o modelo kindling apresenta limitações e desafios metodológicos que devem ser cuidadosamente considerados na condução experimental. Um dos principais entraves é a alta taxa de mortalidade observada durante protocolos prolongados, especialmente nas fases avançadas de sensibilização, quando as crises se tornam mais severas e podem evoluir para status epilepticus. Essa limitação foi relatada em estudos experimentais que observaram perda significativa de animais durante o processo de sensibilização convulsiva induzida por agentes químicos como o pentilenotetrazol (Erkül & Arihan, 2015; Li et al., 2021). Esse fator pode comprometer o tamanho amostral e impactar a análise estatística dos resultados.

Além disso, há uma variabilidade individual significativa na resposta dos animais aos estímulos convulsivos, independentemente de o kindling ser induzido por estímulos elétricos ou por agentes químicos. Em muitos casos, alguns indivíduos não desenvolvem a progressão típica das crises, mesmo após múltiplas exposições, sendo classificados como resistentes ao kindling (Moshé et al., 1981; Reddy et al., 2024). Essa resistência pode estar relacionada a diferenças genéticas, idade, peso corporal, estado hormonal ou mesmo à farmacocinética do agente indutor, resultando em inconsistências na padronização do modelo.

Outro desafio metodológico recorrente é a reproduzibilidade entre diferentes laboratórios, já que pequenas variações nas condições ambientais como temperatura, ciclo claro/escuro, ruído e manuseio dos animais, bem como na pureza do composto químico, intensidade e frequência dos estímulos aplicados, podem alterar o limiar convulsivo e a taxa de progressão das crises (Erkül & Arihan, 2015). A avaliação comportamental das crises, frequentemente baseada na escala de Racine, também constitui uma limitação importante, uma vez que depende da observação direta e da interpretação do pesquisador, o que pode introduzir subjetividade e vieses, especialmente nas fases iniciais do processo de sensibilização, quando os sinais comportamentais são sutis (Reddy et al., 2024).

Somam-se a esses fatores as exigências técnicas e logísticas do protocolo, que requerem acompanhamento contínuo dos animais durante um período prolongado, treinamento prévio dos pesquisadores e controle rigoroso de variáveis experimentais. Pequenas inconsistências na execução do protocolo podem comprometer a progressão do kindling e gerar resultados de difícil comparação entre estudos. Assim, embora o modelo kindling permaneça como uma ferramenta experimental de grande valor translacional, seu uso demanda rigor metodológico e padronização

criteriosa para minimizar perdas experimentais, reduzir vieses e garantir a confiabilidade dos achados científicos.

REFERÊNCIAS

- CHMIELEWSKA, N. et al. Pro-inflammatory cytokines, but not brain- and extracellular matrix-derived proteins, are increased in the plasma following electrically induced kindling of seizures. **Pharmacological Reports**, v. 73, n. 2, p. 506–515, 2021. DOI: 10.1007/s43440-020-00208-w.
- DABROWSKA, N. et al. Parallel pathways of seizure generalization. **Brain: a journal of neurology**, v. 142, p. 2336-2351, 2019. DOI: 10.1093/brain/awz170.
- ERKÜL, M.; ARIHAN, O. Pentylenetetrazole kindling epilepsy model. **Archives of Epilepsy**, v. 21, n. 1, p. 1–6, 2015. DOI: 10.14744/epilepsi.2015.08108.
- GODLEVSKY, L. et al. Anxiolytic and antidepressive effects of electric stimulation of the paleocerebellar cortex in pentylenetetrazol kindled rats. **Acta neurobiologiae experimentalis**, v. 74, p. 456-464, 2014. DOI: 10.55782/ane-2014-2008.
- HASHEMI, A. et al. Effects of GLP-1 receptor activation on a pentylenetetrazole-kindling rat model. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 66, n. 3, p. 399–407, 2018. DOI: 10.1007/s12031-018-1122-3.
- KALER, R. et al. Pentylenetetrazol kindling in mice. **Neuropharmacology**, v. 28, p. 775-780, 1989. DOI: 10.1016/0028-3908(89)90166-4.
- LI, H. et al. Behavioral and brain structural changes in kindled rats induced by *Coriaria* lactone and pentylenetetrazol. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 15, p. 727872, 2021. DOI: 10.3389/fnbeh.2021.727872.
- LÖSCHER, W.; BRANDT, C. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. **Pharmacological reviews**, v. 62, p. 668-700, 2010. DOI: 10.1124/pr.110.003046.
- MAO, Y. et al. Ferroptosis induction in pentylenetetrazole kindling and pilocarpine-induced epileptic seizures in mice. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p. 721, 2019. DOI: 10.3389/fnins.2019.00721.
- MARAZATI, A. et al. Neurobehavioral comorbidities of epilepsy: Role of inflammation. **Epilepsia**, v. 58, p. 48-56, 2017. DOI: 10.1111/epi.13786.
- MASON, C.; COOPER, R. A permanent change in convulsive threshold in normal and brain-damaged rats with repeated small doses of pentylenetetrazol. **Epilepsia**, v. 13, p. 663-674, 1972. DOI: 10.1111/j.1528-1157.1972.tb04401.x.
- MORTAZAVI, F. et al. Spatial learning deficits and emotional impairments in pentylenetetrazole-kindled rats. **Epilepsy & behavior**, v. 7, p. 629-638, 2005. DOI: 10.1016/j.yebeh.2005.08.019.
- MOSHÉ, S. L. et al. Kindling in developing rats: variability of afterdischarge thresholds with age. **Developmental Brain Research**, v. 1, p. 43–58, 1981. DOI: 10.1016/0165-3806(81)90007-8.

PANSANI, A. P. et al. The number and periodicity of seizures induce cardiac remodeling and changes in micro-RNA expression in rats submitted to electric amygdala kindling model of epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 116, p. 107784, mar. 2021. DOI: 10.1016/j.yebeh.2021.107784.

PERVEEN, N. et al. Perampanel increases seizure threshold in pentylenetetrazole-kindled mice and improves behavioral dysfunctions by modifying mRNA expression levels of BDNF/TrkB and inflammatory markers. **Journal of the Saudi Pharmaceutical Society**, v. 32, n. 1, p. 101930, 2024. DOI: 10.1016/j.jsps.2023.101930.

REDDY, D. S. et al. Kindling models of epileptogenesis for developing disease-modifying drugs for epilepsy. **Current Protocols**, v. 4, n. 10, p. e70020, 2024. DOI: 10.1002/cpz1.70020.

SCHREIBER, S. Kindling, Neural Basis. In: SMELSER, N. J.; BALTES, P. B. (ed.). **International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences**. [S. l.]: Elsevier, 2001. p. 8094-8098. DOI: 10.1016/B0-08-043076-7/03552-X.

SHAHPARI, M. et al. Improved Stage Categorization of PTZ-Induced Kindling and Late Enhanced Neurogenesis in PTZ Kindled Mice. **Galen medical journal**, v. 8, p. e1511, 2019. DOI: 10.22086/gmj.v8i0.1511.

SHIMADA, T.; YAMAGATA, K. Pentylenetetrazole-induced kindling mouse model. **Journal of Visualized Experiments**, n. 136, p. e56573, 2018. DOI: 10.3791/56573.

VAN ERUM, J.; VAN DAM, D.; DE DEYN, P. P. PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. **Epilepsy & Behavior**, v. 95, p. 51–55, 2019. DOI: 10.1016/j.yebeh.2019.02.029.

VIJAYANTI, S.; SINGH, N.; KUMARI, P.; SAHA, L. Anti apoptotic role of bezafibrate in pentylenetetrazole induced kindling model in rats. **Annals of Psychiatry and Mental Health**, v. 10, n. 1, p. 1173, 2022. DOI: 10.47739/2374-0124/1173.

WELZEL, L. et al. A face-to-face comparison of the intra-amgdala and intrahippocampal kainate mouse models of mesial temporal lobe epilepsy and their utility for testing novel therapies. **Epilepsia**, v. 61, p. 157-170, 2020. DOI: 10.1111/epi.16406.

ZHU, X. et al. Neuronal Nitric Oxide Synthase Contributes to PTZ Kindling-Induced Cognitive Impairment and Depressive-Like Behavior. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 11, p. 203, out. 2017. DOI: 10.3389/fnbeh.2017.00203.

CAPÍTULO IX

TESTE DE CONVULSÃO INDUZIDA POR AGENTES QUÍMICOS

CHEMICAL AGENT-INDUCED SEIZURE TEST

DOI: 10.51859/ampilla.nat298.1126-9

Isadora Porto de Andrade ¹

David Ribeiro Fontenele ²

Jean Lucas Ibiapina de Sousa ³

Ana Karoline Lourenço de Menezes ⁴

¹ Mestranda em Ciências Fisiológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - UECE

² Graduando do curso de Ciências Biológicas. Universidade Estadual do Ceará - UECE

³ Graduando do curso de Fisioterapia. Centro Universitário Christus - Unichristus

⁴ Graduanda do curso de Medicina Veterinária. Universidade Estadual do Ceará - UECE

RESUMO

Modelos de convulsão induzidos por agentes químicos representam uma ferramenta fundamental na pesquisa translacional da epilepsia. Ao utilizar agentes como o pentilenotetrazol (PTZ), estes modelos mimetizam o desequilíbrio entre a neurotransmissão excitatória e inibitória, replicando a fisiopatologia de epilepsias humanas e permitindo a investigação de novos fármacos e das comorbidades associadas às crises. Contudo, o capítulo aborda criticamente as limitações inerentes a esses protocolos, como a alta mortalidade animal, a significativa variabilidade de resposta individual e os desafios de reprodutibilidade, fatores que podem comprometer a validade dos achados. Dessa forma, a discussão reforça que a padronização rigorosa é um pré-requisito para mitigar tais desafios, garantindo a robustez e a confiabilidade dos dados pré-clínicos e fortalecendo sua aplicação no desenvolvimento de novas terapias.

Palavras-chave: Convulsão. Modelo animal. Indução química. Pentilenotetrazol.

ABSTRACT

Chemically induced seizure models are widely used in preclinical epilepsy research, allowing the

investigation of neurobiological mechanisms underlying neuronal excitability and epileptogenesis. Administration of substances such as pentylenetetrazol, pilocarpine, or kainic acid triggers acute seizures in rodents, providing a platform to study seizure progression and evaluate potential pharmacological therapies. These models have been essential for assessing the effects of anticonvulsants and novel disease-modifying drugs, as well as for understanding mechanisms related to pharmacoresistance, which affects a significant proportion of patients with refractory epilepsy. Furthermore, they enable the exploration of associated comorbidities, including cognitive deficits and behavioral alterations, which share neurobiological substrates between animals and humans. Despite their translational relevance, chemically induced seizure models present limitations, including variability in individual animal responses, adverse effects of chemical agents, and the need for rigorously standardized protocols to ensure reproducibility. When properly applied, these models remain valuable tools in preclinical epilepsy research, providing crucial insights for the development of more effective and safe therapeutic strategies.

Keywords: Seizure. Animal model. Chemical induction. Pentylenetetrazol.

1. INTRODUÇÃO

O teste de convulsão induzido por agentes químicos trata-se de um modelo pré-clínico no qual se utiliza de compostos químicos (denominados quimioconvulsivantes) para indução de crises convulsivas, a fim de avaliar o potencial anticonvulsivante de determinadas substâncias. A indução química ao status epilepticus é a abordagem mais utilizada para indução a epilepsia crônica (Doodipala, 2013). O objetivo dos modelos químicos diferem de acordo com a metodologia utilizada, podendo ser modelos *in vitro*, focado nos mecanismos epileptogênicos como a inibição das respostas ao GABA e à glicina e descargas repetidas espontâneas, e modelos *in vivo*, buscando mimetizar a síndrome epiléptica, através das alterações fisiopatológicas, eletrofisiológicas, comportamentais e neuroquímicas capazes de reproduzir crises convulsivas (De Deyn, et al., 1992).

Historicamente, o campo ganhou força com publicações no final da década de 1940 e no início da década de 1950 que descreveram as propriedades quimioconvulsivantes do pentilenotetrazol (PTZ) ao comparar as propriedades de anticonvulsivantes e fármacos antiepilepticos (DAEs) no teste utilizando o PTZ e em outros testes, como modelo de convulsão por eletrochoque máximo. Logo, o modelo de liminar PTZ tornou-se o principal modelo pré-clínico de estudo para identificação dos fármacos utilizados atualmente no tratamento de crises epilépticas.

Além do PTZ, outros agentes com diferentes mecanismos de ação são amplamente empregados para induzir estados convulsivos. A pilocarpina, por exemplo, um composto colinérgico muscarínico, induz alterações comportamentais progressivas até o status epilepticus límbico. Outra abordagem utiliza aminoácidos exógenos com potente ação excitatória, como o kainato e o ácido ibotênico. Ambos causam convulsões que, no caso do ácido ibotênico, podem levar à neurodegeneração e a danos cerebrais.

Uma terceira estratégia, muito comum nesses modelos, consiste no bloqueio direto da neurotransmissão inibitória do cérebro. Agentes como a picrotoxina e a bicuculina atuam como antagonistas do neurotransmissor GABA, gerando um efeito epileptogênico ao impedir sua ação calmante. A estricnina, por sua vez, age de forma similar, mas bloqueando a ação de outro neurotransmissor inibitório, a glicina, o que resulta em convulsões predominantemente tônicas extensoras.

Este capítulo detalha como os modelos de convulsão química são usados para desenvolver fármacos mais eficazes, conectando os resultados dos testes à melhoria do tratamento e da qualidade de vida de pacientes com epilepsia.

2. PROTOCOLOS PADRONIZADOS

Para a realização de protocolos de indução convulsivante por meio de agentes químicos, é essencial, atentar-se, primeiramente, à disponibilidade e ao uso adequado de materiais e equipamentos comumente utilizados. Dentre eles, destacam-se: aparato transparente para observação comportamental do roedor (40 x 40 x 30 cm), sistema de vídeo (quando se deseja registrar o teste), equipamento de biossegurança e cronômetros para mensuração precisa dos parâmetros que serão analisados (Aquino *et al.*, 2025).

Ao tratar dos critérios utilizados nesses protocolos, observa-se uma ampla variedade de parâmetros que podem ser selecionados de acordo com os objetivos específicos de cada estudo pré-clínico. Esses parâmetros, juntamente com suas funções, estão presentes na tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros utilizados nos testes de convulsão

PARÂMETRO	FUNÇÃO
Latência das convulsões	Mensurar o tempo que o animal leva até a primeira convulsão tônico-clônica
Latência de morte	Mensurar o tempo da primeira convulsão tônico-clônica até a morte do animal
Número das convulsões	Soma da quantidade de episódios convulsivos apresentados pelo animal
Tempo total das convulsões	Mensurar o tempo total de atividade convulsiva durante o período de observação
Taxa de sobrevivência	Apresentar a proporção de animais que sobreviveram durante o teste
Taxa de mortalidade	Apresentar a proporção de animais que morreram durante o teste
Estágio máximo de excitabilidade	Analizar o grau do comportamento convulsivo do animal conforme escalas padronizadas, como a de Racine

Fonte: Autoria própria.

Além de conhecer os materiais necessários e os parâmetros que podem ser selecionados, é excepcional manter os animais em condições ambientais controladas, tendo em vista o impacto que essas condições podem gerar no momento do experimento, tais como: manter a temperatura entre 22 e 27 °C, conservar a umidade do local em torno de 55 e 60% e preservar o ciclo claro/escuro do animal em escala 12:12 h. Além disso, o peso ideal dos roedores para a aplicabilidade do teste encontrou-se com o mínimo de 25g e com o máximo de 35g, sempre permitindo a alimentação e o acesso à água de forma constante

Cada agente químico apresenta particularidades que devem ser consideradas durante o protocolo, como por exemplo a indução por meio de pilocarpina, em que após 45 min da aplicação

do tratamento escolhido, é adicionado uma dose de Metilbrometo de escopolamina para bloquear os efeitos colinérgicos periféricos que podem surgir e, após 15 min, administra-se a dose escolhida de pilocarpina (Islas-Espinoza et al., 2018). Além disso, o tempo de observação após a administração do indutor também pode variar de acordo com o agente escolhido, como o protocolo de indução por PTZ que, em estudos mais atuais, pode ser de até 1 hora (Aquino et al., 2025). A indução por pilocarpina, por sua vez, dependendo da dose, permite a observação do animal em até 2 horas, diferentemente do ácido caínico, que pode ser analisado em até 30 minutos após a administração (Feng et al., 2020) (Islas-Espinoza et al., 2018).

Dessa forma, a indução convulsiva por agentes químicos integra a escolha criteriosa do indutor, o controle rigoroso de parâmetros comportamentais, a padronização ambiental e a adaptação às particularidades de cada substância. Esse conjunto de fatores permite obter dados confiáveis e reproduutíveis, oferecendo uma base sólida para a análise dos mecanismos das crises convulsivas e a avaliação de intervenções terapêuticas em modelos pré-clínicos de epilepsia.

3. BASES NEUROANATÔMICAS E NEUROQUÍMICAS DAS CRISES CONVULSIVAS E DA EPILEPSIA.

A epilepsia é uma desordem neurológica caracterizada por uma disfunção na atividade elétrica cerebral, resultando em descargas neuronais simultâneas que culminam em crises convulsivas (Beghi, 2020; Scheffer et al., 2017). Na base desse fenômeno está a hiperexcitabilidade neuronal, desencadeada por um desequilíbrio entre o neurotransmissor excitatório glutamato e o inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA). Essa disfunção reduz o limiar convulsivo e provoca a superestimulação de receptores glutamatérgicos, como NMDA e AMPA, um processo central na epileptogênese (Treiman, 2001; Rogawski et al., 2001). O resultado é a excitotoxicidade: despolarização excessiva dos neurônios e influxo intenso de cálcio, ativando vias que podem levar à disfunção e morte celular (McNamara et al., 1988).

No entanto, a hiperexcitabilidade de neurônios isolados não é suficiente para gerar uma crise. É necessária a hipersincronia, fenômeno em que grandes redes neuronais disparam de forma sincronizada em tempo e frequência. Assim, a combinação entre hiperexcitabilidade individual e hipersincronia de redes neuronais é o que efetivamente desencadeia as crises convulsivas (Britton; Benarroch, 2006; Fisher et al., 2017).

Crises recorrentes provocam alterações neuroanatômicas e neuroquímicas significativas, sendo a esclerose hipocampal (EH) uma das consequências mais comuns. A EH caracteriza-se pela perda neuronal e gliose, afetando principalmente as regiões CA1 e CA3 do hipocampo (Krook et al., 2015; Thom, 2004). Estruturas como hipocampo, amígdala e córtex piriforme apresentam alta

suscetibilidade, tornando a EH é uma marca registrada da epilepsia do lobo temporal (ELT), tipo mais frequente de epilepsia focal, especialmente em casos refratários que podem requerer intervenção cirúrgica (Engel, 2013; Cendes et al., 1993).

O dano neuronal na ELT não se limita ao hipocampo, estendendo-se a regiões vizinhas como giro para-hipocampal, uncus e amígdala, bem como a áreas distantes. Estudos apontam redução do volume talâmico, atrofia cerebelar e afinamento da substância cinzenta em lobos temporais, cíngulo posterior e tálamo (Menassa; Sloan; Chance, 2017; Cormack et al., 2005; Cooper et al., 1976). Essas alterações estruturais acompanham mudanças neuroquímicas, como aumento de creatina e N-acetil aspartato e redução de colina no hipocampo de pacientes com ELT (He et al., 2021; Hammen; Kuzniecky, 2012).

Por fim, essas modificações estruturais e químicas manifestam-se como déficits funcionais relevantes. A atrofia do sistema límbico e a diminuição de colina, neurotransmissor vital para a comunicação neuronal, estão diretamente associadas a prejuízos na memória verbal, de curto prazo e no aprendizado espacial, sendo que alterações cognitivas são frequentes em pacientes com epilepsia crônica (Lamberink et al., 2020; Xiao et al., 2023).

4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS

O modelo de convulsão induzida por agentes químicos é amplamente utilizado em pesquisas pré-clínicas para investigar a excitabilidade neuronal e avaliar respostas farmacológicas em crises agudas. Ele permite estudar de forma controlada como diferentes fármacos podem atenuar ou prevenir episódios convulsivos, fornecendo dados importantes para a otimização de tratamentos (Erkül, Arihan, 2015; Li et al., 2021).

Além disso, o modelo possibilita examinar alterações neuroquímicas e estruturais associadas a convulsões intensas, incluindo desequilíbrios entre neurotransmissores excitatórios e inibitórios e estresse oxidativo, que podem resultar em déficits cognitivos e comportamentais semelhantes aos observados em pacientes com epilepsia (Li et al., 2021; Moshe et al., 1981). Essas análises ajudam a relacionar eventos convulsivos agudos a repercussões funcionais, oferecendo uma perspectiva translacional valiosa para a compreensão da doença em humanos.

O modelo químico também é útil para investigar mecanismos de neuroproteção e potenciais efeitos adversos de medicamentos, permitindo avaliar a capacidade de intervenções farmacológicas em modular a excitabilidade neuronal e reduzir complicações associadas a crises severas (Erkül, Arihan, 2015; Li et al., 2021). Essa abordagem contribui para o desenvolvimento de terapias mais seguras e eficazes.

De forma geral, o modelo de convulsão induzida por agentes químicos se destaca por gerar dados robustos e aplicáveis clinicamente, consolidando-se como uma ferramenta essencial na pesquisa pré-clínica para entender os mecanismos biológicos das crises e aprimorar estratégias terapêuticas em epilepsia.

5. LIMITAÇÕES E DESAFIOS METODOLÓGICOS

Os modelos de convulsão aguda induzida por agentes químicos, como pentilenotetrazol (PTZ), pilocarpina e ácido caínico, são amplamente utilizados na pesquisa pré-clínica devido à sua capacidade de induzir crises de forma rápida e reproduzível. No entanto, esses protocolos apresentam diversas limitações e desafios metodológicos que podem impactar a confiabilidade e a interpretação dos resultados.

Um dos principais desafios é a variabilidade individual na resposta aos agentes convulsivantes, que pode ser influenciada por fatores como idade, sexo, peso corporal e histórico de estresse do animal (Yuskaitis et al., 2021). Essa heterogeneidade requer amostras maiores e rigoroso controle experimental para garantir a consistência dos dados.

A mortalidade elevada durante protocolos que utilizam doses mais altas ou agentes mais potentes constitui outro desafio significativo. Animais podem não sobreviver a crises severas, o que afeta a análise estatística e levanta questões éticas importantes, exigindo monitoramento constante e definição clara de limites experimentais (Löscher, 2011).

Além disso, a padronização dos protocolos incluindo dose, via de administração, tempo de observação e critérios para classificação das crises é crucial para assegurar a comparabilidade entre estudos. Pequenas diferenças nessas variáveis podem alterar drasticamente os resultados, limitando a replicabilidade (McCandless & Finesmith, 2008).

Outra limitação metodológica é que esses modelos reproduzem principalmente crises agudas, dificultando a análise de processos crônicos de epileptogênese e da progressão da doença, o que restringe o estudo de mecanismos de epilepsia refratária ou epileptogênese lenta (Yuskaitis et al., 2021).

Por fim, a avaliação comportamental das crises, embora essencial, está sujeita à subjetividade dos observadores e a influências ambientais, como ruído ou manejo inadequado, que podem interferir na latência, duração e gravidade das crises (McCandless & Finesmith, 2008).

Esses desafios metodológicos reforçam a necessidade de protocolos cuidadosamente planejados, treinamento adequado dos pesquisadores e controle rigoroso de variáveis biológicas e ambientais, garantindo que os dados obtidos sejam confiáveis, reproduzíveis e relevantes para a pesquisa pré-clínica em epilepsia.

REFERÊNCIAS

- BEGHI, Ettore. The epidemiology of epilepsy. *Neuroepidemiology*, v. 54, n. 2, p. 185-191, 2020.
- BRITTON, J. W.; BENARROCH, E. Convulsões e síncope: bases anatômicas e considerações diagnósticas. *Clinical Autonomic Research*, v. 16, n. 1, p. 18-28, 2006.
- CENDES, Fernando et al. Medida volumétrica por ressonância magnética da amígdala e do hipocampo na epilepsia do lobo temporal. *Neurology*, v. 43, n. 4, p. 719-719, 1993.
- COOPER, Irving S. et al. Chronic cerebellar stimulation in epilepsy: clinical and anatomical studies. *Archives of Neurology*, v. 33, n. 8, p. 559-570, 1976.
- CORMACK, Francesca et al. Anormalidades na densidade da substância cinzenta extra-hipocampal na esclerose mesial temporal pediátrica. *NeuroImage*, v. 27, n. 3, p. 635-643, 2005.
- DE AQUINO, P. E. A. et al. Nanoemulsions of cannabidiol, Δ9-tetrahydrocannabinol, and their combination similarly exerted anticonvulsant and antioxidant effects in mice treated with pentylenetetrazole. *Pharmaceuticals*, Basel, v. 18, n. 6, p. 782, 2025. DOI: 10.3390/ph18060782. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC12196116/>. Acesso em: 3 jul. 2025.
- DOODIPALA, S.; RAMKUMAR, K. Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, p. 18284-18318, 2013. DOI: 10.3390/ijms140918284. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24013377/>. Acesso em: 10 jul. 2025.
- DE DEYN, P. P. et al. Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants. *Epilepsy Research*, v. 12, p. 87-110, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(92\)90030-w](https://doi.org/10.1016/0920-1211(92)90030-w). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1396544/>. Acesso em: 10 jul. 2025.
- ENGEL, Jerome. *Seizures and epilepsy*. Oxford University Press, 2013.
- ERKÜL, M.; ARIHAN, O. Pentylenetetrazole kindling epilepsy model. *Archives of Epilepsy*, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2015. DOI: 10.14744/epilepsi.2015.08108.
- FENG, J. et al. Effect of thiamazole on kainic acid-induced seizures in mice. *Pharmaceuticals*, Basel, v. 18, n. 8, p. 782, 2021. DOI: 10.3390/ph18080782. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7938111/>. Acesso em: 3 jul. 2025.
- FISHER, P. D.; SPERBER, E. F.; MOSHÉ, S. L. Hippocampal sclerosis revisited. *Brain and Development*, v. 20, n. 8, p. 563-573, 1998.
- FISHER, Robert S. et al. Classificação operacional de tipos de crises pela International League Against Epilepsy: Position Paper da ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, v. 58, n. 4, p. 522-530, 2017.
- HAMMEN, Thilo; KUZNIECKY, Ruben. Magnetic resonance spectroscopy in epilepsy. In: *Handbook of Clinical Neurology*, v. 107, p. 399-408, 2012.

ISLAS-ESPINOZA, A. M.; CAMPOS-RODRÍGUEZ, C.; RAMÍREZ SAN JUAN, E. Thalidomide protects against acute pentylenetetrazol and pilocarpine-induced seizures in mice: the role of nitric oxide and inflammation. *Journal of Toxicological Sciences*, Tóquio, v. 43, n. 11, p. 671-684, 2018. DOI: 10.2131/jts.43.671. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/43/11/43_671/ html. Acesso em: 3 jul. 2025.

JACKSON, Graeme D. et al. Hippocampal sclerosis can be reliably detected by magnetic resonance imaging. *Neurology*, v. 40, n. 12, p. 1869-1869, 1990.

JACKSON, Graeme D. et al. Otimizando o diagnóstico de esclerose hipocampal usando imagens de RM. *American Journal of Neuroradiology*, v. 14, n. 3, p. 753-762, 1993.

LAMBERINK, Herm J. et al. Resultado de convulsão e uso de medicamentos antiepilepticos após cirurgia de epilepsia de acordo com diagnóstico histopatológico: um estudo de coorte multicêntrico retrospectivo. *The Lancet Neurology*, v. 19, n. 9, p. 748-757, 2020.

LI, H. et al. Behavioral and brain structural changes in kindled rats induced by Coriaria lactone and pentylenetetrazol. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 15, p. 727872, 2021. DOI: 10.3389/fnbeh.2021.727872.

LIU, Zhao et al. Seizure-induced glutamate release in mature and immature animals: an in vivo microdialysis study. *Neuroreport*, v. 8, n. 8, p. 2019-2023, 1997.

MCNAMARA, J. O. et al. Anticonvulsant and antiepileptogenic actions of MK-801 in the kindling and electroshock models. *Neuropharmacology*, v. 27, n. 6, p. 563-568, 1988.

MENASSA, David A.; SLOAN, Carolyn; CHANCE, Steven A. Primary olfactory cortex in autism and epilepsy: increased glial cells in autism. *Brain Pathology*, v. 27, n. 4, p. 437-448, 2017.

MORIMOTO, Kiyoshi et al. Effects of competitive and noncompetitive NMDA receptor antagonists on kindling and LTP. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 40, n. 4, p. 893-899, 1991.

MOSHÉ, S. L. et al. Kindling in developing rats: variability of afterdischarge thresholds with age. **Developmental Brain Research**, v. 1, p. 43-58, 1981. DOI: 10.1016/0165-3806(81)90007-8.

NOLAN, Danielle; FINK, John. Genetics of epilepsy. In: *Handbook of Clinical Neurology*, v. 148, p. 467-491, 2018.

PIMENTEL-SILVA, Luciana R. et al. Interactions between in vivo neuronal-glial markers, side of hippocampal sclerosis, and pharmacoresponse in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, v. 61, n. 5, p. 1008-1018, 2020.

THOM, Maria. Recent advances in the neuropathology of focal lesions in epilepsy. *Expert Review of Neurotherapeutics*, v. 4, n. 6, p. 973-984, 2004.

TREIMAN, David M. GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia*, v. 42, p. 8-12, 2001.

ROGAWSKI, Michael A. et al. Role of AMPA and GluR5 kainate receptors in the development and expression of amygdala kindling in the mouse. *Neuropharmacology*, v. 40, n. 1, p. 28-35, 2001.

UEDA, Yuto et al. Glutamate excess and free radical formation during and following kainic acid-induced status epilepticus. *Experimental Brain Research*, v. 147, p. 219-226, 2002.

XIAO, Ling et al. Características de memória na epilepsia do lobo temporal mesial: Insights de um jogo de memória de rastreamento ocular e avaliações neuropsicológicas. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, v. 29, n. 9, p. 2621-2633, 2023.

YI, Jae-Hyuk; HAZELL, Alan S. Mecanismos excitotóxicos e o papel dos transportadores astrocíticos de glutamato em lesões cerebrais traumáticas. *Neurochemistry International*, v. 48, n. 5, p. 394-403, 2006.

ZEISEL, Steven H. Choline: needed for normal development of memory. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 19, n. sup5, p. 528S-531S, 2000.

LÖSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy. *European Journal of Pharmacology*, v. 668, n. 1-3, p. 2-10, 2011. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.07.014.

MCCANDLESS, D. W.; FINESMITH, R. B. Chemically induced models of seizures. In: BOULTON, A.; BAKER, G.; BUTTERWORTH, R. (Ed.). *Animal models of neurological disease II*. Totowa: Humana Press, 2008. p. 133-151.

YUSKAITIS, C. J. et al. Factors influencing the acute pentylenetetrazole-induced seizure model in mice. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, v. 8, n. 7, p. 1330-1337, 2021. DOI: 10.1002/acn3.51322.

CAPÍTULO X

O TESTE DO ROTA-ROD EM ANIMAIS

THE ROTAROD TEST IN ANIMALS

DOI: 10.51859/amplla.nat298.1126-10

Liana Ferreira Alencar Silva ¹

Gislei Frota Aragão ²

Nariane Monique Mendes de Lima ³

Anne Kayline Soares Teixeira ⁴

Nilberto Robson Falcão do Nascimento ⁵

¹ Médica, Endocrinologista e aluna especial do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brasil.

² Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brasil.

³ Enfermeira estomaterapeuta, aluna especial do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brasil.

⁴ Enfermeira estomaterapeuta, doutorado pela Universidade Estadual do Ceará

⁵ Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brasil.

RESUMO

O teste do *rota-rod* é uma ferramenta neurocomportamental amplamente utilizada para avaliar a coordenação motora, equilíbrio, aprendizado motor e resistência física em modelos animais, como camundongos e ratos. Introduzido por Jones e Roberts em 1968, ele consiste em colocar o animal sobre um cilindro rotativo e medir a latência até a queda, sendo sensível a alterações no sistema neuromotor. É um método crucial para estudar doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson e a esclerose múltipla, e para avaliar os efeitos de drogas neuroativas e tratamentos terapêuticos. Além disso, o teste pode ser realizado com modos de rotação constante ou progressiva, permitindo a detecção de déficits motores leves ou mais graves. As variáveis que influenciam o desempenho, como a linhagem genética, idade, sexo e peso do animal, devem ser controladas para garantir a validade dos resultados. O teste é simples, econômico e fornece dados quantitativos confiáveis.

Palavras-chave: Teste do rota-rod, coordenação motora, doenças neurodegenerativas, aprendizado motor.

ABSTRACT

The rota-rod test is a widely used neurobehavioral tool to assess motor coordination, balance, motor learning, and physical endurance in animal models, such as mice and rats. Introduced by Jones and Roberts in 1968, it involves placing the animal on a rotating cylinder and measuring the latency until it falls, making it sensitive to alterations in the neuromotor system. It is a crucial method for studying neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease and multiple sclerosis, as well as evaluating the effects of neuroactive drugs and therapeutic treatments. Additionally, the test can be performed with constant or progressive rotation modes, allowing the detection of mild or more severe motor deficits. Variables that influence performance, such as genetic lineage, age, sex, and animal weight, must be controlled to ensure the validity of results. The test is simple, cost-effective, and provides reliable quantitative data.

Keywords: Rota-rod test, motor coordination, neurodegenerative diseases, motor learning.

1. INTRODUÇÃO

O teste do rota-rod, ou teste da barra giratória, é um dos métodos mais utilizados na neurociência experimental para a avaliação da coordenação motora, equilíbrio, aprendizado e resistência física em modelos animais, especialmente roedores. Desde sua introdução por Jones e Roberts em 1968, o rota-rod tornou-se um instrumento clássico e amplamente empregado em laboratórios do mundo inteiro, sendo considerado um teste robusto, sensível e relativamente simples de executar (Jones & Roberts, 1968).

O princípio do teste consiste em colocar o animal (geralmente camundongo ou rato) sobre um cilindro horizontal que gira continuamente ou com aceleração progressiva. O principal parâmetro medido é a latência até a queda, ou seja, o tempo em que o animal consegue permanecer equilibrado no cilindro antes de cair. Esse tempo é diretamente relacionado à integridade do sistema neuromotor, ao equilíbrio e, em sessões repetidas, à capacidade de aprendizado motor do animal.

Além de ser utilizado em modelos de doenças neurodegenerativas como Parkinson, esclerose múltipla e ataxias hereditárias, o teste também é empregado para avaliar os efeitos colaterais de medicamentos, investigar a toxicidade de compostos neuroativos e estudar a recuperação motora após lesões traumáticas no sistema nervoso central (Shiotsuki et al., 2010; Luong et al., 2022).

A simplicidade do teste é uma das razões de sua popularidade. No entanto, apesar de sua aparência simples, ele permite a coleta de dados quantitativos precisos e a análise de parâmetros variados, desde a performance basal até a evolução do desempenho ao longo do tempo. Isso torna o rota-rod uma ferramenta essencial na avaliação funcional de modelos experimentais que envolvem alterações motoras.

Segundo estudos recentes, as capacidades deste teste têm sido ampliadas com a introdução de novas tecnologias, como análise de vídeo e sensores automáticos, que permitem mensurar não apenas o tempo até a queda, mas também aspectos mais detalhados do comportamento motor (Shiotsuki et al., 2010; Takeshita et al., 2023).

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

O teste de rota-rod é uma ferramenta que permite avaliar diferentes aspectos do desempenho motor em modelos animais, principalmente camundongos e ratos. O sucesso no teste depende da integração precisa de múltiplos sistemas fisiológicos, como o sistema nervoso central,

a musculatura esquelética, e os mecanismos de propriocepção e equilíbrio. A queda do animal do cilindro giratório pode ocorrer por fadiga muscular, perda de equilíbrio ou falhas na coordenação motora fina. Estudos demonstram que o rota-rod é sensível para detectar déficits em coordenação e equilíbrio após lesões cerebrais (HAMM; PIKE; O'DELL et al., 1994), além de também medir resistência/fadiga motora em protocolos que aumentam progressivamente a velocidade ou duração (MA et al., 2024). Protocolos descritos em "Assessment of Motor Coordination and Balance in Mice Using the Rotarod" mostram que o teste exige não só força e coordenação, mas também ajustes posturais finos e equilíbrio dinâmico (Curr. Protoc. Mouse Biol., 2012).

A manutenção do equilíbrio sobre um cilindro rotativo envolve a ativação de circuitos neurais complexos. O cerebelo desempenha um papel central na regulação da postura e na correção contínua de movimentos para evitar a queda, enquanto o trato corticospinal e as vias descendentes controlam a coordenação dos movimentos finos (Shiotsuki et al., 2010). Já a propriocepção permite que o animal perceba a posição de seu corpo no espaço e ajuste dinamicamente sua postura.

Com sessões repetidas, é possível avaliar não apenas a coordenação motora basal, mas também o aprendizado motor, que se manifesta pelo aumento progressivo da latência até a queda. Esse aprendizado envolve mecanismos de plasticidade sináptica, particularmente no cerebelo e no córtex motor, sugerindo a participação de processos semelhantes aos da memória motora (Shiotsuki et al., 2010).

Estudos demonstraram que animais submetidos a sessões diárias de rotarod apresentam melhora no desempenho, indicando aquisição de memória motora e adaptação neuromuscular (Shiotsuki et al., 2010). Essa propriedade do teste permite avaliar tanto condições que causam déficits motores quanto alterações no processo de aprendizado motor.

O desempenho no rota-rod reflete a função de diversos sistemas fisiológicos, conforme descrito na tabela 1 (Shiotsuki et al., 2010).

Tabela 1 - Relação do teste de rota-rod nos sistemas fisiológicos

Parâmetro	Descrição
Sistema Nervoso Central	Cerebelo, córtex motor, núcleos da base e vias motoras descendentes
Sistema Musculoesquelético	Força muscular e resistência física
Sistema Sensorial	Propriocepção e integração sensorial

O uso do rota-rod se destaca pela capacidade de fornecer dados reprodutíveis sobre a função motora de modelos experimentais de doenças humanas. Por essa razão, ele é amplamente empregado em pesquisas pré-clínicas relacionadas a:

- Doença de Parkinson
- Ataxias hereditárias
- Esclerose lateral amiotrófica
- Esclerose múltipla
- Lesão medular
- Toxicidade induzida por drogas

Além disso, o rotarod é utilizado para avaliar intervenções terapêuticas, como fármacos neuroprotetores ou terapias celulares, permitindo monitorar tanto a perda de função quanto a recuperação motora ao longo do tempo (Takeshita et al., 2023).

O teste pode ser influenciado por fatores como: nível de ansiedade do animal; peso e idade; sexo e linhagem genética; motivação e comportamento. Essas variáveis devem ser consideradas no desenho experimental para evitar interpretações errôneas dos resultados (Luong et al., 2011; Takeshita et al., 2023).

A escolha da espécie e da linhagem animal é um fator crítico na execução e interpretação do teste de rota-rod. Camundongos e ratos são as espécies mais frequentemente utilizadas devido à sua facilidade de manejo, tamanho corporal adequado para o equipamento e à ampla disponibilidade de modelos genéticos experimentais. No entanto, diferentes linhagens apresentam variações significativas no desempenho motor, no aprendizado e na resposta ao treinamento, o que precisa ser cuidadosamente considerado no delineamento experimental. Estudos demonstram que linhagens distintas, como C57BL/6J, DBA/2J e BALB/cByJ, apresentam desempenhos diferenciados tanto em coordenação motora quanto em aprendizagem motora no rota-rod (MCFADYEN et al., 2003). Outras pesquisas confirmam que fatores genéticos e de linhagem influenciam o desempenho motor, a coordenação e até a resposta ao estresse em tarefas de equilíbrio (AMBROZIAK et al., 2021; CHESLER et al., 2015; FIORILLO et al., 2018). Esses achados reforçam a importância de selecionar cuidadosamente a espécie e a linhagem mais adequadas ao objetivo do estudo, considerando que diferenças genéticas podem afetar substancialmente os resultados obtidos.

Os camundongos são a principal espécie utilizada em protocolos de rota-rod, sobretudo pela disponibilidade de linhagens geneticamente modificadas que permitem estudar doenças humanas específicas, como as ataxias hereditárias, a doença de Parkinson e as doenças

desmielinizantes (Carter *et al.*, 2001; Deacon, 2013). Estudos demonstram que ratos, em geral, conseguem permanecer mais tempo no cilindro rotatório do que camundongos, devido ao seu maior tamanho corporal e maior força muscular (Carter *et al.*, 2001).

Além disso, variáveis como idade, sexo e peso corporal também impactam o resultado do teste de rotarod. Animais jovens, por exemplo, geralmente apresentam melhor coordenação e resistência do que animais idosos, enquanto o desempenho pode diferir entre machos e fêmeas dependendo da linhagem (Takeshita *et al.*, 2023).

Por essas razões, recomenda-se uma padronização rigorosa dos protocolos e a escolha adequada da linhagem para que os resultados sejam reproduutíveis e cientificamente válidos.

3. METODOLOGIA DO TESTE

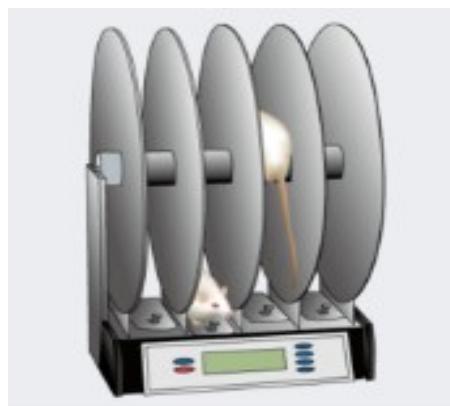
3.1. EQUIPAMENTO

O equipamento básico para o teste de rotarod consiste em um cilindro giratório horizontal, com diâmetro e textura adequados para que o animal possa se equilibrar sem escorregar ou ser arremessado. Já existem versões automatizadas do aparelho, com sensores para registro preciso do tempo de permanência do animal no cilindro, aumentando a reproduutibilidade do teste (Shiotsuki *et al.*, 2010).

Com base em configurações de fabricantes e descrições técnicas, por exemplo Ugo Basile usa-se varões de ~3 cm de diâmetro para camundongos e ~6 cm para ratos, com pistas divididas (flanges) e texturização superficial para proporcionar aderência adequada (Ver Catálogo Ugo Basile; Lewis, 2018).

A altura do cilindro em relação à base costuma ser de 30 a 50 cm, e o solo deve ser acolchoado para evitar lesões em caso de quedas frequentes (Shiotsuki *et al.*, 2010).

Figura 1 – Esquema ilustrativo do aparelho Rota-Rod utilizado em experimentos com roedores.



Fonte: DataBase Center for Life Science (DBCLS). *Rota-Rod apparatus illustration*, 2024. Disponível em: [[File:201407 rotarod test.png|201407_rotarod_test]]. Licença: CC BY 4.0.

3.2. MODOS DE ROTAÇÃO

Existem dois modos principais de execução do teste:

- Velocidade constante: O cilindro gira a uma velocidade fixa, por exemplo, 16 ou 20 rpm. Esse modelo é útil para detectar alterações motoras em testes rápidos.
- Aceleração progressiva: O cilindro acelera de forma contínua, por exemplo, de 4 rpm a 40 rpm em 5 minutos, o que permite avaliar a resistência e a capacidade adaptativa do animal ao aumento do desafio motor (Luong et al., 2011).

O modo acelerado é mais sensível para detectar déficits motores sutis, enquanto o modo constante é mais adequado para triagens rápidas e avaliações de lesões mais graves (Shiotsuki et al., 2010).

4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

A execução adequada do teste de rota-rod requer um protocolo rigoroso que minimize a variabilidade e maximize a reproduzibilidade dos dados. O protocolo básico inclui uma fase de treinamento, seguida da fase de teste experimental.

4.1. FASE DE TREINAMENTO

O treinamento é fundamental para reduzir a variabilidade individual, especialmente nos primeiros dias de exposição ao rota-rod. Durante essa fase, os animais aprendem a permanecer sobre o cilindro, o que facilita a avaliação do desempenho real nos testes subsequentes. Recomenda-se realizar o treinamento por 3 a 5 dias consecutivos, com 2 a 4 tentativas por dia, em velocidades baixas e constantes (por exemplo, 4–8 rpm), aumentando progressivamente a dificuldade (Takeshita et al., 2023).

4.2. FASE DE TESTE

Após o treinamento, realiza-se o teste experimental, com rotação constante ou progressivamente acelerada. São feitas de 2 a 5 repetições por dia, com intervalos de 10 a 15 minutos entre os testes, para evitar fadiga (Takeshita et al., 2023). Se o animal cair antes do tempo estipulado (ex.: antes de 300 segundos), a latência até a queda é registrada. Caso o animal permaneça no cilindro durante todo o período, o teste é encerrado e considera-se o tempo máximo.

4.3. REPOSIÇÃO PÓS-QUEDA

Em alguns protocolos, os animais são reposicionados no cilindro após cada queda até completar o tempo total da sessão (por exemplo, 5 minutos), o que permite avaliar não apenas a latência média, mas também o número de quedas e o tempo máximo contínuo em cada tentativa (Takeshita et al., 2023).

5. PARÂMETROS AVALIADOS

O parâmetro mais utilizado no teste de rotarod é a latência até a queda. No entanto, protocolos mais sofisticados podem avaliar outros aspectos do desempenho motor, permitindo uma avaliação mais completa e sensível, especialmente em modelos de lesão neurológica leve ou doenças progressivas, conforme descrito na tabela 2 (Takeshita et al., 2023).

Tabela 2 – Parâmetro avaliados no teste de rotarod

Parâmetro	Descrição
Latência até a queda	Tempo até o animal cair do cilindro
Número de quedas	Número total de quedas em uma sessão
Tempo máximo contínuo	Tempo mais longo contínuo sem cair
Distância percorrida	Distância total percorrida no cilindro
Curva de aprendizado	Análise da melhora ou piora do desempenho ao longo das sessões

6. APLICAÇÕES EM PESQUISAS

O teste de rota-rod é amplamente utilizado em diversas áreas da pesquisa biomédica:

- Doenças Neurodegenerativas

Modelos animais de Doença de Parkinson, Ataxias cerebelares e Esclerose Múltipla apresentam diminuição da latência no rotarod, sendo esse um dos primeiros sinais de disfunção motora detectável (Shiotsuki et al., 2010; Takeshita et al., 2023).

- Lesões Traumáticas

Em modelos de traumatismo crânioencefálico leve, o protocolo modificado de rotarod permite detectar déficits motores sutis, que não são facilmente captados por outros testes (Takeshita et al., 2023).

- Avaliação de Fármacos e Neurotoxicidade

O rotarod é utilizado para testar efeitos colaterais motores de novos medicamentos, como sedativos ou drogas neuroativas. Também é usado em estudos de toxicidade induzida por quimioterápicos ou drogas recreativas (Luong et al., 2011).

7. VANTAGENS E LIMITAÇÕES

7.1. VANTAGENS

- Simplicidade de execução
- Alta sensibilidade para déficits motores
- Custo relativamente baixo em comparação com sistemas sofisticados de análise motora
- Aplicável em diversas áreas da pesquisa biomédica

7.2. LIMITAÇÕES

- Influência de fatores como ansiedade e motivação do animal
- Necessidade de treinamento prévio para reduzir variabilidade
- Possibilidade de comportamentos como “passive rotation” (o animal se agarra ao cilindro sem caminhar)
- Diferenças entre linhagens e “substrains” podem gerar resultados inconsistentes se não forem controladas adequadamente (Takeshita et al., 2023; Luong et al., 2011)

O teste de rota-rod é considerado de baixo impacto ético, pois não causa dor ou dano direto ao animal. No entanto, quedas frequentes podem gerar estresse ou pequenos traumas, sendo importante utilizar piso acolchoado e limitar o número de quedas por sessão.

8. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O teste de rota-rod se consolidou como uma ferramenta essencial na avaliação da função motora em modelos experimentais de diversas condições neurológicas. Sua simplicidade, sensibilidade e baixo custo tornam-no uma escolha popular para pesquisadores que investigam desde doenças neurodegenerativas, como Parkinson e esclerose múltipla, até os efeitos de medicamentos e intervenções terapêuticas. No entanto, sua eficácia depende de um controle rigoroso de variáveis experimentais, como o comportamento do animal, a linhagem genética e as condições ambientais.

Embora o rota-rod seja um método robusto, é importante reconhecer suas limitações, como a influência de fatores como a motivação e a ansiedade do animal, que podem interferir nos resultados. A padronização dos protocolos e a escolha cuidadosa do modelo animal são cruciais para garantir a reprodutibilidade e validade dos dados obtidos. Assim, o teste de rota-rod continua sendo uma ferramenta valiosa na pesquisa pré-clínica, mas deve ser complementado com outros

métodos de avaliação para uma análise mais abrangente do comportamento motor em modelos experimentais.

REFERÊNCIAS

Jones, B. J., & Roberts, D. J. (1968). The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 20(4), 302-304.

[Link do artigo: <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1968.tb09743.x>]

HAMM, R. J.; PIKE, B. R.; O'DELL, D. M.; LYETH, B. G.; JENKINS, L. W. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, v. 11, n. 2, p. 187-196, abr. 1994.

MA, et al. Rotarod test provides a convenient method for detecting motor function, coordination ability and anti-fatigue ability in rodents. (2024).

ASSESSMENT OF MOTOR COORDINATION AND BALANCE IN MICE USING THE ROTA-ROD, ELEVATED BRIDGE, AND FOOTPRINT TESTS. *Curr. Protoc. Mouse Biol.*, 2012.

Shiotsuki, H., et al. (2010). A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *Journal of Neuroscience Methods*, 189(2), 180-185.

[Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2889987/>]

LUONG, J. et al. The beam walking test: an assay for sensitive detection of motor dysfunction. *Nature Protocols*, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 512-519, 2011. DOI: 10.1038/nprot.2011.309.

LUONG, T. N. et al. Development of a low-cost, customizable rotarod apparatus for preclinical research. *Journal of Neuroscience Methods*, [S. l.], v. 367, p. 109409, 2022

MCFADYEN, M. P. et al. Differences among eight inbred strains of mice in motor ability and motor learning on the rotorod. *Genes, Brain and Behavior*, v. 2, n. 4, p. 214-219, 2003.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12953787/>. Acesso em: 10 out. 2025.

AMBROZIAK, K. et al. Comprehensive characterization of motor and coordination functions in three adolescent wild-type mouse strains. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 15, 2021.

Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7985312>. Acesso em: 10 out. 2025.

CHESLER, E. J. et al. Identification of genetic factors that modify motor performance and body weight using Collaborative Cross mice. *Genes, Brain and Behavior*, v. 14, n. 6, p. 563-574, 2015. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4637864>. Acesso em: 10 out. 2025.

FIORILLO, C. et al. Self-motivated and stress-response performance assays in mice are age-dependent. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 12, 2018.

Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6118215>. Acesso em: 10 out. 2025.

CARTER, R. J. et al. Motor coordination and balance in mice: a comparison of the rotarod, beamwalking, and wire suspension tests. *Journal of Neuroscience Methods*, [S. l.], v. 108, n. 2, p. 129-139, 2001. DOI: 10.1016/s0165-0270(01)00396-8.

DEACON, R. M. C. Measuring motor coordination in mice. **Journal of Visualized Experiments** : JoVE, [S. l.], n. 75, e2048, 2013. DOI: 10.3791/2048.

Takeshita, S., et al. (2023). Four-parameter analysis in modified Rotarod test for detecting minor motor deficits in mice. *BMC Biology*, 21(1), 1-17.

[Disponível em: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-023-01679-y>]

Catálogo Ugo Basile (spec “Mouse RotaRod” / “Rat RotaRod”).

Lewis, PhD, 2018, “Consequences and Prevention of Elevated Circulating ...” (dissertação).

Luong, T. N., et al. (2011). Assessment of motor balance and coordination in mice using the balance beam. *Journal of Visualized Experiments*, (49).

[Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3181253/>]

CAPÍTULO XI

COMO MEDIR O PRAZER? ASPECTOS NEUROBIOLÓGICOS DO TESTE DE ANEDONIA EM ANIMAIS

HOW TO MEASURE PLEASURE? NEUROBIOLOGICAL ASPECTS OF ANHEDONIA TESTING IN ANIMALS

DOI: 10.51859/amplla.nat298.1126-11

Lucas Almeida Vaz ¹

Daniel Sampaio Medeiros ²

¹Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará – Brasil.

²Aluno do curso de Medicina da Universidade Estadual do Ceará – Brasil.

RESUMO

A anedonia, caracterizada pela redução ou perda da capacidade de sentir prazer, é um sintoma presente em diversas doenças neurobiológicas, como depressão, esquizofrenia e doença de Parkinson, e está relacionada a alterações na liberação de dopamina e na densidade neuronal em regiões específicas do cérebro. Em modelos pré-clínicos, o teste de preferência por sacarose (TPS) é considerado o padrão-ouro para mensurar anedonia em roedores, permitindo avaliar tanto o estado anedônico quanto a eficácia de intervenções farmacológicas. O TPS consiste na livre escolha entre água e solução açucarada, quantificando a preferência do animal como indicador do valor de recompensa. Protocolos incluem fases de habituação, cálculo de consumo basal e aplicação de manipulações experimentais, como indução de estresse ou doenças neurobiológicas. A interpretação dos resultados deve considerar fatores como sexo, ciclo circadiano e privação de água e alimento, que podem influenciar a ingestão e comprometer a reprodutibilidade. Do ponto de vista neurobiológico, o prazer está mediado pelo sistema de recompensa mesolímbico, envolvendo a área tegmentar ventral, núcleo accumbens e córtex pré-frontal, com a dopamina sendo o principal neurotransmissor responsável pelo efeito reforçador. A integração do TPS com parâmetros não invasivos, como a variabilidade da frequência cardíaca, amplia sua relevância

translacional, permitindo inferir estados anedônicos em animais e humanos, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas seguras e eficazes.

Palavras-chave: Anedonia. Prazer. Sistema Recompensa. Neurotransmissores. Modelos animais.

ABSTRACT

Anhedonia, characterized by a reduced or complete loss of the ability to feel pleasure, is a symptom found in several neurobiological diseases, such as depression, schizophrenia, and Parkinson's disease. This condition is associated with changes in dopamine release and neuronal density in specific brain regions. In preclinical models, the sucrose preference test (SPT) is considered the gold standard for measuring anhedonia in rodents. This test allows for the evaluation of both anhedonic states and the effectiveness of pharmacological interventions. The SPT involves giving the animal a free choice between water and a sugar solution, with their preference for the sugar serving as an indicator of reward value. Test protocols typically include phases of habituation, calculation of baseline consumption, and the application of experimental manipulations, such as inducing stress or neurobiological diseases. When interpreting the results, it's crucial to consider factors like sex, circadian rhythm, and food/water deprivation, as

these can influence intake and compromise reproducibility. From a neurobiological perspective, pleasure is mediated by the mesolimbic reward system, which involves the ventral tegmental area, nucleus accumbens, and prefrontal cortex. Dopamine is the primary neurotransmitter responsible for this reinforcing effect. Integrating the SPT with non-invasive parameters, such as heart rate variability,

expands its translational relevance. This combined approach allows for inferences about anhedonic states in both animals and humans, ultimately contributing to the development of safe and effective therapeutic strategies.

Keywords: Anhedonia. Pleasure. Reward system. Neurotransmitters. Animal models.

1. INTRODUÇÃO

Diversas atividades essenciais à vida, como alimentar-se, hidratar-se e reproduzir-se, são naturalmente prazerosas. Esse prazer atua como um mecanismo de reforço positivo do sistema de recompensa, deixando marcas no cérebro que mantêm no indivíduo o desejo de repetir tais ações (Atance, 2003). No entanto, doenças como depressão, esquizofrenia e doença de Parkinson podem comprometer esse sistema, seja por alterações na liberação de dopamina ou pela redução da densidade neuronal em regiões específicas, afetando diretamente a capacidade de sentir prazer (Liu et al., 2018; Mateus-Pinheiro et al., 2014; Scheggi et al., 2018). Essa diminuição, ou até mesmo a perda completa, da sensação de prazer em atividades antes gratificantes é denominada anedonia.

A mimetização e a mensuração de transtornos psiquiátricos e neurológicos em roedores são tarefas complexas, com diversas barreiras que dificultam o diagnóstico e a interpretação translacional (Liu et al., 2018). Apesar disso, a investigação da anedonia em animais desempenha um papel fundamental, pois permite avaliar experimentalmente seus mecanismos neurobiológicos, além de validar potenciais abordagens terapêuticas. Neste contexto, o teste de anedonia em roedores se destaca por ser de execução relativamente simples, especialmente quando envolvem estímulos alimentares ou soluções adocicadas, que são de fácil manipulação e quantificação (Mateus-Pinheiro et al., 2014; Scheggi et al., 2018).

Entre esses modelos, o teste de preferência por sacarose (*Sucrose Preference Test, SPT*) é o mais amplamente utilizado e considerado o padrão-ouro para a avaliação de anedonia em ratos e camundongos (Willner, 2016). Trata-se de um teste comportamental baseado no paradigma de duas garrafas, no qual se quantifica a preferência, ou sua redução, por uma solução de sacarose em relação à água. Esse modelo é altamente fidedigno na identificação de estados anedônicos, sendo amplamente aplicado em pesquisas pré-clínicas de transtornos psiquiátricos e particularmente relevante na avaliação de substâncias antidepressivas e antipsicóticas que modulam o circuito de recompensa (Primo et al., 2023).

Diante disso, o objetivo deste capítulo é apresentar em detalhe o protocolo experimental do teste de preferência por sacarose (TPS), discutir as bases neurofisiológicas da anedonia e do sistema de recompensa, e analisar as principais aplicações, limitações e perspectivas futuras desse modelo.

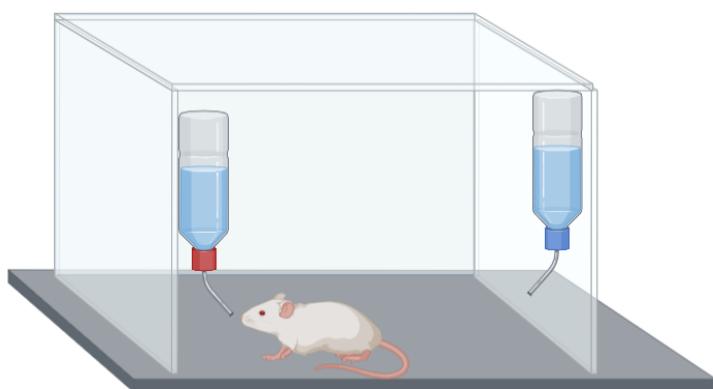
2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL DO TESTE DE PREFERÊNCIA POR SACAROSE (TPS)

A anedonia pode ser investigada em diferentes espécies, como humanos, suínos e até o zebrafish, mas os modelos mais utilizados são os ratos e camundongos. (Figueroa et al., 2015; Fontana et al., 2018; Ellenbroek & Youn, 2016). O teste de preferência por sacarose (TPS) é o mais empregado para identificar e quantificar a capacidade de sentir prazer em roedores, sendo até hoje considerado o padrão-ouro devido à sua alta confiabilidade (Willner, 2016).

O TPS foi desenvolvido com base na suposição de que a redução do consumo de substâncias normalmente palatáveis, em comparação ao grupo controle, indica um estado anedónico (Liu et al., 2018). O teste se baseia na livre escolha do animal entre água pura e uma solução açucarada, considerando que a preferência pela substância açucarada é proporcional à sensação de prazer (Fonseca-Rodrigues et al., 2022).

Para a realização do TPS, o animal é colocado em uma caixa de acrílico na qual já foi previamente habituado, contendo duas garrafas de água nas extremidades, como ilustrado na Figura 1. Uma das garrafas contém água pura e a outra uma solução de sacarose. Após um período determinado, o consumo de cada solução é quantificado, medindo-se o volume antes e após o teste. A preferência pela solução açucarada é calculada pela razão entre o consumo da solução açucarada e o consumo total (Eq. 1); quanto maior o valor, maior a sensação de prazer (Mateus-Pinheiro et al., 2014).

Figura 1 - Representação do teste de preferência por sacarose.



Fonte: Próprio autor (bioRender, editada). Ano 2025

Equação 1 - Equação de preferência por sacarose.

$$\text{Preferência de sacarose} = \frac{\text{ingestão de sacarose}}{\text{ingestão de sacarose} + \text{ingestão de água}} \times 100$$

A anedonia é um sintoma comum para vários transtornos psiquiátricos e neurobiológicos, por isso o protocolo experimental do TPS varia muito de acordo com o delineamento experimental e do objetivo de cada investigação. Primo et al.(2023), fez uma revisão no qual é possível observar além das diferenças metodológicas que o TPS segue um passo a passo geral. Inicialmente, os animais passam por uma fase de treino ou habituação, na qual são expostos a duas garrafas idênticas contendo apenas água. Essa etapa garante que reconheçam ambas como fontes de líquido. Em alguns protocolos, antes dessa fase, os animais são submetidos a curtos períodos de privação de água e alimento (12 a 24 horas) ou a condições de iluminação clara.

Na etapa seguinte, realiza-se a habituação com solução de sacarose (1-2%), o que permite o cálculo de um consumo basal, servindo de referência individual para comparações posteriores. Após a habituação, aplica-se a manipulação experimental de interesse: por exemplo, a indução de depressão por estresse crônico imprevisível (com protocolos que incluem iluminação irregular, gaiola inclinada, cama úmida, privação alimentar, entre outros) (Liu et al., 2018), ou a indução de Parkinson/esquizofrenia por meio de cirurgia estereotáxica (Matheus, 2015). Em seguida, realiza-se um novo TPS, frequentemente após privação prévia de água e alimento, e os resultados são comparados ao consumo basal e ao grupo controle. Reduções significativas na preferência pela sacarose são interpretadas como evidência de anedonia.

Quanto maior o consumo da solução adocicada, maior a sensação de prazer atribuída ao estímulo; quanto menor o consumo, mais evidente o estado anedônico. Essa quantificação é essencial para os estudos farmacológicos, pois permite avaliar a eficácia de tratamentos. Após a indução da anedonia, aplica-se o protocolo terapêutico ao animal e, em seguida, realiza-se um novo TPS. O aumento da preferência pela solução de sacarose em relação ao grupo não tratado indica que a substância testada apresenta efeito terapêutico sobre a anedonia. Assim, o TPS fornece uma medida robusta da ação de fármacos, permitindo verificar se o tratamento promove recuperação parcial ou completa da anedonia, além de oferecer parâmetros sobre a potência e a relevância farmacológica da intervenção no contexto experimental.

Apesar da alta confiabilidade do teste e do passo a passo preconizado por Willner et al. (1987), diversos fatores podem influenciar diretamente os resultados do TPS. Fatores

importantes incluem o ciclo circadiano e o sexo; por exemplo, animais estressados apresentam redução no consumo de sacarose, enquanto fêmeas consomem mais do que machos (Antoniuk et al., 2019; Albert et al., 2015). A privação de água e alimento também é discutida entre os autores. Alguns sugerem que a privação de 24 horas pode enviesar os resultados, pois o animal passa a buscar qualquer líquido para saciar a sede (Primo et al., 2023; He et al., 2020).

De modo geral, o TPS é um protocolo experimental muito útil para a mensuração da anedonia, porém exige padronização e controle rigoroso de fatores externos para garantir a confiabilidade dos resultados nos grupos experimentais. O TPS é considerado um teste excelente por ser simples, barato e representar adequadamente os efeitos farmacológicos, sendo um dos métodos mais utilizados na avaliação da anedonia em modelos pré-clínicos.

3. BASE NEUROANATÔMICA E NEUROQUÍMICA DO TESTE DE PREFERÊNCIA POR SACAROSE

3.1. CIRCUITO PALADAR CÉREBRO

Existem duas vias sensoriais do paladar no cérebro: a gustativa e a hedônica. O processamento sensorial inicia-se com a inervação vagal, que leva os sinais ao núcleo do trato solitário (NTS), onde os neurônios projetam-se para o núcleo parabraquial (NPB). A partir do NPB, as duas vias seguem trajetórias distintas: a via gustativa projeta-se para o núcleo talâmico ventro posteromedial e, em seguida, para o córtex gustativo primário; já a via hedônica projeta-se para o hipotálamo e o prosencéfalo ventral, convergindo diretamente nos neurônios dopaminérgicos do circuito de recompensa, incluindo o núcleo accumbens e a área tegmentar ventral (Lundy et. al., 2004).

Estudos iniciais demonstraram que o valor hedônico da solução açucarada é proporcional à concentração de sacarose e a privação de alimento. Logo quanto mais doce e quanto maior tempo de jejum, maior o valor hedônico da solução açucarada, por isso é fundamental a padronização no delineamento experimental do TPS (Davis et al., 1973; Booth et al., 1972).

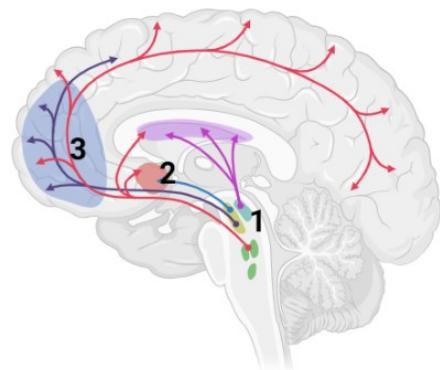
3.2. CIRCUITO RECOMPENSA

O sistema de recompensa é um circuito neural composto por diversas regiões cerebrais, responsável pela liberação de dopamina e pela formação de marcas neurais que induzem o desejo de repetir experiências associadas a essa liberação. Entre as principais estruturas envolvidas estão o feixe prosencefálico medial, a área tegmentar ventral (ATV), o hipotálamo lateral e regiões do córtex pré-frontal. O feixe prosencefálico medial é formado por fibras mielinizadas que conectam

o núcleo accumbens ao hipotálamo e à ATV, constituindo uma das principais vias dopaminérgicas do encéfalo (Atance, 2003).

A ativação do sistema de recompensa ocorre por meio de reforços afetivos positivos, a partir da convergência de estímulos oriundos do córtex pré-frontal (fig. 2.3), do hipotálamo e de outras regiões encefálicas sobre os neurônios dopaminérgicos da ATV (fig. 2.1). O núcleo central desse sistema está nas projeções dopaminérgicas da ATV para o núcleo accumbens (fig. 2.2) (Atance, 2003). O sistema de recompensa recebe aferências de múltiplas regiões cerebrais e, por sua vez, projeta neurônios dopaminérgicos para diferentes áreas do encéfalo, de modo que uma experiência prazerosa ou um estímulo reforçador resulta na liberação de dopamina em vários circuitos neurais, amplificando o efeito reforçador. Lesões nessa circuitaria comprometem de forma significativa o funcionamento do sistema de recompensa (Hajnal et al., 2005).

Figura 2 - Representação do sistema recompensa. 1. Área Tegmentar Ventral; 2. Núcleo do accumbens; 3. CórTEX pré-frontal.



Fonte: Próprio autor (bioRender, editada). Ano 2025.

Diversas substâncias atuam diretamente sobre os neurônios dopaminérgicos do sistema de recompensa. A sacarose, aumenta os níveis de dopamina extraneuronal no núcleo accumbens (NAc) de forma dependente da concentração (Hajnal et al., 2004). Apesar de o papel da dopamina na recompensa ainda ser debatido, há evidências de que a atividade dopaminérgica, especialmente no sistema mesolímbico, se intensifica diante de estímulos naturalmente preferidos (Salamone, 2003; Wise, 2002). Assim, os aumentos fáscicos de dopamina no NAc são considerados indicadores do valor de recompensa (prazer) associado a estímulos como a sacarose.

Esses aumentos transitórios modulam a sinalização dopaminérgica em regiões estriatais, ativando preferencialmente receptores D1, de baixa afinidade, enquanto os receptores D2, de alta afinidade, permanecem estimulados pelos níveis basais de dopamina (Nakanishi et al., 2014). O

incremento dopaminérgico no NAc, desencadeado pelo consumo de sacarose, confere saliência de incentivo ao alimento, reforçando seu valor motivacional (Berridge, 2007).

3.3. BASES NEUROQUÍMICAS DO SISTEMA RECOMPENSA.

O principal neurotransmissor associado ao efeito reforçador é a dopamina. O sistema dopaminérgico atua em diferentes regiões cerebrais, modulando múltiplas respostas. Sua ação no estriado ventral está diretamente relacionada à conversão de emoções em comportamentos motivados, os quais podem se expressar em atos motores. O núcleo accumbens, por sua vez, estabelece a conexão entre o sistema límbico e o sistema motor extrapiramidal, transformando sinais emocionais em respostas motivacionais. Dessa forma, o desejo pode se traduzir em ações motoras, compulsivas, quase involuntárias (Galvão, 1999; Atance, 2003).

A região central do sistema de recompensa é formada pelas conexões axonais entre o núcleo accumbens e a ATV, essa é uma região altamente sensível a alterações funcionais. Na esquizofrenia, observa-se uma hiperatividade dopaminérgica nessa via, enquanto no Parkinson há redução da densidade desses neurônios. Já na depressão, ocorre uma diminuição da expressão dos receptores dopaminérgicos D2 no núcleo accumbens e D3 no córtex pré-frontal, todas essas alterações afetam a capacidade de sentir prazer (Atance, 2003; Lemos et al., 2024; Mateus-Pinheiro et al., 2014).

Segundo Atance (2003), as drogas de abuso também atuam nessa região central, promovendo a liberação de dopamina no núcleo accumbens. A cocaína bloqueia a recaptura da dopamina no sistema mesocorticolímbico, prolongando a atividade dopaminérgica. Já as anfetaminas, além de inibirem a recaptura de dopamina e serotonina, aumentam a liberação de dopamina nos terminais pré-sinápticos.

Enquanto algumas doenças comprometem o sistema de recompensa a ponto de reduzir a capacidade de sentir prazer em situações antes prazerosas da vida, as drogas de abuso provocam uma superestimulação desse circuito, deixando uma marca profunda e induzindo o desejo constante por mais estímulo, característica central da dependência. Diante dessas peculiaridades, uma substância segura e eficaz para o tratamento de doenças neurobiológicas deve ser capaz de aumentar a atividade dopaminérgica, mas sem apresentar ou com mínimo potencial de causar dependência.

4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS DO TESTE DE PREFERÊNCIA POR SACAROSE

A anedonia é um sintoma comum a diversas doenças neurobiológicas e se manifesta, principalmente nos mamíferos, de forma muito semelhante. Dessa forma existem diversas maneiras de medir a anedonia em diversos grupos de animais, inclusive em humanos (Irons e Ribot, 1898; Fontana et al., 2018; Ellenbroek & Youn, 2016).

Em 1976, Chapman, Chapman e Raulin desenvolveram escalas de anedonia física e social, destinadas a avaliar a capacidade de experimentar prazer em contextos sensoriais e sociais. Essas medidas de auto-relato fornecem índices diretos do déficit de prazer e continuam sendo amplamente utilizadas. No entanto, devido à impossibilidade de comunicação verbal entre humanos e roedores, a aplicação direta dessas escalas em modelos animais é inviável. Por esse motivo, outros testes comportamentais foram desenvolvidos para melhor descrever e identificar a anedonia em modelos pré-clínicos (Liu et al., 2018).

O TPS é o protocolo mais utilizado e confiável para mensurar prazer e diagnosticar anedonia em roedores (Willner, 2016). No entanto, essa técnica não pode ser diretamente traduzida como método diagnóstico em humanos.

Existem parâmetros atuais que permitem inferir a anedonia tanto em roedores quanto em humanos. Observou-se que o estado anedônico associado ao transtorno depressivo maior está diretamente relacionado à redução da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) (Ma et al., 2025). Assim, a análise da VFC por meio do eletrocardiograma constitui um parâmetro não invasivo, aplicável tanto em animais quanto em humanos, fornecendo indícios importantes para o diagnóstico de anedonia, além de ser confiável e seguro para a experimentação de tratamentos.

5. LIMITES E DESAFIOS METODOLÓGICOS

Apesar da alta confiabilidade e ampla utilização do teste de preferência por sacarose (TPS) para a mensuração da anedonia em roedores, a grande diversidade de protocolos e a falta de padronização entre diferentes grupos de pesquisa ao redor do mundo podem comprometer a comparação de resultados (Willner, 2016). Fatores como sexo, horário do dia, duração do teste e a presença ou não de restrição de água e alimento podem influenciar significativamente os resultados, prejudicando a reprodutibilidade se não forem cuidadosamente controlados ou descritos (Primo et al., 2023).

Outro ponto crucial é a ausência de critérios claros no delineamento experimental, o que pode afetar a confiabilidade do teste e, em alguns casos, torná-lo irreprodutível. Embora o TPS seja

um método útil e fidedigno, é essencial estabelecer um protocolo padronizado e segui-lo rigorosamente ao longo de todo o experimento (Primo et al., 2023).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste de anedonia é fundamental para diagnosticar algumas doenças neurobiológicas, tanto no humano quanto nos modelos animais. O TPS se consolidou como padrão-ouro, por ser confiável para a avaliação da anedonia em modelos pré-clínicos, permitindo a investigação detalhada dos mecanismos neurobiológicos do prazer e da recompensa. Sua aplicação em roedores possibilita não apenas a identificação de estados anedônicos, mas também a avaliação da eficácia de intervenções farmacológicas, oferecendo dados relevantes sobre a recuperação da capacidade de experimentar prazer em diferentes contextos experimentais.

Apesar da alta confiabilidade do TPS, a diversidade de protocolos e a falta de padronização entre grupos de pesquisa ainda representam um desafio importante para a comparabilidade dos resultados. Fatores como sexo, ciclo circadiano, duração do teste e manipulação prévia de água e alimento podem influenciar diretamente os resultados, reforçando a necessidade de um delineamento experimental rigoroso e criterioso. O controle adequado desses fatores é essencial para garantir a reprodutibilidade e a validade dos achados, reforçando a importância de seguir protocolos padronizados durante toda a execução do teste.

Por fim, a translacionalidade do TPS se beneficia da integração com outros parâmetros não invasivos, como a variabilidade da frequência cardíaca, que permite inferir estados anedônicos tanto em animais quanto em humanos. Essa abordagem combinada fortalece o potencial do TPS como modelo experimental relevante, não apenas para a compreensão das bases neurobiológicas da anedonia, mas também para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas seguras e eficazes para doenças neurobiológicas em que a perda de prazer é um sintoma central.

REFERÊNCIAS

ALBERT, Paul R. et al. Why is depression more prevalent in women? *Journal Of Psychiatry And Neuroscience*, v. 40, n. 4, p. 219-221, jul. 2015. Canadian Science Publishing.
<http://dx.doi.org/10.1503/jpn.150205>.

ANTONIUK, Svitlana et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: meta-analysis of model reliability. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, [S.L.], v. 99, n. 1, p. 101-116, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.12.002>.

ATANCE, José Antonio Ramos. Sistema Recompensa. In: ATANCE, José Antonio Ramos. *Neurobiología da drogadição*. Madrid: Eudema, 2003. p. 1-94.

BOOTH, D.A. et al. Taste reactivity in starved, ready to eat and recently fed rats. *Physiology & Behavior*, v. 8, n. 5, p. 901-908, maio 1972. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(72\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(72)90303-4).

CHAPMAN, Loren J.; CHAPMAN, Jean P.; RAULIN, Michael L.. Scales for physical and social anhedonia. *Journal Of Abnormal Psychology*, v. 85, n. 4, p. 374-382, ago. 1976. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/0021-843x.85.4.374>.

DAVIS, John D. et al. The effectiveness of some sugars in stimulating licking behavior in the rat. *Physiology & Behavior*, v. 11, n. 1, p. 39-45, jul. 1973. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(73\)90120-0](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(73)90120-0).

ELLENBROEK, Bart et al. Rodent models in neuroscience research: is it a rat race?. *Disease Models & Mechanisms*, v. 9, n. 10, p. 1079-1087, 1 out. 2016. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/dmm.026120>.

FIGUEROA, Jaime et al. Anhedonia in pigs? Effects of social stress and restraint stress on sucrose preference. *Physiology & Behavior*, v. 151, n. 1, p. 509-515, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.08.027>.

FONSECA-RODRIGUES, Diana et al. Sucrose intake and preference by Wistar Han rats are not influenced by sex or food/water deprivation. *Pharmacology Biochemistry And Behavior*, v. 216, n. 1, p. 173387, maio 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2022.173387>.

FONTANA, Barbara D. et al. The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: a critical review. *Experimental Neurology*, v. 299, n. 1, p. 157-171, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.004>.

GALVÃO, Olavo Faria. O reforçamento na biologia evolucionária atual. *Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva*, v. 1, n. 1, p. 49-56, 1 fev. 1999. *Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva (RBTCC)*. <http://dx.doi.org/10.31505/rbtcc.v1i1.270>.

HAJNAL, Andras et al. Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *American Journal Of Physiology-Regulatory, Integrative And Comparative Physiology*, v. 286, n. 1, p. 31-37, jan. 2004. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00282.2003>.

HAJNAL, Andras et al. Taste pathways that mediate accumbens dopamine release by sapid sucrose. *Physiology & Behavior*, v. 84, n. 3, p. 363-369, mar. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.12.014>.

HE, Li-Wen et al. Optimization of food deprivation and sucrose preference test in SD rat model undergoing chronic unpredictable mild stress. *Animal Models And Experimental Medicine*, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 69-78, mar. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ame2.12107>.

IRONS, David; RIBOT, Th.. The Psychology of the Emotions. *The Philosophical Review*, v. 7, n. 3, p. 332-340, maio 1898. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/2177078>.

LEMOS, Amanda Kedma et al. Atualizações sobre o sistema dopaminérgico: neuroplasticidade, adolescência, envolvimentos com Esquizofrenia, Transtorno Obsessivo Compulsivo e TDAH. *Hum@Næ*, v. 18, n. 1, p. 1-27, 02 jun. 2024.

LIU, Meng-Ying et al. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nature Protocols*, v. 13, n. 7, p. 1686-1698, jul. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41596-018-0011-z>.

LUNDY, F. R. Jr.; NORRIS, R. Sistema gustativo. In: PAXINOS, G.; MAI, J. (Ed.). *O sistema nervoso do rato*. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2004. p. 891-921.

MA, Chin-Chao; YANG, Chu-Ya; CHANG, Wei-Chou; SACK, Alexander T.; CHANG, Chuan-Chia; CHANG, Hsin-An. From Rhythm to Relief: heart rate variability as a window into anhedonia response during agomelatine treatment in major depressive disorder. *Medicina*, v. 61, n. 9, p. 1522, 25 ago. 2025. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/medicina61091522>.

MATEUS-PINHEIRO, António et al. The Sweet Drive Test: refining phenotypic characterization of anhedonic behavior in rodents. *Frontiers In Behavioral Neuroscience*, Braga, v. 8, n. 74, p. 1-10, 7 mar. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00074>.

MATHEUS, Filipe Carvalho. Dissociando anedonia de outros sintomas da depressão na doença de Parkinson em um modelo experimental em ratos: papel do estriado dorsolateral e do córtex pré-frontal. 2015. 179 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2015.

NAKANISHI, S.; HIKIDA, T.; YAWATA, S.. Distinct dopaminergic control of the direct and indirect pathways in reward-based and avoidance learning behaviors. *Neuroscience*, v. 282, p. 49-59, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.04.026>.

PRIMO, Maria João et al. Sucrose preference test: a systematic review of protocols for the assessment of anhedonia in rodents. *European Neuropsychopharmacology*, v. 77, n. 1, p. 80-92, dez. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2023.08.496>.

SALAMONE, J.D.; CORREA, M.; MINGOTE, S.; WEBER, S.M.. Nucleus Accumbens Dopamine and the Regulation of Effort in Food-Seeking Behavior: implications for studies of natural motivation, psychiatry, and drug abuse. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, v. 305, n. 1, p. 1-8, abr. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.102.035063>.

SCHEGGI, Simona et al. Making Sense of Rodent Models of Anhedonia. *International Journal Of Neuropsychopharmacology*, v. 21, n. 11, p. 1049-1065, 20 set. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ijnp/ppy083>.

Willner, P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiology of Stress*, v. 6, p. 78-93, 2016. DOI: 10.1016/j.ynstr.2016.08.002

WILLNER, P. et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, v. 93, n. 3, p. 358-364, nov. 1987. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00187257>.

CAPÍTULO XII

ASPECTOS NEUROFISIOLÓGICOS E TRANSLACIONAIS DO TESTE DE PLACA QUENTE EM MODELOS ANIMAIS DE NOCICEPÇÃO

NEUROPHYSIOLOGICAL AND TRANSLATIONAL ASPECTS OF THE HOT PLATE TEST IN ANIMAL MODELS OF NOCICEPTION

DOI: 10.51859/amplia.nat298.1126-12

Madna Costa Freitas ¹
Gislei Frota Aragão ²

¹ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará – Brasil.

² Professor do Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará – ISCB/UECE – Brasil.

RESUMO

O teste de placa quente (*Hot Plate Test*) é um modelo amplamente validado para avaliação da nocicepção térmica supramedular em roedores, com destaque para sua sensibilidade a fármacos de ação central. Baseado na latência para comportamentos reflexos como lambedura ou salto, o teste tem permitido avanços na compreensão dos mecanismos fisiológicos e farmacológicos da dor térmica aguda. Este capítulo demonstra que a nocicepção térmica envolve uma rede integrada de vias ascendentes, como os tratos espinotalâmico e espinoreticular, e descendentes moduladoras, que englobam neurotransmissores excitatórios (glutamato, substância P) e inibitórios (GABA, opioides, monoaminas). Os dados discutidos evidenciam que alterações na liberação desses neurotransmissores, principalmente mediadas por influxo de cálcio nos terminais sinápticos, modulam diretamente a resposta nociceptiva. Além disso, o teste de placa quente é responsável a diversas classes de compostos, desde opioides até fitofármacos e canabinoides, e tem sido aplicado em modelos de TEA e neurotoxicidade, com capacidade de detectar hiper ou hipossensibilidades térmicas. No entanto, limitações como variabilidade interindividual, influência de fatores motores e ausência de avaliação de dor crônica exigem cautela metodológica e uso complementar de outros

modelos. Conclui-se que, quando conduzido com rigor experimental, o teste de placa quente é uma ferramenta eficaz e com perspectiva translacional relevante para investigar analgesia e os circuitos centrais da dor.

Palavras-chave: Nocicepção térmica. Analgesia central. Neurotransmissores. Modelos animais.

ABSTRACT

The hot plate test is a widely validated model for the evaluation of supraspinal thermal nociception in rodents, particularly due to its sensitivity to centrally acting drugs. Based on the latency to reflex behaviors such as paw licking or jumping, this test has contributed to advances in the understanding of the physiological and pharmacological mechanisms of acute thermal pain. This chapter demonstrates that thermal nociception involves an integrated network of ascending pathways, such as the spinothalamic and spinoreticular tracts, and descending modulatory systems, comprising excitatory neurotransmitters (glutamate, substance P) and inhibitory ones (GABA, opioids, monoamines). The data discussed indicate that changes in the release of these neurotransmitters—primarily mediated by calcium influx into synaptic terminals—directly modulate the nociceptive response. In addition, the hot plate test is responsive to various classes of compounds,

including opioids, phytopharmaceuticals, and cannabinoids, and has been applied in models of autism spectrum disorder and neurotoxicity, with the ability to detect thermal hypersensitivity or hyposensitivity. However, limitations such as interindividual variability, motor interference, and the lack of assessment of chronic pain require careful methodology and the complementary use

of other models. It is concluded that, when conducted with experimental rigor, the hot plate test is an effective tool with relevant translational potential for investigating analgesia and the central circuits of pain.

Keywords: Thermal nociception. Central analgesia. Neurotransmitters. Animal models.

1. INTRODUÇÃO

A dor é definida como uma experiência sensorial e emocional aversiva, causada por, ou similar àquela causada por, lesão tecidual real ou potencial (Raja *et al.*, 2020). Este fenômeno é mediado por mecanismos neurofisiológicos integrados, que envolvem quatro etapas principais: transdução, pelas quais nociceptores convertem sinais nocivos em impulsos elétricos; transmissão, por fibras aferentes (A δ e C); modulação espinhal e percepção em áreas corticais e límbicas. Tais processos são amplamente influenciados por interações neuro-imunes no local de lesão e dentro do sistema nervoso central, ressaltando o caráter multidimensional e adaptativo da dor (Karcz *et al.*, 2024).

A investigação desse fenômeno em modelos animais, especialmente roedores, é crucial para compreensão de seus mecanismos fisiopatológicos e desenvolvimento de intervenções terapêuticas. Como a dor subjetiva não pode ser medida diretamente nesses modelos, utiliza-se a nocicepção, definida como codificação neuronal de estímulos nocivos, avaliada através de comportamentos reflexos (Deuis; Dvorakova; Vetter, 2017).

O teste de placa quente (*Hot Plate Test*) se apresenta como um eficaz modelo para avaliar a nocicepção térmica supramedular, pois detecta reações reflexas (lambéatura, salto) mediadas por circuitos centrais e sensíveis a fármacos com ação central (Espejo *et al.*, 1994; Deuis; Dvorakova; Vetter, 2017). Dessa forma, esse trata-se de um modelo amplamente utilizado na pesquisa pré-clínica da dor, com reconhecida relevância na avaliação de fármacos analgésicos de ação central e no entendimento dos mecanismos que modulam a dor térmica.

Nesse cenário, este capítulo tem como objetivo apresentar os fundamentos neurofisiológicos, o protocolo experimental e as principais aplicações do teste de placa quente em modelos animais de nocicepção.

2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL DO TESTE DE PLACA QUENTE

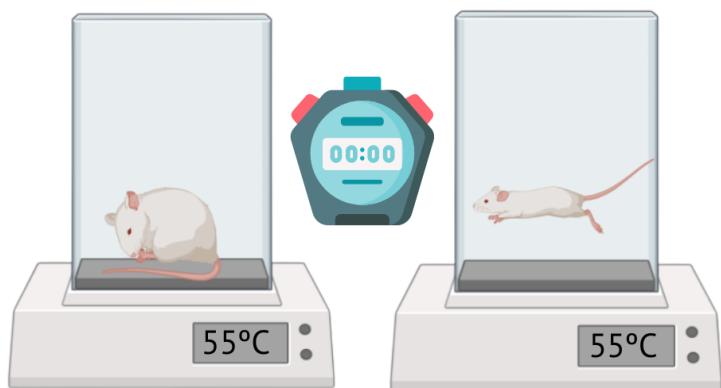
O teste de placa quente é um modelo amplamente utilizado na avaliação da nocicepção térmica supramedular em roedores, especialmente camundongos e ratos. Esse método foi descrito

pela primeira vez por Woolfe e Macdonald na década de 1940, no contexto da avaliação da eficácia analgésica de derivados da petidina, sendo padronizado como um ensaio sensível para detectar fármacos com ação central sobre a percepção da dor térmica. O protocolo original consistia na exposição de ratos a uma superfície aquecida entre 52 °C e 55 °C, mensurando a latência para respostas reflexas como a lambidura da pata ou o salto, comportamentos estes interpretados como indicadores confiáveis de nociceção central (Macdonald; Woolfe, 1946).

Desde sua introdução, o método tem sido continuamente aperfeiçoado, mantendo sua relevância pela simplicidade de execução, sensibilidade farmacológica e boa reprodutibilidade em estudos com modelos animais. O teste baseia-se na medição do tempo de latência até a manifestação de comportamentos nocifensivos após exposição a uma superfície metálica aquecida, sendo particularmente sensível à ação de fármacos com efeito analgésico central (Macdonald; Woolfe, 1946; Espejo *et al.*, 1994; Deuis; Dvorakova; Vetter, 2017).

O equipamento básico do teste consiste em uma câmara cilíndrica ou quadrada transparente posicionada sobre uma placa metálica aquecida (Figura 1), com temperatura normalmente mantida entre 50 °C e 55 °C. Após a introdução do animal na câmara, inicia-se a cronometragem para registrar o tempo de latência até a primeira resposta nocifensiva observável, geralmente apresentada pela ação de lamber a pata posterior ou saltar. É estabelecido um tempo máximo de exposição, geralmente de 30 segundos (*cut-off*), para evitar lesões teciduais. A latência média é então utilizada como medida da sensibilidade nociceptiva do animal e da eficácia de fármacos analgésicos (Hunskaar; Berge; Hole, 1986; Ye *et al.*, 2021).

Figura 1 - Representação do teste de placa quente em roedores



Fonte: Próprio autor. Ano: 2025.

O protocolo pode variar conforme o delineamento experimental, incluindo alterações na temperatura da placa, número de exposições e análise de diferentes comportamentos. Além da versão clássica, existem variações do teste de placa quente que ampliam sua aplicabilidade. No modelo dinâmico, a temperatura da placa é gradualmente elevada (por exemplo, a uma taxa de

10–12 °C/min), permitindo a determinação do limiar de retirada térmica (Yalcin *et al.*, 2009). Já o modelo unilateral permite testar separadamente cada membro posterior, sendo particularmente útil na detecção de hiperalgesia local após administração de substâncias algógenas periféricas (Menéndez *et al.*, 2002).

Além da padronização dos parâmetros técnicos, é fundamental considerar fatores não-nociceptivos que influenciam os resultados do teste. Um estudo experimental demonstrou que variáveis como peso corporal, exposição prévia ao aparelho e diferenças individuais impactam diretamente a latência de resposta térmica. Animais com maior massa corporal tendem a apresentar menor latência, possivelmente devido a alterações na condução térmica ou sensibilidade basal. Ainda, exposições repetidas ao teste, mesmo sem intervenção farmacológica, resultam em redução progressiva da latência, o que pode refletir aprendizado ou habituação. Os autores também relataram alta variabilidade entre indivíduos do mesmo grupo, reforçando a necessidade de controle rigoroso de variáveis como sexo, idade, histórico prévio e condições ambientais. Esses achados ressaltam a importância da padronização experimental para assegurar a validade e a reproduzibilidade do modelo (Gunn *et al.*, 2011).

Em síntese, o protocolo do teste de placa quente apresenta simplicidade operacional, sensibilidade farmacológica e relevância translacional, sendo um dos métodos mais utilizados para avaliação da dor térmica aguda em modelos pré-clínicos de nocicepção.

3. BASE NEUROANATÔMICA E NEUROQUÍMICA DO TESTE DE PLACA QUENTE

3.1. TRANSDUÇÃO E CONDUÇÃO NOCICEPTIVA TÉRMICA

A nocicepção térmica no teste de placa quente inicia-se nos nociceptores periféricos da pele, responsáveis por detectar estímulos superiores a 43 °C. Esses nociceptores expressam canais iônicos como TRPV1, TRPA1 e TRPM3, que atuam na transdução de estímulos térmicos em sinais elétricos. Estudos com camundongos deficientes em TRPV1 mostraram redução significativa na percepção de dor térmica, evidenciando seu papel crítico na transdução do estímulo nocivo (limiar aneural > 50 °C) (Hoffmann *et al.*, 2013; Yonghak, Miyata; Kurganov 2020).

Após a transdução, a condução do estímulo se dá pelas fibras aferentes A δ (rápidas e levemente mielinizadas), associadas à percepção de dor aguda, e fibras C (lentas e não mielinizadas), ligadas a sensações térmicas mais difusas e persistentes. Essas fibras penetram na medula espinhal de forma unilateral por meio da raiz dorsal e convergem principalmente nas lâminas I e II do corno dorsal, também conhecidas como substância gelatinosa, onde ocorre

integração sináptica entre interneurônios excitatórios (p. ex., glutamatérgicos) e inibidores (GABAérgicos e glicinérgicos) (Chen; Tang, 2024).

A partir desse ponto, o sinal nociceptivo ascende via trato espinotalâmico lateral até o tálamo e, em seguida, ao córtex somatossensorial para a percepção consciente da dor. Simultaneamente, mecanismos de sensibilização central, como o “wind-up” e potenciação a longo prazo (LTP), podem ocorrer nas sinapses das fibras A δ /C com interneurônios, amplificando a nocicepção térmica (Todd, 2022).

3.2. VIAS NEUROANATÔMICAS DA NOCICEPÇÃO TÉRMICA

A condução da informação nociceptiva térmica envolve principalmente a ativação da via espinotalâmica lateral, que transporta sinais de dor e temperatura desde os neurônios de segunda ordem na medula espinhal até estruturas supramedulares, como o tálamo e o córtex somatossensorial. Neurônios localizados predominantemente nas lâminas I e V do corno dorsal cruzam a linha média da medula e ascendem contralateralmente por essa via até o núcleo ventroposterolateral (VPL) do tálamo (Ab Aziz; Ahmad, 2006).

O tálamo atua como uma estação de retransmissão sensorial, projetando sinais para o córtex somatossensorial primário (S1), onde ocorre a codificação discriminativa da localização e intensidade do estímulo térmico (Ab Aziz; Ahmad, 2006). Evidências demonstram que neurônios talâmicos que expressam o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) contribuem para a modulação da dor térmica. Um estudo com camundongos mostrou que a ablação desses neurônios resulta em aumento da latência no teste de placa quente, sugerindo que esses circuitos talâmicos são essenciais para a resposta nociceptiva térmica (Kang *et al.*, 2025).

Além disso, foi identificada uma via espino-cortical direta, que contorna o tálamo e conecta de forma monossinaptica neurônios espinhais ao córtex somatossensorial. Essa conexão, evidenciada em camundongos por meio de técnicas de traçado neuronal e optogenética, permite uma resposta mais rápida a estímulos nocivos e pode participar da mediação dos comportamentos observados no teste de placa quente (Cai *et al.*, 2023).

Paralelamente à via espinotalâmica, o trato espinorreticular conduz informações nociceptivas a núcleos do tronco encefálico, como o núcleo parabranquial lateral, que se conecta à amígdala central. Essa via está envolvida na mediação dos componentes afetivos e motivacionais da dor térmica, além de participar na regulação das respostas emocionais e comportamentais à dor (Torres-Rodriguez *et al.*, 2023).

Dessa forma, o teste de placa quente ativa circuitos neurais distribuídos entre medula, tálamo, córtex somatossensorial, estruturas límbicas e núcleos do tronco encefálico. A integração

dessas vias ascendentes permite a expressão de comportamentos reflexos e adaptativos frente ao estímulo nociceptivo, tornando o modelo altamente sensível a intervenções com fármacos de ação central.

3.3. BASES NEUROQUÍMICAS DA RESPOSTA NOCICEPTIVA TÉRMICA

A resposta nociceptiva térmica ativada no teste de placa quente envolve uma complexa interação entre neurotransmissores excitatórios e inibitórios em múltiplos níveis do sistema nervoso central. Entre os mediadores mais relevantes estão o glutamato, os opioides endógenos, a serotonina (5-HT), a noradrenalina e o GABA, que atuam tanto no processamento inicial do estímulo quanto na modulação descendente da dor (Tao *et al.*, 2019).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório envolvido na nocicepção, sendo liberado por aferentes primários nas sinapses com neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula. Ele se liga a receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA, kainato) e metabotrópicos (mGluRs), promovendo a despolarização dos neurônios espinhais e a transmissão do sinal doloroso (Latremoliere; Woolf, 2009). Em um modelo com o teste de placa quente, o bloqueio dos receptores NMDA reduziu significativamente a latência de resposta, reforçando seu papel na sensibilização central térmica (Rahman *et al.*, 2002).

Em contrapartida, os sistemas inibitórios endógenos, como os opioides e o GABA, atuam limitando a excitação excessiva. Os opioides, como a endorfina, encefalina e dinorfina, ativam receptores μ , δ e κ distribuídos no corno dorsal, tronco encefálico e córtex, inibindo a liberação de neurotransmissores excitatórios e promovendo analgesia (Stein, 2016). A administração de morfina ou agonistas opioides aumenta a latência no teste de placa quente, validando sua sensibilidade a drogas de ação central (Deuis; Dvorakova; Vetter, 2017).

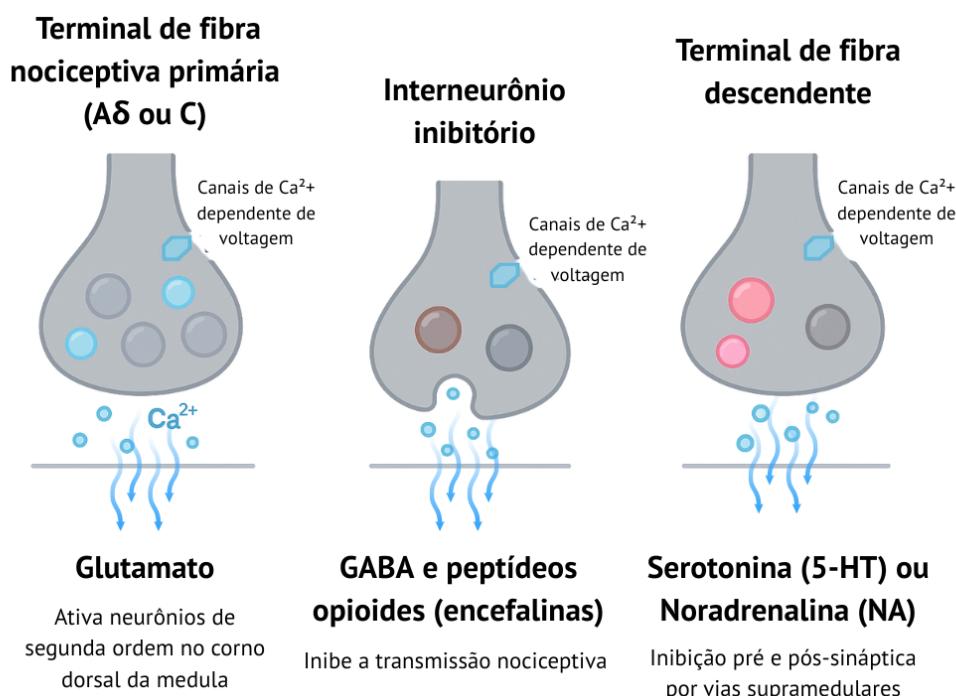
O neurotransmissor GABA, por sua vez, exerce modulação sináptica inibitória através dos receptores GABA_A e GABA_B. Seu papel na regulação térmica foi evidenciado por experimentos em que antagonistas GABAérgicos diminuíram a latência nociceptiva, sugerindo que a inibição gabaérgica é essencial para o controle do limiar térmico doloroso (Enna; McCarson, 2006).

Além disso, os sistemas monoaminérgicos descendentes, envolvendo serotonina (5-HT) e noradrenalina, regulam a transmissão da dor via projeções oriundas do bulbo rostral ventromedial e da substância cinzenta periaquedatal (PAG). Agentes farmacológicos que aumentam a disponibilidade sináptica dessas monoaminas, como antidepressivos tricíclicos ou ISRS, têm demonstrado eficácia em elevar a latência na placa quente, refletindo sua ação antinociceptiva central (Millan, 2002).

A ativação dos nociceptores térmicos periféricos leva à despolarização das fibras sensoriais e à entrada de íons cálcio nos terminais pré-sinápticos, promovendo a liberação de neurotransmissores como glutamato e substância P. Esses neurotransmissores atuam sobre receptores específicos no corno dorsal da medula, desencadeando a resposta nociceptiva ascendente. Em paralelo, interneurônios inibitórios e fibras descendentes moduladoras também dependem da entrada de cálcio para a liberação de GABA, encefalinas, serotonina e noradrenalina, todos fundamentais para a modulação da dor térmica percebida (Chang; Jiang; Chen, 2019).

A figura 2 ilustra os três principais tipos de terminais sinápticos envolvidos nesse processo e os mecanismos de liberação mediados por influxo de cálcio nos diferentes contextos: excitatório aferente, inibitório local e modulador descendente.

Figura 2 - Mecanismos de liberação neurotransmissora mediados por influxo de cálcio nas vias nociceptivas



Terminais neuroniais envolvidos na modulação da dor térmica no teste de placa quente. Terminal de fibra nociceptiva primária (A δ ou C) libera glutamato em resposta ao influxo de Ca^{2+} , ativando neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula. Interneurônio inibitório libera GABA e peptídeos opioides (encefalinas), promovendo inibição da transmissão nociceptiva. Terminal de fibra descendente libera serotonina (5-HT) ou noradrenalina (NA), reforçando a inibição pré e pós-sináptica por vias supramedulares.

Fonte: Próprio autor. Ano: 2025.

Por fim, mecanismos endocanabinoides também participam da modulação da dor térmica. Agonistas de receptores CB1 reduzem a sensibilidade nociceptiva em testes térmicos, enquanto

antagonistas desses receptores bloqueiam o efeito analgésico de canabinoides ou opioides, sugerindo uma interação funcional entre esses sistemas (Woodhams *et al.*, 2017).

4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS DO TESTE DE PLACA QUENTE

O teste de placa quente é amplamente utilizado na triagem de analgésicos de ação central devido à sua capacidade de detectar alterações na latência de resposta térmica mediadas por vias supramedulares. Essa característica confere ao modelo alta relevância translacional, pois permite a previsão da eficácia analgésica de fármacos em humanos com base em seus efeitos em roedores (Espejo *et al.*, 1994; Deuis; Dvorakova; Vetter, 2017).

Compostos opioides como morfina e fentanil promovem aumento significativo da latência de resposta no teste, efeito revertido pela administração de naloxona, o que confirma a participação de receptores μ -opioides. Essa correlação entre o perfil farmacodinâmico em modelos animais e a eficácia clínica observada reforça o valor do teste na triagem de analgésicos centrais (Giorno *et al.*, 2018; Baehr *et al.*, 2022).

Além dos opioides clássicos, o teste tem sido sensível a compostos não opioides com propriedades analgésicas centrais. Flavonoides como herbacetina e galangina, por exemplo, mostraram aumento de latência no teste de placa quente, sugerindo ação central que também pode ser revertida com naloxona ou mediada por citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β (Oqal *et al.*, 2023; Lin *et al.*, 2024).

Essa metodologia também é utilizada para investigar alterações nociceptivas associadas à dependência, tolerância e abstinência de opiáceos. Estudos demonstram que o uso crônico de fentanil pode induzir hiperalgesia, observada pela redução da latência de resposta térmica, sendo o teste útil para rastrear a dinâmica desses processos fisiopatológicos (Minville *et al.*, 2010; Uddin *et al.*, 2021).

Do ponto de vista farmacológico, o teste também se aplica à triagem de fármacos ansiolíticos, anticonvulsivantes e antidepressivos, cujos efeitos centrais sobre a modulação da dor térmica vêm sendo explorados. Além disso, em modelos inflamatórios, como os induzidos por formalina ou carragenina, o teste de placa quente permite a avaliação de potenciais efeitos antinociceptivos de novos compostos (Aitbaba *et al.*, 2024; Souza *et al.*, 2025).

A aplicação do teste expandiu-se para modelos de neurodesenvolvimento, como no Transtorno do Espectro Autista (TEA). Em modelos murinos induzidos por ácido valproico, bem como em linhagens geneticamente modificadas, a latência de resposta térmica tem sido utilizada

como indicador de hipo ou hipersensibilidade sensorial, características comuns em pacientes com TEA (Banerjee *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2021).

Além disso, em estudos de neurotoxicidade, como os induzidos por quimioterápicos (cisplatina, 5-fluorouracil), o teste tem sido eficaz na detecção de hiperalgesia térmica e na avaliação da ação de agentes com potencial neuroprotetor. Esses modelos contribuem para o entendimento dos mecanismos de neuropatia induzida por fármacos e para o desenvolvimento de terapias que visam preservar a integridade funcional das vias nociceptivas (Calls *et al.*, 2020; Faheem *et al.*, 2022).

5. LIMITES E DESAFIOS METODOLÓGICOS

Apesar de ser amplamente utilizado, o teste de placa quente apresenta diversas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. Fatores não-nociceptivos, como peso corporal, habituação e repetição de testes, podem interferir significativamente nas respostas comportamentais observadas, como já citado anteriormente (Gunn *et al.*, 2011).

Além disso, o teste tradicional envolve os quatro membros do animal e, por vezes, a cauda, o que pode dificultar inferências sobre efeitos localizados ou assimétricos. Nessas situações, têm sido aplicados modelos modificados, como o protocolo unilateral, que permite a avaliação isolada de cada pata posterior, sendo útil para detectar hiperalgesia localizada. No entanto, essas adaptações frequentemente exigem contenção manual dos animais, aumentando o estresse e a variabilidade (Deuis; Dvorakova; Vetter, 2017).

A reproduzibilidade dos dados também pode ser comprometida por fatores técnicos, como a temperatura da placa, a taxa de aquecimento e os critérios de resposta adotados. Por exemplo, placas aquecidas a 50 °C versus 55 °C geram latências significativamente diferentes, dificultando comparações entre estudos. Além disso, comportamentos como lamber a pata, salto ou elevar os membros possuem diferentes sensibilidades à analgesia, o que pode impactar a interpretação dos resultados farmacológicos (Espejo *et al.*, 1994; Deuis; Dvorakova; Vetter, 2017).

É necessário salientar que o teste de placa quente não contempla aspectos afetivo-motivacionais da dor crônica ou neuropática, uma vez que se baseia majoritariamente em reflexos espinais e supramedulares rápidos. Assim, embora eficaz para detectar analgesia em dor térmica aguda, o modelo apresenta limitações na previsão da eficácia clínica de compostos voltados à dor persistente, especialmente os não-opioides, dado que não representa de forma robusta fenômenos como sensibilização central (Deuis; Dvorakova; Vetter, 2017).

Outra limitação importante reside na influência de efeitos adversos de fármacos no sistema motor ou no estado geral de alerta. Drogas que causam sedação, sonolência, ataxia ou redução da

atividade locomotora podem aumentar artificialmente a latência de resposta, sem atuar diretamente na via nociceptiva. Por isso, a aplicação de testes complementares, como o ensaio de formalina ou o teste de Hargreaves, é recomendada para discriminar efeitos analgésicos genuínos (Chen *et al.*, 2024).

Por fim, mesmo sendo um paradigma consolidado e amplamente aceito na triagem inicial de analgésicos, o teste de placa quente requer rigor experimental, controle de variáveis não relacionadas à dor e integração com modelos comportamentais adicionais para garantir validade translacional e precisão nos achados.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise integrada dos fundamentos neurofisiológicos, dos aspectos metodológicos e das aplicações do teste de placa quente evidencia que esse método permanece essencial para a investigação da nocicepção térmica supramedular em modelos animais. A ativação coordenada de circuitos espinais e supraspinais confere ao modelo sensibilidade a drogas de ação central e o torna altamente preditivo de respostas analgésicas observadas em humanos.

Em síntese, o teste de placa quente se apresenta como um modelo efetivo, desde que empregado com rigor técnico e contextualizado dentro de um escopo experimental mais direcionado. Sua utilização criteriosa contribui para o avanço da farmacologia da dor e para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e seguras.

REFERÊNCIAS

AB AZIZ, Che Badariah; AHMAD, Asma Hayati. The role of the thalamus in modulating pain. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, [S.l.], v. 13, n. 2, p. 11–18, jul. 2006.

AITBABA, Abdelfatah; KABDY, Hamid; BASLAM, Abdelmounaim; AZRAIDA, Hajar; ABOUFATIMA, Rachida; YAZOULI, Loubna El; SOKAR, Zahra; GARZOLI, Stefania; CHAIT, Abderrahman. Chemical Investigation and Antinociceptive Activity Evaluation of Marrubium Vulgare L. Aqueous Extract. **Chemistry & Biodiversity**, [S.l.], v. 21, n. 5, p. 1, 17 abr. 2024. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.202400228>.

BAEHR, Carly A.; WU, Mariah M.; PANDIT, Sujata G.; ARIAS-UMANA, Jose; AUCOIN, David; PRAVETONI, Marco. Pharmacological Profiling of Antifentanyl Monoclonal Antibodies in Combination with Naloxone in Pre- and Postexposure Models of Fentanyl Toxicity. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, [S.l.], v. 381, n. 2, p. 129-136, maio 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.121.001048>.

BANERJEE, Anwesha; ENGINEER, Crystal T.; SAULS, Bethany L.; MORALES, Anna A.; KILGARD, Michael P.; PLOSKI, Jonathan E.. Abnormal emotional learning in a rat model of autism exposed to valproic acid in utero. **Frontiers In Behavioral Neuroscience**, [S.l.], v. 8, p. 1, 12 nov. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00387>.

CAI, Bing; WU, Dan; XIE, Hong; CHEN, Yan; WANG, Huadong; JIN, Sen; SONG, Yuran; LI, Anan; HUANG, Shiqi; WANG, Sashuang. A direct spino-cortical circuit bypassing the thalamus modulates nociception. **Cell Research**, [S.L.], v. 33, n. 10, p. 775-789, 13 jun. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41422-023-00832-0>.

CALLS, Aina; TORRES-ESPIN, Abel; NAVARRO, Xavier; YUSTE, Victor J; UDINA, Esther; BRUNA, Jordi. Cisplatin-induced peripheral neuropathy is associated with neuronal senescence-like response. **Neuro-Oncology**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 88-99, 29 jun. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/neuonc/noaa151>.

CHANG, Chu-Ting; JIANG, Bo-Yang; CHEN, Chih-Cheng. Ion Channels Involved in Substance P-Mediated Nociception and Antinociception. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 7, p. 1596, 30 mar. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20071596>.

CHEN, Xufeng; TANG, Shao-Jun. Neural Circuitry Polarization in the Spinal Dorsal Horn (SDH): a novel form of dysregulated circuitry plasticity during pain pathogenesis. **Cells**, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 398, 25 fev. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells13050398>.

DEUIS, Jennifer R.; DVORAKOVA, Lucie S.; VETTER, Irina. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. **Frontiers In Molecular Neuroscience**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1, 6 set. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2017.00284>.

ENNA, S.J.; MCCARSON, Kenneth E.. The Role of GABA in the Mediation and Perception of Pain. **Advances In Pharmacology**, [S.L.], p. 1-27, 2006. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s1054-3589\(06\)54001-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1054-3589(06)54001-3).

ESPEJO, Emilio F.; STINUS, Louis; CADOR, Martine; MIR, Diego. Effects of morphine and naloxone on behaviour in the hot plate test: an ethopharmacological study in the rat. **Psychopharmacology**, [S.L.], v. 113, n. 3-4, p. 500-510, jan. 1994. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02245230>.

FAHEEM, Muhammad; KHAN, Arif-Ullah; SALEEM, Muhammad Waqas; SHAH, Fawad Ali; ALI, Fawad; KHAN, Abdul Waheed; LI, Shupeng. Neuroprotective Effect of Natural Compounds in Paclitaxel-Induced Chronic Inflammatory Pain. **Molecules**, [S.L.], v. 27, n. 15, p. 4926, 2 ago. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27154926>.

GIORNO, Thais Biondino Sardella; MOREIRA, Iris Gonçalvez da Silva; REZENDE, Claudia Moraes; FERNANDES, Patricia Dias. New β N-octadecanoyl-5-hydroxytryptamide: antinociceptive effect and possible mechanism of action in mice. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1, 3 jul. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-28355-4>.

GUNN, Amanda; BOBECK, Erin N.; WEBER, Ceri; MORGAN, Michael M.. The Influence of Non-Nociceptive Factors on Hot-Plate Latency in Rats. **The Journal Of Pain**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 222-227, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2010.06.011>.

HOFFMANN, T.; KISTNER, K.; MIERMEISTER, F.; WINKELMANN, R.; WITTMANN, J.; FISCHER, M.J.M.; WEIDNER, C.; REEH, P.W.. TRPA1 and TRPV1 are differentially involved in heat nociception of mice. **European Journal Of Pain**, [S.L.], v. 17, n. 10, p. 1472-1482, 29 maio 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/j.1532-2149.2013.00331.x>.

HUNSKAAR, Steinar; BERGE, Odd-Geir; HOLE, Kjell. A modified hot-plate test sensitivie to mild analgesics. **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 101-108, ago. 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-4328\(86\)90088-4](http://dx.doi.org/10.1016/0166-4328(86)90088-4).

KANG, Sukjae J.; LIU, Shijia; KIM, Jong-Hyun; KIM, Dong-Il; OH, Tae Gyu; PENG, Jiahang; YE, Mao; LEE, Kuo-Fen; EVANS, Ronald M.; GOULDING, Martyn. Thalamic CGRP neurons define a spinothalamic pathway for affective pain. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 122, n. 28, p. 1, 9 jul. 2025. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2505889122>.

KARCZ, Marcin; ABD-EL-SAYED, Alaa; CHAKRAVARTHY, Krishnan; MANSOOR, Aman; STRAND, Natalie; MALINOWSKI, Mark; LATIF, Usman; DICKERSON, David; SUVAR, Tolga; LUBENOW, Timothy. Pathophysiology of Pain and Mechanisms of Neuromodulation: a narrative review (a neuron project). **Journal Of Pain Research**, [S.L.], v. 17, p. 3757-3790, nov. 2024. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/jpr.s475351>.

LATREMOLIERE, Alban; WOOLF, Clifford J.. Central Sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **The Journal Of Pain**, [S.L.], v. 10, n. 9, p. 895-926, set. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2009.06.012>.

LIN, Kaiwen; FU, Datian; WANG, Zhongtao; ZHANG, Xueer; ZHU, Canyang. Analgesic and anti-inflammatory effects of galangin: a potential pathway to inhibit transient receptor potential vanilloid 1 receptor activation. **The Korean Journal Of Pain**, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 151-163, 1 abr. 2024. Korean Pain Society. <http://dx.doi.org/10.3344/kjp.23363>.

MACDONALD, A. D.; WOOLFE, G. Analgesic action of pethidine derivatives and other analgesics and their effect on respiration. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 1, n. 1, p. 4-14, 1946.

MARTIN, Loren J.; POULSON, Sandra J.; MANNAN, Emma; SIVASELVACHANDRAN, Sivaani; CHO, Moonjeong; SETAK, Fatima; CHAN, Claire. Altered nociceptive behavior and emotional contagion of pain in mouse models of autism. **Genes, Brain And Behavior**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 1, 23 nov. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/gbb.12778>.

MENÉNDEZ, Luis; LASTRA, Ana; HIDALGO, Agustín; BAAMONDE, Ana. Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. **Journal Of Neuroscience Methods**, [S.L.], v. 113, n. 1, p. 91-97, jan. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0165-0270\(01\)00483-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0165-0270(01)00483-6).

MILLAN, Mark J.. Descending control of pain. **Progress In Neurobiology**, [S.L.], v. 66, n. 6, p. 355-474, abr. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0301-0082\(02\)00009-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0301-0082(02)00009-6).

MINVILLE, V; FOURCADE, O; GIROLAMI, J.-P.; TACK, I. Opioid-induced hyperalgesia in a mice model of orthopaedic pain: preventive effect of ketamine. **British Journal Of Anaesthesia**, [S.L.], v. 104, n. 2, p. 231-238, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1093/bja/aep363>.

OQAL, M.; QNAIS, E.; ALQUDAH, A.; GAMMOH, O.. Analgesic effect of the flavonoid herbacetin in nociception animal models. **European Review For Medical And Pharmacological Sciences**, [S.L.], v. 27, n. 23, p. 11236-11248, dez. 2023. Verduci Editore s.r.l.. http://dx.doi.org/10.26355/eurrev_202312_34563.

RAJA, Srinivasa N.; CARR, Daniel B.; COHEN, Milton; FINNERUP, Nanna B.; FLOR, Herta; GIBSON, Stephen; KEEFE, Francis J.; MOGIL, Jeffrey S.; RINGKAMP, Matthias; SLUKA, Kathleen A.. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, [S.L.], v. 161, n. 9, p. 1976-1982, set. 2020. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>.

RAHMAN, Omar I.F; TERAYAMA, Ryuji; IKEDA, Tetsuya; KOGANEMARU, Mikako; NAKAMURA, Tadashi; SHIBA, Ryosuke; NISHIMORI, Toshikazu. Differential effects of NMDA and AMPA/KA receptor antagonists on c-Fos or Zif/268 expression in the rat spinal dorsal horn induced by noxious thermal or mechanical stimulation, or formalin injection. **Neuroscience Research**, [S.L.], v. 43, n. 4, p. 389-399, ago. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-0102\(02\)00067-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-0102(02)00067-6).

SOUZA, Mikaela Lucinda de; PAIVA, João Pedro Barros de; FRANCO, Graziella dos Reis Rosa; GONTIJO, Vanessa Silva; ALVES, Marina Amaral; SOUZA, Hygor Marcos Ribeiro de; LONTRA, Anna Carolina Pereira; OLIVEIRA, Eduardo Araújo de; GIORNO, Thaís Biondino Sardella; GUEDES, Isabella Alvim. Design, Synthesis, and Evaluation of Antinociceptive Properties of Novel CBD-Based Terpene-Cinnamoyl-Acyl-Hydrazone Analogues. **Pharmaceuticals**, [S.L.], v. 18, n. 5, p. 755, 20 maio 2025. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph18050755>.

STEIN, Christoph. Opioid Receptors. **Annual Review Of Medicine**, [S.L.], v. 67, n. 1, p. 433-451, 14 jan. 2016. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-med-062613-093100>.

TAO, Zhuo-Ying; WANG, Pei-Xing; WEI, Si-Qi; TRAUB, Richard J.; LI, Jin-Feng; CAO, Dong-Yuan. The Role of Descending Pain Modulation in Chronic Primary Pain: potential application of drugs targeting serotonergic system. **Neural Plasticity**, [S.L.], v. 2019, p. 1-16, 17 dez. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/1389296>.

TODD, Andrew J.. An Historical Perspective: the second order neuron in the pain pathway. **Frontiers In Pain Research**, [S.L.], v. 3, p. 1, 8 mar. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpain.2022.845211>. TODD, Andrew J.. An Historical Perspective: the second order neuron in the pain pathway. **Frontiers In Pain Research**, [S.L.], v. 3, p. 1, 8 mar. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpain.2022.845211>.

TORRES-RODRIGUEZ, Jeitzel M.; WILSON, Torri D.; SINGH, Sudhuman; TORRUELLA-SUÁREZ, Maria L.; CHAUDHRY, Sarah; ADKE, Anisha P.; BECKER, Jordan J.; NEUGEBAUER, Benjamin; LIN, Jenny L.; GONZALEZ, Santiago Martinez. The parabrachial to central amygdala pathway is critical to injury-induced pain sensitization in mice. **Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 49, n. 3, p. 508-520, 4 ago. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41386-023-01673-6>.

UDDIN, Olivia; JENNE, Carleigh; FOX, Megan E.; ARAKAWA, Keiko; KELLER, Asaf; CRAMER, Nathan. Divergent profiles of fentanyl withdrawal and associated pain in mice and rats. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [S.L.], v. 200, p. 173077, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2020.173077>.

WOODHAMS, Stephen G.; CHAPMAN, Victoria; FINN, David P.; HOHMANN, Andrea G.; NEUGEBAUER, Volker. The cannabinoid system and pain. **Neuropharmacology**, [S.L.], v. 124, p. 105-120, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.06.015>.

YALCIN, Ipek; CHARLET, Alexandre; FREUND-MERCIER, Marie-José; BARROT, Michel; POISBEAU, Pierrick. Differentiating Thermal Allodynia and Hyperalgesia Using Dynamic Hot and

Cold Plate in Rodents. **The Journal Of Pain**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 767-773, jul. 2009. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2009.01.325>.

YE, Rong-Rong; JIANG, Shuang; XU, Xu; LU, Yan; WANG, Yu-Jun; LIU, Jing-Gen. Dezocine as a potent analgesic: overview of its pharmacological characterization. **Acta Pharmacologica Sinica**, [S.L.], v. 43, n. 7, p. 1646-1657, 4 nov. 2021. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41401-021-00790-6>.

YONGHAK, Park; MIYATA, Seiji; KURGANOV, Erkin. TRPV1 is crucial for thermal homeostasis in the mouse by heat loss behaviors under warm ambient temperature. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 8799, 29 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-65703-9>.

CAPÍTULO XIII

BASES NEUROBIOLÓGICAS DO TESTE DE HABITUAÇÃO/ DESABITUAÇÃO OLFACTIVA EM ROEDORES

NEUROBIOLOGICAL BASES OF THE OLFACTORY HABITUATION/DISHABITUATION TEST IN RODENTS

DOI: 10.51859/amplia.nat298.1126-13

Maria Helena da Silva Pitombeira ¹
Gislei Frota Aragão ²

¹ Pós-graduanda em Ciências Fisiológicas pelo Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará – UECE.

² Professor Adjunto do curso de Medicina. Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF – UECE). Vice-diretor do Instituto Superior de Ciências Biomédicas. Universidade Estadual do Ceará – UECE.

RESUMO

Modelos animais têm sido amplamente utilizados para reproduzir diversas condições de saúde, incluindo transtornos neuropsiquiátricos, configurando ferramentas valiosas para compreender processos fisiopatológicos e cognitivos subjacentes. Entre as avaliações comportamentais, a função olfativa destaca-se por ser crucial, já que déficits nesse sentido podem confundir os resultados, sobretudo em testes voltados à análise do comportamento social. Roedores possuem um sistema olfativo altamente desenvolvido, essencial para funções vitais como busca por alimento, fuga de predadores e interações sociais. O teste de habituação/desabituação olfativa é um método simples e de baixo custo para avaliar a capacidade olfativa em roedores, baseando-se na redução progressiva do interesse do animal por odores repetidos (habituação) e no aumento da exploração diante de odores novos (desabituação). Este capítulo detalha o protocolo, destacando sua execução, análise estatística e bases neurobiológicas. O processamento olfativo inicia-se no epitélio olfatório nasal e envolve várias regiões cerebrais, incluindo bulbo olfatório, córtex piriforme, amígdala e córtex entorrinal. Moléculas-chave, como os canais TRPA1, participam da sinalização olfativa e estão implicadas em doenças neurodegenerativas.

Alterações em genes como o NEGR1 também têm sido associadas tanto à disfunção olfativa quanto a condições neuropsiquiátricas, como o transtorno do espectro autista. Apesar de suas vantagens, o teste apresenta limitações, como o tempo prolongado de execução e a dependência da interpretação do observador, embora tecnologias recentes, como softwares de rastreamento por vídeo, estejam sendo desenvolvidas para minimizar tais vieses. Compreender o sistema olfativo e seus métodos de avaliação é fundamental para interpretar corretamente resultados em modelos experimentais de doenças neurológicas e psiquiátricas.

Palavras-chave: Modelos animais. Olfação. Habituação/desabituação Olfativa. Transtornos neuropsiquiátricos.

ABSTRACT

Animal models are increasingly used to mimic various health conditions, including neuropsychiatric disorders, serving as valuable tools for understanding underlying pathophysiological and cognitive processes. Among behavioral assessments, olfactory function is crucial since olfactory deficits can confound results, especially in tests evaluating social behavior. Rodents possess a highly

developed olfactory system essential for vital functions such as feeding, predator avoidance, and social interactions. The olfactory habituation/dishabituation test is a simple, cost-effective method to assess olfactory capacity in rodents, relying on the animal's reduced interest in repeated odors (habituation) and increased exploration of new odors (dishabituation). This chapter details the protocol, emphasizing its execution, statistical analysis, and neurobiological underpinnings. Olfactory processing begins in the nasal olfactory epithelium and involves several brain regions, including the olfactory bulb, piriform cortex, amygdala, and entorhinal cortex. Key molecular players, such as TRPA1 channels, participate in olfactory signaling and are implicated in neurodegenerative diseases. Alterations in genes

like NEGR1 have also been linked to both olfactory dysfunction and neuropsychiatric conditions like autism spectrum disorder. Despite its advantages, the habituation/dishabituation test has limitations, including lengthy execution times and observer-dependent measurements, although new technologies like video-tracking software aim to reduce such biases. Understanding the olfactory system and its behavioral assessments is fundamental for accurately interpreting results in experimental models of neurological and psychiatric disorders.

Keywords: Animal Models. Olfaction. Olfactory Habituation/Dishabituation. Neuropsychiatric Disorders.

1. INTRODUÇÃO

O uso de modelos animais tem crescido significativamente ao longo dos anos devido à sua capacidade de reproduzir diferentes condições de saúde, incluindo transtornos neuropsiquiátricos, mostrando-se ferramentas confiáveis e validadas. Para compreender os mecanismos fisiopatológicos e os processos cognitivos envolvidos nessas condições, investiga-se o comportamento de animais submetidos a modelos experimentais, o que fornece pistas valiosas para o entendimento de diversas disfunções em saúde mental, como o Transtorno do Espectro Autista e a Esquizofrenia (OUMMADI et al., 2020; TARLAND; BROSDA, 2018).

A análise do comportamento animal costuma ser realizada por meio de baterias de testes comportamentais, escolhidas conforme os desfechos de interesse. Para garantir resultados fidedignos, é fundamental excluir possíveis fatores de confusão, como alterações no olfato dos animais. O sistema olfativo está diretamente envolvido em funções-chave do comportamento, incluindo aspectos sensoriais, emocionais e de memória (YUAN; SLOTNICK, 2014).

Nos roedores, o sistema olfativo é extremamente desenvolvido e participa de funções vitais, como busca por alimento, fuga de predadores, interações sociais e reprodução. Assim, a integridade do olfato é essencial para assegurar a confiabilidade dos resultados dos testes comportamentais, especialmente daqueles voltados à avaliação da sociabilidade. Déficits na capacidade de discriminação olfativa podem gerar interpretações equivocadas sobre comportamentos sociais anormais (JOHNSON; HAMMOCK; DEWAN, 2023; OUMMADI et al., 2020).

Além disso, algumas condições neurológicas apresentam alterações olfativas como parte de seus endofenótipos, sendo o caso das doenças de Alzheimer, Parkinson, Esquizofrenia e

Depressão. No estudo dessas e de outras doenças do sistema nervoso, a avaliação da capacidade olfativa torna-se uma importante etapa de triagem, especialmente antes da aplicação de testes que dependem diretamente do olfato, como o teste de interação social e o teste de preferência por novos objetos (TARLAND; BROSDA, 2018).

Diversos testes foram desenvolvidos para avaliar o olfato em roedores, variando de métodos simples a procedimentos mais sofisticados que requerem equipamentos caros, como os olfatômetros. Entre eles, destaca-se o teste de habituação/desabituação olfativa, que se caracteriza por ser uma técnica simples, acessível e eficaz para verificar se o sistema olfativo dos animais está funcional (ARBUCKLE et al., 2015).

2. TESTE DE HABITUAÇÃO/DESABITUAÇÃO OLFATIVA

Desenvolvido inicialmente na década de 1980 por Gregg e Thiessen, o teste de habituação/desabituação olfativa foi criado para avaliar a olfação de esquilos-da-magnólia, também conhecidos como gerbillhos-da-magnólia. Posteriormente, Mu Yang e Jacqueline Crawley (2009) adaptaram o método para utilização em camundongos.

Trata-se de um teste simples e relativamente rápido, no qual diferentes odores são apresentados ao roedor por meio de um cotonete embebido nas substâncias odoríferas. Os estímulos olfativos são divididos em três categorias:

- **Odor neutro:** geralmente água destilada.
- **Odores não sociais:** frequentemente, extrato de amêndoas, banana ou outros semelhantes.
- **Odores sociais:** maravilha proveniente de outro animal do mesmo sexo ou do sexo oposto, dependendo do objetivo do estudo, que tenha permanecido na gaiola por, no mínimo, três dias.

Normalmente, a sequência de apresentação dos odores é: odor neutro → odores não sociais → odores sociais. Cada estímulo é oferecido três vezes consecutivas, durante dois minutos por apresentação. O princípio fundamental do teste baseia-se na **habituação**, caracterizada pela redução progressiva do interesse do animal por odores repetidos. Assim, o roedor passa menos tempo explorando o mesmo odor em exposições sucessivas. Por outro lado, quando um novo odor é apresentado, ocorre a **desabituação**, evidenciada pelo aumento do tempo que o animal passa cheirando o novo estímulo (ARBUCKLE et al., 2015; YANG; CRAWLEY, 2009).

2.1. EXECUÇÃO DO TESTE

A execução do teste de habituação/desabituação olfativa requer materiais simples e de baixo custo: cronômetros, cotonetes (ou aplicadores de madeira com ponta de algodão), estímulos olfativos previamente preparados e gaiolas adequadas, contendo maravalha limpa. Antes do início do teste, o animal deve permanecer durante 30 minutos em aclimatação na gaiola de teste. Durante esse período, um cotonete limpo e seco deve ficar posicionado dentro da gaiola (Figura 1), simulando as condições que ocorrerão durante o teste. Isso visa evitar que o animal explore o cotonete apenas por ser um objeto novo, e não pelo odor presente (ARBUCKLE et al., 2015; YANG; CRAWLEY, 2009).

Figura 1 – Ratos durante o processo de aclimatação do Teste de Habituação/Desabituação Olfativa

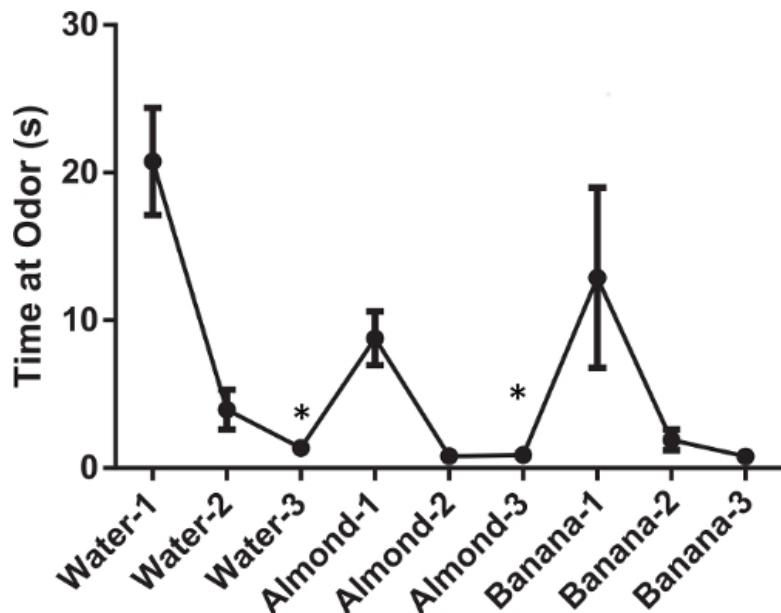


Fonte: Arbuckle et al., 2015.

Os estímulos olfativos devem ser preparados antecipadamente, assim como definida a ordem de apresentação, que deve ser rigorosamente seguida para todos os animais. São utilizados um odor neutro, dois odores não sociais e dois odores sociais, cada um apresentado por três vezes consecutivas, durante dois minutos. O intervalo entre os estímulos é de um minuto. O comportamento de cheirar é considerado válido quando o animal aproxima-se da ponta do cotonete ou aplicador a uma distância igual ou inferior a dois centímetros (ARBUCKLE et al., 2015; YANG; CRAWLEY, 2009).

Ao término do protocolo, espera-se que o animal passe cada vez menos tempo explorando o mesmo odor a cada repetição, mas dedique mais tempo à exploração de um novo odor, comportamento ilustrado na Figura 2 (ARBUCKLE et al., 2015).

Figura 2 – Exemplo de gráfico gerado após exposição aos odores não-sociais



Notas: Time at odor (s) = tempo cheirando; water-1 = água-1; water-2 = água-2; water-3 = água-3; almond-1 = amêndo-1; almond-2 = amêndo-2; almond-3 = amêndo-3. A cada exposição repetida de um mesmo odor, o tempo gasto no comportamento de cheirar decaí até que um novo odor não social seja apresentado.

Fonte: Arbuckle et al., 2015

Após o teste, o animal avaliado não deve retornar à sua gaiola de origem até que todos os demais animais daquele grupo sejam testados.

2.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos no teste de habituação/desabituação olfativa devem ser analisados por meio de ANOVA, seguida do teste de Newman-Keuls ou outro pós-teste equivalente, capaz de verificar, estatisticamente, a ocorrência de habituação e desabituação aos diferentes odores (ARBUCKLE et al., 2015; YANG; CRAWLEY, 2009).

3. BASES NEUROBIOLÓGICAS DO TESTE DE HABITUAÇÃO/DESABITUAÇÃO OLFATIVA

A realização de testes que avaliam a olfação é extremamente importante, não apenas pelos possíveis vieses que déficits olfativos podem introduzir em outros testes comportamentais, mas também porque alterações olfativas, como a anosmia (perda total do olfato), representam sinais precoces de doenças neurodegenerativas. Além disso, o processamento de estímulos olfativos está intimamente relacionado a outros comportamentos. Inicialmente processadas pelo trato olfatório principal — um dos sistemas sensoriais mais primitivos — as informações olfativas seguem para

centros superiores, onde contribuem para respostas comportamentais, como interação social e formação de memórias (KONKOLY et al., 2021).

O processamento sensorial dos odores começa no epitélio olfatório, localizado na cavidade nasal, onde neurônios sensoriais bipolares detectam os odores e transmitem essas informações ao bulbo olfatório. Contudo, o processamento não se encerra no bulbo: as informações seguem para regiões olfatórias primárias e secundárias, como o núcleo olfatório anterior, tubérculo olfatório, córtex piriforme, amígdala e córtex entorrinal. Destaca-se a amígdala, estrutura do sistema límbico responsável por formar memórias carregadas de conteúdo emocional. Sua participação no processamento olfativo explica a existência de memórias olfativas marcantes, frequentemente ligadas à infância (KONKOLY et al., 2021; MUELLER; EGGER, 2020; SMITH; BHATNAGAR, 2019).

Diversos quimiorreceptores participam da olfação, destacando-se os canais catiônicos do receptor potencial transitório (TRP), especialmente a subfamília A, com ênfase no TRPA1. Esse receptor está presente em vários tecidos e desempenha funções fisiológicas diversas, incluindo o processamento de sinais sensoriais térmicos e químicos, como odores. Estudos indicam que o TRPA1 está envolvido na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, contribuindo para desmielinização, perda de fibras nervosas e prejuízos de memória (BORBÉLY et al., 2019; PAYRITS et al., 2020; SÁGHY et al., 2016).

Em 2020, pesquisadores investigaram a presença do TRPA1 no epitélio olfatório, bulbo olfatório e córtex piriforme de camundongos — regiões do trato olfatório principal que costumam ser afetadas nos estágios iniciais das doenças neurodegenerativas. Nesses contextos, ocorre ativação excessiva do TRPA1, o que pode levar à morte neuronal por mecanismos mediados por cálcio e pela excitotoxicidade do glutamato, explicando, em parte, por que a anosmia é sintoma precoce em diversos distúrbios neurodegenerativos. Além disso, há evidências de que o TRPA1 também participa da regulação do comportamento social em camundongos, de modo que alterações nesse receptor podem gerar déficits tanto no processamento olfativo quanto em aspectos comportamentais mais amplos (KONKOLY et al., 2021).

Outras descobertas relevantes associam disfunções olfativas a questões neuropsiquiátricas, como observado no caso do gene NEGR1, implicado em alterações neurobiológicas no Transtorno do Espectro Autista (TEA). Em camundongos geneticamente modificados para expressar o NEGR1, foram identificados comportamentos semelhantes ao autismo, além de alterações na migração neuronal, na maturação das espinhas dendríticas e no alongamento axonal. Recentemente, foi demonstrado que esse gene também reduz a neurogênese

no bulbo olfatório, prejudicando a discriminação e o processamento sensorial olfativo (KIM et al., 2024).

4. LIMITAÇÕES

Apesar de sua relevância e simplicidade de execução, o teste de habituação/desabituação olfativa apresenta algumas limitações. A avaliação de um único animal leva, no mínimo, 75 minutos, considerando os 30 minutos de aclimatação e cerca de 45 minutos para a execução do protocolo. Além disso, a interpretação dos parâmetros depende do julgamento do avaliador, e há necessidade de interação indireta entre o animal e o experimentador, devido à troca constante dos cotonetes ou aplicadores, o que pode introduzir viés ou estressar o roedor. Com o intuito de reduzir essas limitações, vêm sendo desenvolvidas soluções como softwares de rastreamento por vídeo (OUMMADI et al., 2020).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste de habituação/desabituação olfativa destaca-se como uma ferramenta valiosa e acessível para a avaliação da função olfativa em roedores, contribuindo de forma significativa para a interpretação correta de diversos testes comportamentais, especialmente aqueles voltados ao estudo de sociabilidade e memória. Além de seu papel metodológico, a compreensão das bases neurobiológicas do olfato, incluindo as vias neurais e os mecanismos moleculares envolvidos, revela-se essencial diante das crescentes evidências que associam disfunções olfativas a doenças neurodegenerativas e transtornos neuropsiquiátricos. Apesar de suas limitações, este teste permanece relevante, sobretudo quando integrado a outras abordagens comportamentais e tecnológicas que visam reduzir vieses e aprimorar a qualidade dos dados obtidos. Assim, aprofundar o estudo do sistema olfativo não apenas aprimora modelos experimentais, mas também oferece perspectivas promissoras para a identificação precoce e o entendimento dos mecanismos patológicos subjacentes a várias condições neurológicas e psiquiátricas.

REFERÊNCIAS

ARBUCKLE, Erin P.; SMITH, Gregory D.; GOMEZ, Maribel C.; LUGO, Joaquin N. Testing for odor discrimination and habituation in mice. *Journal of Visualized Experiments*, [S. l.], v. 2015, n. 99, 2015. ISSN: 1940087X. DOI: 10.3791/52615,. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25992586/>. Acesso em: 13 jul. 2025.

BORBÉLY, Éva; PAYRITS, Maja; HUNYADY, Ágnes; MEZŐ, Gréta; PINTÉR, Erika. Important regulatory function of transient receptor potential ankyrin 1 receptors in age-related learning and memory alterations of mice. *GeroScience*, [S. l.], v. 41, n. 5, p. 643–654, 2019. ISSN:

25092723. DOI: 10.1007/S11357-019-00083-1,. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31327098/>. Acesso em: 13 jul. 2025.

JOHNSON, Chloe Elise; HAMMOCK, Elizabeth Anne Dunn; DEWAN, Adam Kabir. Vasopressin receptor 1a, oxytocin receptor, and oxytocin knockout male and female mice display normal perceptual abilities toward non-social odorants. **Hormones and behavior**, [S. l.], v. 148, p. 105302, 2023. ISSN: 10956867. DOI: 10.1016/J.YBEH.2022.105302. Disponível em:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10067158/>. Acesso em: 1 jul. 2025.

KIM, Kwang Hwan; NOH, Kyungchul; LEE, Jaesung; LEE, Soojin; LEE, Sung Joong. NEGR1 Modulates Mouse Affective Discrimination by Regulating Adult Olfactory Neurogenesis. **Biological Psychiatry Global Open Science**, [S. l.], v. 4, n. 5, p. 100355, 2024. ISSN: 26671743. DOI: 10.1016/J.BPSGOS.2024.100355. Disponível em:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11338060/>. Acesso em: 13 jul. 2025.

KONKOLY, János et al. The Role of TRPA1 Channels in the Central Processing of Odours Contributing to the Behavioural Responses of Mice. **Pharmaceuticals**, [S. l.], v. 14, n. 12, p. 1336, 2021. ISSN: 14248247. DOI: 10.3390/PH14121336/S1. Disponível em:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8703823/>. Acesso em: 20 maio. 2025.

MUELLER, Max; EGGER, Veronica. Dendritic integration in olfactory bulb granule cells upon simultaneous multispine activation: Low thresholds for nonlocal spiking activity. **PLoS Biology**, [S. l.], v. 18, n. 9, p. e3000873, 2020. ISSN: 15457885. DOI: 10.1371/JOURNAL.PBIO.3000873. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7535128/>. Acesso em: 13 jul. 2025.

OUMMADI, Asma; MEYER-DILHET, Géraldine; BÉRY, Amandine; AUBERT, Arnaud; BARONE, Pascal; MORTAUD, Stéphane; GUILLEMIN, Gilles J.; MENUET, Arnaud; LAUGERAY, Anthony. 3Rs-based optimization of mice behavioral testing: The habituation/dishabituation olfactory test. **Journal of Neuroscience Methods**, [S. l.], v. 332, p. 108550, 2020. ISSN: 0165-0270. DOI: 10.1016/J.JNEUMETH.2019.108550. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165027019304078>. Acesso em: 13 jul. 2025.

PAYRITS, M.; BORBELY, E.; GODO, S.; ERNSZT, D.; KEMENY, A.; KARDOS, J.; SZOKE, E.; PINTER, E. Genetic deletion of TRPA1 receptor attenuates amyloid beta- 1-42 (A β 1-42)-induced neurotoxicity in the mouse basal forebrain in vivo. **Mechanisms of Ageing and Development**, [S. l.], v. 189, 2020. ISSN: 18726216. DOI: 10.1016/J.MAD.2020.111268,. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32473171/>. Acesso em: 13 jul. 2025.

SÁGHY, Éva et al. TRPA1 deficiency is protective in cuprizone-induced demyelination—A new target against oligodendrocyte apoptosis. **GLIA**, [S. l.], v. 64, n. 12, p. 2166–2180, 2016. ISSN: 10981136. DOI: 10.1002/GLIA.23051,. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27568827/>. Acesso em: 13 jul. 2025.

SMITH, Timothy D.; BHATNAGAR, Kunwar P. Anatomy of the olfactory system. **Handbook of Clinical Neurology**, [S. l.], v. 164, p. 17–28, 2019. ISSN: 22124152. DOI: 10.1016/B978-0-444-63855-7.00002-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31604545/>. Acesso em: 13 jul. 2025.

TARLAND, Emilia; BROSDA, Jan. Male rats treated with subchronic PCP show intact olfaction and enhanced interest for a social odour in the olfactory habituation/dishabituation test. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 345, p. 13–20, 2018. ISSN: 0166-4328. DOI:

10.1016/J.BBR.2018.02.023. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432817317679?via%3Dihub>. Acesso em: 20 maio. 2025.

YANG, Mu; CRAWLEY, Jacqueline N. Simple Behavioral Assessment of Mouse Olfaction. **Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.], [S. l.], v. CHAPTER, n. SUPPL. 48, p. Unit, 2009.** ISSN: 19348584. DOI: 10.1002/0471142301.NS0824S48. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2753229/>. Acesso em: 13 jul. 2025.

YUAN, Ti Fei; SLOTNICK, Burton M. Roles of olfactory system dysfunction in depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, [S. l.], v. 54, p. 26–30, 2014.** ISSN: 0278-5846. DOI: 10.1016/J.PNPBP.2014.05.013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278584614001043>. Acesso em: 13 jul. 2025.

CAPÍTULO XIV

TESTE DAS TRÊS CÂMARAS: DESENVOLVIMENTO, ATUALIZAÇÕES, E APLICAÇÕES EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE AUTISMO

THREE-CHAMBER TEST: DEVELOPMENT, UPDATES, AND APPLICATIONS IN EXPERIMENTAL MODELS OF AUTISM

DOI: 10.51859/ampilla.nat298.1126-14

Mart Som dos Reis Sousa ¹
Layanne Cabral da Cunha Araujo ²
Mayron Alves de Vasconcelos ³

¹ Doutorando em Ciências Fisiológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Estadual do Ceará – UECE

² Professora da Universidade Estadual do Ceará - UECE

³ Professor da Universidade Estadual do Ceará - UECE

RESUMO

O teste das três câmaras é um modelo padrão para estudos primários e translacionais relacionados a desordens do neurodesenvolvimento, principalmente ao autismo. O teste se baseia na capacidade de interação social, comunicação e evidências de comportamentos estereotipados de modelos animais autistas, com base em duas atividades principais: a primeira, denominada de atividade de interação social, no qual os animais podem optar entre interação com um outro animal desconhecido ou com um objeto, e segunda, denominada de atividade de novidade social, que consiste na capacidade dos mesmos animais em optar entre dois animais um estranho e um familiar. Também são observados o tempo de tomada de decisão, bem como a existência de movimentos repetitivos como a auto limpeza ou a ato de aparar o bigode. O modelo é fundamental ao entendimento de processos fisiológicos relacionados a desordens de neurodesenvolvimento, bem como para a avaliação de estratégias de tratamento, como o uso da ocitocina. Neste capítulo abordamos as características do teste, as bases neuroanatômicas e neuroquímicas, bem como as aplicações translacionais, os desafios até então

identificados e as sugestões de ajustes do referido teste.

Palavras-chave: Novidade social, Autismo, Interação social, Ocitocina.

ABSTRACT

The three-chamber test is a standard model for primary and translational studies related to neurodevelopmental disorders, mainly autism. The test is based on the capacity for social interaction, communication and evidence of stereotypical behaviors of autistic animal models, based on two main activities: the first, indicated as social interaction activity, in which animals can choose between interacting with another unknown animal or with an object, and the second, indicated as social novelty activity, which is the ability of the same animals to choose between two animals, a stranger and a familiar one. The decision-making time is also observed, as well as the existence of repetitive movements such as self-grooming or trimming the whiskers. The model is fundamental to understanding physiological processes related to neurodevelopmental disorders, as well as for evaluating treatment strategies, such as the use of oxytocin. In this chapter, we address the characteristics of the test, the neuroanatomical

and neurochemical bases, as well as the translational applications, the challenges identified so far and the suggestions for adjustments to the aforementioned test.

Keywords: Social novelty, Autism, Social interaction, Oxytocin.

1. INTRODUÇÃO

O autismo é uma desordem de neuro desenvolvimento caracterizada por déficits sociais e comportamentos estereotipados (Paval, 2017), e atualmente estima-se que 1 em cada 100 crianças são autistas, numa proporção entre meninos e meninas de 3:1 (AlBatti *et al.*, 2022). Apesar de ser uma doença comum, as causas ainda estão pouco esclarecidas, existindo hipóteses de origem genética, em função de uma maior probabilidade de famílias que tenham filhos autistas terem novos filhos autistas, mas fatores ambientais sofridos durante o período de gestação também têm sido relacionados ao desencadeamento da doença. A teoria de separação maternal que se baseia no modelo de estresse de início de vida, e possui interferência nos neurotransmissores de glutamato é uma das hipóteses de contribuição para o desenvolvimento do autismo (Reshetnikov *et al.*, 2018).

Atualmente, os modelos animais são fundamentais para entender a fisiologia dos sintomas do autismo, buscar a identificação das causas e também para o desenvolvimento de estratégias de tratamento (Alabdali *et al.*, 2024). Alguns modelos foram desenvolvidos ao longo dessas últimas três décadas, incluindo o desenvolvimento de linhagens híbridas e também modelos de indução por ácido propanóico (El Ansary *et al.*, 2012) e ácido valpróico (Tartaglione *et al.*, 2018).

Além dos modelos animais, o desenvolvimento dos testes comportamentais para avaliar as características do autismo também se fez necessário. Na década de 90, os testes de análise de comportamento como o modelo de ratos da pradaria usado na avaliação comportamental e social de relações monogâmicas, teste de livre interação social e o teste de reconhecimento e preferência social contribuíram para o desenvolvimento do teste das três câmaras, no qual possibilitou uma alternativa para avaliar os comportamentos de animais que se assemelham ao autismo, bem como para testar estratégias de tratamento (Moy *et al.*, 2004). Aqui neste capítulo abordamos as características do referido teste, os ajustes do método ocorrido ao longo dessas duas décadas e a parte da neurofisiologia relacionada aos déficits de interação social, comportamentos estereotipados e de comunicação que são características comuns em modelos animais em indivíduos autistas. O capítulo está subdividido em descrição do protocolo teste, bases neuroanatômicas e neuroquímicas; aplicações clínicas e translacionais limites e desafios.

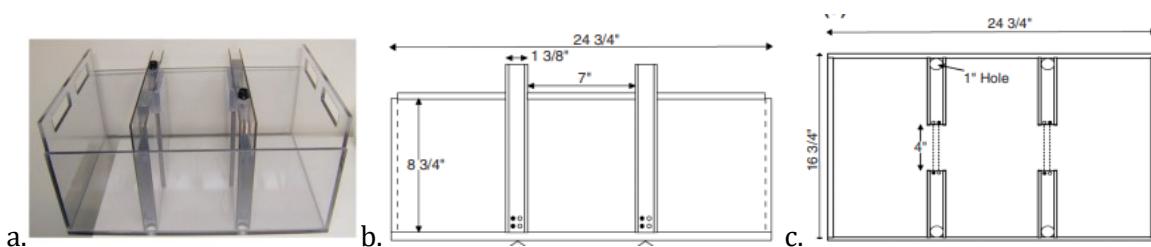
2. PROTOCOLO TESTE DAS TRÊS CÂMARAS

O teste das três câmaras foi inicialmente desenvolvido pelo grupo de pesquisa da neurocientista Jacqueline N. Crawley em 2004 como uma proposta para avaliar modelos murinos que melhor representassem indivíduos com autismo. O referido teste foi uma adaptação do teste de ligação de pares muito usado para avaliar memória e reconhecimento social. Com isso, as características avaliadas no teste das três câmaras são a sociabilidade, comunicação social e comportamentos repetitivos (Crawley, 2004). O grupo de pesquisa de Crawley desenvolveram um aparato de vidro (figura 2.1) para avaliar a sociabilidade com o uso de um conjunto de tarefas, que mensurava o tempo gasto de um camundongo com um novo indivíduo e a preferência entre um novo indivíduo e um indivíduo familiar (Moy *et al.*, 2004). As dimensões do aparato de vidro estão descritas na figura 2.1.

O autismo tem como uma das principais características o déficit de sociabilidade, com isso, modelos de camundongos com traços de autismo foram submetidos à opção de explorar uma câmara nova e vazia ou uma câmara com um camundongo estranho. Posteriormente, os mesmos camundongos foram novamente submetidos a uma nova exploração: uma câmara com um camundongo estranho e outra com um camundongo familiar. Nessas duas atividades descritas anteriormente, Moy *et al.*, (2004), quantificou o tempo de permanência e o número de entradas em cada câmara.

Os camundongos, estranhos e familiares, são colocados em gaiolas, com fins aos camundongos a serem avaliados, colocados livremente entre as duas câmaras, pudessem ter comunicação física, visual, olfativa e auditiva. As gaiolas possuem uma dimensão de 11cm de altura e 10,5 cm de largura com grades com espaçamento de 1cm, no qual permitem o contato físico e evitam brigas entre os camundongos. Um peso deve ser colocado na parte superior da gaiola a fim de que movimentos dos camundongos presentes na gaiola ou o camundongo da área externa possa derrubá-la. É interessante que o camundongo engaiolado seja habituado a essa situação.

Figura 1 - Aparato de vidro com três câmaras



Fonte: Nadler *et al.*, (2004).

A sociabilidade é considerada como a capacidade do camundongo em permanecer na câmara com o camundongo estranho em detrimento ao tempo gasto pelo mesmo camundongo na câmara vazia adjacente à câmara central (figura 2.2a). No segundo momento, o tempo gasto com o camundongo estranho em comparação com o camundongo familiar é considerado como a preferência pela novidade social (figura 2.2b) (Moy *et al.*, 2004). É válido enfatizar que o teste das três câmaras também deve ser acompanhado dos testes de comportamento na gaiola de convivência, teste de olfato e teste de locomoção, com fins a que garantam que fatores como locomoção e olfato estejam preservados, além de exames que descarte anormalidades físicas que estimulem a viés dos dados.

Os testes de comportamento na gaiola de convivência consistem de na primeira semana de biotério os camundongos serem observados durante 20 minutos em três períodos diários (8:00 h, 12:00 h e 18:30 h), sendo que duas horas antes do meio dia são disponibilizados um pedaço quadrado de algodão, a fim de avaliar a capacidade do camundongo de construir ninhos. A observação noturna (18:30h) consiste em observar, 10 minutos com luz acesa e 10 minutos com luz apagada, usando luz vermelha, a capacidade de construção e destruição de ninhos, sons grupais, outras atividades, brigas, convulsões, tremores ou qualquer outra atividade anormal.

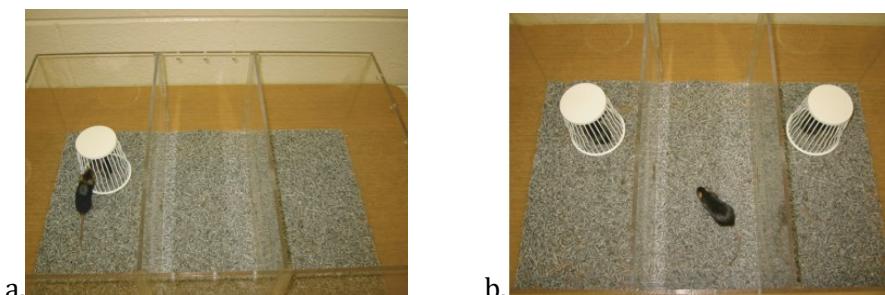
As avaliações sobre condições de saúde dos camundongos consistem na observação da aparência da pelagem, do bigode, da postura corporal e da normalidade da marcha. E para a verificação da capacidade reflexiva recomenda-se o toque nos bigodes com um cotonete em cada lado do rosto, a aproximação do cotonete nos olhos e uso de som metálico, sendo que este último avalia tanto o reflexo quanto a audição. Cada animal também é colocado em uma gaiola de plástico vazia que deve ser submetida a movimentos laterais e verticais com fins a verificar sua capacidade de ficar em pé. Os animais também são avaliados quanto ao reflexo visual e a capacidade de usar as patas traseiras e dianteiras para se agarrar (Moy *et al.*, 2004).

Um dia antes da realização do teste das três câmaras também é recomendado a avaliação da capacidade locomotora por meio de um teste em campo aberto em uma câmara de 0,4m x 0,3m x 0,4m de base quadriculada com 106 quadrados sendo avaliado o número de quadrados cruzados durante 5 minutos. E um dia depois do teste de locomoção os animais devem ser submetidos a testes de olfato. No dia seguinte ao teste de locomoção os animais também devem ser submetidos a testes de balanço e coordenação motora, no qual os animais são colocados sobre um cilindro e submetidos a uma aceleração constante iniciando em 3 rpm até atingir 30 rpm em duas tentativas, sendo avaliados o tempo de permanência de cada no cilindro em aceleração (Moy *et al.*, 2004).

O teste das três câmaras também precede de um momento de habituação, não obrigatória, no qual, os camundongos são colocados na câmara central por cinco minutos e as demais câmaras

vazias ficam com as entradas obstruídas. Além de habituação por ser um teste análogo ao teste de campo aberto, ele permite identificar capacidade locomotora e níveis de ansiedade. Após os cinco minutos de habituação, inicia-se o teste das três câmaras propriamente dito com a introdução de um camundongo estranho dentro de uma gaiola junto a uma das câmaras adjacentes à câmara central, a outra câmara permanece vazia. Após a introdução do camundongo estranho as passagens para as demais câmaras são abertas e os movimentos do camundongo colocado na câmara central é avaliado por 10 minutos com o uso de um software de identificação de movimentos. Será considerado como entrada a câmara quando o camundongo estiver com as quatro patas dentro dela. Em eventos de observação visual presencial recomenda-se que o pesquisador fique a 1,5 m de distância. O segundo camundongo não familiar deve ser introduzido na câmara vazia após 10 minutos do primeiro teste e deverá ser observado o tempo gasto em cada câmara e o número de transições entre as duas câmaras adjacentes (Moy *et al.*, 2004).

Figura 2 - Teste das três câmaras.



Fonte: Moy *et al.*, (2004).

Outros fatores a considerar são que o teste das três câmaras tem sido utilizado para avaliar outras desordens de comportamento e sociabilidade além do autismo como: alzheimer (Companys-Alemany *et al.*, 2020), esquizofrenia (Tatsukawa *et al.*, 2019, Plekanchuk *et al.*, 2022), síndrome de rett (Wu *et al.*, 2016), depressão (Yi *et al.*, 2023), parkinson (Okitsu *et al.*, 2024), entre outros. Também devemos enfatizar que para avaliar características de autismo alguns modelos animais foram desenvolvidos: BTBR e FMR, e como modelo controle observamos que o modelo C57BL/6J é o mais utilizado. A indução do autismo também pode ser realizada com a exposição de fêmeas durante a gestação a 400 mg/kg de ácido valpróico, com isso a prole dessas fêmeas terá sintomas do autismo (Zong *et al.*, 2023).

3. BASES NEUROANATÔMICA E NEUROQUÍMICA

A sociabilidade é uma característica que está associada a região do córtex frontal, e crianças com assimetria nessa região possuem déficits de sociabilidade e teriam dificuldade em regular a expressão de emoções positivas e negativas, no caso de autistas as regiões do lobo frontal, córtex

temporal superior e amígdala são as principais relacionadas ao comportamento social (Amaral *et al.*, 2008), enquanto que as regiões corticais, subcorticais, giro frontal superior, córtex motor suplementar, área de Wernicke e o sulco temporal superior são fundamentais no processo de linguagem (Redcay, 2007) e as regiões córtex orbitofrontal e núcleo caudado estão relacionadas aos comportamentos repetitivos (Atmaca *et al.*, 2007). A figura 3.1 apresenta a localização cerebral dessas regiões.

Em observações pós morte ou com base em imagens de ressonância magnética, pesquisadores indicaram que indivíduos autistas possuem um desenvolvimento cerebral atípico durante a infância. Hutsler *et al.*, (2006) citaram que existem pequenas alterações nos neurônios e nas células da glia da região do córtex cerebral, além disso, Casanova *et al.*, (2006) encontraram diferenças de densidade de células, existência de espaçamentos nas mini colunas radiais em áreas corticais, incluindo o lobo frontal. Schumann e Amaral (2006) também observaram redução do número de células do prosencéfalo e Schumann *et al.*, (2004) encontraram uma redução da quantidade de neurônios no núcleo lateral da amígdala em cadáveres de indivíduos autistas.

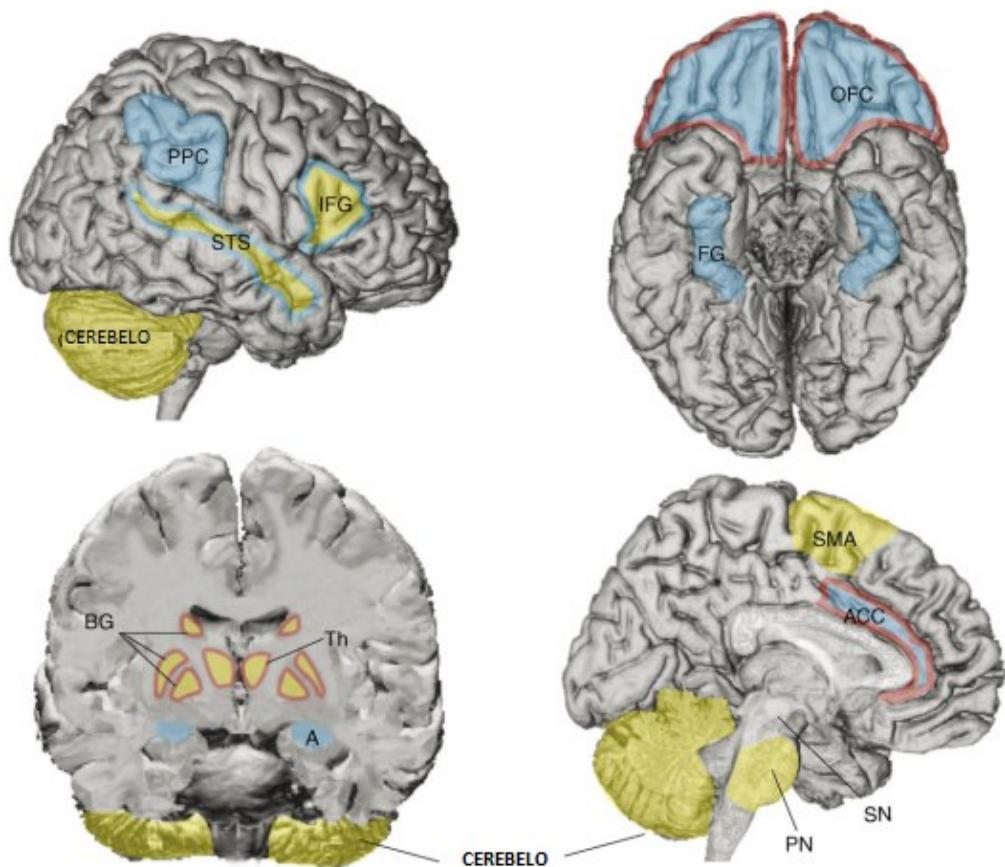
O cerebelo de alguns indivíduos autistas também têm sido uma região que apresenta hipoplasia e redução no volume de matéria cinza no vermis cerebelar superior (Stoodley, 2014). Enquanto em outros indivíduos autistas apresentam hiperplasia (Courchesne, 1994), além da diminuição significativa da quantidade de células de Purkinje na região cerebelar (Amaral *et al.*, 2008; Fatemi *et al.*, 2012; Wegiel *et al.*, 2014). Enquanto, o córtex pré-frontal é uma região que possui papel no controle cognitivo, ao coordenar a memória, tomada de decisões, emoções, planejamento e também atividade relacionadas a comportamento social, sendo que o giro frontal inferior (IFG) está diretamente relacionado à capacidade de linguagem, imitação na construção de redes de processamento social.

Indivíduos autistas possuem os neurônios pirâmides do IFG menores em comparação com indivíduos normais, o que pode justificar a menor capacidade dos autistas em desenvolver uma comunicação suplementar com o uso de gestos ou sinais que simbolizam expressões sentimentais (Schumann; Nordahl, 2011). A região do giro fusiforme é muito importante durante as interações sociais e em indivíduos autistas observa-se uma hipoatividade e um menor metabolismo mitocondrial nessa região, que pode refletir em menor densidade de neurônios (Van Kooten *et al.*, 2008).

Em relação a base neuroquímica estudos recentes também têm observado uma forte relação do hormônio ocitocina, produzido no núcleo paraventricular e supraóptico do hipotálamo, com os sintomas de autismo (Moerkerke *et al.*, 2021; Audustottir *et al.*, 2024), sendo que algumas pesquisas em crianças autistas identificaram baixos níveis desse hormônio no plasma (Parker *et*

al., 2014) e na saliva (Pichugina *et al.*, 2022). No entanto, o tratamento com ocitocina, sob o uso de spray nasal, possibilitou aumento em marcadores relacionados à interação social (Guastella *et al.*, 2016) e a redução dos movimentos repetitivos (Yamasue *et al.*, 2018).

Figura 3 - Regiões cerebrais relacionadas à sociabilidade, déficits de comunicação e comportamentos repetitivos em indivíduos autistas



Sociabilidade	Comunicação	Comportamento repetitivo
OFC- Cortex orbitofrontal ACC- Cortex cingulado anterior FG - Giro fusiforme STS - Sulco temporal superior A- Amígdala IFG - Giro frontal inferior PPC - Cortex parietal posterior	IFG - Giro frontal inferior STS - Sulco temporal superior SMA - Área motora suplementar BG - Gânglios basais SN- Substânci a negra Th - Tálamo PN - Núcleo pontino do cerebelo	OFC- Cortex orbitofrontal ACC- Cortex cingulado anterior BG - Gânglios basais Th - Tálamo

Fonte: Amaral *et al.*, (2008).

O que sabemos até o momento é que os neurônios produtores de ocitocina, que são originários do hipotálamo, denominados de neurônios magnocelular e parvocelular, se espalham por todo o cérebro e são reguladores dos comportamentos sociais (Zang *et al.*, 2021). Altas concentrações podem desencadear diferentes vias de sinalização, Gi em vez de Gq por exemplo, e até reduzir o efeito quando administrada de forma contínua ou em maiores concentrações (Kou *et al.*, 2022).

Estudos também enfatizam o papel conjunto dos receptores de ocitocina e arginina vasopressina em diferentes regiões do sistema nervoso central, no qual tem sido observado maior concentração de receptores metabotrópicos de ocitocina do tipo Gq na área tegmentar ventral, núcleo accumbens, córtex cingulado anterior, amigdala central e basolateral e hipotálamo anterior e ventral (Boccia *et al.*, 2013), sendo fundamentais nos processos de comportamento social, momentos de primeiro contato e situações de confiança (Song *et al.*, 2016), enquanto que os receptores de ocitocina do tipo Gi são menos frequentes no sistema nervoso central e estão mais presentes em órgãos periféricos (Garibay *et al.*, 1991).

Outros hormônios também merecem destaque, como: a arginina vasopressina um nonapeptídeo também produzido pelos neurônios magnocelulares e parvocelulares do hipotálamo, e também encontrado na amigdala, no septo ventrolateral, no núcleo do leito da estria terminal, locus ceruleus e no bulbo olfatório tem sido usado para melhorar os sintomas de autismo em ratos induzidos com ácido valpróico (Zhou *et al.*, 2022), principalmente quanto ao reconhecimento social (Wu *et al.*, 2021).

O sistema que envolve o ácido gama aminobutírico derivado do glutamato que atua no desenvolvimento do cérebro e influencia na proliferação, migração, maturação sináptica, diferenciação e morte celular (Ower; Kriegstein, 2002), bem como na regulação do balanço de mecanismos inibitórios e excitatórios (Yizhar *et al.*, 2011) quando desregulado contribui também para o surgimento de sintomas de autismo. O glutamato é responsável pela excitação de neurônios do córtex de mamíferos, sendo que quando os receptores de glutamato sofrem modificações desencadeia implicações na excitabilidade e no desenvolvimento intelectual (Yennawar *et al.*, 2019). Exposição e aumento nos níveis de serotonina durante a gestação têm sido associados a interferências em mecanismos de memória, aprendizagem, humor e no desenvolvimento de problemas comportamentais e de deficiência social, típicos sintomas de autismo (Verre *et al.*, 2025). Enquanto a dopamina com mecanismos de cognição social (Paval, 2017). Outros estudos também têm dado ênfase na relação de melatonina (Braam *et al.*, 2018), acetilcolina (Takeshi *et al.*, 2016) e vitamina D (Pertile *et al.*, 2018) a prejuízos nas interações sociais e a sintomas do autismo.

4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS

Os modelos animais *BtBr*, *SKANK3* e *Fmr1* são os principais para estudos translacionais relacionados ao autismo e com aplicações do teste das três câmaras, apesar de não reproduzir todos os sintomas da doença são importantes e possuem potencial para o entendimento dos mecanismos de origem, avaliar possíveis compostos que atenuem os sintomas e também para construção de etiologias genéticas e fisiológicas (Schwartz et al., 2013; Xing; Yu, 2025). Animais deficientes em proteínas secretoras de ocitocina após serem tratados com elevadas doses de ocitocina administrada diretamente na região intracerebroventricular possibilitou a reversão de problemas de reconhecimento social (Jin et al., 2007; Sala et al., 2011) e animais induzidos ao autismo com uso do ácido valpróico e tratados com arginina vasopressina também têm sido usados para avaliar os níveis de interação social (Wu et al., 2021).

As aplicações translacionais do teste das três câmaras não se restringem apenas ao uso de hormônios e outros compostos químicos administrados diretamente para avaliar as mudanças de comportamento e interação social, mas também ao uso de outras alternativas, como compostos naturais, probióticos, alimentos, entre outros. Alabdali et al., (2025) observaram que ratos induzidos a sintomas do autismo com uso de ácido propiônico e posteriormente tratados com ácido gama aminobutírico em conjunto com probióticos com predominância de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, frutooligossacarídeos, além de vitamina D3 e B-lactam, a base de amoxicilina, promoveu um melhor equilíbrio na relação entre fatores químicos inibitórios e excitatórios e a restauração dos indicadores de interação social em comparação com o uso apenas do ácido gama aminobutírico. O uso de vitamina D3, também tem sido associado a neurotransmissores responsáveis pela regulação da aprendizagem, memória e fatores emotivos (Pertile et al., 2018), enquanto que B-lactam promove a ativação do transportador de glutamato (Zeng et al., 2010).

Yang et al., (2024) avaliou a influência do sulforafano, presente no brócolis fresco, sobre os comportamentos de ratos induzidos ao autismo por lipopolissacarídeo, e também em pacientes autistas. Os pesquisadores observaram melhora do tempo de cheiro durante o teste das três câmaras, mudanças na composição da microbiota intestinal dos ratos, enquanto que nos pacientes existiu maior uso de comunicação verbal quanto não verbal e mudança na abundância relativa da microbiota, principalmente no gênero *bacteroides*. O sulforafano é um fitoquímico organosulfurado lipofílico da família dos isotiocianatos derivado da glucorafanina hidrolisada e presente em couve-flor, couve-de- bruxelas e brócolis sendo considerado um protetor químico contra o câncer (Treasure et al., 2023).

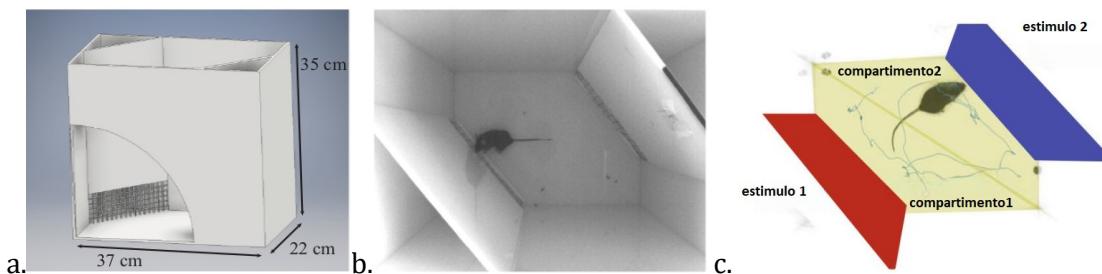
Vários outros estudos têm avaliado o teste das três câmaras como uma ferramenta para pesquisas translacionais e aplicações clínicas não só para o autismo, mas também para outras doenças que alteram as relações de interação social. Em estudos com Alzheimer o teste das três câmaras tem sido usado para avaliar bioativos que interferem no desenvolvimento da doença e melhoram a capacidade cognitiva e de interação social (Companys-Alemany *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2025). Esquizofrenia (Mihara *et al.*, 2017, Tatsukawa *et al.*, 2019, Plekanchuk *et al.*, 2022), síndrome de rett (Wu *et al.*, 2016), depressão (Yi *et al.*, 2023), parkinson (Okitsu *et al.*, 2024) e demência (Zuo *et al.*, 2025) também tem usado o referido teste para avaliar a influência bioativos e fármacos nas atividades de comportamento e interações social.

5. LIMITES E DESAFIOS METODOLÓGICOS

O teste das três câmaras é um modelo padrão usado desde 2004 pelo grupo da neurocientista jacqueline Crawley, mas que possui algumas limitações, entre elas Netser *et al.*, (2017; 2019) pontuaram que primeiro, os animais podem ter preferência em se posicionar em qualquer uma das câmaras e a mudança de uma câmara para outra não necessariamente significa interação ou preferência social, outra ressalva se refere ao negligenciamento das dinâmicas de interação comportamentais, pois avalia-se apenas o tempo de permanência nas câmaras e a terceira observação é de que o teste das três câmaras não considera os aspectos motivacionais durante a interação. Os citados autores apresentaram um novo designer para o aparatos do teste das três câmaras (Figura 5.1.c) acompanhado de um novo software de análise dos vídeos, no qual foi capaz de identificar novos parâmetros de comportamento social dos animais, bem como as diferenças de comportamento entre sexo e linhagem, além de solucionar os questionamentos até então considerados.

Diferentemente do modelo original de Moy *et al.*, (2004), o designer de Netser *et al.*, (2017; 2019) propõe uma área de arena em formato de hexágono irregular (Figura 5.1.b) e câmaras móveis em formato triangular que são colocadas nas extremidades da diagonal, ambas as estruturas podem ser branca ou preta (Figura 5.1.a), sempre oposta a cor do animal. O software baseia-se no movimento do corpo separado do movimento da cabeça do animal em análise e assim o algoritmo do software identifica o contato da cabeça com as áreas de estímulo anulando assim falsos positivos de comunicação presentes no design experimental proposto por Moy *et al.*, (2004).

Figura 5 - Novo apparatus do teste das três câmaras



Fonte: Netser *et al.*, (2017; 2019).

Outro destaque desse sistema é a capacidade de identificar os movimentos de corte de bigode e as consequências após o corte. Os cantos da arena também são áreas de análise, pois permitem aos animais momentos de descanso e higienização anulando assim outros falsos positivos, enquanto que o espaço da arena permite possibilitar a distinção de comportamento entre sexo como também entre diferentes linhagens, alem de ser possível a avaliação de animais maiores ou obesos (Netser *et al.*, 2019).

O ajuste do modelo das três câmaras foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa coordenado pelo neuro biólogo Shlomo Wagner, o respectivo modelo tem sido usado para a avaliação da diferença de comportamento social entre ratos e camundongos (Netser *et al.*, 2020), entre sexo e linhagens (Kopachev *et al.*, 2022) e em mecanismos fisiológicos relacionados as redes neurais, cérebro social (Mohapatra *et al.*, 2024). A partir do modelo desenvolvido por Netser *et al.*, (2017), outras atividades foram incluídas ao teste, como: preferência entre sexo e preferência emocional. A primeira atividade consiste em avaliar a escolha do murino por diferentes tipos de sexo, e a segunda consiste na avaliação da preferência por animais totalmente estranhos em comparação com animais que pertencem ao mesmo grupo de convivência (Jabarin *et al.*, 2021; Kopachev *et al.*, 2022).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após essa análise bibliográfica identificamos que o teste das três câmaras é o mais indicado para avaliar modelos animais que apresentem os sintomas de autismo, e que ao longo dessas duas décadas desde o seu desenvolvimento, ajustes do método foram realizados otimizando a sua capacidade de representar estudos translacionais. Evidenciamos também que o modelo é uma boa ferramenta para entender processos fisiológicos relacionados à desregulação neurobiológica, bem como para avaliar potenciais compostos que possam reverter situações de déficits de interação social, de memória, aprendizagem, entre outros.

REFERÊNCIAS

- ALABDALI, Altaf N. et al. Impact of GABA and nutritional supplements on neurochemical biomarkers in autism: a PPA rodent model study. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 18, p. 1553438, 2025.
- ALBATTI, Turki H. et al. Prevalence of autism spectrum disorder among Saudi children between 2 and 4 years old in Riyadh. **Asian journal of psychiatry**, v. 71, p. 103054, 2022.
- AMARAL, David G.; SCHUMANN, Cynthia Mills; NORDAHL, Christine Wu. Neuroanatomy of autism. **Trends in neurosciences**, v. 31, n. 3, p. 137-145, 2008.
- ATMACA, Murad et al. Volumetric MRI study of key brain regions implicated in obsessive-compulsive disorder. **Progress in neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 31, n. 1, p. 46-52, 2007.
- AUDUNSDOTTIR, Kristin et al. The effects of oxytocin administration on social and routinized behaviors in autism: A preregistered systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 167, p. 107067, 2024.
- BOCCIA, M. L. et al. Immunohistochemical localization of oxytocin receptors in human brain. **Neuroscience**, v. 253, p. 155-164, 2013.
- BRAAM, Wiebe et al. Low maternal melatonin level increases autism spectrum disorder risk in children. **Research in developmental disabilities**, v. 82, p. 79-89, 2018.
- CASANOVA, Manuel F. et al. Minicolumnar abnormalities in autism. **Acta neuropathologica**, v. 112, p. 287-303, 2006.
- COMPANYS-ALEMANY, Júlia et al. A novel NMDA receptor antagonist protects against cognitive decline presented by senescent mice. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, p. 284, 2020.
- COURCHESNE, Eric et al. Cerebellar hypoplasia and hyperplasia in infantile autism. **The Lancet**, v. 343, n. 8888, p. 63-64, 1994.
- CRAWLEY, Jacqueline N. Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. **Mental retardation and developmental disabilities research reviews**, v. 10, n. 4, p. 248-258, 2004.
- EL-ANSARY, Afaf K.; BACHA, Abir Ben; KOTB, Malak. Etiology of autistic features: the persisting neurotoxic effects of propionic acid. **Journal of neuroinflammation**, v. 9, p. 1-14, 2012.
- FATEMI, S. Hossein et al. Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism. **The Cerebellum**, v. 11, p. 777-807, 2012.
- GARIBAY, Jermelina Linor R. et al. Analysis by mRNA levels of the expression of six G protein α -subunit genes in mammalian cells and tissues. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1094, n. 2, p. 193-199, 1991.

GUASTELLA, Adam J.; HICKIE, Ian B. Oxytocin treatment, circuitry, and autism: a critical review of the literature placing oxytocin into the autism context. **Biological psychiatry**, v. 79, n. 3, p. 234-242, 2016.

HUTSLER, Jeffrey J.; LOVE, Tiffany; ZHANG, Hong. Histological and magnetic resonance imaging assessment of cortical layering and thickness in autism spectrum disorders. **Biological psychiatry**, v. 61, n. 4, p. 449-457, 2007.

JABARIN, Renad et al. Pharmacological modulation of AMPA receptors rescues specific impairments in social behavior associated with the A350V Iqsec2 mutation. **Translational psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 234, 2021.

JIN, Duo et al. CD38 is critical for social behaviour by regulating oxytocin secretion. **Nature**, v. 446, n. 7131, p. 41-45, 2007.

KOPACHEV, Natalia; NETSER, Shai; WAGNER, Shlomo. Sex-dependent features of social behavior differ between distinct laboratory mouse strains and their mixed offspring. **Iscience**, v. 25, n. 2, 2022.

KOU, Juan et al. A randomized trial shows dose-frequency and genotype may determine the therapeutic efficacy of intranasal oxytocin. **Psychological Medicine**, v. 52, n. 10, p. 1959-1968, 2022.

MOERKERKE, Matthijs et al. Endogenous oxytocin levels in autism—a meta-analysis. **Brain Sciences**, v. 11, n. 11, p. 1545, 2021.

MOHAPATRA, Alok Nath et al. Synchronized LFP rhythmicity in the social brain reflects the context of social encounters. **Communications Biology**, v. 7, n. 1, p. 2, 2024.

MOY, S. S. et al. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. **Genes, Brain and Behavior**, v. 3, n. 5, p. 287-302, 2004.

NETSER, Shai et al. A novel system for tracking social preference dynamics in mice reveals sex- and strain-specific characteristics. **Molecular autism**, v. 8, p. 1-14, 2017.

NETSER, Shai et al. **A system for tracking the dynamics of social preference behavior in small rodents**. MyJoVE Corporation, 2019.

NETSER, Shai et al. Distinct dynamics of social motivation drive differential social behavior in laboratory rat and mouse strains. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 5908, 2020.

OKITSU, Masato et al. Mouse Model of Parkinson's Disease with Bilateral Dorsal Striatum Lesion with 6-Hydroxydopamine Exhibits Cognitive Apathy-like Behavior. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 14, p. 7993, 2024.

OWENS, David F.; KRIEGSTEIN, Arnold R. Is there more to GABA than synaptic inhibition?. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 9, p. 715-727, 2002.

PARKER, Karen J. et al. Plasma oxytocin concentrations and OXTR polymorphisms predict social impairments in children with and without autism spectrum disorder. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 33, p. 12258-12263, 2014.

PAVĀL, Denis. A dopamine hypothesis of autism spectrum disorder. **Developmental neuroscience**, v. 39, n. 5, p. 355-360, 2017.

PERTILE, Renata AN et al. Vitamin D regulation of GDNF/Ret signaling in dopaminergic neurons. **The FASEB Journal**, v. 32, n. 2, p. 819-828, 2018.

PICHUGINA, Yulia A. et al. Salivary oxytocin in autistic patients and in patients with intellectual disability. **Frontiers in Psychiatry**, v. 13, p. 969674, 2022.

PLEKANCHUK, V. S.; PROKUDINA, O. I.; RYAZANOVA, M. A. Social behavior and spatial orientation in rat strains with genetic predisposition to catatonia (GC) and stereotypes (PM). **Vavilov Journal of Genetics and Breeding**, v. 26, n. 3, p. 281, 2022.

REDCAY, Elizabeth. The superior temporal sulcus performs a common function for social and speech perception: implications for the emergence of autism. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 1, p. 123-142, 2008.

RESHETNIKOV, V. V. et al. The long-term effects of early postnatal stress on cognitive abilities and expression of genes of the glutamatergic system in mice. **Neurochemical Journal**, v. 12, p. 142-151, 2018.

SALA, Mariaelvina et al. Pharmacologic rescue of impaired cognitive flexibility, social deficits, increased aggression, and seizure susceptibility in oxytocin receptor null mice: a neurobehavioral model of autism. **Biological psychiatry**, v. 69, n. 9, p. 875-882, 2011.

SCHUMANN, Cynthia Mills; AMARAL, David G. Stereological analysis of amygdala neuron number in autism. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 29, p. 7674-7679, 2006.

SCHUMANN, Cynthia Mills et al. The amygdala is enlarged in children but not adolescents with autism; the hippocampus is enlarged at all ages. **Journal of neuroscience**, v. 24, n. 28, p. 6392-6401, 2004.

SCHUMANN, Cynthia Mills; NORDAHL, Christine Wu. Bridging the gap between MRI and postmortem research in autism. **Brain research**, v. 1380, p. 175-186, 2011.

SCHWARTZER, J. J. et al. Maternal immune activation and strain specific interactions in the development of autism-like behaviors in mice. **Translational psychiatry**, v. 3, n. 3, p. e240-e240, 2013.

SONG, Zhimin et al. Activation of oxytocin receptors, but not arginine-vasopressin V1a receptors, in the ventral tegmental area of male Syrian hamsters is essential for the reward-like properties of social interactions. **Psychoneuroendocrinology**, v. 74, p. 164-172, 2016.

STOODLEY, Catherine J. Distinct regions of the cerebellum show gray matter decreases in autism, ADHD, and developmental dyslexia. **Frontiers in systems neuroscience**, v. 8, p. 92, 2014.

TAKECHI, Kenshi et al. The $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor modulates autism-like behavioral and motor abnormalities in pentylenetetrazol-kindled mice. **European journal of pharmacology**, v. 775, p. 57-66, 2016.

TARTAGLIONE, Anna Maria et al. Prenatal valproate in rodents as a tool to understand the neural underpinnings of social dysfunctions in autism spectrum disorder. **Neuropharmacology**, v. 159, p. 107477, 2019.

TATSUKAWA, Tetsuya et al. Scn2a haploinsufficient mice display a spectrum of phenotypes affecting anxiety, sociability, memory flexibility and ampakine CX516 rescues their hyperactivity. **Molecular Autism**, v. 10, p. 1-15, 2019.

VAN KOOTEN, Imke AJ et al. Neurons in the fusiform gyrus are fewer and smaller in autism. **Brain**, v. 131, n. 4, p. 987-999, 2008.

VAN DER VEERE, Christine N.; DEN HEIJER, Anne E.; BOS, Arend F. Development of children at age 7-8 years after intrauterine exposure to selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs)—Results from the Dutch prospective cohort SMOK study. **Early Human Development**, p. 106405, 2025.

WEGIEL, Jerzy et al. Stereological study of the neuronal number and volume of 38 brain subdivisions of subjects diagnosed with autism reveals significant alterations restricted to the striatum, amygdala and cerebellum. **Acta neuropathologica communications**, v. 2, p. 1-18, 2014.

WU, Yang et al. Characterization of Rett Syndrome-like phenotypes in Mecp2-knockout rats. **Journal of neurodevelopmental disorders**, v. 8, p. 1-12, 2016.

WU, Jing et al. Postnatal AVP treatments prevent social deficit in adolescence of valproic acid-induced rat autism model. **Peptides**, v. 137, p. 170493, 2021.

XING, Chuan; YU, Xiang. Oxytocin and autism: Insights from clinical trials and animal models. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 92, p. 103015, 2025.

YAMASUE, Hidenori et al. Effect of intranasal oxytocin on the core social symptoms of autism spectrum disorder: a randomized clinical trial. **Molecular psychiatry**, v. 25, n. 8, p. 1849-1858, 2020.

YANG, Jiexian et al. Therapeutic efficacy of sulforaphane in autism spectrum disorders and its association with gut microbiota: animal model and human longitudinal studies. **Frontiers in Nutrition**, v. 10, p. 1294057, 2024.

YANG, Linhan et al. Withaferin A Rescues Brain Network Dysfunction and Cognitive Deficits in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Pharmaceuticals**, v. 18, n. 6, p. 816, 2025.

YENNAWAR, Madhumita; WHITE, Rachel S.; JENSEN, Frances E. AMPA receptor dysregulation and therapeutic interventions in a mouse model of CDKL5 deficiency disorder. **Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 24, p. 4814-4828, 2019.

YI, Donglin et al. Effects of Maternal Exposure to Decamethylcyclopentasiloxane on the alternations in Offspring Behaviors in Mice. **Biomedicines**, v. 11, n. 1, p. 35, 2022.

YIZHAR, Ofer et al. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. **Nature**, v. 477, n. 7363, p. 171-178, 2011.

ZENG, Ling-Hui et al. Modulation of astrocyte glutamate transporters decreases seizures in a mouse model of Tuberous Sclerosis Complex. **Neurobiology of disease**, v. 37, n. 3, p. 764-771, 2010.

ZHANG, Bin et al. Reconstruction of the hypothalamo-neurohypophyseal system and functional dissection of magnocellular oxytocin neurons in the brain. **Neuron**, v. 109, n. 2, p. 331-346. e7, 2021.

ZHONG, Jiu-Gen et al. Associations between dysbiosis gut microbiota and changes of neurotransmitters and short-chain fatty acids in valproic acid model rats. **Frontiers in Physiology**, v. 14, p. 1077821, 2023.

ZHOU, Bo et al. The changes of amygdala transcriptome in autism rat model after arginine vasopressin treatment. **Frontiers in Neuroscience**, v. 16, p. 838942, 2022.

ZOU, Huihui et al. Neurotropin alleviates cognitive impairment by inhibiting TLR4/MyD88/NF- κ B inflammation signaling pathway in mice with vascular dementia. **Neurochemistry international**, v. 171, p. 105625, 2023.

CAPÍTULO XV

MODELO DE DEPRESSÃO CONSEQUENTE AO ESTRESSE GESTACIONAL INDUZIDO POR CORTICOSTERONA EM CAMUNDONGOS

MODEL OF GESTATIONAL STRESS DEPRESSION IN MICE BY CORTICOSTERONE

DOI: 10.51859/ampilla.nat298.1126-15

Matheus Firmino de Moraes ¹
Ana Maria Sampaio Assereuy ²

¹ Doutorando em ciências fisiológicas. Programa de pós-graduação em ciências fisiológicas - UECE

² Doutora em farmacologia, Professora Emérita do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará-UECE (PPGCF-UECE)

RESUMO

A depressão perinatal representa uma condição multifatorial que compromete o bem-estar físico e emocional da mãe e da prole. O estresse gestacional, gerado pela elevada liberação de glicocorticoide, causa um estado de hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e favorece o surgimento de um fenótipo depressivo. Este trabalho tem por objetivo caracterizar o modelo experimental de depressão por estresse gestacional em camundongos induzido por corticosterona destacando os parâmetros comportamentais, neuroendócrinos e outros biomarcadores. A adição de corticosterona na água de beber ou a aplicação por outras vias de administração, do 6.^º ao 20.^º dia gestacional, reproduz o estado de estresse crônico. Avaliações comportamentais como o Nado Forçado e o Campo Aberto, indicam anedonia, desesperança e alterações locomotoras. Análises neuroquímicas e neurofisiológicas demonstram disfunções nos sistemas glutamatérgico e GABAérgico, com hiperexcitabilidade neuronal, além de alterações dopaminérgicas nos circuitos de recompensa e evidências de neuroinflamação e disfunções epigenéticas. O modelo permite a investigação translacional de alvos moleculares, como BDNF, GR e marcadores inflamatórios, além de testar intervenções farmacológicas e epigenéticas com relevância clínica. Apesar da eficácia, limitações

como variações no consumo de corticosterona, impacto sistêmico inespecífico e interferência de alterações fisiológicas gestacionais demandam cautela interpretativa. Conclui-se que o modelo de depressão gestacional induzida por corticosterona é uma ferramenta válida e promissora para o estudo da fisiopatologia da depressão perinatal e desenvolvimento de estratégias terapêuticas e preventivas.

Palavras-chave: Eixo HPA (hipotálamo-hipófise-adrenal). Neuroplasticidade. Transtornos afetivos. Inflamação neuroendócrina. Transtornos depressivos.

ABSTRACT

Perinatal depression is a multifactorial condition that the physical and emotional health of both mothers and offsprings. Gestational stress, driven by elevated glucocorticoid release, induces a state of hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and contributes to the development of a depressive-like phenotype. This study aims to characterize an experimental model of stress-induced perinatal depression in mice by corticosterone exposure, highlighting behavioral and neuroendocrine parameters, along with potential biomarkers. Corticosterone administration via drinking water or by alternative routes—from gestational day 6 to day 20 reproduces a state of chronic stress.

Behavioral assessments, such as the tests Forced Swim and Open Field, reveal anhedonia, despair-like behavior, and locomotor alterations. Neurochemical and neurophysiological analyses demonstrate dysfunctions in the glutamatergic and GABAergic systems, accompanied by neuronal hyperexcitability, in addition to dopaminergic alterations in reward related circuits, and evidence of neuroinflammation and epigenetic dysregulation. This model enables the translational investigation of molecular targets such as BDNF, glucocorticoid receptors (GR), and inflammatory markers, as well as the testing of pharmacological and epigenetic interventions of

clinical relevance. Despite its efficacy, limitations such as variations in the intake of corticosterone, nonspecific systemic effects, and the influence of gestational physiological changes require cautious interpretation. In conclusion, the corticosterone-induced model is a valid and promising tool for the pathophysiology study of perinatal depression and development of preventive and therapeutic strategies.

Keywords: HPA axis (hypothalamic-pituitary-adrenal). Neuroplasticity. Affective disorders. Neuroendocrine inflammation. Depressive disorders.

1. INTRODUÇÃO

A depressão perinatal é um transtorno que acomete mulheres durante a gestação ou no período pós-parto, sendo associada a prejuízos emocionais, cognitivos e comportamentais tanto na mãe quanto na prole (Xie *et al.*, 2025). Fatores hormonais, sociais e neurobiológicos contribuem para a etiologia multifatorial dessa condição (Zutić, 2023).

O estresse gestacional é considerado um fator de risco, já que essa condição estimula a hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), culminando na liberação em excesso de glicocorticoide (Fei *et al.*, 2024), podendo comprometer a neurogênese, a plasticidade sináptica e a resposta ao estresse à longo prazo (Enayati *et al.*, 2020).

Modelos animais têm sido fundamentais para o estudo da depressão perinatal, pois permitem a avaliação de parâmetros comportamentais e hormonais em condições controladas. Dentre os modelos destaca-se a administração de corticosterona como uma abordagem confiável e translacional para simular os efeitos do estresse crônico (Wang *et al.*, 2024). A exposição crônica à corticosterona induz comportamentos relacionados à anedonia, desesperança e alterações neuroendócrinas e simula a depressão (Kokras *et al.*, 2020).

Assim, o uso de corticosterona durante a gestação surge como uma alternativa para a padronização de modelos de depressão por estresse gestacional, com potencial para elucidar mecanismos moleculares e comportamentais específicos deste transtorno (Fei *et al.*, 2024). Diante disso, o presente estudo teve como objetivo caracterizar o modelo experimental de depressão induzida por corticosterona em camundongos fêmeas gestantes, avaliando parâmetros comportamentais e neuroendócrinos associados ao desenvolvimento do fenótipo depressivo.

2. MODELO EXPERIMENTAL

Neste modelo experimental são utilizadas fêmeas adultas, com 8–12 semanas de idade e pesando entre 20 e 30 g. Para o acasalamento, cada fêmea deve ser pareada com um macho fértil da mesma linhagem por 24 h. Após esse período deve ser verificado a presença do “plug” vaginal, a detecção positiva marca o Dia Gestacional 0 (DG0). As fêmeas gestantes devem ser distribuídas aleatoriamente em grupos (Mader *et al.*, 2009).

A indução farmacológica de depressão perinatal é realizada com corticosterona diluída em solução de 0,45 % de etanol em água destilada. A solução pode ser oferecida na água de beber, garantindo uma dose aproximada de 25 mg/kg/dia, calculada com base no consumo hídrico médio e no peso corporal. A administração é iniciada no Dia Gestacional 6 (DG6), fase em que a organogênese está estabelecida e a plasticidade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) se intensifica, sendo mantida até o DG20, último dia de gestação. Esse regime contínuo permite a indução de um modelo de estresse crônico leve e fisiologicamente relevante (Kott *et al.*, 2016).

A administração pela água de beber é amplamente utilizada em protocolos que envolvem o uso de corticosterona por ser não invasiva, causar menor estresse manipulatório e permitir exposição contínua ao fármaco. No entanto, outras vias de administração também são descritas na literatura. A gavage oferece maior controle sobre a dose exata administrada diariamente. Já a injeção subcutânea (s.c.) ou intraperitoneal (i.p.) permite administração precisa e absorção rápida, porém exige manipulação constante, o que pode interferir nos desfechos comportamentais (Kott *et al.*, 2016). A escolha da via deve considerar o equilíbrio entre controle experimental, bem-estar animal e validade translacional do modelo.

Nos DG18–19 (final de gestação) e no 3.º dia pós-parto (PP3) devem ser conduzidas avaliações comportamentais para caracterizar o fenótipo depressivo materno. O Teste de Preferência por Sacarose (SPT) deve ser realizado por 48 h, precedido de privação hídrica-durante 4 h, oferecendo-se simultaneamente água e solução de sacarose a 1 %. A anedonia é expressa como percentual de preferência pela solução açucarada. No Teste do Nado Forçado (FST), as fêmeas são colocadas individualmente em um cilindro de vidro (25 cm × 20 cm, água a 25 ± 1 °C) por 6 min, e marcado 4 min de imobilidade, tempo no qual o animal pode ser enquadrado com comportamento de desesperança. Para controlar possíveis efeitos locomotores, pode ser aplicado o teste de Campo Aberto pela colocação dos animais em arena (40 cm × 40 cm × 30 cm), registrando-se cruzamentos e tempo de permanência no centro da arena (Xie *et al.*, 2025).

A eutanásia deve ocorrer no DG20 (subconjunto gestacional) ou PP7 (subconjunto pós-parto) mediante superdosagem anestésica, coletando-se sangue para dosagem de

corticosterona plasmática por ELISA e validação da eficácia do protocolo; encéfalo (hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala) destinados a imunohistoquímica, qPCR e Western Blot; e as glândulas adrenais para análise histopatológicas (Xie *et al.*, 2025).

3. BASES NEUROANATÔMICA E NEUROQUÍMICA

O modelo de depressão induzida por corticosterona impacta diretamente o equilíbrio entre os sistemas glutamatérgico (excitador) e GABAérgico (inibidor). O estresse crônico leva à disfunção da sinalização do glutamato, com hiperatividade sináptica, acúmulo de glutamato extracelular e excitotoxicidade neuronal, especialmente no hipocampo e córtex pré-frontal. Esses efeitos resultam na degeneração de dendritos, redução da densidade sináptica e morte neuronal (Khoodoruth *et al.*, 2022; Fogaça; Duman, 2019).

Por outro lado, há evidências de que a função do sistema GABAérgico também é comprometida, com redução da expressão de receptores GABA-A e GABA-B, o que prejudica os mecanismos de inibição tônica e fásica. Essa desregulação contribui para a hiperexcitabilidade neuronal e aumenta a vulnerabilidade a respostas comportamentais desadaptadas, como ansiedade, agitação e distúrbios do sono, frequentemente observados em modelos perinatais de depressão (Khoodoruth *et al.*, 2022; Fogaça; Duman, 2019).

No eixo da recompensa e motivação, as alterações dopaminérgicas afetam o funcionamento do núcleo accumbens e da área tegumental ventral (VTA), reduzindo a liberação de dopamina nesses circuitos. Isso leva à anedonia (perda de interesse por atividades naturalmente prazeirosas) e está associada à redução da atividade locomotora e do comportamento exploratório. Além disso, há diminuição na expressão de receptores dopaminérgicos D2 e da proteína transportadora de dopamina (DAT), comprometendo a sinalização e o tônus dopaminérgico basal (Peng *et al.*, 2020).

Outro aspecto relevante é a neuroinflamação. A corticosterona em níveis cronicamente elevados ativa a micróglio e astrócitos, aumentando a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6) e promovendo o estresse oxidativo. Isso contribui para a quebra da barreira hematoencefálica, causando a disfunção sináptica e a redução da neuroplasticidade. Marcadores proteicos de ativação microglial como o Iba-1 e de reatividade astrocitária como o GFAP são frequentemente aumentados em análises imuno-histoquímicas de animais que foram induzidos a depressão por corticosterona (Zhao *et al.*, 2025).

Além das alterações neuroquímicas e estruturais, há evidências de mecanismos epigenéticos modulando a expressão gênica em resposta ao estresse gestacional. A hipermetilação de promotores de genes relacionados ao BDNF, GR (receptor de glicocorticoide) e NR3C1 pode

reduzir a sensibilidade da retroalimentação negativa do eixo HPA, perpetuando a ativação desse sistema e aumentando o risco de transtornos depressivos na mãe e na prole (Mourtzi; Sertedaki; Charmandari, 2021).

Por fim, destaca-se que a exposição à corticosterona durante a gestação interfere diretamente nos níveis de hormônios sexuais como estrogênio e progesterona, fundamentais para a estabilidade emocional materna no pós-parto e compromete o equilíbrio neuroendócrino necessário para a neuroproteção, o vínculo materno e o comportamento de cuidado parental (Gotlieb *et al.*, 2022).

4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS

O modelo experimental de depressão perinatal induzido por corticosterona em camundongos apresenta elevado potencial de aplicação translacional por mimetizar aspectos fisiopatológicos, comportamentais e neuroendócrinos observados em quadros depressivos humanos, especialmente aqueles associados ao período gestacional e pós-parto. A semelhança com o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) humano, a responsividade ao tratamento farmacológico e a possibilidade de mensuração de biomarcadores tornam este modelo útil para investigação de mecanismos patológicos e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Wang *et al.*, 2024; Chai *et al.*, 2022).

A exposição pré-natal ao estresse e à disfunção do eixo HPA tem sido associadas a maior incidência de transtorno depressivo, déficits cognitivos, alterações no vínculo materno-infantil e maior risco de psicopatologias na prole. Nesse sentido, modelos animais que reproduzem tais alterações contribuem para a identificação de alvos moleculares, como a via BDNF-TrkB-mTOR, receptores de glicocorticoides (GR), neurotrofinas, sistemas monoaminérgicos e mediadores inflamatórios, os quais podem ser modulados farmacologicamente com potencial benefício terapêutico (Neeley *et al.*, 2011; Glover; O'Connor; O'Donnell, 2010).

A administração de corticosterona durante a gestação permite a avaliação pré-clínica de tratamentos convencionais e alternativos, como antidepressivos tricíclicos, ISRS, compostos anti-inflamatórios, fitoterápicos e intervenções epigenéticas, bem como o impacto de diferentes estratégias terapêuticas em parâmetros comportamentais, neuroquímicos e hormonais tanto na mãe quanto na prole, em estágios distintos do desenvolvimento (Mourtzi; Sertedaki; Charmandari, 2021; Brummelte; Galea, 2010; Qiu *et al.*, 2021).

Outro ponto importante é a utilidade deste modelo na investigação do comportamento materno e do vínculo afetivo nos estudos de depressão, possibilitando a investigação e intervenção com foco em promoção de saúde mental perinatal, bem como no desenvolvimento de

estratégias de prevenção de transtornos do neurodesenvolvimento em filhos de mães expostas ao estresse crônico (Brummelte; Galea, 2010).

Em resumo, as aplicações clínicas e translacionais do modelo de depressão induzida por corticosterona abrangem desde o entendimento da etiopatologia até a triagem de novas intervenções terapêuticas, com implicações diretas na medicina translacional, na psiquiatria perinatal e na neurociência do desenvolvimento.

5. LIMITES E DESAFIOS METODOLÓGICOS

Apesar da ampla utilização do modelo de depressão perinatal induzido por corticosterona em camundongos, alguns limites e desafios metodológicos devem ser considerados para garantir a validade e a reproduzibilidade dos achados. Entre os principais desafios está a variação no consumo voluntário de corticosterona pela água de beber, que pode ocorrer devido a fatores como estágio gestacional e temperatura ambiente. Essa variabilidade pode comprometer o controle preciso da dose efetivamente absorvida, dificultando a padronização entre experimentos e grupos experimentais. Vias não invasivas como a administração via água, reduz o estresse manipulativo, mas oferecem menor controle da dose; por outro lado, vias como gavagem ou injeções subcutâneas, podem gerar estresse adicional e afetar os desfechos comportamentais (Ding *et al.*, 2018; Kott *et al.*, 2016).

Além disso, a administração crônica de corticosterona pode impactar outros parâmetros fisiológicos, como o metabolismo energético, sistema imunológico e o eixo reprodutivo, o que gera efeitos colaterais que precisam ser cuidadosamente controlados e interpretados. Embora a administração de corticosterona reproduza aspectos importantes da fisiopatologia da depressão, como alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), anedonia e disfunções neuroendócrinas, trata-se de um modelo unifatorial, que não contempla a complexidade multifatorial da depressão perinatal em humanos como outros fatores hormonais, genéticos, ambientais e psicossociais (Wang *et al.*, 2024; Van Donkelaar *et al.*, 2014).

A avaliação comportamental no período gestacional também apresenta limitações, pois o estado fisiológico das fêmeas grávidas (alterações hormonais, ganho de peso, restrição de movimentos) pode interferir nos resultados dos testes, como o de Campo Aberto ou Nado Forçado, exigindo interpretação cautelosa. Por fim, destaca-se a necessidade de validação cruzada com outros modelos de depressão perinatal, bem como o uso de múltiplos parâmetros (comportamentais, moleculares e histológicos) para conferir robustez dos achados (Brummelte; Lieblich; Galea, 2012; Demuyser *et al.*, 2016).

REFERÊNCIAS

- BRUMMELTE, Susanne; GALEA, Liisa A.M. Chronic corticosterone during pregnancy and postpartum affects maternal care, cell proliferation and depressive-like behavior in the dam. **Hormones and Behavior**, v. 58, n. 5, p. 769-779. 2010.
- BRUMMELTE, Susanne; LIEBLICH, Stephanie E.; GALEA, Liisa A.M. Gestational and postpartum corticosterone exposure to the dam affects behavioral and endocrine outcome of the offspring in a sexually-dimorphic manner. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 406-418. 2012.
- CHAI, Yujuan *et al.* The Value of HPA Axis Hormones as Biomarkers for Screening and Early Diagnosis of Postpartum Depression: updated information about methodology. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 17. 2022.
- DEMUYSER, Thomas *et al.* In-depth behavioral characterization of the corticosterone mouse model and the critical involvement of housing conditions. **Physiology & Behavior**, v. 156, p. 199-207. 2016.
- DING, Hui *et al.* Depression-like behaviors induced by chronic corticosterone exposure via drinking water: time-course analysis. **Neuroscience Letters**, v. 687, p. 202-206. 2018.
- ENAYATI, Mohsen *et al.* Prenatal maternal stress alters depression-related symptoms in a strain - and sex-dependent manner in rodent offspring. **Life Sciences**, v. 251, p. 117597. 2020.
- FEI, Fei *et al.* Comparison of CUMS at different pregnancy stages, maternal separation, and their effects on offspring in postpartum depression mouse models. **Helijon**, v. 10, n. 15, p. 35363. 2024.
- FOGAÇA, Manoela V.; DUMAN, Ronald S.. Cortical GABAergic Dysfunction in Stress and Depression: new insights for therapeutic interventions. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, p. 20. 2019.
- GOTLIEB, Neta *et al.* Impact of Chronic Prenatal Stress on Maternal Neuroendocrine Function and Embryo and Placenta Development During Early-to-Mid-Pregnancy in Mice. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 1566-1581. 2022.
- GLOVER, Vivette; O'CONNOR, T.G.; O'DONNELL, Kieran. Prenatal stress and the programming of the HPA axis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 1, p. 17-22. 2010.
- KHOODORUTH, Mohamed Adil Shah *et al.* Glutamatergic System in Depression and Its Role in Neuromodulatory Techniques Optimization. **Frontiers in Psychiatry**, v. 13, p. 12. 2022.
- KOKRAS, Nikolaos *et al.* Do corticosterone levels predict female depressive-like behavior in rodents? **Journal of Neuroscience Research**, v. 99, n. 1, p. 324-331. 2020.
- KOTT, J.M. *et al.* Effectiveness of different corticosterone administration methods to elevate corticosterone serum levels, induce depressive-like behavior, and affect neurogenesis levels in female rats. **Neuroscience**, v. 312, p. 201-214. 2016.

MADER, Sarah L. *et al.* Refining timed pregnancies in two strains of genetically engineered mice. **Lab Animal**, v. 38, n. 9, p. 305-310. 2009.

MOURTZI, Niki; SERTEDAKI, Amalia; CHARMANDARI, Evangelia. Glucocorticoid Signaling and Epigenetic Alterations in Stress-Related Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5964. 2021.

NEELEY, E.W. *et al.* Prenatal stress differentially alters brain-derived neurotrophic factor expression and signaling across rat strains. **Neuroscience**, v. 187, p. 24-35. 2011.

PENG, Beibei *et al.* Corticosterone Attenuates Reward-Seeking Behavior and Increases Anxiety via D2 Receptor Signaling in Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 41, n. 7, p. 1566-1581. 2020.

QIU, Wansu *et al.* Postpartum corticosterone and fluoxetine shift the tryptophan-kynurenone pathway in dams. **Psychoneuroendocrinology**, v. 130, p. 105273. 2021.

VAN DONKELAAR, Eva L. *et al.* Long-Term Corticosterone Exposure Decreases Insulin Sensitivity and Induces Depressive-Like Behaviour in the C57BL/6NCrl Mouse. **Plos One**, v. 9, n. 10, p. 106960. 2014.

WANG, Hao *et al.* Chronic Corticosterone Administration-Induced Mood Disorders in Laboratory Rodents: features, mechanisms, and research perspectives. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 25, n. 20, p. 11245. 2024.

XIE, Hongxiao *et al.* Corticosterone-induced postpartum depression induces depression-like behavior and impairs hippocampal neurogenesis in adolescent offspring via HPA axis and BDNF-mTOR pathway. **Neurobiology Of Stress**, v. 34, p. 100708. 2025.

ZHAO, Kunying *et al.* Neuroinflammation and stress-induced pathophysiology in major depressive disorder: mechanisms and therapeutic implications. **Frontiers In Cellular Neuroscience**, v. 19, p. 17. 2025.

ZUTIĆ, Maja. Biopsychosocial Models of Peripartum Depression: a narrative review. **Clínica y Salud**, v. 34, n. 2, p. 91-99. 2023.

CAPÍTULO XVI

TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO: BASES NEUROBIOLÓGICAS

ELEVATED PLUS MAZE TEST: NEUROBIOLOGICAL BASIS

DOI: 10.51859/ampilla.nat298.1126-16

Pedro Gabriel Maia Alves ¹
Ana Maria Sampaio Assreuy ²

¹ Mestrando em Ciências Fisiológicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) da Universidade Estadual do Ceará - UECE

² Pós-doutorada em Biologia Molecular. Doutora em Farmacologia, Professora Emérita do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará (PPGCF/UECE).

RESUMO

O comportamento ansioso em roedores pode ser analisado através do teste de labirinto em cruz elevado, no qual o animal se encontra em confronto com seus instintos naturais de exploração de novos lugares evitando situações aversivas ao explorar um local exposto e elevado (braços abertos do aparato). Os parâmetros analisados descrevem a capacidade de exploração do animal bem como seu comportamento ansioso ou normal. O teste avalia a atividade de estruturas cerebrais relacionadas ao medo e ansiedade em animais como o hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, além da atividade do sistema neuroendócrino via eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Portanto, sua utilidade está em evidenciar o efeito ansiolítico ou ansiogênico de fármacos através da análise de dados obtidos neste teste juntamente com outros testes associados na busca de novos medicamentos com aplicação sobre a ansiedade.

Palavras-chave: Teste comportamental. Comportamento ansioso. Hipocampo. Córtex pré-frontal. Amígdala.

ABSTRACT

Anxiety-like behavior in rodents can be assessed by the elevated plus maze test, in which the animals are posted in conflict to their natural instincts to explore new environments, avoiding aversive situations when exploring new, exposed and high places (open arms). The parameters studied describe the animals exploring skills as well as their standard or anxiety-like behavior. Central nervous system activity is monitored in areas related to fear and anxiety in animals such as hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex, along with the neuroendocrine system activation due to the hypothalamus-hypophysis-adrenal axis. Therefore, the test is useful to evaluate the anxiolytic or anxiogenic activity of drugs by the use of multiple tests and data analysis in the search of new medicines to be applied on anxiety.

Keywords: Behavioral test. Anxiety-like behavior. Hippocampus. Prefrontal cortex. Amygdala.

1. INTRODUÇÃO

A pesquisa de novos fármacos é um campo de relevância pois muitas classes de moléculas moduladoras do sistema nervoso central (SNC), ao tratar desordens mentais, vêm acompanhadas de efeitos colaterais que alteram o comportamento (Edinoff *et al.*, 2021). Portanto se faz necessário a prospecção de fármacos alternativos e a avaliação de seus efeitos fisiológicos e sobre as suas possíveis alterações comportamentais.

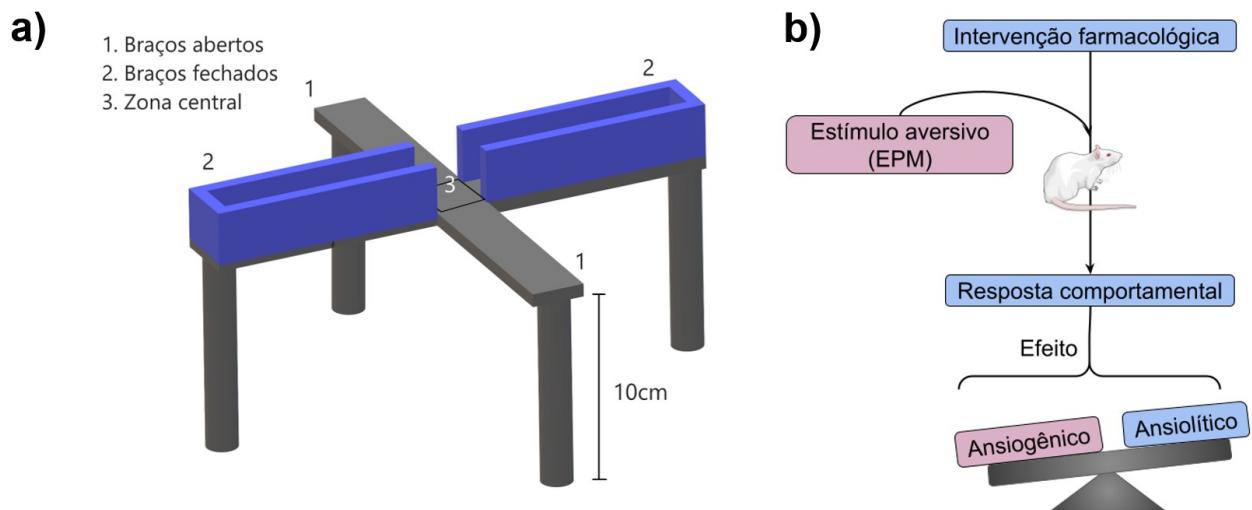
Nesse contexto, alterações comportamentais em experimentos com animais são uma das variantes que podem ser analisadas como resposta aos estímulos que o animal recebe. O modelo murino contribui bastante para pesquisas de avaliação de efeito de novos fármacos pois os roedores são bastante sensíveis às mudanças ambientais e fisiológicas, e essa sensibilidade se reflete em seu padrão de comportamento que pode ser analisado e interpretado conforme padrões e parâmetros pré-definidos pela literatura com dados experimentais sobre o modelo (van der Staay, 2006).

Os estudos de análises comportamentais se baseiam no instinto inato dos animais, como a vontade natural dos roedores de explorar novos lugares e elementos do ambiente, a tendência de se esconder de predadores ou evitar estímulos estressores e aversivos (Pisula, Mondlinska, Chrzanowska, 2019). Alterações nesses tipos de comportamento podem sugerir mudanças em áreas cerebrais associadas à modulação do medo e ansiedade. Um dos modelos comportamentais utilizados para analisar essas alterações é o do labirinto em cruz elevado (*elevated plus maze - EPM*), que avalia a tendência do animal de preferir explorar um local seguro e coberto a um lugar novo, exposto e elevado no aparato, o que pode sugerir um comportamento mais ansioso e defensivo (Pellow *et al.*, 1985).

O aparato consiste em peças (Fig. 1.a), normalmente feitas de acrílico, que quando montadas formam braços perpendiculares abertos (apenas com a passagem de 50x10 cm) e fechados (passagem de 50 x 10 cm contornada por paredes opacas de 15 a 40 cm), apoiados por suportes de 10 a 50 cm do chão, há também uma zona central que é formada da interseção desses braços, onde inicialmente o animal é posicionado (Pellow *et al.*, 1985).

A análise da resposta do comportamento animal, após sofrer interferência advinda de alguma intervenção, é feita através do teste (Fig 1.b), que promove um estímulo aversivo através da exploração de locais que o roedor com perfil mais ansioso ou tratado com ansiogênicos tentará evitar, enquanto o animal sem alterações ou tratado com ansiolíticos explora igualmente todas as partes do aparato (Pellow *et al.*, 1985).

Figura 1 - Esquema de aparato de labirinto em cruz elevado e desenho experimental do uso do EPM



Fonte: elaborado pelo autor

2. PROTOCOLO DO TESTE

O protocolo experimental pode ser dividido em 3 etapas para melhor organização: pré-laboratorial, com preparo e planejamento do teste; laboratorial, com a condução do experimento e coleta de dados; e pós-laboratorial, para a análise e interpretação de dados obtidos. O planejamento em qualquer teste comportamental é imprescindível para a qualidade da coleta de dados fidedignos e minimização de erros tanto de análise (pelo pesquisador ou observador) quanto advindos dos animais (pelo estresse, interferências ou execução indevida do teste) (Campos *et al.*, 2023).

Desse modo, as outras etapas de execução e análise se tornam mais claras e objetivas, evitando até mesmo a repetição de testes por falta de significância estatística nos dados.

2.1. PREPARO DE SALA E DE APARATO

É necessário minimizar quaisquer fatores que possam influenciar no comportamento dos animais antes e durante o período do teste. Detalhes como odor, iluminação, sons e manuseio dos animais são interferências que podem alterar o seu comportamento, adicionando tendências e viés na coleta de dados entre os indivíduos do estudo (Campos *et al.*, 2023).

Portanto, o ambiente em que o aparato de labirinto em cruz elevado será montado deve ser previamente higienizado (com produto adequado sem odor ou álcool à 5%), separado da sala de quarentena e na ausência de outros animais, para que os animais de estudo possam ser

aclimatados nesta nova sala antes do experimento (Toyama, 2012). Além disso, a sala em questão deve ter iluminação moderada e uniforme (325 lux, distante 1m do piso), e ser isolada de sons, barulhos ou ruídos externos (abaixo de 85 dB) (Campos *et al.*, 2023).

Os pesquisadores observadores que entrarão em contato com o aparato e/ou animais, devem evitar perfumes ou odores muito fortes, além de planejar o experimento para que os animais sejam manuseados o mínimo possível e de forma padronizada, como na disposição e transporte das caixas ou gaiolas dentro da sala. Todas estas recomendações fazem parte de treinamentos de pessoal para uso de animais (Campos *et al.*, 2023).

2.2. CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO E COLETA DE DADOS

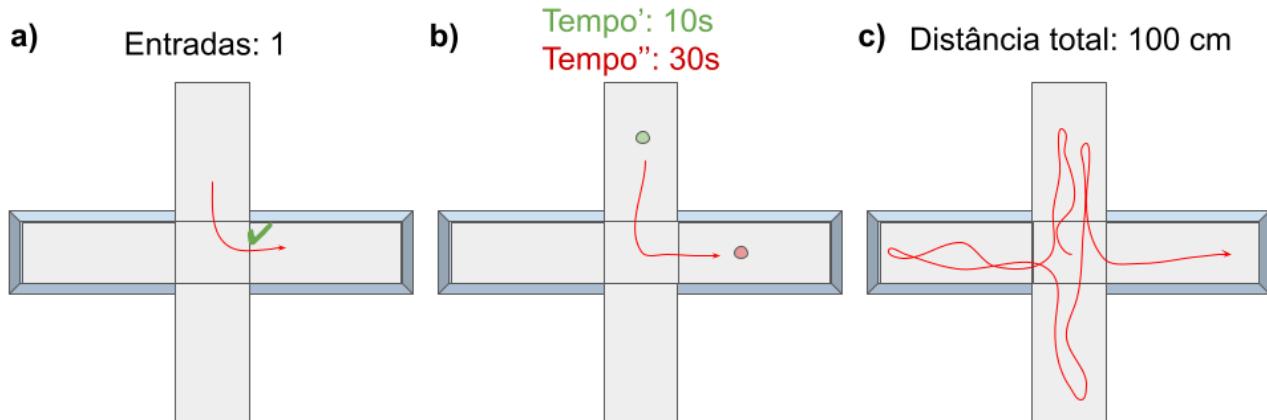
A execução é feita conforme parâmetros escolhidos pelo pesquisador observador com base na literatura. Entretanto, o método preconizado normalmente consiste em transportar um animal da sua gaiola, posicionando-o na interseção entre os braços do aparato (zona central), e à partir deste momento, marcar o início da avaliação, que pode ser de 5 à 10 minutos, ou de acordo com a metodologia utilizada. Ao final do tempo decorrido, o animal é devolvido para sua gaiola e o aparato é limpo com solução sanitizante (diluída ou própria para não deixar odor) antes da avaliação de outro animal (Pentkowski *et al.*, 2021).

A observação do comportamento deve ser realizada pelos pesquisadores em silêncio ou por câmera previamente posicionada acima do aparato, que grava as entradas e trajetórias do animal nos braços do teste para posterior análise. Recursos como relógios e cronômetros podem ser utilizados para padronizar o tempo entre cada teste, desde que não emitam som perto do animal (Pisula, Mondlinska, Chrzanowska, 2019).

2.3. ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DE DADOS

Os dados que serão obtidos em forma de anotações ou gravações podem ser analisados conforme parâmetros escolhidos pelo pesquisador. Normalmente é analisado o comportamento animal na forma de: número de entradas em cada braço (Fig. 2.a), em número de eventos quando o animal passa com as 4 patas para dentro dos limites do braço em questão; tempo de permanência em cada braço (Fig. 2.b), quantificado em segundos (s) ou porcentagem (%) em que o animal está explorando do braço em questão; e distância total percorrida no aparato (Fig 2.c), quantificado em centímetros do trajeto do animal ao todo (Knight *et al.*, 2022).

Figura 2 - Análise de dados experimentais do labirinto em cruz elevado



Fonte: Elaborado pelo autor.

Desse modo é possível comparar cada um desses parâmetros entre os diferentes grupos experimentais e evidenciar as diferenças de preferência dos animais a escolherem explorar um tipo de ambiente em relação ao outro (braços abertos ou fechados), chamado comportamento de evitação (avoidance) (Kenwood, Kalim, Barbas, 2022).

A interpretação dos dados é realizada de acordo com os objetivos do pesquisador e propósito da investigação, normalmente, procura-se evidenciar o comportamento ansioso de um grupo de animais em detrimento a outro grupo, ou a reversão do comportamento ansioso para parâmetros normais através de algum tratamento (ansiolítico), comparado com grupos controles. Ou até mesmo avaliar o potencial ansiogênico de uma molécula ainda não estudada, e investigar esse efeito para classificá-lo como efeito adverso (Freitas, 2025).

Em qualquer caso que se queira investigar, a análise de dados de um teste isolado não é suficiente para atribuir com precisão o efeito modulador de comportamento àquela intervenção utilizada, sendo portanto, recomendada a análise das diferenças no comportamento animal evidenciadas em diferentes testes comportamentais que sustentem um resultado condizente com a proposição do estudo, como por exemplo associar o teste de campo aberto ao de labirinto em cruz elevado (Costa *et al.*, 2015).

Em suma, o teste avalia o perfil de comportamento ansioso do animal através da atividade exploratória, entretanto, o efeito ansiolítico ou ansiogênico de algum tratamento ou intervenção somente é comprovado através dos resultados de outros testes que deem suporte à hipótese estudada naquele modelo específico e na espécie animal utilizada.

3. BASE NEUROANATÔMICA E NEUROQUÍMICA

A execução do teste visa analisar o comportamento ansioso dos animais, tendo sido inalterado, atenuado ou aumentado por algum fator ou intervenção farmacológica. Isto é possível pelas áreas cerebrais com as quais o teste se relaciona, através da interação do animal com estímulos aversivos como um ambiente novo e inexplorado, elevado e exposto (Kenwood, Kalim, Barbas, 2022).

3.1. EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL (HPA)

Estímulos aversivos podem rapidamente ativar vias de sinalização de produção de moléculas que excitam o sistema nervoso simpático, sendo marcadores da condição de estresse como o cortisol nos humanos, já no modelo murino, é produzida a corticosterona (Pentkowski *et al.*, 2021).

Esta substância ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, no qual células neuroendócrinas do hipotálamo, em resposta à corticosterona produzida pelas glândulas suprarrenais após o estresse, liberam o Fator Liberador de Corticotrofina (CRF ou CRH), um hormônio que estimula diretamente a hipófise (ou glândula pituitária) em sua porção anterior (adeno-hipófise) a produzir e liberar a Adrenocorticotrofina (ACTH), que uma vez na circulação sistêmica, aumenta a produção de glicocorticóides (como corticotrofina) novamente pelo córtex adrenal (Burtscher *et al.*, 2022).

A corticosterona se liga em diferentes estruturas cerebrais que expressam receptores para glicocorticóides e mineralocorticóides, como a porção ventral do hipocampo, córtex frontal e o próprio hipotálamo para manutenção da retroalimentação negativa dessa molécula. De modo que em uma situação de estresse ela continue sendo produzida e secretada quando seus níveis estão baixos, e quando o estímulo estressante cessa, o excesso de corticosterona ligada aos receptores de mineralocorticóides auxilia no retorno para os níveis basais (Pentkowski *et al.*, 2021).

3.2. HIPOCAMPO

O papel do hipocampo na modulação do comportamento frente ao teste de labirinto em cruz elevado tem relação com os tipos de populações de neurônios que são estimulados, pois mesmo encarregado do processamento de informações relacionadas a situações que estimulam o sistema autônomo simpático (luta e fuga), há uma divisão entre as porções dorsal e ventral do hipocampo (Ghasemi *et al.*, 2022).

A porção dorsal é responsável pelo processamento da memória espacial, necessário para que o indivíduo utilize o ambiente ao seu favor em situações de fuga e estresse, como para se esconder. Enquanto a porção ventral exerce o controle da influência emocional de medo e

ansiedade sobre o comportamento, o que vai delimitar se a reação do indivíduo frente ao estímulo será dominada pelo pensamento racional ou impulsivo (Pentkowski *et al.*, 2021).

3.3. AMÍGDALA

Esta estrutura cerebral está relacionada com o comportamento e percepção de medo e ansiedade nos animais e além disso, é capaz de promover alta neuroplasticidade frente à situações de estresse (Kenwood, Kalim, Barbas, 2022).

Mais especificamente, a disposição e composição dos dendritos pode sofrer modificações distintas em resposta ao estresse agudo ou crônico, envolvendo mudanças como retração neuronal para áreas controladoras da ansiedade como o córtex pré-frontal, enquanto sofre hipertrofia e aumento de projeções dendríticas para áreas relacionadas ao comportamento de medo e ansiedade do SNC como o hipocampo e o sistema límbico, tornando estas estruturas mais sensíveis e responsivas a estas situações aversivas via comunicação estimulante glutamatérgica (Zhang *et al.*, 2019).

3.4. CÓRTEX PRÉ-FRONTAL

O córtex pré-frontal é uma das regiões responsáveis pelas funções como memória de trabalho, controle de comportamento impulsivo e habilidade de tomada de decisões, de modo que danos à esta região podem influenciar nas reações de medo e ansiedade, fazendo com que o indivíduo perca a capacidade de controlar os comportamentos impulsivos frente situações de estresse, e o seu SNC se torne mais excitável para estas respostas (Costa *et al.*, 2015).

O comportamento ansioso é útil para antecipar situações de perigo, enquanto o medo ajuda a evitar o perigo imediato, entretanto, um indivíduo que se mantém constantemente alerta à situações aversivas pode não se adaptar bem aos ambientes e estar sujeito ao estresse crônico enquanto incapaz de regular suas respostas sensibilizadas aos estímulos deste ambiente (Kenwood, Kalim, Barbas, 2022).

3.5. COMPORTAMENTO ANSIOSO NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Fisiologicamente o hipocampo tem função de inibir o comportamento ansioso, enquanto a amígdala é responsável pelo estado de alerta, além de comunicar a situação de perigo e ansiedade para outras áreas cerebrais, incluindo o córtex pré-frontal cuja função é coordenar a tomada de decisões e ações que serão feitas frente ao perigo (Šimić *et al.*, 2021).

Quando não há intervenção (controle), ou quando investiga-se que alguma intervenção (teste) é inofensiva à essas estruturas cerebrais, o resultado do labirinto em cruz elevado deve

refletir uma capacidade de exploração inalterada, ou seja, o número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos não deve possuir diferença estatística entre os grupos experimentais, juntamente com o trajeto percorrido (Rigney *et al.*, 2022).

Entretanto, quando há lesões ou administração de fármacos moduladores dessas áreas cerebrais, o comportamento observado no teste é alterado para um perfil ansiogênico, de modo que os grupos que receberam alguma intervenção modulatória podem apresentar diferenças nos parâmetros de entradas e tempo de permanência nos braços comparados com o grupo sem intervenção. Ou seja, a exploração dos braços abertos é notavelmente diminuída, havendo uma possível preferência pelos braços fechados, além de menor trajeto percorrido pelos animais, evidenciando um comportamento ansioso (Shi *et al.*, 2023).

Uma outra situação possível é o estudo da atividade terapêutica de fármacos com efeito neuroprotetor, no qual é investigada a capacidade de uma molécula de reverter (no caso de pós-tratamento) ou proteger (pré-tratamento) as áreas cerebrais mediante um dano ou intervenção farmacológica lesiva. Diminuindo a diferença entre o perfil de exploração dos animais induzidos ao comportamento ansioso e tratados, e os animais não induzidos (Freitas, 2025; Taiwo *et al.*, 2024).

4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS

A pesquisa farmacológica utilizando-se de modelos comportamentais animais como o teste de labirinto em cruz elevado permite que a prospecção de novos fármacos ou moléculas com propriedades biológicas passe para estágios mais avançados de validação, aproximando-se da possibilidade das moléculas de estudo, sejam sintéticas ou naturais, serem distribuídas ao público-alvo para o tratamento de desordens do SNC.

Para tal, é necessária a elucidação dos seus efeitos farmacológicos e mecanismos de ação, que podem ser investigados através de estudos *in silico* (simulações computacionais), *in vitro* (estudos com reações químicas e cultura de células) e *in vivo* (estudos laboratoriais em animais), permitindo combinar as análises de dados entre testes como o labirinto em cruz elevado e ensaios computacionais para propor as vias de comunicação mais prováveis pelas quais o fármaco exerce seu efeito terapêutico (Chopade *et al.*, 2021).

Tendo em vista a variedade de efeitos colaterais causados por drogas que tratam desordens relacionadas à ansiedade como cansaço, fadiga, dores de cabeça, náuseas, ganho de peso, constipação e outros (Bandelow *et al.*, 2022), o labirinto pode ser útil até mesmo para que sejam testadas otimizações propostas por simulações e sínteses laboratoriais de drogas já existentes, através da manipulação de seus grupos funcionais e conjugação com outras moléculas à fim de

melhorar a sua eficácia, diminuir sua toxicidade ou efeitos colaterais adversos, contribuindo para a garantia de sua segurança de uso dentro da janela terapêutica.

Em alguns casos, as doenças necessitam de um tratamento múltiplo envolvendo a associação de mais de um fármaco em busca da somação dos efeitos dos seus princípios ativos. Nesse contexto, os modelos comportamentais podem auxiliar na avaliação dos diferentes efeitos farmacológicos possíveis em associações para evidenciar efeitos de somação, anulação e interferências entre drogas e até mesmo encontrar efeito sinérgico (efeito terapêutico multiplicado) entre novas moléculas estudadas e fármacos já existentes (Panayotis *et al.*, 2021).

Uma das vantagens do teste é que além de ser de fácil execução e ter relativo baixo custo, ele pode ser utilizado para estudar lesões ou interferências em áreas cerebrais bem delimitadas e específicas, como no estudo de fármacos que modulam estruturas essenciais do comportamento de ansiedade como a porção ventral do hipocampo (Shi *et al.*, 2023).

5. LIMITES E DESAFIOS METODOLÓGICOS

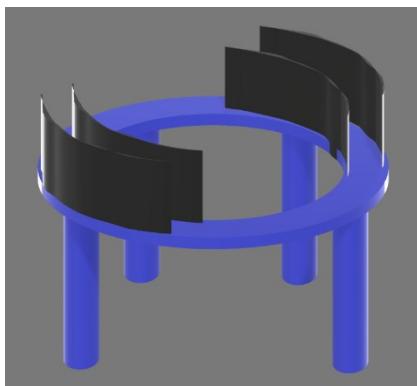
Apesar de ser um teste relativamente rápido e de fácil execução, apenas um animal é analisado por vez, fazendo com que o teste seja extenso para experimentos com grandes números amostrais. Além disso, como a maioria dos testes comportamentais, mesmo com a diferença observada nos parâmetros entre grupos experimentais, o efeito de um tratamento ou intervenção só pode ser melhor descrito através da relação de dados conclusivos de outros testes comportamentais complementares.

As particularidades de cada modelo experimental com animais podem influenciar comportamentos intrínsecos que merecem atenção e análise diferenciada. Por exemplo, alguns tipos de intervenção que podem diminuir a atividade locomotora dos animais (via danos cerebelares), o que surtirá impacto em todos os parâmetros comumente observados (número de entradas, tempo de permanência e locomoção total), portanto, pode ser preciso a adição de diferentes parâmetros para complementar a análise de resultados como a quantificação da postura de alongamento e atenção (conhecida também como *stretch-attend posture* - SAP) (Costa *et al.*, 2015).

Um detalhe intrínseco ao aparato em cruz é a zona central onde o animal é posicionado no início do teste, o que pode gerar um pouco de dificuldade na interpretação dos dados se o animal escolher permanecer nessa zona ou hesitar entrar completamente nos braços, inviabilizando a contagem desse evento como parâmetro de “entrada”. Para sanar esse tipo de interferência na análise, é possível utilizar um tipo de aparato modificado chamado labirinto em zero elevado (Fig. 3), uma alternativa de validação já comprovada e que exibe resultados semelhantes aos do

labirinto em cruz elevado já que drogas ansiolíticas aumentam a exploração dos braços abertos em ambos os aparatos (Nisbett, Vendruscolo, Koob, 2024).

Figura 3 - Representação do labirinto em zero elevado



Fonte: elaborado pelo autor

O aparato em questão consiste de uma plataforma circular elevada dividida em 4 quadrantes, alternando entre trechos do trajeto com paredes semelhantes aos braços fechados do labirinto em cruz, e outros 2 trechos sem as paredes, equivalentes aos braços abertos. Desse modo, sem a zona central, o animal é posicionado em um dos braços abertos, e tem como possibilidade de exploração apenas os braços restantes, sem interferência da zona central.

Como previamente citado, o teste de labirinto em cruz elevado apenas não é suficiente para comprovar efeito ansiolítico ou ansiogênico de uma dada substância, sendo necessária a análise dos seus resultados em conjunto com outros testes complementares que avaliam, por outros parâmetros, o comportamento ansioso do roedor, como por exemplo os testes de: campo aberto, suspensão pela cauda, placa perfurada, nado forçado, claro/escuro.

Além da confirmação dos achados de um estudo através de outros testes, é recomendada também a padronização do sexo dos animais, visto que diferenças entre o sexo de roedores pode apresentar tendências de comportamento distintas, tornando um estudo com grupo misto mais complicado na questão da coleta e análise dos parâmetros investigados (Knight *et al.*, 2022).

REFERÊNCIAS

- BANDELOW, B. et al. The German Guidelines for the treatment of anxiety disorders: first revision. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 272, n. 4, p. 571-582, 2022.
- BURTSCHER, J. et al. The interplay of hypoxic and mental stress: Implications for anxiety and depressive disorders. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 138, p. 104718, 2022.

CAMPOS, A.S. et al. Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica/Concea. 1^a ed. Brasília/DF. **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação**, 1107 p, 2023.

COSTA PA. Brain DNA damage and behavioral changes after repeated intermittent acute ethanol withdrawal by young rats. **Psychopharmacology (Berl)**, 2015.

CHOPADE, A.R. et al. Identification of anxiolytic potential of niranthin: in-vivo and computational investigations. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 11, p. 223-233, 2021.

EDINOFF, AMBER N. et al. Zolpidem: efficacy and side effects for insomnia. **Health Psychology Research**, v. 9, n. 1, p. 24927, 2021.

FREITAS, M.C. Efeito da metformina sobre as alterações comportamentais e neurobiológicas em proles de camundongos induzidas ao transtorno do espectro autista por ácido valproico. 2025. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – **Universidade Estadual do Ceará**, Fortaleza, 2025.

GHASEMI, M. et al. Anxiety and hippocampal neuronal activity: Relationship and potential mechanisms. **Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 431-449, 2022.

KENWOOD MM, KALIN NH, BARBAS H. The prefrontal cortex, pathological anxiety, and anxiety disorders. **Neuropsychopharmacology**, 2022

KNIGHT P, et al. Sex differences in the elevated plus-maze test and large open field test in adult Wistar rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 2021

NISBETT, KE.; VENDRUSCOLO, LF.; KOOB, GF. Indulging Curiosity: Preliminary Evidence of an Anxiolytic-like Effect of Castor Oil and Ricinoleic Acid. **Nutrients**, v. 16, n. 10, p. 1527, 2024.

PANAYOTIS, N. et al. β -sitosterol reduces anxiety and synergizes with established anxiolytic drugs in mice. **Cell Reports Medicine**, v. 2, n. 5, 2021.

PELLOW, S., CHOPIN, P.; FILE, S.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, 14: 149-67, 1985.

PENTKOWSKI NS, et al. Anxiety and Alzheimer's disease: Behavioral analysis and neural basis in rodent models of Alzheimer's-related neuropathology. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 2021.

PISULA, W.; MODLINSKA, K.; CHRZANOWSKA, A. Behavioural response to the environmental changes of various types in Lister-Hooded male rats. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 7111, 2019.

RIGNEY, N. et al. Knockdown of sexually differentiated vasopressin expression in the bed nucleus of the stria terminalis reduces social and sexual behaviour in male, but not female, mice. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 34, n. 9, p. e13083, 2022.

SHI, H. et al. Hippocampus: molecular, cellular, and circuit features in anxiety. **Neuroscience Bulletin**, v. 39, n. 6, p. 1009-1026, 2023.

ŠIMIĆ, G. et al. Understanding emotions: origins and roles of the amygdala. **Biomolecules**, v. 11, n. 6, p. 823, 2021.

TAIWO, A. et al. Neuro-protective effect of pre-treatment with Sorghum bicolor and vitamin C on tramadol induced brain oxidative stress and anxiety-like behaviour in male albino rats. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, p. 53-63, 2024.

TOYAMA, R. P. Avaliação comportamental e bioquímica de camundongos submetidos à inflamação perinatal e criolesão. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – **Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, 2012.

VAN DER STAAY, F. J. Animal models of behavioral dysfunctions: basic concept and classifications, and an evaluation strategy. **Brain Research Reviews**, 52: 131-159, 2006.

ZHANG JY, et al. Chronic Stress Remodels Synapses in an Amygdala Circuit-Specific Manner. **Biological Psychiatry**, 2019.

CAPÍTULO XVII

TESTE DE SUSPENSÃO DE CAUDA: MODELO COMPORTAMENTAL EM MURINOS

BEHAVIORAL MODEL IN MICE: TAIL SUSPENSION TEST

DOI: 10.51859/ampilla.nat298.1126-17

Renata Belizário Diniz ¹
Maria Izabel Florindo Guedes ²
Gislei Frota Aragão ²

¹ Doutoranda em Ciências Fisiológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - ISCB. Universidade Estadual do Ceará – UECE – Brasil

² Professor(a) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará – UECE – Brasil

RESUMO

O Teste de Suspensão pela Cauda é um modelo comportamental amplamente utilizado em pesquisas pré-clínicas para avaliar a eficácia de compostos com potencial antidepressivo em roedores, principalmente camundongos. Desenvolvido em 1985 por Steru e colaboradores, surgiu como alternativa ao Teste do Nado Forçado, eliminando variáveis como a hipotermia e demonstrando maior sensibilidade farmacológica, uma vez que responde a doses mais baixas de antidepressivos. O procedimento consiste em suspender o animal pela cauda em um aparato padronizado, registrando o tempo de imobilidade como principal medida. A imobilidade reflete uma complexa interação neurobiológica, envolvendo os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico, dopaminérgico e glutamatérgico. Além disso, estruturas como córtex pré-frontal, hipocampo e núcleo accumbens desempenham papéis centrais, enquanto fatores moleculares e endócrinos, como o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, o fator neurotrófico derivado do cérebro e a neuroinflamação mediada por células gliais, também contribuem para a modulação do comportamento. Originalmente interpretada como um sinal de desespero comportamental, a imobilidade é atualmente considerada uma estratégia de enfrentamento passiva, representando economia de energia diante de uma situação inescapável. Essa mudança

conceptual amplia a validade translacional do Teste de Suspensão pela Cauda, tornando-o não apenas um marcador de atividade antidepressiva, mas também um modelo relevante para explorar mecanismos neurobiológicos da depressão. Assim, o Teste de Suspensão pela Cauda consolidou-se como uma ferramenta prática, sensível e confiável para triagem de fármacos e investigação dos sistemas neurais e moleculares associados ao comportamento depressivo.

Palavras-chave: Teste de Suspensão pela Cauda. Antidepressivos. Neurobiologia. Murinos. Modelos Animais.

ABSTRACT

The Tail Suspension Test is a behavioral model widely used in preclinical research to evaluate the efficacy of compounds with potential antidepressant activity in rodents, mainly mice. Developed in 1985 by Steru and collaborators, it emerged as an alternative to the Forced Swim Test, eliminating variables such as hypothermia and demonstrating greater pharmacological sensitivity, since it responds to lower doses of antidepressants. The procedure consists of suspending the animal by the tail in a standardized apparatus, recording immobility time as the main measure. Immobility reflects a complex neurobiological interaction involving the serotonergic, noradrenergic, dopaminergic, and glutamatergic systems. In addition, structures such as the prefrontal cortex,

hippocampus, and nucleus accumbens play central roles, while molecular and endocrine factors such as the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, the brain-derived neurotrophic factor, and neuroinflammation mediated by glial cells also contribute to the modulation of behavior. Originally interpreted as a sign of behavioral despair, immobility is currently considered a passive coping strategy, representing energy conservation in the face of an inescapable situation. This conceptual shift broadens the translational validity of the Tail

Suspension Test, making it not only a marker of antidepressant activity but also a relevant model for exploring the neurobiological mechanisms of depression. Thus, the Tail Suspension Test has been consolidated as a practical, sensitive, and reliable tool for drug screening and for the investigation of neural and molecular systems associated with depressive behavior.

Keywords: Tail Suspension Test. Antidepressants. Neurobiology. Rodents. Animal Models.

1. INTRODUÇÃO

O Teste de Suspensão pela Cauda (*Tail Suspension Test - TST*) é um modelo comportamental utilizado na pesquisa pré-clínica para avaliar a atividade de compostos com potencial antidepressivo em murinos (Steru et al., 1985). O princípio fundamental do teste reside na observação de que um animal, quando submetido a uma condição de estresse agudo, exibe uma sequência comportamental característica (Cryan et al., 2005).

O TST foi criado em 1985, por um grupo de pesquisadores franceses, liderado por Lucien Steru, por meio da publicação do artigo intitulado "The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice" na revista científica "Psychopharmacology". O objetivo era criar um método de triagem rápido, confiável e com alta validade preditiva para compostos antidepressivos, que superasse algumas das limitações de testes existentes, como o Teste do Nado Forçado (*Forced Swim Test - FST*), desenvolvido por Porsolt no final da década de 1970 (Steru et al., 1985).

A principal vantagem do TST em relação ao FST é a eliminação do fator de hipotermia, que pode ocorrer durante o nado em água e atuar como uma variável de confusão nos resultados. Além disso, o TST é considerado menos estressante fisicamente para o animal, embora ambos se baseiam no mesmo princípio teórico (Thierry et al., 1986).

Em segundo lugar, o TST demonstra possuir uma maior sensibilidade farmacológica. Os antidepressivos são eficazes no TST em doses consideravelmente mais baixas do que as necessárias para produzir um efeito no FST. Essa maior sensibilidade sugere que o desequilíbrio fisiológico imposto pelo TST é menos severo, permitindo que os efeitos mais sutis dos fármacos sejam detectados com maior clareza (Cryan et al., 2002).

2. O TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA (TST)

O TST é conduzido em caixas ou câmaras individuais que isolam visualmente os animais uns dos outros. Essas câmaras são construídas com três paredes e um topo aberto, feitas de um material opaco (como plástico de cor neutra) para reduzir distrações visuais. As dimensões da caixa podem variar, mas sugere-se compartimentos com aproximadamente 55 cm de altura, 15 cm de largura e 11,5 cm de profundidade. A cor do aparato deve ser escolhida para fornecer um contraste com a pelagem do animal, facilitando a análise de vídeo. Uma haste é posicionada horizontalmente sobre a caixa, de onde o animal será suspenso pela cauda utilizando-se uma fita adesiva, a uma distância de aproximadamente 1-2 cm da extremidade da cauda. É fundamental que a fita não comprima a cauda a ponto de causar dor ou impedir a circulação. O animal é então elevado de forma que seu corpo fique a uma altura de 30-50 cm do chão da caixa (Can et al., 2011).

O ambiente deve ser silencioso e com iluminação controlada (20 a 900 lux) para minimizar a ansiedade do animal. O uso de ruído branco de fundo é recomendado para mascarar sons externos. Além disso, os testes com camundongos machos e fêmeas devem ser realizados separadamente, idealmente em dias diferentes ou, no mínimo, com uma limpeza completa do aparato entre os sexos, para evitar a influência de sinais ferohormonais (Queensland Brain Institute, 2022).

Camundongos são predominantemente utilizados no TST. Embora existam adaptações para ratos, seu maior peso corporal pode causar desconforto e lesões na cauda, tornando o teste menos comum para esta espécie. Fatores como linhagem, sexo e idade são variáveis críticas. Por exemplo, camundongos da linhagem C57BL/6 tendem a escalar a própria cauda durante o teste, um comportamento raro ou ausente em outras linhagens como a A/J, 129-SV-ter e DBA/2 (Mayorga, Lucki, 2001). Para contornar esse problema, os pesquisadores podem considerar a colocação de cilindros ocos de Plexiglas ao redor da base da cauda do animal (Can et al., 2011).

Antes do início do teste, os animais devem ser transportados para a sala experimental e deixados em suas gaiolas de alojamento por um período de aclimatação de pelo menos 30 a 60 minutos. Isso permite que eles se habituem às novas condições de luz, som e odor, reduzindo o estresse da novidade (Castagné et al., 2010).

O experimentador deve segurar o camundongo e aplicar a fita adesiva na porção distal da cauda. Este processo deve ser realizado de forma rápida e consistente para minimizar o estresse de manuseio. Imediatamente após, o animal é suspenso, prendendo a fita ao gancho na câmara de teste. A gravação de vídeo e a cronometragem começam no momento da suspensão (Queensland Brain Institute, 2022).

Embora o teste dure 6 minutos, o período de tempo analisado para a imobilidade pode variar (Can et al., 2011). O protocolo australiano da Universidade de Queensland, descarta os primeiros 2 minutos, argumentando que este período inicial reflete principalmente uma resposta aguda de pânico e luta, e analisa apenas os últimos 4 minutos, quando o comportamento se torna mais estável e pronunciado (Queensland Brain Institute, 2022).

Tabela 1 – Resumo dos principais parâmetros a serem garantidos e evitados no Teste de Suspensão de Cauda em Murinos.

Garantir	Evitar
Ambiente e Aparato	
Ambiente controlado isolando animais individualmente	Estímulos externos
Gerador de ruído branco	Tráfego de humanos
Ambiente acústico consistente	Luzes intensas e/ou variáveis
Iluminação controlada	Permitir que animais interajam
Fundo de cor contrastante com a cor do animal	Permitir que o animal alcance ou toque em
Limpeza e desinfecção completa do aparato antes e depois de cada animal ou sessão	qualquer superfície
Procedimento e Animal	
Aclimatação de 30 a 60 minutos antes do início do teste	Danos a pele/cauda do animal
Aplicação da fita adesiva na cauda de 1 a 2 cm da ponta	Usar animais excessivamente pesados
Testar machos e fêmeas separadamente	Deixar o animal no experimento mesmo com sinais de estresse excessivo
Monitoramento do animal	Causar sofrimento ou lesão ao animal
Coleta e Análise dos Dados	
Uma definição clara e consistente de imobilidade (ex: ausência completa de movimentos ativos, ignorando balanços passivos ou pequenos movimentos respiratórios).	Contar oscilações passivas (movimento de pêndulo) ou pequenos movimentos das patas dianteiras (sem envolvimento do corpo) como mobilidade.
Gravação em vídeo toda a sessão para permitir uma análise cuidadosa e a reavaliação dos dados, se necessário.	Interpretar uma redução da imobilidade como um efeito antidepressivo sem antes descartar um aumento geral da atividade motora.

Fonte: autoria própria. Ano 2025.

A principal medida do TST é o tempo total de imobilidade. A imobilidade é definida como a ausência completa de movimento ativo. O animal fica pendurado passivamente, completamente imóvel (Lopez-GonzalezdelRey, 2023). É importante notar que pequenos movimentos necessários para a respiração não interrompem um período de imobilidade. Além disso, movimentos sutis confinados apenas às patas dianteiras (sem envolvimento do resto do corpo) e oscilações passivas, semelhantes a um pêndulo, que são resultado do momento de um surto de agitação anterior, não

devem ser contados como mobilidade e são considerados parte do período de imobilidade (Can et al., 2011).

Figura 1 – Aparato e movimentação de murinos no Teste de Suspensão de Cauda



Fonte: autoria própria. Ano 2025.

Tradicionalmente, a pontuação é feita por um observador humano treinado que deve estar cego às condições experimentais para evitar viés. O observador assiste às gravações de vídeo e usa um ou mais cronômetros para medir o tempo total que o animal passa imóvel (Can et al., 2011). Porém, sistemas modernos oferecem métodos de pontuação automatizada que aumentam a objetividade e a eficiência. Estes sistemas podem usar software de rastreamento de vídeo (video-tracking) que analisa o fluxo de pixels para detectar movimento (Crowley et al., 2004), ou podem empregar sensores de força (strain gauges) conectados ao gancho de suspensão. Esses sensores medem as forças geradas pelos movimentos do animal (Cryan et al., 2005). Há dados suficientes para mostrar que ambos os métodos resultam em dados consistentes e que a variabilidade entre a pontuação automatizada e a manual não é maior do que entre dois pontuadores humanos (Crowley et al., 2004; Stukalin et al., 2020).

A imobilidade observada no teste é um comportamento complexo influenciado por múltiplos sistemas neurobiológicos. Os sistemas de neurotransmissores serotoninérgico, noradrenérgico, dopaminérgico e glutamatérgico estão envolvidos no comportamento animal. Além disso, circuitos neurais específicos, como o córtex pré-frontal, o hipocampo e o núcleo accumbens, desempenham um papel importante. Fatores moleculares e endócrinos, como o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e a

neuroinflamação, também estão envolvidos na modulação do comportamento no TST, conforme descrito a seguir (Donato et al., 2013; Wang et al., 2013; Muir et al., 2018).

Imediatamente após ser suspenso, o instinto do animal é tentar escapar. Esse comportamento ativo é uma manifestação clássica da resposta de luta ou fuga, coordenada por uma rápida ativação de sistemas neurais associados ao alerta, motivação e movimento (Steru et al., 1985).

A situação inescapável atua como um potente estressor, ativando o eixo HPA (Kim et al., 2012). O hipotálamo libera o hormônio liberador de corticotropina, que sinaliza para a hipófise liberar o hormônio adrenocorticotrófico. Este, por sua vez, estimula as glândulas adrenais a secretar glicocorticoides, como a corticosterona em roedores. Essa onda hormonal prepara o corpo para uma ação imediata (Zhao et al., 2018).

O estresse induzido pelo TST aumenta o conteúdo de noradrenalina no cérebro. A noradrenalina é responsável pelo estado de alerta, vigilância e a modulação da plasticidade sináptica necessária para o aprendizado motor e a ação (Hao et al., 2013). Simultaneamente, o sistema dopaminérgico, envolvido com a motivação e o controle motor, é ativado para impulsionar os comportamentos de busca e fuga. Juntos, esses sistemas monoaminérgicos impulsionam os movimentos observados, como torções corporais, solavancos e movimentos de corrida, na tentativa de escapar da situação (Navidi & Maleki, 2023).

Após as tentativas iniciais de fuga sem resultado, o animal adota uma postura passiva e imóvel. A interpretação inicial do estado de imobilidade do murino no TST é a de desespero comportamental (behavioral despair), sugerindo que o animal "desiste" de lutar por acreditar que a situação é inútil, um endofenótipo que se acredita refletir aspectos centrais da sintomatologia depressiva em humanos, como a perda de motivação e a desistência. No entanto, uma visão mais contemporânea e amplamente aceita é que a imobilidade representa uma estratégia de enfrentamento passiva (passive coping strategy). Em vez de desespero, o animal adota um comportamento de conservação de energia diante de uma ameaça que não pode ser superada pela luta (Cryan et al., 2005).

3. BASES NEUROBIOLÓGICAS DO TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA

Um dos mecanismos mais críticos que impulsionam a imobilidade é uma liberação intensa e rápida de glutamato. O início do estresse da suspensão provoca um aumento acentuado na liberação de glutamato, especificamente em áreas como o campo CA3 do hipocampo (Wang et al., 2015). Essa "tempestade" de glutamato leva a uma hiperativação dos seus receptores, em

particular os receptores NMDA, um estado que está diretamente ligado à indução do comportamento de desespero (Shin et al., 2014).

As células gliais, que normalmente mantêm a homeostase cerebral, desempenham um papel relevante nesta resposta. Os astrócitos são responsáveis por recapturar o excesso de glutamato do espaço sináptico. No entanto, sob estresse, a função dos transportadores de glutamato nos astrócitos pode ser prejudicada, falhando em limpar a "tempestade" de glutamato e, assim, prolongando a excitotoxicidade. Além disso, o próprio estresse pode fazer com que os astrócitos liberem mais gliotransmissores, como o glutamato, através de canais chamados hemicanais de conexina 43, exacerbando o problema (Duarte et al., 2024). A disfunção ou ablação de astrócitos está diretamente associada a um aumento no comportamento de imobilidade (Zhang et al., 2020). Como células imunes residentes do cérebro, a micróglia é ativada pelo estresse. Essa ativação microglial desencadeia uma resposta neuroinflamatória que contribui para os fenótipos do tipo depressivo, incluindo o aumento da imobilidade no TST (Li et al., 2023).

O sistema serotoninérgico é um modulador complexo do humor e da resposta ao estresse. Receptores como o 5-HT1A, quando ativados, têm um efeito inibitório sobre a atividade neuronal. A dinâmica da sinalização serotoninérgica durante o estresse agudo contribui para a modulação dos circuitos que governam a transição entre o comportamento ativo e passivo (Altieri et al., 2013).

O BDNF é uma proteína relacionada ao crescimento e a plasticidade dos neurônios, funcionando como um fator de resiliência contra o estresse. Uma deficiência na produção ou função do BDNF torna os animais mais vulneráveis aos efeitos do estresse, resultando em um tempo de imobilidade significativamente maior no TST (Jha et al., 2016; Kojima et al., 2020). A transição para a imobilidade pode, portanto, ser vista também como uma falha dos sistemas de resiliência neuronal em contrapor os efeitos deletérios do estresse agudo.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, o comportamento de murinos no TST é um reflexo direto de uma complexa interação neurobiológica. A luta inicial é uma resposta de estresse clássica, impulsionada pela noradrenalina e dopamina. A subsequente imobilidade não é mera exaustão, mas um estado neurobiológico distinto, precipitado por uma sobrecarga de glutamato, neuroinflamação mediada por células gliais e uma incapacidade dos sistemas de resiliência, como o BDNF, de manterem o comportamento de enfrentamento ativo.

REFERÊNCIAS

- ALTIERI, S. C.; GARCIA-GARCIA, A. L.; LEONARDO, E. D.; ANDREWS, A. M. Rethinking 5-HT1A receptors: emerging modes of inhibitory feedback of relevance to emotion-related behavior. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 72-83, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cn3002174>.
- CAN, A.; BLACKWELL, R. A.; PIANTADOSI, S. C.; DAO, D. T.; O'DONNELL, K. C.; GOULD, T. D. Antidepressant-like responses to lithium in genetically diverse mouse strains. **Genes, Brain and Behavior**, v. 10, n. 4, p. 434-443, 2011.
- CASTAGNÉ, V.; MOSER, P.; ROUX, S.; PORSOULT, R. D. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. **Current Protocols in Pharmacology**, Chapter 5, Unit 5.8, 2010.
- CROWLEY, J. J.; JONES, M. D.; O'LEARY, O. F.; LUCKI, I. Automated tests for measuring the effects of antidepressants in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, n. 2, p. 269-274, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.03.014>.
- CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 238-245, 2002.
- CRYAN, J. F.; MOMBREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 571-625, 2005.
- DUARTE, Y.; QUINTANA-DONOSO, D.; MORAGA-AMARO, R.; DINAMARCA, I.; LEMUNAO, Y.; CÁRDENAS, K.; BAHAMONDE, T.; BARRIENTOS, T.; OLIVARES, P.; NAVAS, C.; CARVAJAL, F. J.; SANTIBÁÑEZ, Y.; CASTRO-LAZO, R.; MEZA, M. P.; JORQUERA, R.; GÓMEZ, G. I.; HENKE, M.; ALARCÓN, R.; GABRIEL, L. A.; OCARANZA, M. P.; CASTRO, P. F.; LAGOS, C. F.; STEHBERG, J. The role of astrocytes in depression, its prevention, and treatment by targeting astroglial gliotransmitter release. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 121, n. 46, e2307953121, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.2307953121>.
- DONATO, F.; FONSECA, F. C. A.; GOMES, J. F. S.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Involvement of the dopaminergic and serotonergic systems in the antidepressant-like effect of creatine in mice. **Life Sciences**, v. 93, n. 23, p. 975-982, 2013. DOI: 10.1016/j.lfs.2013.10.016.
- HAO, C. W.; LAI, W. S.; HO, C. T.; SHEEN, L. Y. Antidepressant-like effect of lemon essential oil is through a modulation in the levels of norepinephrine, dopamine, and serotonin in mice: Use of the tail suspension test. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 370-379, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.11.008>.
- JHA, S.; DONG, B. E.; XUE, Y.; DELOTTERIE, D. F.; VAIL, M. G.; SAKATA, K. Antidepressive and BDNF effects of enriched environment treatment across ages in mice lacking BDNF expression through promoter IV. **Translational Psychiatry**, v. 6, e896, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/tp.2016.160>.

KIM, K.; KWON, H.; BAEK, I.; HAN, P. Repeated Short-term (2h×14d) Emotional Stress Induces Lasting Depression-like Behavior in Mice. **Experimental Neurobiology**, v. 21, n. 1, p. 16-22, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.5607/en.2012.21.1.16>.

KOJIMA, M.; OTABI, H.; KUMANOGOH, H.; TOYODA, A.; IKAWA, M.; OKABE, M.; MIZUI, T. Reduction in BDNF from Inefficient Precursor Conversion Influences Nest Building and Promotes Depressive-Like Behavior in Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, art. 3984, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21113984>.

LI, X.; PENG, Z.; JIANG, L.; ZHANG, P.; YANG, P.; YUAN, Z.; CHENG, J. Dlg1 deletion in microglia ameliorates chronic restraint stress induced mice depression-like behavior. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, art. 1124845, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1124845>.

LOPEZ-GONZALEZDELREY, N. **Tail suspension test to assess depression/anxiety behavior in parkinsonian mice**. Protocols.io, 2023. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.n2bj3odxlk5/v1>.

MAYORGA, A. J.; LUCKI, I. Limitations on the use of the C57BL/6 mouse in the tail suspension test. **Psychopharmacology**, v. 155, n. 1, p. 110-112, 2001.

MUIR, J.; LOPEZ, J.; BAGOT, R. C.; NESTLER, E. J. Wiring the depressed brain: optogenetic and chemogenetic explorations of neural circuits in depression-like behaviour. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 1, p. 18-28, 2018. DOI: 10.1016/j.biopsych.2017.08.012.

NAVIDI, A.; MALEKI, S. A. Involvement of the Dopaminergic and Serotonergic Systems in the Antidepressant-like Effect Caused by Ethanolic Extract of Pistacia lentiscus in Tail Suspension Test. **Archives of Neuroscience**, v. 11, n. 1, e140852, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.5812/ans-140852>.

SHIN, I. J.; SON, S. U.; PARK, H.; KIM, Y.; PARK, S. H.; SWANBERG, K.; SHIN, J. Y.; HA, S. K.; CHO, Y.; BANG, S. Y.; LEW, J. H.; CHO, S. H.; MAENG, S. Preclinical evidence of rapid-onset antidepressant-like effect in Radix Polygalae extract. **PLoS One**, v. 9, n. 2, e88617, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088617>.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367-370, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00428203>.

STUKALIN, Y.; LAN, A.; EINAT, H. Revisiting the validity of the mouse tail suspension test: Systematic review and meta-analysis of the effects of prototypic antidepressants. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 112, p. 39-47, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.01.034>.

THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND. Queensland Brain Institute. **LAB_075 Tail Suspension Test for Mice**. Queensland: The University of Queensland, 2022.

THIERRY, B.; STÉRU, L.; SIMON, P.; PORSLDT, R. The tail suspension test: Ethical considerations. **Psychopharmacology**, v. 90, p. 284-285, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00181261>.

WALKER, A. K.; KAVELAARS, A.; HEIJNEN, C. J.; DANTZER, R. Neuroinflammation and comorbidity of pain and depression. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 1, p. 80-101, 2014.

WANG, Z.; GU, J.; WANG, X.; XIE, K.; LUAN, Q.; WAN, N.; ZHANG, Q.; JIANG, H.; LIU, D. Antidepressant-like activity of resveratrol treatment in the forced swim test and tail suspension test in mice: the HPA axis, BDNF expression and phosphorylation of ERK. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 112, p. 104-110, 2013. DOI: 10.1016/j.pbb.2013.10.007.

WANG, X.; ZHANG, D.; LU, X.-Y. Dentate gyrus-CA3 glutamate release/NMDA transmission mediates behavioral despair and antidepressant-like responses to leptin. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 4, p. 509-519, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/mp.2014.75>.

ZANOS, P.; GOULD, T. D. Mechanisms of ketamine action as an antidepressant. **Molecular Psychiatry**, v. 23, n. 4, p. 801-811, 2018.

ZHANG, J.; ZHANG, L.; YI, S.; JIANG, X.; QIAO, Y.; ZHANG, Y.; XIAO, C.; ZHOU, T. Mouse Astrocytes Promote Microglial Ramification by Releasing TGF- β and Forming Glial Fibers. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 14, art. 195, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00195>.

ZHAO, J.; NIU, C.; WANG, J.; YANG, H.; DU, Y.; WEI, L.; LI, C. The depressive-like behaviors of chronic unpredictable mild stress-treated mice ameliorated by Tibetan medicine Zuotai: involvement in the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis pathway. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 14, p. 129-141, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/NDT.S153325>.

CAPÍTULO XVIII

ASPECTOS NEUROBIOLÓGICOS E TRANSLACIONAIS DO TESTE DE MARBLE BURYING EM MODELOS COMPORTAMENTAIS

NEUROBIOLOGICAL AND TRANSLATIONAL ASPECTS OF THE MARBLE BURYING TEST IN BEHAVIORAL MODELS

DOI: 10.51859/ampilla.nat298.1126-18

Renê Felipe de Freitas ¹
Gislei Frota Aragão ²

¹ Mestrando em Ciências Fisiológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Estadual do Ceará – UECE.

² Professor Adjunto do Curso de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Estadual do Ceará – UECE.

RESUMO

O teste de *Marble Burying* (MB) é um modelo comportamental utilizado na pesquisa pré-clínica para avaliar padrões repetitivos, compulsivos e ansiosos em roedores, com destaque para sua aplicação em modelos de transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) e transtorno do espectro autista (TEA). A metodologia baseia-se no comportamento espontâneo de escavação e enterramento de objetos, sendo considerada sensível a diversas classes de psicofármacos, como inibidores seletivos da recaptação de serotonina, benzodiazepínicos e moduladores glutamatérgicos. A execução do teste envolve circuitos cortico-estriatais-límbicos e é modulada por múltiplos sistemas neurotransmissores e neuromoduladores, incluindo serotonina, dopamina, glutamato, GABA, noradrenalina, acetilcolina, endocanabinoides, neuropeptídeos e hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. A diversidade neuroquímica envolvida torna o MB um modelo útil para investigar alterações funcionais em diferentes condições psiquiátricas e do neurodesenvolvimento. Ainda assim, limitações metodológicas, como a variabilidade nos protocolos experimentais, ausência de padronização e uso restrito de medidas acumulativas, demandam cautela na interpretação dos dados. Propostas mais recentes, como a aplicação de tecnologias

automatizadas, avaliação da dinâmica temporal da escavação e integração com outros paradigmas comportamentais, têm ampliado a utilidade translacional do modelo. Quando aplicado com rigor metodológico e embasamento teórico, o MB contribui significativamente para a compreensão dos mecanismos neurais da compulsividade e da rigidez comportamental, favorecendo o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes.

Palavras-chave: Comportamento repetitivo. Transtornos neuropsiquiátricos. Triagem farmacológica. Neurotransmissores. Circuitos cortico-estriatais-límbicos.

ABSTRACT

The Marble Burying (MB) test is a behavioral model used in preclinical research to assess repetitive, compulsive, and anxiety-related patterns in rodents, with notable application in models of obsessive-compulsive disorder (OCD) and autism spectrum disorder (ASD). The methodology is based on the spontaneous digging and burying behavior of objects and is considered sensitive to various classes of psychotropic drugs, such as selective serotonin reuptake inhibitors, benzodiazepines, and glutamatergic modulators. The execution of the test involves cortico-striato-limbic circuits and is modulated by multiple

neurotransmitter and neuromodulatory systems, including serotonin, dopamine, glutamate, GABA, norepinephrine, acetylcholine, endocannabinoids, neuropeptides, and hormones from the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. This neurochemical diversity makes MB a useful model for investigating functional alterations in various psychiatric and neurodevelopmental conditions. Nevertheless, methodological limitations, such as variability in experimental protocols, lack of standardization, and reliance on cumulative outcome measures, require caution in data interpretation. Recent proposals, including the use of automated behavioral analysis technologies, temporal evaluation of digging

dynamics, and integration with other behavioral paradigms, have enhanced the model's translational potential. When applied with methodological rigor and theoretical grounding, the MB test contributes significantly to the understanding of neural mechanisms underlying compulsion and behavioral rigidity, supporting the development of more effective therapeutic strategies.

Keywords: Repetitive behavior. Neuropsychiatric disorders. Pharmacological screening. Neurotransmitters. Cortico-striato-limbic circuits.

1. INTRODUÇÃO

O teste de *Marble Burying* (MB), é amplamente utilizado como ferramenta experimental para a avaliação de comportamentos ansiosos, compulsivos e repetitivos em roedores. Sua origem remonta ao trabalho de Pinel e Treit (1978), que descreveram o comportamento de enterramento como uma resposta defensiva instintiva a objetos estranhos no ambiente. Posteriormente, Broekkamp *et al.* (1986) propuseram uma adaptação metodológica utilizando bolinhas de vidro (*marbles*) como estímulos neutros, possibilitando a quantificação do comportamento em contextos não ameaçadores e sensível à ação de fármacos ansiolíticos.

No início dos anos 1990, Njung'e e Handley (1991) observaram que os roedores enterravam bolinhas mesmo na ausência de estímulos aversivos, sugerindo que o comportamento poderia refletir um padrão compulsivo. Em contrapartida, Gyertyán (1995) argumentou que esse padrão de escavação estaria mais associado a comportamentos instintivos da espécie, como o ato natural de escavar, do que a condições psicopatológicas como o transtorno obsessivo-compulsivo (TOC). Essa divergência iniciou um debate conceitual que permanece atual, envolvendo a validade construtiva e preditiva do teste.

Em 2006, foi publicado um protocolo padronizado do teste MB na revista *Nature Protocols*, estabelecendo diretrizes metodológicas replicáveis, como o número de bolinhas; a espessura do substrato e a duração da sessão, que favoreceram a padronização e a comparação entre os estudos (Deacon, 2006).

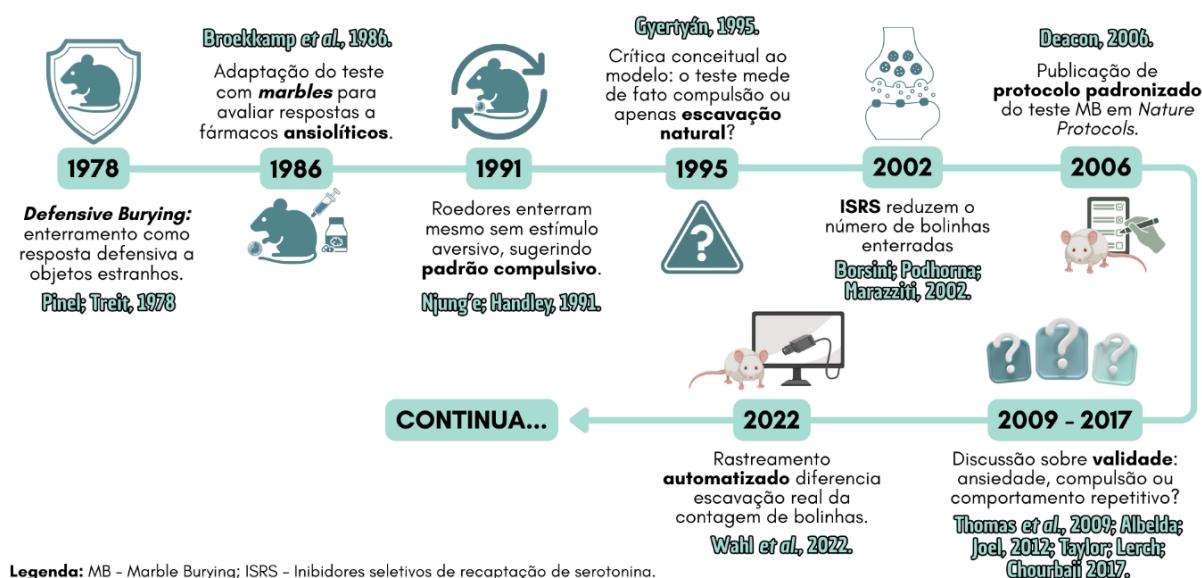
Durante os anos 2000, estudos farmacológicos reforçaram a sensibilidade do MB a ansiolíticos e inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs), como o escitalopram e a fluoxetina, os quais reduzem o número de bolinhas enterradas (Borsini, Podhorna; Marazziti, 2002; Langer; Einat; Stukalin, 2020). Esse perfil de resposta contribuiu para consolidar o teste

como uma ferramenta válida na triagem de compostos com potencial ansiolítico ou anticomulsivo.

Contudo, análises mais recentes vêm questionando a especificidade comportamental do MB. Estudos demonstram que o comportamento de enterramento nem sempre se correlaciona com outras medidas clássicas de ansiedade, levando a interpretações alternativas que posicionam o MB como um modelo de comportamento motor estereotipado ou repetitivo (Thomas *et al.*, 2009; Taylor, Lerch e Chourbaji, 2017). Essa perspectiva ganha força especialmente na caracterização de fenótipos em modelos genéticos de neurodesenvolvimento, como os envolvendo os genes *Shank2*, *Ube3a* e *Sapap3*, que também apresentam alterações nos circuitos relacionados à compulsão e à repetição (Wahl *et al.*, 2022).

Mais recentemente, avanços tecnológicos têm sido incorporados à análise do MB, incluindo sistemas de rastreamento automatizado que permitem distinguir a escavação real de movimentos locomotores não específicos. Tais ferramentas ampliam a padronização interlaboratorial e aprimoram a análise temporal e espacial da atividade comportamental (Wahl *et al.*, 2022). A Figura 1, a seguir, resume os principais marcos históricos, conceituais e metodológicos que definiram a trajetória do teste de MB nas últimas décadas.

Figura 1 – Da Defesa à Repetição: A Trajetória do Teste de *Marble Burying*



Fonte: Autoria própria. Ano 2025.

Apesar de sua aparente simplicidade, o MB se mostra como uma ferramenta comportamental multifacetada, cuja interpretação depende de variáveis como linhagem animal, protocolo experimental, substâncias testadas e estratégias analíticas. Diante disso, este capítulo tem como objetivo aprofundar os fundamentos metodológicos do teste, suas bases

neuroanatômicas e neuroquímicas, aplicações farmacológicas e clínicas, bem como discutir suas limitações e potencial translacional, contribuindo para um uso mais crítico e fundamentado dessa importante ferramenta na pesquisa pré-clínica.

2. PROTOCOLO E FUNDAMENTOS DO TESTE DE MARBLE BURYING

A estrutura metodológica do teste de MB evoluiu significativamente desde suas primeiras descrições, e hoje existem diretrizes bem estabelecidas que orientam sua aplicação em estudos pré-clínicos. Contudo, o delineamento do protocolo ainda apresenta variações importantes, influenciando diretamente a interpretação dos resultados. Além disso, o teste permite múltiplas formas de análise, desde a contagem clássica de bolinhas enterradas até estratégias automatizadas de rastreamento de escavação, o que reforça a necessidade de compreensão detalhada de suas bases operacionais. A seguir, serão apresentados os principais componentes do protocolo tradicional, suas variações experimentais, os parâmetros comportamentais mais utilizados e as abordagens modernas de quantificação e padronização.

2.1. ESTRUTURA GERAL DO TESTE

O teste de MB apresenta uma estrutura simples e amplamente padronizada, sendo aplicado em roedores, especialmente em camundongos, para avaliação de comportamentos de escavação. Embora variações metodológicas existam, os principais elementos do protocolo — como arena, substrato, número de bolinhas e tempo de exposição — mantêm certa uniformidade entre os estudos, formando a base estrutural do protocolo (Njung'e; Handley, 1991; Deacon, 2006; Angoa-Pérez *et al.*, 2013).

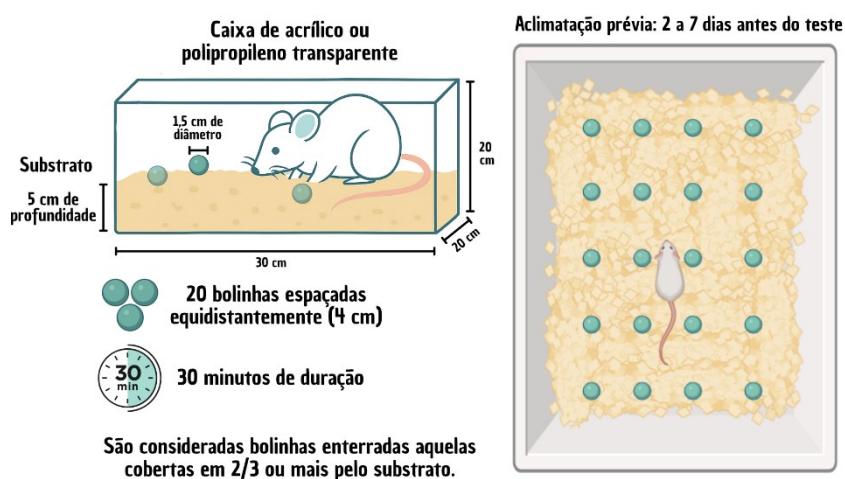
O procedimento consiste em posicionar o animal individualmente em uma caixa de acrílico ou polipropileno transparente, contendo uma camada uniforme de maravilha limpa com 4 a 5 cm de profundidade. Sobre esse substrato, são distribuídas 20 bolinhas de vidro, geralmente com 1,5 cm de diâmetro, organizadas em quatro fileiras de cinco bolinhas cada, com espaçamento uniforme de 4 cm entre cada bolinha (Deacon, 2006). Esse arranjo simétrico facilita a visualização e a contagem precisa das bolinhas enterradas ao final da sessão.

A duração do teste é tipicamente de 30 minutos, período em que o animal permanece em livre exploração da arena. Ao final, considera-se como “enterrada” qualquer bolinha que esteja coberta por dois terços ou mais de substrato, critério amplamente utilizado por sua simplicidade e reproduzibilidade. Para garantir estabilidade comportamental, recomenda-se que os animais sejam aclimatados por 2 a 7 dias antes do experimento, sob condições ambientais controladas de iluminação, ruído, temperatura e rotina de manuseio (Deacon, 2006).

As dimensões da caixa podem variar conforme o protocolo, mas a configuração mais adotada como referência — especialmente em estudos de padronização — corresponde a 30 × 20 × 20cm (Deacon, 2006). Ainda assim, outros estudos empregaram arenas maiores ou menores, refletindo adaptações específicas aos seus objetivos experimentais. Tais variações estruturais e metodológicas — incluindo tempo, substrato, critérios de análise e tipo de arena — serão abordadas no subtópico seguinte.

A Figura 2 ilustra uma representação esquemática da organização clássica do teste, destacando seus principais componentes estruturais e etapas experimentais, como a disposição das bolinhas, a profundidade do substrato e o tempo de exposição.

Figura 2 – Estrutura Geral do Teste de *Marble Burying*



Fonte: Autoria própria com base em Deacon (2006).

2.2. VARIAÇÕES METODOLÓGICAS ENTRE PROTOCOLOS

Embora o teste de MB apresente uma estrutura básica e replicável, a literatura apresenta variações metodológicas significativas entre os protocolos empregados por diferentes grupos de pesquisa. Essas variações incluem desde as dimensões da caixa até as condições ambientais do teste, e podem influenciar diretamente a frequência e a qualidade do comportamento de enterramento observado.

Entre os estudos clássicos, observam-se diferenças nas medidas das caixas experimentais, que variam de 30 × 20 cm (Deacon, 2006) até dimensões maiores, como 42 × 24 × 12 cm (Njung'e; Handley, 1991) ou 26,6 × 42,5 × 18,5 cm (Wahl *et al.*, 2022). A profundidade do substrato de maravalha também varia de 4 a 5 cm, sendo a padronização dessa variável crucial para assegurar condições equivalentes de escavação.

Além disso, aspectos como o tipo de iluminação, o horário de testagem, o diâmetro das bolinhas e o tempo total de exposição (geralmente 30 minutos) diferem entre os estudos. Em alguns casos, como no protocolo de Wahl *et al.* (2022), técnicas automatizadas de rastreamento comportamental foram incorporadas para mensurar de forma precisa episódios de escavação, promovendo maior objetividade e padronização.

Essas divergências metodológicas são detalhadas na Tabela 1, que sintetiza os principais parâmetros utilizados nos estudos mais citados que empregaram o MB para investigar aspectos relacionados à ansiedade, compulsividade ou repetição motora.

Tabela 1 – Variação entre Estudos do Teste de *Marble Burying*

ACLIMATAÇÃO E ILUMINAÇÃO	OBJETIVO PRINCIPAL	MODELO ANIMAL	REFERÊNCIA
Aclimatação de alguns dias; ciclo claro-escuro 12/12h (luz das 6h às 18h); teste entre 8h-15h em sala com iluminação normal	Discriminar ansiolíticos vs. antipsicóticos	Camundongos Swiss machos (20-24 g)	Broekkamp <i>et al.</i> (1986)
Aclimatados por ≥3 dias no local do experimento; ciclo claro/escuro 12/12h (luz às 08h); testes entre 10h e 18h	Avaliar o enterramento de bolinhas como modelo de	Camundongos MF1 fêmeas (23-35 g)	Njung' e, Handley (1991)
Iluminação e ruído controlados; não realizar em dias de limpeza	Padronização metodológica do teste	Camundongos C57BL/6J	Deacon (2006)
Aclimatação ≥10 dias; ciclo claro/escuro 12:12h; 30 min de aclimatação na sala de teste; testes entre 8h e 12h; ruído branco contínuo (55 dB)	Investigar se o enterramento de bolinhas reflete comportamento repetitivo ou ansiedade	Camundongos de 12 linhagens e C57BL/6J	Thomas <i>et al.</i> (2009)
3-5 dias de manuseio prévio; 60 min de aclimatação antes do teste; ciclo claro/escuro 12h/12h; teste entre 9h-16h	Avaliar comportamento repetitivo e compulsivo	Camundongos TPH2 KO e WT	Angoa-Pérez <i>et al.</i> (2013)
Ciclo claro/escuro 12/12h; grupo-hospedagem mista por genótipo; aclimatação padrão; ambiente holandês com controle ambiental	Desenvolver método automatizado para análise do	Camundongos C57BL/6J e modelos genéticos: <i>Ube3a</i> ; <i>Shank2</i> ; <i>Sapap3</i> ; ambos	Wahl <i>et al.</i> (2022)

TEMPO DE TESTE	CRITÉRIO PARA BOLINHA ENTERRADA	Nº DE BOLINHAS	SUBSTRATO E PROFUNDIDADE	ESTRUTURA DA ARENA	REFERÊNCIA
30 min	≥2/3 coberta	25	Serragem (sawdust), 5 cm	23×17×14 cm (testes com marbles e grooming)	Broekkamp <i>et al.</i> (1986)
30 min	≥2/3 coberta	20	Serragem (sawdust), 5 cm	Caixa de polipropileno 42×24×12 cm	Njung' e Handley (1991)
30 min	≥2/3 coberta	20	Maravilha (aspen), 5 cm	30×20 cm, acrílico transparente	Deacon (2006)
30 min (experimento 1); 20 min (demais)	>50% da superfície da bolinha coberta por substrato	20	4,5 cm de corncob ou SANI-CHIP (dependendo do experimento)	27×16,5×12,5 cm	Thomas <i>et al.</i> (2009)
30 min	≥2/3 coberta	20	20 bolinhas de vidro (1,5 cm - diâmetro)	Maravilha de camundongo (não aromatizada), 5 cm	Gaiola padrão de policarbonato
30 min	≥2/3 coberta visualmente. também validação com rastreamento	20		26×48×20 cm com tampa de filtro	Angoa-Pérez <i>et al.</i> (2013)
30 min	≥2/3 coberta visualmente. também validação com rastreamento	20		Maravilha (Lignocel) para Ube3a e Shank2; Corncob para	26,6×42,5×18,5 cm, caixa Eurostand
					Wahl <i>et al.</i> (2022)

Fonte: Autoria própria.

A análise comparativa entre os estudos mostra que, embora exista uma estrutura central compartilhada, detalhes metodológicos como substrato, critérios de análise e ambiente de testagem devem ser criteriosamente considerados e, sempre que possível, justificados em função dos objetivos experimentais. A escolha da configuração mais adequada depende do modelo experimental, da hipótese de pesquisa e dos mecanismos comportamentais que se deseja explorar. Nesse sentido, compreender as bases neuroanatômicas e neuroquímicas associadas ao comportamento de enterramento torna-se essencial para interpretar de forma mais precisa os dados obtidos.

3. BASES NEUROANATÔMICAS E NEUROQUÍMICAS DO TESTE DE MARBLE BURYING

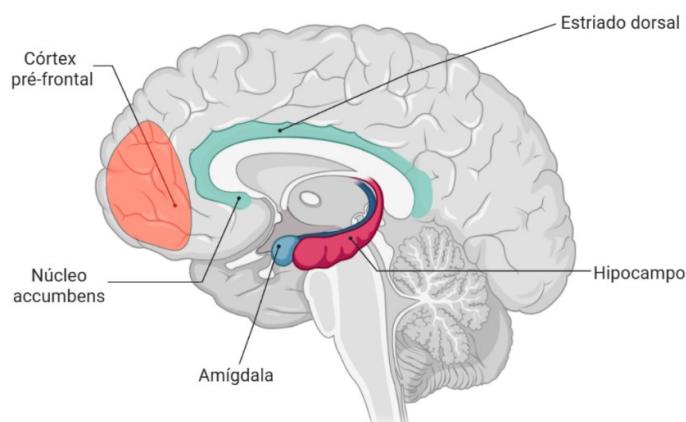
O comportamento de enterramento avaliado no teste de MB não é um fenômeno isolado, mas sim o resultado da ativação coordenada de diferentes estruturas cerebrais e sistemas neurotransmissores. Entender os circuitos e mediadores envolvidos é fundamental para interpretar com precisão os dados obtidos nesse teste, especialmente quando aplicado a modelos de transtornos neuropsiquiátricos (Albelda; Joel, 2011; Welch *et al.*, 2007).

Nas próximas seções, serão abordadas as principais áreas cerebrais implicadas nesse comportamento (como hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal, núcleo accumbens e estriado dorsal), bem como os neurotransmissores que modulam sua expressão, incluindo serotonina, GABA, dopamina, glutamato, noradrenalina e acetilcolina.

3.1. ÁREAS CEREBRAIS ENVOLVIDAS NO COMPORTAMENTO DE ENTERRAMENTO

O comportamento de enterramento observado no teste de MB resulta da interação entre diferentes sistemas neurais responsáveis por integrar estímulos sensoriais, regular emoções e coordenar padrões motores. Diversas estruturas cerebrais têm sido implicadas nesse comportamento, não apenas pela ativação funcional durante o teste, mas também por estudos com lesões, manipulação farmacológica e modelos genéticos (Deacon; Rawlins, 2005; Welch *et al.*, 2007; Won *et al.*, 2012). Entre as áreas mais relevantes estão o hipocampo, a amígdala, o córtex pré-frontal, o núcleo accumbens e o estriado dorsal (Figura 3). Cada uma dessas regiões contribui de forma específica para componentes como escavação, defesa, repetição e controle comportamental.

Figura 3 – Áreas Cerebrais Envolvidas no Teste de *Marble Burying*



Fonte: Autoria própria com elementos do [BioRender.com](https://www.biorender.com). Ano 2025.

3.1.1. Hipocampo

O hipocampo é uma das estruturas mais implicadas no comportamento de escavação e enterramento, principalmente por seu papel na memória espacial, navegação ambiental e processamento de experiências aversivas. Evidência oriunda de um estudo com lesões hipocampais indica uma redução significativa no número de bolinhas enterradas, sugerindo que a integridade dessa região é necessária para a execução do comportamento típico no teste de MB (Deacon; Rawlins, 2005).

Além disso, o hipocampo participa de circuitos relacionados à resposta ao novo e à exploração ativa do ambiente, o que se alinha à natureza do teste, em que o animal responde a objetos estranhos dispostos simetricamente no substrato. Sua ativação durante o MB reforça seu envolvimento na detecção contextual e na organização de sequências comportamentais, características centrais do paradigma (Antunes; Biala, 2011).

3.1.2. Amígdala

A amígdala é uma estrutura límbica essencial para a detecção de estímulos emocionalmente relevantes e a construção de respostas defensivas, especialmente aquelas relacionadas ao medo e à ansiedade (Li *et al.*, 2023). No contexto do teste de MB, acredita-se que seu envolvimento esteja relacionado à avaliação de estímulos estranhos (bolinhas) como potenciais ameaças ou elementos perturbadores no ambiente.

Modelos experimentais demonstram que manipulações que afetam a atividade da amígdala podem alterar significativamente o número de bolinhas enterradas, reforçando sua participação na modulação emocional do comportamento escavatório (Torruella-Suárez *et al.*, 2020). Além disso, a conexão funcional entre a amígdala e o córtex pré-frontal sugere que essa estrutura também participa da transição entre respostas inibitórias e comportamentos repetitivos frente ao desafio apresentado pelo teste.

3.1.3. Córtez pré-frontal

O córtex pré-frontal (CPF) é amplamente reconhecido por seu papel no controle executivo, tomada de decisão e regulação de comportamentos impulsivos e repetitivos (Friedman; Robbins, 2021). Em modelos animais, o CPF atua na inibição de respostas automáticas, sendo importante para o equilíbrio entre comportamentos exploratórios e compulsivos (Fineberg *et al.*, 2010). No contexto do teste de MB, a disfunção pré-frontal pode favorecer padrões comportamentais mais rígidos ou estereotipados.

Estudos com modelos genéticos de transtornos neuropsiquiátricos, como o TOC e o TEA, indicam alterações estruturais e funcionais no CPF, frequentemente associadas a um aumento na

frequência de comportamentos de enterramento. Além disso, há forte conectividade funcional entre o CPF, a amígdala e os núcleos da base, compondo circuitos cortico-estriatais que modulam respostas emocionais e motoras complexas (Albelda; Joel, 2011).

3.1.4. Núcleo accumbens e Estriado dorsal

O núcleo accumbens (NAc) e o estriado dorsal desempenham papel central na integração entre motivação, recompensa e execução motora, sendo fundamentais para a expressão de comportamentos direcionados e repetitivos. Essas estruturas fazem parte dos circuitos cortico-estriato-talâmicos, frequentemente implicados em modelos de compulsão e TOC (Dobrovitsky; West; Horvitz, 2019).

No contexto do teste de MB, o aumento do comportamento de enterramento tem sido associado à hiperatividade dessas vias, indicando que o NAc pode atuar como um modulador da saliência atribuída ao estímulo (bolinha) e do impulso motor para escavar (Koob; Volkow, 2010). Já o corpo estriado dorsal está mais relacionado à automatização de sequências motoras repetitivas, o que contribui para o aspecto estereotipado da tarefa (Graybiel, 2008).

Estudos com camundongos geneticamente modificados, como aqueles com deleções nos genes *Sapap3* ou *Shank2*, mostraram alterações no funcionamento estriatal acompanhadas de aumento no comportamento de enterramento, fortalecendo a hipótese de que essas estruturas estão diretamente envolvidas nos mecanismos neurais que sustentam a compulsividade no MB (Welch *et al.*, 2007; Won *et al.*, 2012).

3.2. SISTEMAS DE NEUROTRANSMISSORES E NEUROMODULADORES ENVOLVIDOS

O comportamento de enterramento avaliado no teste de MB resulta da ação conjunta de múltiplos sistemas neurotransmissores que regulam emoção, excitação, controle motor e impulsividade. Dentre os sistemas mais bem caracterizados na literatura estão os de serotonina (5-HT), GABA, dopamina e glutamato, que modulam de forma crítica a expressão comportamental durante o teste (Borsini, Podhorna, Marazziti, 2002; Egashira *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2019). Além desses, noradrenalina, acetilcolina e o sistema endocanabinoide também têm sido apontados como moduladores secundários ou contextuais (Kinsey *et al.*, 2011).

A serotonina, particularmente por meio dos receptores 5-HT1A e 5-HT2A, está fortemente implicada na inibição de comportamentos compulsivos. ISRSs, como fluoxetina e escitalopram, reduzem o número de bolinhas enterradas, mostrando a participação serotoninérgica em circuitos cortico-estriatais associados ao controle de impulsividade e à modulação da ansiedade,

características centrais em modelos de TOC (Borsini; Podhorna; Marazziti, 2002; Langer; Einat; Stukalin, 2020).

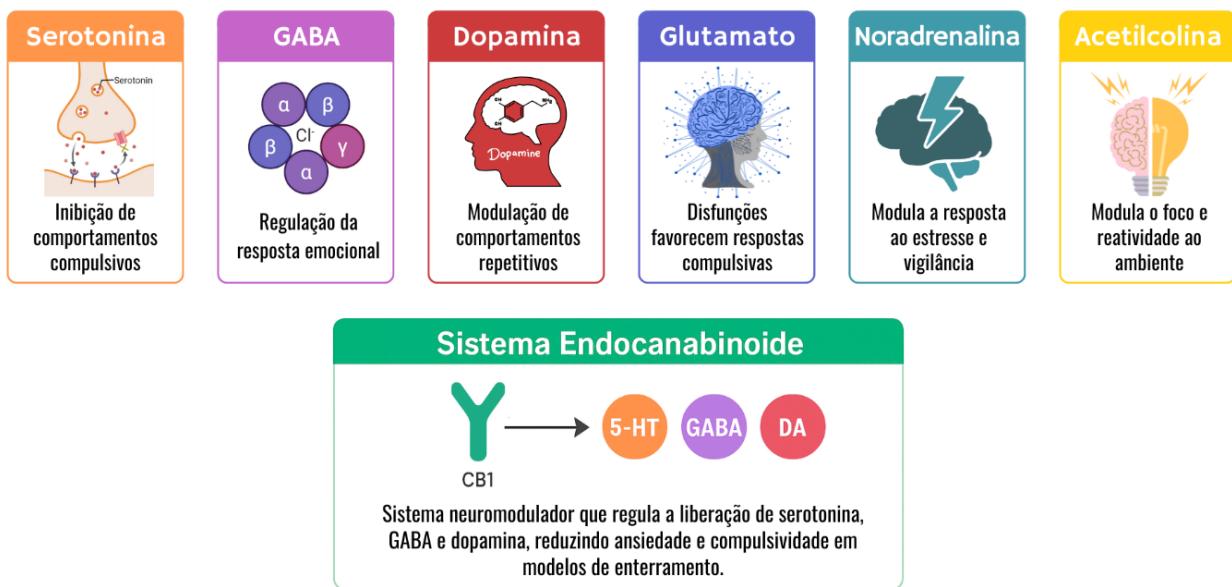
O sistema GABAérgico, por sua vez, atua como principal regulador inibitório do SNC. Fármacos ansiolíticos, como os benzodiazepínicos (ex: diazepam), que potencializam a ação do GABA, também reduzem o comportamento de enterramento, sugerindo que o aumento da inibição neuronal pode diminuir a responsividade emocional frente a estímulos potencialmente aversivos ou estranhos, como as bolinhas do teste (Chen *et al.*, 2019).

A dopamina, envolvida em circuitos de recompensa e motivação, também modula o comportamento de enterramento. A ativação excessiva da via dopaminérgica, especialmente em regiões como o estriado dorsal e o núcleo accumbens, está associada ao aumento de comportamentos repetitivos e estereotipados, frequentemente observados em modelos genéticos de Transtorno do Espectro Autista (TEA) e TOC (Jeyabalan *et al.*, 2022).

O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do cérebro, contribui para a plasticidade sináptica e a regulação da excitabilidade em redes cortico-estriatais. Disfunções no sinal glutamatérgico têm sido associadas a comportamentos compulsivos e desregulação emocional, podendo amplificar padrões de escavação anormais. Bloqueadores de receptores NMDA, como a memantina, têm sido testados por seu potencial modulador nesses circuitos (Egashira *et al.*, 2008).

Outros sistemas, como o noradrenérgico e colinérgico, possuem papel modulador na atenção, resposta ao estresse e vigilância comportamental, podendo influenciar indiretamente os resultados no teste (Hartog *et al.*, 2020; Patel *et al.*, 2025). O sistema endocanabinoide, por sua vez, surge relacionando-se à neuropsicofarmacologia do comportamento repetitivo. Agonistas de receptores CB1 e moduladores indiretos de endocanabinoides endógenos têm demonstrado efeitos na redução da compulsividade e da ansiedade, ainda que os resultados sejam preliminares e altamente dependentes do modelo experimental utilizado (Kinsey *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2025). Esses sistemas estão resumidos na Figura 4, que apresenta uma visão integrada dos principais neurotransmissores e neuromoduladores associados ao comportamento de enterramento.

Figura 4 - Neurotransmissores e Neuromoduladores envolvidos no Teste de *Marble Burying*



Fonte: Autoria própria. Ano 2025.

Portanto, o comportamento observado no teste de MB não é mediado por um único sistema neurotransmissor, mas sim pela interação dinâmica entre diversas vias neuroquímicas. Essa complexidade amplia o potencial interpretativo do teste, ao mesmo tempo em que impõe desafios relacionados à especificidade e à reproduzibilidade dos achados, exigindo uma análise criteriosa do desenho experimental e das vias moduladas por cada intervenção testada.

4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS DO TESTE DE MARBLE BURYING

O teste de MB tem sido bastante utilizado na pesquisa pré-clínica como ferramenta para investigação de comportamentos repetitivos, compulsivos e ansiosos em modelos animais. Ao longo das últimas décadas, o modelo foi ganhando destaque por sua simplicidade metodológica, reproduzibilidade e sensibilidade a diferentes classes de psicofármacos, o que o torna uma ferramenta para estudos com potencial translacional (Njung'e; Handley, 1991; Deacon, 2006; Angoa-Pérez *et al.*, 2013).

No contexto do TOC, por exemplo, o MB tem sido empregado para modelar aspectos do comportamento compulsivo, dada a sua sensibilidade a tratamentos com ISRSs, como fluoxetina e escitalopram. A redução consistente do número de bolinhas enterradas após administração desses fármacos demonstra a eficácia observada em pacientes humanos, fornecendo validação preditiva ao modelo. Fármacos com mecanismos alternativos, como moduladores dopaminérgicos, glutamatérgicos e canabinoides, também têm sido testados com resultados relevantes,

expandindo o uso do MB como plataforma de triagem farmacológica (Borsini, Podhorna; Marazziti, 2002; Langer; Einat; Stukalin, 2020).

Além do TOC, o MB tem sido aplicado em estudos com modelos genéticos e ambientais de TEA, nos quais os comportamentos repetitivos e a rigidez comportamental são componentes primordiais do fenótipo. Animais com mutações em genes como *Shank2*, *Sapap3*, *Ube3a* e *MeCP2*, comumente associados ao TEA ou à Síndrome de Rett, apresentam aumento nos níveis de enterramento, sendo o teste útil para caracterização fenotípica e avaliação de intervenções terapêuticas (Won *et al.*, 2012; Peça *et al.*, 2011; Chao *et al.*, 2010). Essa abordagem permite avaliar o impacto funcional de alterações moleculares específicas, oferecendo insights sobre os circuitos neurais subjacentes à compulsividade.

Adicionalmente, o MB tem sido utilizado como indicador comportamental em modelos de ansiedade e estresse, apesar de sua validade para esses fins ainda ser objeto de debate. Estudos sugerem que fármacos ansiolíticos clássicos, como os benzodiazepínicos, reduzem o comportamento de enterramento, o que pode refletir uma atenuação da reatividade emocional a estímulos estranhos, especialmente em linhagens de animais com alta responsividade ao ambiente (Chen *et al.*, 2019; Dixit; Sahu; Mishra, 2020).

Com o avanço das tecnologias de análise comportamental, abordagens automatizadas têm sido incorporadas ao MB, permitindo não apenas quantificar o número de bolinhas enterradas, mas também analisar a dinâmica temporal dos episódios de escavação, a intensidade dos movimentos e a preferência espacial dentro da arena (Wahl *et al.*, 2022). Essas inovações ampliam a resolução fenotípica do teste, favorecendo sua padronização.

Apesar de sua aparente simplicidade, o teste de MB captura elementos comportamentais complexos, como organização motora, responsividade emocional e impulsividade. Sua utilidade não se limita à triagem farmacológica, sendo também empregado em estudos com intervenções dietéticas, epigenéticas e ambientais, tornando-se um indicador funcional da modulação de circuitos cortico-estriatais-límbicos (Albelda; Joel, 2011; Clipperton-Allen *et al.*, 2022).

Portanto, o teste de Marble Burying se estabelece como uma ferramenta de grande utilidade translacional, especialmente na avaliação de novas terapias para transtornos compulsivos, do espectro autista e de ansiedade. Seu uso integrado a outros paradigmas e a análises neurobiológicas permite uma compreensão mais profunda das bases neurocomportamentais da compulsividade, aproximando os achados da bancada das demandas clínicas contemporâneas.

5. LIMITAÇÕES E DESAFIOS METODOLÓGICOS DO TESTE DE MARBLE BURYING

Apesar de sua abrangente utilização na pesquisa pré-clínica, o teste de MB apresenta diversas limitações metodológicas e conceituais que precisam ser consideradas para garantir a validade e a reproduzibilidade dos achados. Esses desafios abrangem desde a variabilidade nos protocolos experimentais até a interpretação ambígua dos comportamentos observados (Dixit; Sahu; Mishra, 2020).

Um dos principais entraves é a heterogeneidade dos procedimentos entre laboratórios, que inclui diferenças no número de bolinhas utilizadas, tipo e profundidade do substrato (geralmente maravalha ou serragem), tempo de exposição, iluminação do ambiente, e critérios operacionais para considerar uma bolinha como enterrada (Angoa-Pérez *et al.*, 2013; Dixit; Sahu; Mishra, 2020). Além disso, fatores biológicos como linhagem, sexo, idade e experiências prévias dos animais também influenciam o desempenho, dificultando a padronização (Dixit; Sahu; Mishra, 2020; Santana-Santana; Bayascas; Giménez-Llort, 2021).

Outro aspecto crítico refere-se à validade do modelo. Embora o MB tenha sido inicialmente utilizado como paradigma de ansiedade, sua validade de constructo para transtornos compulsivos é questionável. Muitos estudos sugerem que o comportamento de enterramento não está necessariamente vinculado a compulsões patológicas, mas sim a respostas exploratórias ou defensivas naturais do animal (Gyertyán, 1995; Dixit; Sahu; Mishra, 2020). A validação neurobiológica do teste também é limitada, pois não há evidência clara de que os circuitos ativados no enterramento sejam equivalentes aos circuitos cortico-estriato-talâmicos desregulados no TOC humano (Szechtman *et al.*, 2020; Dixit; Sahu; Mishra, 2020).

A validade preditiva também é motivo de debate. Embora o teste seja sensível a ISRSs, e esses efeitos requeiram administração crônica, semelhante ao observado clinicamente no TOC, fármacos como benzodiazepínicos e anticonvulsivantes também reduzem o comportamento de enterramento, mesmo sem eficácia comprovada em humanos com TOC (Egashira *et al.*, 2008). Por outro lado, medicamentos com efeito terapêutico comprovado, como o riluzol, podem não alterar o comportamento no MB, gerando falsos negativos (Dixit; Sahu; Mishra, 2020).

Do ponto de vista analítico, o teste costuma utilizar apenas uma medida acumulativa (número total de bolinhas enterradas), ignorando aspectos dinâmicos do comportamento, como padrão temporal, intensidade da escavação e persistência ao longo do tempo. Essa abordagem reduz a sensibilidade do modelo frente a intervenções sutis. Estratégias mais modernas têm proposto o uso de análise comportamental automatizada e rastreamento digital, capazes de

diferenciar escavação real de movimentações superficiais e de ampliar a resolução do fenótipo (Wahl *et al.*, 2022).

Além disso, a interpretação do comportamento observado é altamente dependente do contexto do modelo experimental, sendo o MB aplicado em protocolos que investigam não apenas TOC, mas também TEA, esquizofrenia e estresse (Jeyabalan *et al.*, 2022). Cada condição envolve alterações neurobiológicas distintas, o que torna arriscado atribuir ao comportamento de enterramento um significado único e universal.

Assim, o MB deve ser utilizado como parte de uma bateria comportamental, associada a outros testes específicos e a marcadores neurobiológicos que permitam validar as inferências comportamentais (Dixit; Sahu; Mishra, 2020). A Figura 5 a seguir, ilustra as principais limitações e desafios metodológicos do teste de MB, abrangendo aspectos de padronização, validade científica, análise comportamental e estratégias propostas para seu aprimoramento.

Figura 5 – Principais Limitações e Desafios Metodológicos do Teste de *Marble Burying*



Fonte: Autoria própria. Ano 2025.

Portanto, embora o teste de MB seja uma ferramenta acessível e amplamente utilizada, seu uso requer hipóteses claras, desenho experimental rigoroso e interpretação crítica dos resultados. A adoção de protocolos padronizados, o controle de variáveis biológicas e metodológicas, e a incorporação de tecnologias de análise automatizada são estratégias recomendadas para superar suas limitações e aprimorar seu valor translacional.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste de MB destaca-se como uma ferramenta útil e amplamente empregada na investigação de comportamentos repetitivos e compulsivos em modelos animais, com aplicabilidade na triagem farmacológica e na caracterização de fenótipos neuropsiquiátricos. Apesar de sua simplicidade operacional e boa sensibilidade, o modelo apresenta limitações importantes relacionadas à padronização metodológica, validade preditiva e interpretação comportamental.

Nesse sentido, seu uso deve ser criterioso, preferencialmente integrado a outras abordagens comportamentais e neurobiológicas. Com os avanços em tecnologias de rastreamento e análise automatizada, o MB continua a oferecer contribuições relevantes à pesquisa translacional, desde que aplicado com rigor experimental e embasamento conceitual adequado.

REFERÊNCIAS

- ALBELDA, N.; JOEL, D. Animal models of obsessive-compulsive disorder: exploring pharmacology and neural substrates. *Neurosci Biobehav Rev.*, v. 36, n. 1, p. 47-63, jan. 2012.
- ANGOA-PÉREZ, M. *et al.* Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice. *J Vis Exp.*, [S.I], n. 82, e50978, 24 dez. 2013.
- ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process.*, v. 13, n. 2, p. 93-110, maio 2012.
- BORSINI, F.; PODHORNA, J.; MARAZZITI, D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology (Berl)*, v. 163, n. 2, p. 121-141, set. 2002.
- BROEKKAMP, C. L.; RIJK, H. W.; JOLY-GELOUIN, D.; LLOYD, K. L. Major tranquillizers can be distinguished from minor tranquillizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 126, n. 3, p. 223-229, 1986.
- CHAO, H. T. *et al.* Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature*, v. 468, n. 7321, p. 263-269, 11 nov. 2010.
- CHEN, H. S. *et al.* GABA and 5-HT Systems Are Involved in the Anxiolytic Effect of Gan-Mai-Da-Zao Decoction. *Frontiers in Neuroscience*, v. 12, p. 1043, 22 jan. 2019.
- CLIPPERTON-ALLEN, A. E. *et al.* Pten haploinsufficiency causes desynchronized growth of brain areas involved in sensory processing. *iScience*, v. 25, n. 2, p. 103796, 19 jan. 2022.
- DEACON, R. M. Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. *Nature Protocols*, v. 1, n. 1, p. 122-124, 2006.
- DEACON, R. M.; RAWLINS, J. N. Hippocampal lesions, species-typical behaviours and anxiety in mice. *Behavioral Brain Research*, v. 156, n. 2, p. 241-249, 30 jan. 2005.

DIXIT, P. V.; SAHU, R.; MISHRA, D. K. Marble-burying behavior test as a murine model of compulsive-like behavior. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 102, art. 106676, mar./abr. 2020.

DOBROVITSKY, V.; WEST, M. O.; HORVITZ, J. C. The role of the nucleus accumbens in learned approach behavior diminishes with training. **European Journal of Neuroscience**, v. 50, n. 9, p. 3403-3415, nov. 2019.

EGASHIRA, N. *et al.* Calcium-channel antagonists inhibit marble-burying behavior in mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 108, n. 1, p. 140-143, set. 2008.

FINEBERG, N. A. *et al.* Probing compulsive and impulsive behaviors, from animal models to endophenotypes: a narrative review. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 3, p. 591-604, fev. 2010.

FRIEDMAN, N. P.; ROBBINS, T. W. The role of prefrontal cortex in cognitive control and executive function. **Neuropsychopharmacology**, v. 47, n. 1, p. 72-89, jan. 2022.

GRAYBIEL, A. M. Habits, rituals, and the evaluative brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 31, p. 359-387, 2008.

GYERTYÁN, I. Analysis of the Marble Burying Response: Marbles Serve to Measure Digging Rather than Evoke Burying. **Behavioural Pharmacology**, v. 6, p. 24-31, 1995.

HARTOG, K. *et al.* Stigma reduction interventions for children and adolescents in low- and middle-income countries: Systematic review of intervention strategies. **Soc Sci Med**, v. 246, p. 112749, 2020.

JEYABALAN, S. *et al.* Potential effects of noni (*Morinda citrifolia* L.) fruits extract against obsessive-compulsive disorder in marble burying and nestlet shredding behavior mice models. **Front Pharmacol**, v. 13, p. 993927, 2022.

KINSEY, S. G. *et al.* Inhibition of endocannabinoid catabolic enzymes elicits anxiolytic-like effects in the marble burying assay. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 98, p. 21-27, 2011.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 217-238, 2010.

LANGER, E.; EINAT, H.; STUKALIN, Y. Similarities and dissimilarities in the effects of benzodiazepines and specific serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in the defensive marble burying test: A systematic review and meta-analysis. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 36, p. 38-49, 2020.

LI, Y. J. *et al.* Paraventricular nucleus-central amygdala oxytocinergic projection modulates pain-related anxiety-like behaviors in mice. **CNS Neurosci Ther**, v. 29, n. 11, p. 3493-3506, 2023.

NJUNG'E, K.; HANDLEY, S. L. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 38, n. 1, p. 63-7, 1991.

PATEL, C. *et al.* Central cholinergic transmission modulates endocannabinoid-induced marble-burying behavior in mice. **Behav Brain Res**, v. 476, p. 115252, 2025.

PEÇA, J. *et al.* Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. **Nature**, v. 472, n. 7344, p. 437-42, 2011.

PINEL, J. P.; TREIT, D. Burying as a defensive response in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 92, n. 4, p. 708-712, 1978.

SANTANA-SANTANA, M.; BAYASCAS, J. R.; GIMÉNEZ-LLORT, L. Sex-Dependent Signatures, Time Frames and Longitudinal Fine-Tuning of the Marble Burying Test in Normal and AD-Pathological Aging Mice. **Biomedicines**, v. 9, n. 8, p. 994, 2021.

SZECHTMAN, H. *et al.* The Psychopharmacology of Obsessive-Compulsive Disorder: A Preclinical Roadmap. **Pharmacological Reviews**, v. 72, n. 1, p. 80-151, 2020.

TAYLOR, G. T.; LERCH, S.; CHOURBAJI, S. Marble burying as compulsive behaviors in male and female mice. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 77, n. 3, p. 254-260, 2017.

THOMAS, A. *et al.* Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. **Psychopharmacology**, v. 204, n. 2, p. 361-373, 2009.

TORRUELLA-SUÁREZ, M. L. *et al.* Manipulations of central amygdala neurotensin neurons alter the consumption of ethanol and sweet fluids in mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 3, p. 632-647, 2020.

WAHL, L. *et al.* A Novel Automated Approach for Improving Standardization of the Marble Burying Test Enables Quantification of Burying Bouts and Activity Characteristics. **eNeuro**, v. 9, n. 2, p. ENEURO.0446-21.2022, 2022.

WELCH, J. M. *et al.* Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviours in Sapap3-mutant mice. **Nature**, v. 448, n. 7156, p. 894-900, 2007.

WON, H. *et al.* Autistic-like social behaviour in Shank2-mutant mice improved by restoring NMDA receptor function. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 261-265, 2012.

CAPÍTULO XIX

BASES NEUROBIOLÓGICAS DO TESTE COMPORTAMENTAL DE PLACA PERFURADA (HOLE BOARD)

NEUROBIOLOGICAL BASES OF THE HOLE BOARD BEHAVIORAL TEST

DOI: 10.51859/ampilla.nat298.1126-19

Stephanie Lian Martins Kostk Oliveira ¹
Ana Maria Sampaio Assreuy ²

¹ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – PPGCF. Universidade Estadual do Ceará – UECE.

² Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará – ISCB/UECE – Brasil.

RESUMO

O teste comportamental de placa perfurada (Hole Board test) é amplamente empregado na investigação do comportamento exploratório, da ansiedade e da cognição em modelos animais. Baseado na quantificação de movimentos exploratórios, como a frequência de “head-dips”, o teste permite avaliar o equilíbrio entre curiosidade e inibição comportamental frente ao novo. Derivado dos princípios do condicionamento clássico de Pavlov, o método reflete a integração funcional entre circuitos neuroanatômicos e neuroquímicos, especialmente o córtex pré-frontal, o hipocampo e a amígdala. A modulação desses circuitos envolve neurotransmissores como serotonina, dopamina e GABA (ácido gama-aminobutírico), que influenciam diretamente as respostas ansiosas e exploratórias. Apesar de sua importância translacional, o teste apresenta limitações metodológicas relacionadas à variabilidade interlaboratorial, à influência de fatores ambientais e à ausência de padronização de parâmetros experimentais. Assim, o Hole Board test mantém-se como uma ferramenta relevante nas neurociências comportamentais, desde que aplicado de forma criteriosa e interpretado dentro de um contexto metodológico rigoroso.

Palavras-chave: comportamento exploratório; ansiedade; neurociências comportamentais; Hole Board test; neurotransmissores.

ABSTRACT

The Hole Board test is widely used to investigate exploratory behavior, anxiety, and cognition in animal models. Based on the quantification of exploratory movements, such as the frequency of “head-dips,” the test evaluates the balance between curiosity and behavioral inhibition when facing novelty. Derived from Pavlov’s classical conditioning principles, this method reflects the functional integration of neuroanatomical and neurochemical circuits, particularly the prefrontal cortex, hippocampus, and amygdala. The modulation of these pathways involves neurotransmitters such as serotonin, dopamine, and GABA (gamma-aminobutyric acid), which directly influence anxious and exploratory responses. Despite its translational importance, the test presents methodological limitations related to interlaboratory variability, environmental influence, and lack of parameter standardization. Therefore, the Hole Board test remains a relevant tool in behavioral neuroscience, provided it is applied carefully and interpreted within a rigorous methodological framework.

Keywords: Active avoidance. Defensive behavior. Neuropsychiatric models.

1. INTRODUÇÃO

Os testes comportamentais em roedores são amplamente utilizados para elucidar mecanismos neurobiológicos vinculados a contextos emocionais e cognitivos, com aplicabilidade na farmacologia experimental e na psiquiatria translacional (Casarrubea et al., 2023).

A contribuição fundamental do fisiologista Ivan P. Pavlov (1849–1936) ao demonstrar, por meio do condicionamento clássico, que estímulos originalmente neutros podem adquirir a capacidade de evocar respostas condicionadas após associações repetidas com estímulos incondicionados, estabeleceu as bases experimentais para o estudo sistemático do comportamento aprendido. Esse princípio estabeleceu fundamentos para o desenvolvimento de paradigmas de comportamento animal que quantificam respostas a estímulos exploratórios e aversivos (Calcagni et al., 2018).

O teste comportamental de placa perfurada (Hole Board Test) foi desenvolvido nos anos 1970 para superar limitações do teste de campo aberto (Open Field Test), ao avaliar a exploração ativa do animal por meio da frequência de “head dip” em buracos dispostos no piso da arena (File & Wardill, 1975; Casarrubea et al., 2023). Este teste, que quantifica competição entre impulso exploratório e reação inata ao novum, tem sido aplicado de forma crescente em estudos sobre ansiedade, motivação e memória, embora seus índices comportamentais (como head dip) ainda suscitam debate quanto ao seu significado psicológico (Casarrubea et al., 2023).

Este capítulo objetivou apresentar uma visão abrangente das bases neurobiológicas do teste comportamental de placa perfurada, abordando seu protocolo experimental, os fundamentos anatômicos e neuroquímicos envolvidos, suas aplicações clínicas e translacionais, além dos principais desafios metodológicos relacionados à sua utilização.

2. PROTOCOLOS DO TESTE

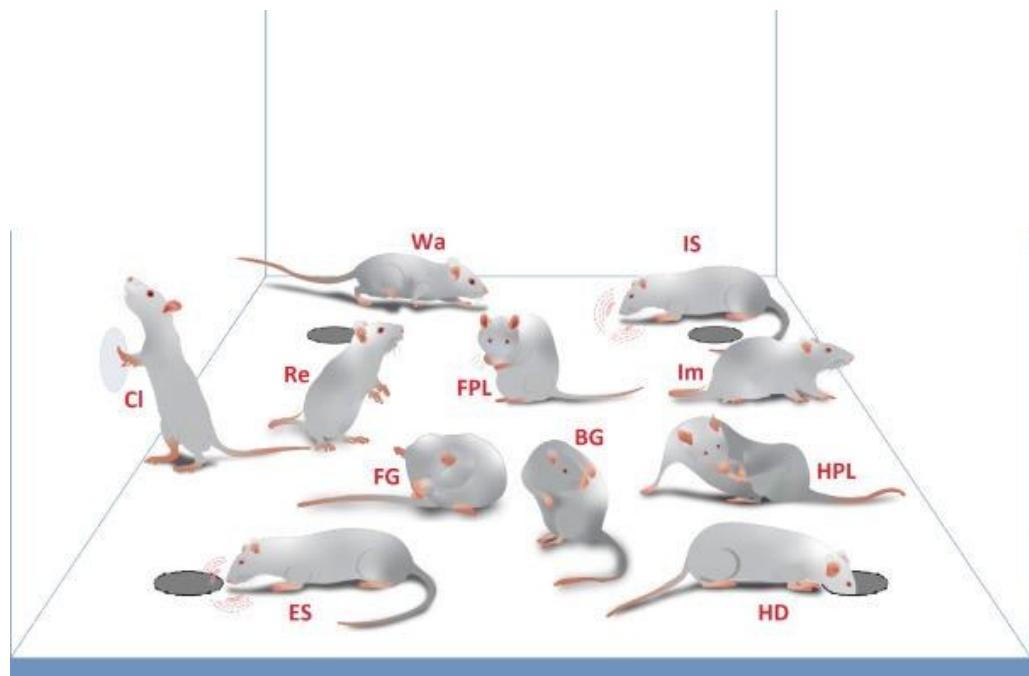
O teste de placa perfurada é realizado em uma arena quadrada (tipicamente 40×40 cm), elevada de 7–28 cm do chão, com o piso perfurado por 4 a 16 furos de aproximadamente 3,8–4 cm de diâmetro e espaçados de forma igualitária (d’Isa, Comi e Leocani, 2021). A iluminação ambiente é mantida baixa (20–40 lux ou luz vermelha) para evitar estresse dos roedores e favorecer o comportamento exploratório natural (La-Vu et al., 2020).

Cada animal é colocado individualmente no centro da arena por um período padrão de 5 minutos, durante o qual é possível observar um rico repertório comportamental, que pode ser sistematicamente registrado e analisado. Entre os comportamentos mais frequentemente descritos estão: “walking”, que consiste na locomoção livre pela arena com movimentos de olfação

ambiental; “immobile-sniffing”, em que o animal permanece com o corpo imóvel, mas farejando o ambiente ao seu redor; “climbing”, quando o animal se ergue apoiando-se nas paredes do aparato; “rearing”, postura ereta sem apoio contra as paredes; e “immobility”, em que o animal permanece completamente imóvel, indicando possível inibição comportamental. Comportamentos de cuidado corporal, como “front-paw licking”, “hind-paw licking”, “face grooming” e “body grooming”, são observados como parte da auto-higiene natural do animal. No contexto do teste Hole Board, destacam-se ainda os comportamentos diretamente relacionados ao aparato: o “edge-sniff”, quando o animal fareja apenas a borda dos buracos, e o “head-dip”, que consiste na inserção da cabeça do animal dentro de um dos orifícios até o nível das orelhas (Casarrubea et al., 2023).

Os comportamentos citados acima são utilizados como parâmetros objetivos para inferência de estados emocionais e exploratórios. O número de “head-dips” é particularmente valorizado como índice de exploração ativa (neofilia), sendo inversamente correlacionado ao nível de ansiedade do animal, ou seja, animais menos ansiosos tendem a realizar mais inserções de cabeça nos buracos, enquanto aqueles mais ansiosos evitam esse tipo de exploração. Além disso, outros indicadores como a frequência de “rearing”, o grau de locomoção (número de cruzamentos entre quadrantes ou distância percorrida) e os períodos de “freezing” (imobilidade completa) são comumente analisados em conjunto, compondo um perfil comportamental multifatorial do animal frente ao ambiente de teste (Brown e Nemes, 2008; Casarrubea et al., 2023).

Figura 1 - Repertório comportamental em ratos no aparato Hole-Board.



Walking (Wa): locomoção ativa com exploração olfativa do ambiente; *Immobil-Sniffing (IS):* farejamento sem deslocamento; *Climbing (CI):* postura ereta com apoio nas paredes de acrílico; *Rearing (Re):* postura ereta sem apoio; *Immobility (Im):* imobilidade completa; *Front-Paw Licking (FPL):* lambedura das patas anteriores; *Hind-Paw Licking (HPL):* lambedura das patas posteriores; *Face Grooming (FG):* fricção da face

(orelhas, boca, vibrissas, olhos) com movimentos circulares das patas anteriores; *Body Grooming (BG)*: lambadura do corpo com movimentos de escovação com os incisivos; *Edge-Sniff (ES)*: olfação da borda de um dos orifícios; *Head-Dip (HD)*: inserção da cabeça em um dos orifícios da placa perfurada. *Fonte:* Casarrubea et al., 2023.

Gravações são feitas por vídeo ou sensores infravermelhos (fotocélulas), conferindo a precisão dos eventos. Parâmetros como número total de “head-dips”, frequência de “rearing”, movimentos entre quadrantes e tempo de imobilidade são tabulados. Em algumas análises avançadas, dados comportamentais são integrados por análise de padrões temporais (*T-patterns*) ou *z-scores*, aumentando sensibilidade e reprodutibilidade (Labots et al., 2015; La-Vu et al., 2020).

Para controle experimental, recomenda-se padronizar linhagem, sexo, idade e horário de teste (preferencialmente no início da fase escura, ativa para roedores), bem como higienização entre sessões para evitar pistas olfativas. Em estudos farmacológicos, os animais são pré-tratados com compostos ansiolíticos ou ansiogênicos, geralmente administrados 30 minutos antes do teste, permitindo comparar alterações no “head-dip” e seus correlatos.

3. BASES NEUROANATÔMICAS E NEUROQUÍMICAS

O comportamento observado no Hole Board Test está sustentado por circuitos cerebrais centrais envolvidos com exploração, ansiedade e tomada de decisão. Estruturas-chave incluem o córtex pré-frontal (CPF), o núcleo accumbens (NAc) e o complexo amigdalo-hipocampal, que, por meio de interações com o sistema mesolímbico e mesocortical, modulam a curiosidade inata e o controle de possíveis ameaças (Ogawa & Watabe-Uchida, 2018; Muñoz et al., 2020).

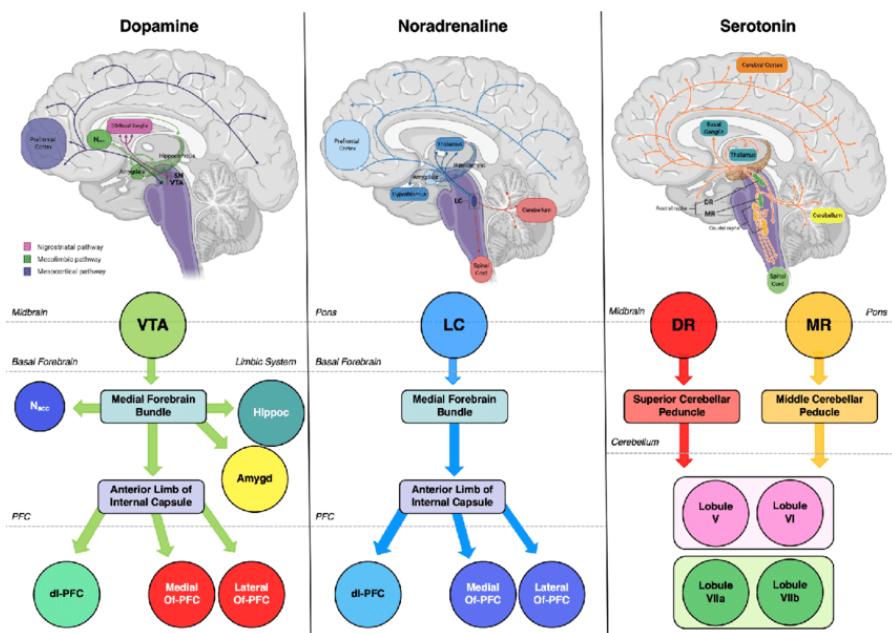
A via dopaminérgica mesolímbica, originada na área tegmental ventral (ATV) e projetada para o NAc e CPF, é essencial para reforço motivacional e exploração ativa. Alterações na liberação de dopamina estão diretamente relacionadas ao número de “head-dips”; fármacos ansiolíticos modulam esses níveis e promovem aumento do comportamento exploratório (Ogawa & Watabe-Uchida, 2018).

O sistema serotoninérgico, proveniente do núcleo do rafe dorsal, projeta-se de forma ampla e regula a ansiedade e o impulso exploratório via receptores 5 HT_{1A} e 5 HT_{2A} localizados no CPF, amígdala e gânglios basais. A ativação desses receptores pode reduzir o comportamento exploratório, diminuindo “head-dips”. Além disso, a neurotransmissão gabaérgica nos circuitos cortico-estriatais, amigdalo-hipocampais e no tálamo exerce efeito inibitório modulador, atuando como freio à excitação excessiva. Fármacos facilitadores do GABA (ácido gama-aminobutírico), como benzodiazepínicos, aumentam o “head-dip” ao reduzir a ansiedade (Hrdina, 2002; Casarrubea et al., 2023).

As vias noradrenérgicas, originadas no locus coeruleus, modulam o nível de ativação cortical e a vigilância comportamental, afetando respostas como “walking”, “edge-sniff” e “head-dip” em função do aumento da atenção e da responsividade a estímulos ambientais (Ogawa & Watabe-Uchida, 2018).

Em modelos que avaliam a relação entre comportamento exploratório e memória espacial, como nas variações do teste Hole Board, em que determinados orifícios contêm recompensa (furos ‘isca’, ou baited holes), observa-se ativação significativa de regiões do hipocampo, especialmente dos subcampos CA1 e CA3. Essas áreas são fundamentais para a consolidação da memória espacial e o reconhecimento de ambientes previamente explorados. Estudos demonstram que alterações na liberação do neurotransmissor glutamato nessas regiões estão associadas a diminuição do comportamento exploratório em sessões subsequentes do teste, indicando possível formação de memória de familiaridade com o ambiente (Pitsikas; Kaffe; Markou, 2012).

Figura 2 - Representação esquemática das principais vias monoaminérgicas no sistema nervoso central de roedores: À esquerda, a via dopaminérgica mostra projeções da área tegmental ventral (VTA) e da substância negra (SN) para o núcleo *accumbens*, córtex pré-frontal, hipocampo e outras regiões subcorticais; Ao centro, a via noradrenérgica evidencia projeções originadas no *locus coeruleus*, com amplas conexões para o córtex, cerebelo e tálamo, associadas ao estado de alerta e atenção; À direita, a via serotoninérgica, parte dos núcleos do rafe dorsal e mediano, projetando-se extensivamente para o sistema límbico e o neocôrtex, envolvida na modulação emocional, ansiedade e comportamento exploratório.



Fonte: D'Ambrosio et al. (2021).

4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAS

O Hole Board Test é comumente inserido em estudos farmacológicos pré-clínicos para avaliar compostos ansiolíticos e ansiogênicos. Estudos demonstram que fármacos como o diazepam aumentam significativamente o número de “head dips”, enquanto ansiogênicos como o FG7142 reduzem esse comportamento, validando o teste como sensível à modulação do estado emocional de roedores (Tsuji et al., 2000-não listado; Casarrubea et al., 2021).

A versão modificada do teste Hole Board, conhecida como Modified Hole Board (mHB), mescla elementos do campo aberto e interações sociais, possibilitando a análise simultânea de exploração, ansiedade, cognição e sociabilidade em um único paradigma. Esse método maximiza a eficiência experimental e reduz o estresse animal, além de permitir inferências translacionais relevantes. O mHB também é empregado para estudar diferenças genético-comportamentais, por exemplo, em linhagens com alta ou baixa ansiedade inata, revelando variações na exploração e na motivação social conforme predisposições emocionais (Ohl, Holsboer & Landgraf, 2001; Labots et al., 2015).

Na esfera cognitiva, uma variação do Hole-Board tradicional, conhecida como 4-Hole Board Test tem sido empregada para a avaliação de memória espacial de trabalho e de referência. Diferente do protocolo convencional, que utiliza múltiplos orifícios distribuídos pela arena para medir exploração espontânea e ansiedade, o modelo 4-Hole apresenta matriz reduzida de quatro furos dispostos de forma sistemática, com alguns desses furos contendo recompensas previamente associadas (furos isca). O desempenho do animal é avaliado com base na capacidade de reconhecer, ao longo de sessões repetidas, quais furos contêm recompensa, inferindo-se assim processos de aprendizado, memória espacial e familiaridade com o ambiente. Essa abordagem permite mensurar componentes cognitivos sem a necessidade de reforços aversivos, sendo particularmente útil em modelos translacionais de cognição, como na investigação de déficits associados ao envelhecimento, lesões hipocampais ou neurodegeneração (D'isa; Comi; Leocani, 2021).

Do ponto de vista translacional, paradigmas baseados em conflitos de aproximação e esquiva (“approach-avoidance conflict”) semelhantes ao Hole-Board têm sido adaptados para estudos com humanos, inclusive com uso de neuroimagem funcional. Esses modelos permitem avaliar, em paralelo ao que se faz em roedores, como a ansiedade influencia decisões frente a estímulos ambíguos ou com valência mista, facilitando a comparação entre dados pré-clínicos e clínicos (Mcnaughton; Corr, 2014; Kirlic, Young & Aupperle, 2017).

Estudos recentes também demonstraram que a análise de padrões temporais (“T-Patterns”), como sequências “edge-sniff/head-dip”, oferece robustos indicadores emocionais. Por exemplo, com o uso de ansiolíticos (diazepam), a caminhada (“walking”) passa a integrar essas sequências, enquanto em estados elevados de ansiedade (induzida??? com FG7142), ela desaparece, evidenciando sensibilidade comportamental e maior validade para estudos farmacodinâmicos (Casarrubea et al., 2021, 2023).

5. LIMITAÇÕES E DESAFIOS METODOLÓGICOS

Apesar de amplamente utilizado, o Hole Board test apresenta desafios significativos relacionados à reproduzibilidade e interpretação ambígua dos comportamentos. Uma revisão sistemática envolvendo 206 estudos com o uso do diazepam revelou grande variabilidade de efeitos sobre o número de head-dips, sugerindo prática de “HARKing” (hipóteses formuladas após os resultados), o que compromete a validade dos achados (File & Wardill, 1975; Casarubea et al., 2021). Outro problema crítico é a habituação rápida ao aparelho. Testes repetidos tendem a reduzir a exploração por familiaridade, o que pode mascarar efeitos de tratamentos quando o protocolo não controla adequadamente esse efeito (File e Wardill, 1975).

A interpretação do head-dip como medida inversa de ansiedade também é controversa. Em ambientes com níveis variáveis de aversividade (iluminação), estudos clássicos demonstraram que essa relação se mantém apenas ou somente dentro de um determinado intervalo. Em condições altamente aversivas, o head-dip pode representar tentativa de fuga, não exploração, invertendo seu significado (Bilkei-Gorzo e Gyertyán, 1997).

A confiabilidade “test-retest”, mensurada por coeficientes de correlação entre comportamentos repetidos ao longo do tempo, demonstrou variações significativas no Hole-Board Test. Em roedores, valores entre 0,31 e 0,99 foram observados, dependendo de fatores como intervalo entre sessões, padronização do ambiente e homogeneidade do grupo experimental — evidenciando a importância do controle rigoroso de variáveis para garantir resultados reproduutíveis (File & Wardill, 1975).

Ademais, a difícil dissociação entre ansiedade e alterações motoras ou sedativas induzidas por fármacos apresenta-se como outra questão. Redução na exploração pode tanto refletir ansiedade aumentada como sedação, exigindo uso de testes complementares (como campo aberto) ou análises multivariadas para discriminar esses efeitos (Bilkei-Gorzo & Gyertyán, 1997).

Por fim, a falta de padronização em aspectos como linhagem, sexo, horário de teste e intensidade luminosa prejudica a comparabilidade entre estudos. Protocolos sem documentação detalhada apresentam baixa replicabilidade, refletindo um problema mais amplo de rigor

científico nas neurociências comportamentais (Ferland-Beckham et al., 2021). Ainda assim, ensaios pré-clínicos como o Hole Board permanecem fundamentais para a compreensão das bases neurobiológicas do comportamento, pois permitem integrar dimensões cognitivas e emocionais de forma controlada e mensurável. Quando conduzidos com rigor metodológico, esses modelos oferecem um elo valioso entre a experimentação animal e a prática clínica, contribuindo para o desenvolvimento de novas terapias e para a tradução do conhecimento neurocientífico em benefícios concretos à saúde mental.

REFERÊNCIAS

- BILKEI-GORZÓ, A.; GYERTYÁN, I. Some doubts about the basic concept of hole-board test. **Neurobiology**, v. 4, n. 4, p. 405-415, 1996.
- BROWN, G. R.; NEMES, C. The exploratory behavior of rats in the hole-board apparatus: is head-dipping a valid measure of neophilia? **Behavioural Processes**, v. 78, n. 3, p. 442-448, 2008.
- CALCAGNI, G.; CABALLERO-GARRIDO, E.; PELLÓN, R. Behavior stability and individual differences in Pavlovian extended conditioning. **arXiv**, v. 11, 2018.
- CASARRUBEA, M.; DI GIOVANNI, G.; AIELLO, S.; CRESCIMANNO, G. The hole-board apparatus in the study of anxiety. **Physiology & Behavior**, v. 271, p. 114346, 2023.
- CASARRUBEA, M.; DI GIOVANNI, G.; CRESCIMANNO, G. Effects of different anxiety levels on the behavioral patternings investigated through T-pattern analysis in Wistar rats tested in the hole-board apparatus. **Brain Sciences**, v. 11, p. 714, 2021.
- D'AMBROSIO, A. et al. Disruption of brainstem monoaminergic fibre tracts in multiple sclerosis as a putative mechanism for cognitive fatigue: a fixel-based analysis. **NeuroImage: Clinical**, v. 30, p. 102587, 2021.
- D'ISA, R.; COMI, G.; LEOCANI, L. The 4-hole-board test for assessment of long-term spatial memory in mice. **Current Protocols**, v. 1, n. 8, p. e228, 2021.
- FERLAND-BECKHAM, C. et al. Systematic review and methodological considerations for the use of single prolonged stress and fear extinction retention in rodents. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 15, p. 652636, 2021.
- FILE, S. E.; WARDILL, A. G. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. **Psychopharmacologia**, v. 44, n. 1, p. 53-59, 1975.
- HRDINA, P. Neurobiology of mental illness. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 27, n. 6, p. 451-452, 2002.
- KIRLIC, N.; YOUNG, J.; AUPPERLE, R. L. Animal to human translational paradigms relevant for approach-avoidance conflict decision making. **Behaviour Research and Therapy**, v. 96, p. 14-29, 2017.

LABOTS, M.; VAN LITH, H. A.; OHL, F.; ARNDT, S. S. The modified hole-board: measuring behavior, cognition and social interaction in mice and rats. **Journal of Visualized Experiments**, n. 98, p. 52529, 2015.

LA-VU, M.; TOBIAS, B. C.; SCHUETTE, P. J.; ADHIKARI, A. To approach or avoid: an introductory overview of the study of anxiety using rodent assays. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 14, p. 145, 2020.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. Approach, avoidance, and their conflict: the problem of anchoring. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 8, p. 124, 2014.

MUÑOZ, A.; LOPEZ-LOPEZ, A.; LABANDEIRA, C. M.; LABANDEIRA-GARCIA, J. L. Interactions between the serotonergic and other neurotransmitter systems in the basal ganglia: role in Parkinson's disease and adverse effects of L-DOPA. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 14, p. 26, 2020.

OGAWA, S. K.; WATABE-UCHIDA, M. Organization of dopamine and serotonin system: anatomical and functional mapping of monosynaptic inputs using rabies virus. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 174, p. 9-22, 2018.

OHL, F.; HOLSBØER, F.; LANDGRAF, R. The modified hole-board as a differential screen for behavior in rodents. **Behavior Research Methods, Instruments, & Computers**, v. 33, n. 3, p. 392-397, 2001.

PITSIKAS, N.; KAFFE, E.; MARKOU, A. The metabotropic glutamate 2/3 receptor antagonist LY341495 differentially affects recognition memory in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 230, n. 2, p. 374-379, 2012.

CAPÍTULO XX

ASPECTOS NEUROFISIOLÓGICOS DO TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

NEUROPHYSIOLOGICAL ASPECTS OF THE MORRIS WATER MAZE TEST

DOI: 10.51859/amplia.nat298.1126-20

Vinícius Bandeira Moura ¹
Maurício Fraga van Tilburg ²

¹ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará – Brasil.

² Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade estadual do Ceará – ISB/UECE – Brasil.

RESUMO

O teste do labirinto aquático de Morris (MWM) é um dos paradigmas comportamentais mais consolidados na neurociência para a avaliação da memória espacial e do aprendizado em roedores. Desenvolvido por Richard Morris em 1984, o MWM se destaca por minimizar interferências motoras e motivacionais, utilizando pistas visuais distais em um ambiente aquático padronizado. Este capítulo revisa os aspectos fundamentais do protocolo experimental do MWM, abordando desde a preparação do aparato até a análise comportamental, incluindo variáveis como latência de escape, distância percorrida e padrões de nado. São discutidas as bases neuroanatômicas, com ênfase no papel central do hipocampo e suas sub-regiões, além da contribuição do córtex pré-frontal na modulação do comportamento exploratório. Também são explorados os mecanismos neuroquímicos relacionados aos principais neurotransmissores envolvidos, como serotonina, dopamina e glutamato, e suas implicações na plasticidade sináptica e na formação de memórias. O capítulo ainda destaca as aplicações translacionais do MWM no estudo de doenças neurodegenerativas, lesões cerebrais traumáticas e distúrbios do neurodesenvolvimento, consolidando sua relevância como ferramenta pré-clínica na avaliação de fármacos e intervenções terapêuticas. Por fim, são apresentadas as principais limitações metodológicas do teste, como fatores ambientais, genéticos e estratégias não-espaciais adotadas pelos animais, que devem

ser cuidadosamente controlados para garantir a validade dos resultados.

Palavras-chave: Memória espacial. Hipocampo. Neurotransmissores. Labirinto aquático de Morris.

ABSTRACT

The Morris Water Maze (MWM) test is one of the most established behavioral paradigms in neuroscience for evaluating spatial memory and learning in rodents. Developed by Richard Morris in 1984, the MWM is distinguished by its ability to minimize motor and motivational biases, relying on distal visual cues in a standardized aquatic environment. This chapter reviews the essential aspects of the MWM experimental protocol, from apparatus preparation to behavioral analysis, including key variables such as escape latency, swim path, and search strategies. It also discusses the neuroanatomical foundations, highlighting the central role of the hippocampus and its subregions, as well as the contribution of the prefrontal cortex in modulating exploratory behavior. Neurochemical mechanisms are explored, emphasizing the involvement of neurotransmitters such as serotonin, dopamine, and glutamate in synaptic plasticity and memory formation. Furthermore, the translational applications of the MWM are addressed, particularly its use in animal models of neurodegenerative diseases, traumatic brain injuries, and neurodevelopmental disorders, reinforcing its relevance as a preclinical tool for evaluating cognitive function and therapeutic

interventions. Finally, the main methodological limitations of the test are discussed, including environmental, genetic, and procedural variables that must be carefully controlled to ensure data reliability and reproducibility.

Keywords: Spatial memory. Hippocampus. Neurotransmitters. Morris maze water.

1. INTRODUÇÃO

O Teste do Labirinto Aquático de Morris (MWM, do inglês Morris Water Maze) é uma ferramenta comportamental amplamente utilizada na neurociência para investigar a memória espacial e o aprendizado em roedores (Nunez, 2008). Desenvolvido por Richard Morris em 1984, em um modelo de rato e posteriormente adaptado para camundongos, este teste se tornou um padrão ouro devido à sua capacidade de avaliar a memória dependente do hipocampo de forma robusta e confiável (Morris, 1984; Vorhees & Williams, 2006).

Diferente de outros métodos, o MWM minimiza a influência de fatores não-cognitivos, como motivação e habilidades motoras, ao exigir que o animal utilize pistas espaciais distais para localizar uma plataforma submersa em uma piscina de água opaca (McNamara & Skelton, 1993).

A relevância do MWM reside na sua aplicabilidade para o estudo de diversas condições neurológicas e psiquiátricas que afetam a cognição, incluindo doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, lesões cerebrais traumáticas, e transtornos do neurodesenvolvimento. Se configurando provavelmente como o teste comportamental mais utilizado para a avaliação de memória e aprendizado espacial em roedores (Tucker *et al.*, 2018).

Desta forma, o objetivo deste capítulo é abordar os pontos chaves do protocolo experimental do teste do labirinto aquático de Morris, bem como seus aspectos neuroquímicos, neuroanatômicos e suas especificidades.

2. MODELO EXPERIMENTAL

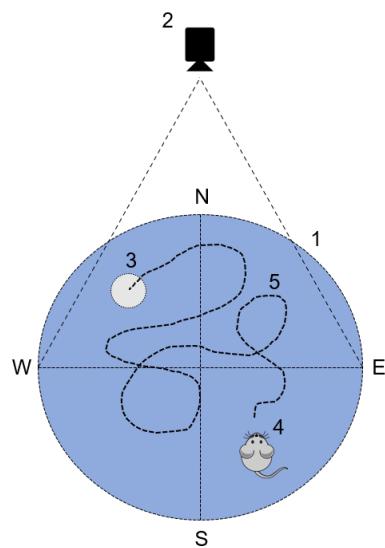
O modelo do labirinto aquático de Morris envolve a utilização de uma piscina circular preenchida com água e uma plataforma de escape móvel, podendo em diferentes situações estar submersa ou acima da água. A água deve ser opaca, geralmente pela adição de tinta não tóxica ou leite em pó, algo que deve impedir a visualização da plataforma pelo animal (Nunez, 2008).

A piscina deverá conter cerca de 1,8 metro de diâmetro e 60 centímetros de profundidade, estas dimensões podem variar entre os estudos, devido a utilização de modelos animais murinos diferentes. Por fim, a água deve ser mantida na faixa de 24 – 26° C para camundongos e 20 – 22° C para ratos. Além disso, a piscina deve ser dividida, de forma abstrata, em 4 quadrantes: N, S, E e W (Vorhees & Williams, 2006).

A sala de experimentação deve ser constituída de um ambiente sem estímulos, o avaliador deve se afastar do aparato metodológico para que a sua presença não seja um viés para a experimentação.

Anteriormente ao teste deve ser feito o treinamento dos animais, para que possam se habituar ao aparato e entendam que a forma de escape é a plataforma. Desta forma, a plataforma de escape deve estar suspensa, cerca de 2,5 cm acima da água, posicionada no centro da piscina. Cada animal deverá passar por 3 tentativas consecutivas, onde inicialmente coloca-se o animal por 20 segundos na plataforma, logo depois coloque o animal em uma das 4 posições do quadrante da piscina. Abaixe-o na água de forma suave evitando assim, estresse, e deixe-o na água por 60 segundos.

Figura 1 - Visão Vertical do Aparato do Teste do Labirinto Aquático de Morris



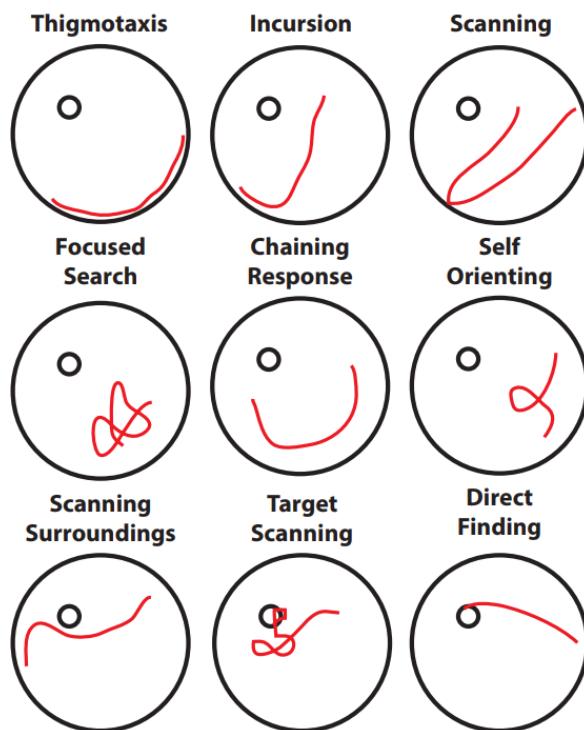
Legenda: Representação do Aparato do Teste do Labirinto Aquático de Morris. **1:** Piscina; **2:** Câmera gravadora; **3:** Base de escape; **4:** Animal de experimentação; **5:** Caminho percorrido pelo animal. **Fonte:** Os autores.

Para o teste, a plataforma de escape deverá ficar submersa à cerca de 2,5 cm da água, o teste inicia quando o pesquisador coloca o animal em um dos quadrantes e deixa-o na água por 60 segundos. Ao todo, deve ser realizado o teste em triplicata para cada quadrante, por fim, pode ser realizado o teste de sondagem, onde é retirada a plataforma de escape da piscina e o animal tenderá a buscá-la, esta variação do labirinto aquático de Morris é bastante utilizada para avaliar a capacidade de memorização do animal pela localização da plataforma de escape (Nunez, 2008).

Diversas variáveis podem ser observadas no labirinto aquático de Morris, como a rota de nado, distância percorrida, velocidade de natação e o tempo gasto no quadrante. A análise desses dados permite observar déficits cognitivos, assim como, inferir sobre a capacidade de memória espacial e a capacidade de aprendizagem (Vorhees & Williams, 2006).

Existem diversos padrões de nado possíveis para este teste, isso demonstra os diferentes tipos de comportamentos dos animais, de acordo com o tipo de experimentação, a figura 2 demonstra alguns dos possíveis comportamentos (Vouros *et al.*, 2018).

Figura 2 - Classes Comportamentais.



Legenda: **Thigmotaxis:** busca pela borda da piscina; **Incursion:** nado para o centro da piscina; **Scanning:** busca aleatória ao centro da piscina; **Focused Search:** nado em pequena região; **Chaining Response:** nado em círculo; **Self Orienting:** nado em loop para se orientar; **Scanning Surroundings:** nado próximo a plataforma de escape, mas se afasta; **Target Scanning:** procura pela plataforma de escape e muda de percurso ao redor dela; **Direct Finding:** nado direto para a plataforma.

Fonte: Vouros *et al.*, 2018.

3. BASES NEUROANATÔMICAS E NEUROQUÍMICAS DO TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

O labirinto aquático de Morris se demonstra uma avaliação vantajosa em relação a outros métodos que avaliam memória e aprendizagem, sobretudo pela sua aptidão em separar déficits na formação da memória de déficits nos processos sensoriais, motores, motivacionais e de recuperação (McNamara & Skelton, 1993).

O hipocampo é uma estrutura localizada na região medial do lobo temporal de ambos os lados cerebrais, responsável pela formação, armazenamento e organização de novas memórias (Knierim *et al.*, 2015).

Esta estrutura desempenha um papel crucial para a formação de novas memórias, sobretudo a declarativa, sendo crucial para a consolidação de novas informações de curto e longo

prazo. Além disso, é essencial para a aprendizagem espacial, atuando como uma espécie de “mapa cognitivo” que nos permite explorar e recordar locais, principalmente pela grande presença das denominadas *place cells* que disparam potenciais de ação em locais específicos do ambiente (Avigan *et al.*, 2020; Rolls, 2022).

Do ponto de vista emocional, o hipocampo atua em conjunto com a amígdala, processando e organizando as informações captadas, além de recuperar e formar memórias de eventos, adicionando o contexto temporal e espacial as informações captadas pela amígdala (Proiner *et al.*, 2023).

Por fim, esta pequena região, é uma das poucas regiões a participar da neurogênese, formação de novos neurônios, no indivíduo adulto, processo associado à capacidade de plasticidade sináptica, a formação de novas memórias e a adaptação a novos ambientes (Fares *et al.*, 2019).

Embora o hipocampo seja uma estrutura única, ele pode ser dividido em porção dorsal e porção ventral, porções que desempenham papéis distintos. A porção dorsal é associada ao desempenho espacial e à memória, onde estudos demonstraram que lesões nessa região podem prejudicar de forma significativa a capacidade de memória espacial e navegação, como observado em experimentação no labirinto aquático de Morris (Othman *et al.*, 2022).

Por outro lado, a porção ventral está mais envolvida com o processamento de emoções e a motivação, onde uma lesão nesta região não traria grandes diferenças na memória ou navegação do animal no labirinto aquático de Morris, mas sim, no seu comportamento, onde lesões nesta porção estão associados a transtornos neurológicos, psiquiátricos e dentre outros (Mansk, 2020).

Outro ponto crucial, são as denominadas *place cells*, que são responsáveis por disparar potenciais de ação em locais específicos do labirinto, criando uma espécie de mapa cognitivo das novas regiões exploradas pelo animal. Estas células estão presentes em sub-regiões do hipocampo, chamadas de CA1 e CA3 e desempenham papel importante para a navegação e memória (Othman *et al.*, 2022).

O córtex pré-frontal é uma região do cérebro que possui grande importância para as funções cognitivas. Entre suas funções destacam-se o planejamento, execução de comportamentos complexos e a tomada de decisões (Friedman & Robbins, 2021).

No contexto do teste do labirinto aquático de Morris, embora o hipocampo seja associado à memória espacial, portanto, de forma clássica difere maior participação, o córtex pré-frontal desempenha papel significativo de modulação da busca pela resolução do teste (Vorhees & Williams, 2006).

Disfunções nesta região podem levar a déficits na flexibilidade comportamental e na capacidade de alternar entre diferentes estratégias de busca, resultando em uma performance prejudicada no teste do labirinto aquático de Morris. Além disso, a interação córtex pré-frontal e hipocampo é crucial para o desenvolvimento da aprendizagem espacial e da memória, permitindo que os animais ajustem a sua forma de agir a partir de informações pré-existentes (Wang & Cai, 2006; Ragozzino, 2007).

A serotonina é um neurotransmissor que atua em diferentes funções cognitivas, entre elas a memória e o aprendizado espacial. A manipulação dos níveis de serotonina ou a atividade de seus receptores pode contribuir para a mudança da latência de escape e o tempo gasto no quadrante alvo do experimento, além disso, a redução de serotonina em regiões específicas, pode modificar a aprendizagem e a atividade do hipocampo. Baixas quantidades do receptor de serotonina também possuem influência na neuroplasticidade e sensibilidade ao estresse, promovendo variações na performance do labirinto aquático de Morris (Wert-Carvajal *et al.*, 2022).

A dopamina desempenha um papel diverso na aprendizagem e memória, influenciando a motivação e a consolidação da memória espacial. O sistema dopaminérgico pode modular a formação da memória espacial e aprendizagem a partir dos receptores D1 presentes no giro dentado do hipocampo, onde a superativação deste sistema traz resultados prejudiciais aos animais em experimentação (Wang *et al.*, 2024).

Vale ressaltar que, a interação entre os sistemas dopaminérgicos e o serotoninérgico possui grande influência no desempenho dos roedores no labirinto aquático de Morris, sobretudo na perspectiva que estes neurotransmissores desempenham papéis fundamentais na regulação de mecanismos cognitivos, como a memória espacial, a ansiedade, motivação e a resposta ao estresse (Russo *et al.*, 2012).

Por fim, podemos ressaltar a ação do glutamato, considerado um dos principais neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso central, sendo crucial para os mecanismos de plasticidade sináptica, essencial para a memória e o aprendizado espacial. Os receptores muscarínicos (M1, M4 e M5) e os receptores metabotrópicos de glutamato são atualmente alvos importantes na busca fármacos que atuem no sistema nervoso com terapia para deficiências cognitivas, sendo essenciais para a preservação dos processos cognitivos (Wieronska *et al.*, 2023).

4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS

O teste do labirinto aquático de Morris superou sua função primária como ferramenta de pesquisa básica, tornando-se instrumento para a investigação de distúrbios cognitivos em

modelos de experimentação animal, com implicações diretas para a compreensão e tratamento de condições humanas. Ressalta-se a capacidade de detectar déficits na memória espacial e no aprendizado (Tucker *et al.*, 2018).

Uma das aplicações clínicas do MWM é no estudo de doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer e a doença de Parkinson. Em modelos animais de Alzheimer, como camundongos transgênicos que expressam mutações associadas à doença, o labirinto aquático de Morris é amplamente utilizado para observar déficits de memória espacial que mimetizam os sintomas cognitivos observados em pacientes humanos (Liang *et al.*, 2024).

Embora a doença de Parkinson seja caracterizada por distúrbios motores, o MWM pode ser empregado para investigar mecanismos cognitivos não motores que estejam correlacionados à doença, permitindo avaliar esses déficits em modelos animais, auxiliando na identificação de mecanismos subjacentes e na avaliação de novas abordagens terapêuticas (Iravani & Shoaib, 2024).

Podemos citar também, a lesão cerebral traumática, onde o labirinto aquático de Morris é um dos métodos comportamentais mais empregados para avaliar déficits cognitivos em roedores após lesões cerebrais traumáticas, que frequentemente resulta em sintomas cognitivos persistentes, incluindo disfunções executoras e déficits de memória. Isto permite o estudo dos eventos desencadeados por este tipo de lesão e a eficácia de terapias na recuperação da função cognitiva. Vale ressaltar que estas lesões impactam o sistema nervoso central de forma difusa, sendo crucial cautela nas interpretações dos resultados (Budinich *et al.*, 2013).

Por fim, podemos citar a natureza translacional do teste que reside na sua capacidade de preencher a lacuna entre a pesquisa básica e a clínica. Ao fornecer um modelo robusto para avaliar a função cognitiva em roedores, o MWM é uma ferramenta essencial no pipeline de desenvolvimento de fármacos. Novos compostos com potencial terapêutico para distúrbios cognitivos podem ser testados no MWM para determinar sua capacidade de reverter ou atenuar os déficits de memória. Os resultados obtidos em modelos animais podem então guiar a seleção de candidatos a fármacos para ensaios clínicos em humanos, acelerando o processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos (Tucker *et al.*, 2018).

5. LIMITES E DESAFIOS METODOLÓGICOS

Diversos fatores podem influenciar a performance dos animais no teste do labirinto aquático de Morris, tornando a interpretação dos resultados mais complexa. A idade e a linhagem dos roedores são variáveis críticas, pois a capacidade de aprendizagem e memória espacial pode variar significativamente entre diferentes grupos etários e genéticos. Por exemplo, animais mais

velhos ou certas linhagens podem apresentar déficits cognitivos basais que precisam ser considerados (Vorhees & Williams, 2006).

O estresse também é um fator importante, onde níveis elevados de estresse podem prejudicar a performance no MWM, afetando a motivação, a exploração e a capacidade de consolidação da memória. Além disso, fatores ambientais, como a iluminação, a temperatura da água e a presença de ruídos, também podem influenciar os resultados. A consistência dessas condições ao longo de todos os ensaios e entre os grupos experimentais é essencial para garantir a reproduzibilidade dos dados. Ainda podemos ressaltar que, a experiência prévia do animal com testes comportamentais ou a exposição a certas substâncias pode afetar sua performance no labirinto aquático de Morris (Othman *et al.*, 2022).

Outro desafio significativo é a interpretação das estratégias de busca, pela plataforma, utilizadas pelos animais. Idealmente, o MWM avalia a aprendizagem espacial baseada em pistas distais, que reflete a função do hipocampo, no entanto, os animais podem empregar estratégias não-espaciais, como a busca aleatória, especialmente em fases iniciais do treinamento ou em condições de déficit cognitivo, a falha em distinguir entre essas estratégias pode levar a conclusões errôneas sobre a natureza dos déficits de memória (Gehring *et al.*, 2015).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste do labirinto aquático de Morris permanece como um importante modelo comportamental na neurociência, sendo capaz de fornecer informações detalhadas sobre a memória espacial e o aprendizado. Ao compreender suas bases neurofisiológicas podemos explorar com maior profundidade as interações entre estruturas cerebrais e neurotransmissores envolvidos nos processos cognitivos. No entanto, a interpretação dos dados obtidos deve considerar diversos fatores que podem influenciar de forma significativa nas discussões.

Se faz necessário um avanço na padronização dos protocolos, a incorporação de tecnologias de rastreamento automatizado e o uso combinado com outras abordagens neurobiológicas para ampliar ainda mais seu poder explicativo, mantendo o labirinto aquático de Morris como um modelo central na investigação da cognição e dos transtornos neurológicos.

REFERÊNCIAS

AVIGAN, Philip D.; CAMMACK, Katharine; SHAPIRO, Matthew L. Flexible spatial learning requires both the dorsal and ventral hippocampus and their functional interactions with the prefrontal cortex. *Hippocampus*, v. 30, n. 7, p. 733-744, 2020.

BUDINICH, Craig S. et al. Short and long-term motor and behavioral effects of diazoxide and dimethyl sulfoxide administration in the mouse after traumatic brain injury. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 108, p. 66-73, 2013.

FARES, Jawad et al. Neurogenesis in the adult hippocampus: history, regulation, and prospective roles. **International Journal of Neuroscience**, v. 129, n. 6, p. 598-611, 2019.

FRIEDMAN, Naomi P.; ROBBINS, Trevor W. The role of prefrontal cortex in cognitive control and executive function. **Neuropsychopharmacology**, v. 47, n. 1, p. 72-89, 2022.

GEHRING, Tiago V. et al. Detailed classification of swimming paths in the Morris Water Maze: multiple strategies within one trial. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 14562, 2015.

MANSK, Lara Monteiro Zanetti et al. Formação de múltiplas memórias hipocampo-dependentes: o aprendizado como interferência. 2020.

MCNAMARA, Robert K.; SKELTON, Ronald W. Effects of intracranial infusions of chlordiazepoxide on spatial learning in the Morris water maze. I. Neuroanatomical specificity. **Behavioural brain research**, v. 59, n. 1-2, p. 175-191, 1993.

MORRIS, Richard. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 11, n. 1, p. 47-60, 1984.

NUNEZ, Joseph. Morris water maze experiment. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 19, p. 897, 2008.

OTHMAN, Muhammad Zulfadhli; HASSAN, Zurina; HAS, Ahmad Tarmizi Che. Morris water maze: a versatile and pertinent tool for assessing spatial learning and memory. **Experimental animals**, v. 71, n. 3, p. 264-280, 2022.

IRAVANI, Mahmoud M.; SHOAIB, Mohammed. Executive dysfunction and cognitive decline, a non-motor symptom of Parkinson's disease captured in animal models. **International Review of Neurobiology**, v. 174, p. 231-255, 2024.

KNIERIM, James J. The hippocampus. **Current biology**, v. 25, n. 23, p. R1116-R1121, 2015.

LIANG, Yaowei et al. Effect of acute stress on working memory in pilots: Investigating the modulatory role of memory load. **Plos one**, v. 19, n. 1, p. e0288221, 2024.

TUCKER, Laura B.; VELOSKY, Alexander G.; MCCABE, Joseph T. Applications of the Morris water maze in translational traumatic brain injury research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 88, p. 187-200, 2018.

RAGOZZINO, Michael E. The contribution of the medial prefrontal cortex, orbitofrontal cortex, and dorsomedial striatum to behavioral flexibility. **Annals of the New York academy of sciences**, v. 1121, n. 1, p. 355-375, 2007.

ROLLS, Edmund T. et al. The effective connectivity of the human hippocampal memory system. **Cerebral Cortex**, v. 32, n. 17, p. 3706-3725, 2022.

RUSSO, Scott J. et al. Neurobiology of resilience. **Nature neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 1475-1484, 2012.

WERT-CARVAJAL, Carlos et al. Dopamine and serotonin interplay for valence-based spatial learning. **Cell reports**, v. 39, n. 2, 2022.

WIEROŃSKA, Joanna M. et al. Activation of metabotropic glutamate receptor (mGlu2) and muscarinic receptors (M1, M4, and M5), alone or in combination, and its impact on the acquisition and retention of learning in the Morris water maze, NMDA expression and cGMP synthesis. **Biomolecules**, v. 13, n. 7, p. 1064, 2023.

VORHEES, Charles V.; WILLIAMS, Michael T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. **Nature protocols**, v. 1, n. 2, p. 848-858, 2006.

VOUROS, Avgoustinos et al. A generalised framework for detailed classification of swimming paths inside the Morris Water Maze. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 15089, 2018.

ZHANG, Tracy D. et al. How well do rodent models of Parkinson's disease recapitulate early non-motor phenotypes? A systematic review. **Biomedicines**, v. 10, n. 12, p. 3026, 2022.

CAPÍTULO XXI

TESTE DE INDUÇÃO DE CATATONIA COM ANTIPSICÓTICOS EM ROEDORES

CATATONIA INDUCTION TEST WITH ANTIPSYCHOTICS IN RODENTS

DOI: 10.51859/amplia.nat298.1126-21

Vitória Emily Guimarães do Nascimento ¹
Gerllanny Mara de Souza Lopes ²
Camila Nogueira dos Santos ¹
Mariliz Victória Freitas Silva ³
Gislei Frota Aragão ⁴

¹Mestranda em Medicina Translacional. Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional. Universidade Federal do Ceará - UFC.

²Doutoranda em Medicina Translacional. Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional. Universidade Federal do Ceará - UFC.

³Graduada em Enfermagem pela Universidade Estadual do Ceará - UECE.

⁴Professor Adjunto. Universidade Estadual do Ceará – UECE.

RESUMO

O teste de indução de catatonia avalia a catalepsia em roedores. O método mais utilizado é a indução com antipsicóticos e a avaliação é feita principalmente pelo teste de barra. O objetivo deste capítulo é descrever o teste de indução de catatonia com antipsicóticos em roedores. Existem diferenças entre os modelos experimentais, o que dificulta a padronização do teste. Assim, foram selecionados cinco estudos para evidenciar suas particularidades, como equipamento utilizado, condições ambientais e parâmetros de controle, e a realização do procedimento. Estudos demonstraram que a catatonia pode estar relacionada ao bloqueio de receptores dopamínergicos D1 e D2, mas também há o envolvimento de outros sistemas, como o serotonínérigo e o GABAérgico. Dessa forma, esse teste apresenta relevância translacional tanto para a triagem de novas drogas psicóticas quanto para análise de outros distúrbios em roedores. Todavia, as diferenças metodológicas podem influenciar na intensidade da catalepsia, dificultando a comparação e a reprodução dos dados, sendo necessário a padronização de protocolos.

Palavras-chave: Comportamento. Neurociências. Modelos Animais.

ABSTRACT

The catatonia induction test assesses catalepsy in rodents. The most commonly used method is antipsychotic induction, and assessment is primarily performed using the pull-up bar test. The objective of this chapter is to describe the antipsychotic catatonia induction test in rodents. Differences exist between experimental models, making standardization difficult. Therefore, five studies were selected to highlight their specificities, such as equipment used, environmental conditions, control parameters, and procedure execution. Studies have shown that catatonia may be related to the blockade of dopaminergic D1 and D2 receptors, but other systems, such as serotonergic and GABAergic, are also involved. Therefore, this test has translational relevance both for screening new psychotic drugs and for analyzing other disorders in rodents. However, methodological differences can influence the intensity of catalepsy, making comparison and replication of data difficult, necessitating standardization of protocols.

Keywords: Behavior. Neurosciences. Models Animal.

1. INTRODUÇÃO

A catatonia é uma síndrome neuropsiquiátrica caracterizada por sinais motores, afetivos e comportamentais (Rogers *et al.*, 2023). O termo “catatonia”, também denominado de “loucura da tensão”, foi descrito pela primeira vez pelo psiquiatra alemão Karl Ludwig Kahlbaum, em 1874, caracterizando-se inicialmente pela alternância entre excitação e estupor seguida por uma fase de movimentos anormais (Kahlbaum, 1874; Rogers *et al.*, 2023).

Para Kahlbaum, a catatonia seria uma entidade nosológica única com curso clínico distinto, mas isso não foi bem aceito na época (Rasmussen; Mazurek; Rosebush, 2016). Em 1899, Emil Kraepelin incorporou a catatonia no conceito de demência precoce, e, posteriormente, Eugen Bleuler (1911) manteve-a como subtipo da esquizofrenia. Essa visão permaneceu na 9^a revisão da Classificação Internacional de Doenças (CID-9) e na 3^a edição revisada do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-III-R) (Nunes, 2015).

Atualmente já é bem estabelecido que a catatonia não se restringe apenas à esquizofrenia e pode se manifestar tanto em outras condições psiquiátricas quanto em condições clínicas gerais, como transtorno de humor, psicose pós-parto, transtorno do espectro autista, infecções no sistema nervoso central, doenças autoimunes e endócrinas, entre outros (Castro; Leal; Del-Ben, 2024; Rogers; Wilson; Oldham, 2025). Assim, de acordo com o estudo de Hirjak *et al.*, (2024), estima-se que dentre os pacientes psiquiátricos cerca de 9% apresentam características de catatonia, enquanto que na população geral a incidência é de 10,6 (IC 95% 10,0-11,1) por 100.000 pessoas/ano (Hirjak *et al.*, 2024).

A CID-11 definiu 15 características clínicas da catatonia relacionadas a diminuição da atividade psicomotora (olhando, ambitidência, negativismo, estupor, mutismo), aumento da atividade psicomotora (hiperatividade extrema) e atividade psicomotora anormal (caretas, maneirismos, postura, estereotipia, rigidez, ecolalia, verbigeração, flexibilidade cerosa e catalepsia). Essas características devem estar presentes por horas e gerar prejuízo funcional ou representar risco de complicações ao indivíduo. Além disso, a catatonia apresenta quatro diagnósticos: catatonia não especificada, catatonia induzida por substâncias ou medicamentos, catatonia associada a outro transtorno mental e síndrome de catatonia secundária. Esta divisão contribui para melhor compreensão da síndrome (Rogers; Wilson; Oldham, 2025).

No contexto pré-clínico, o teste de indução de catatonia em roedores é baseado no fato de que algumas espécies de ratos e camundongos quando expostos a uma droga antipsicótica apresentam intensa rigidez muscular (Chaves; Oliveira; Melo, 2012). Geralmente, quando o animal

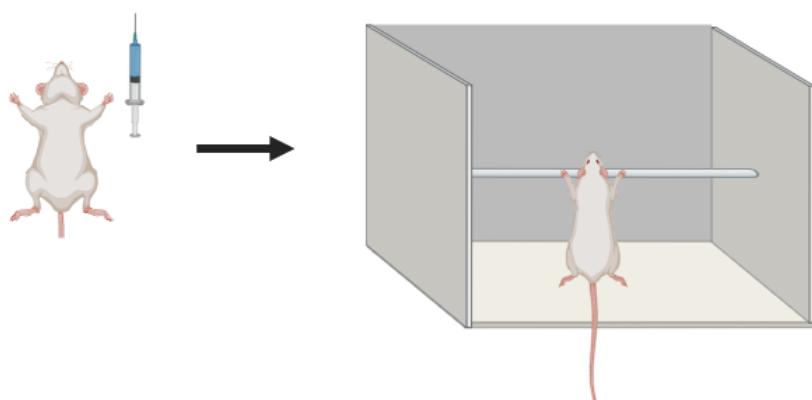
é colocado em uma postura incomum, ele muda de posição rapidamente. Todavia, um animal induzido a catatonia mantém a postura anormal por um tempo maior (Sanberg *et al.*, 1988).

Existem muitas maneiras de induzir e avaliar a catatonia nos roedores. Conforme visto na revisão de escopo de Mallien *et al.* (2024), a maioria dos modelos experimentais utilizam tratamento farmacológico para a indução, todavia há metodologias com abordagens de reprodução, animais geneticamente modificados ou outros métodos estressores (Mallien *et al.*, 2024). Para a avaliação da catatonia, o teste comumente empregado é o teste de barra, descrito originalmente por Kuschinsky e Hornykiewicz, em 1972, que avalia um dos componentes motores da catatonia, a catalepsia (Sanberg *et al.*, 1988; Kuschinsky; Hornykiewicz, 1972). Diante disso, o objetivo deste capítulo é descrever o teste de indução de catatonia com antipsicóticos em roedores.

2. MODELOS EXPERIMENTAIS

Para a realização do teste de indução da catatonia é utilizado o teste de barra, que envolve colocar as patas dianteiras do camundongo ou rato em uma barra após a administração de um antipsicótico (Figura 1). A altura deve ser ajustada proporcionalmente de acordo com o tamanho do animal de tal forma que os membros posteriores fiquem apoiados no chão. O parâmetro avaliado é o tempo que o roedor leva para retornar a sua postura normal, sendo esse tempo considerado a medida da catalepsia (Samal; Rebelo; Pandit, 2019).

Figura 1 - Teste de indução de catatonia em roedor



Fonte: Elaboração própria (Biorender.com), 2025.

Apesar de ser considerado um teste de fácil execução, há diferenças metodológicas entre os autores, o que dificulta a padronização de um protocolo (Sanberg *et al.*, 1988). Devido a isto, cinco estudos foram selecionados e organizados (Quadro 1) de modo a evidenciar as

particularidades de cada protocolo do teste de indução da catatonia em roedores com antipsicóticos (Quadro 2).

Quadro 1 – Caracterização dos estudos selecionados

Estudo	Autores	Ano de publicação	Título
1	Hoffman; Donovan	1995	<i>Catalepsy as a rodent model for detecting antipsychotic drugs with extrapyramidal side effect liability</i>
2	Ohno <i>et al.</i>	2008	<i>Anticataleptic 8-OH-DPAT preferentially counteracts with haloperidol-induced Fos expression in the dorsolateral striatum and the core region of the nucleus accumbens</i>
3	Azam <i>et al.</i>	2010	<i>Design, synthesis and anti-Parkinsonian evaluation of 3-alkyl/aryl-8-(furan-2-yl)thiazolo[5,4-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidine-2(3H)-thiones against neuroleptic-induced catalepsy and oxidative stress in mice</i>
4	Colombo	2011	Avaliação do estado emocional associado à catalepsia causada pela administração intraperitoneal de haloperidol
5	Bricker; Sampson; Ablorodeppay	2014	<i>Evaluation of the potential of antipsychotic agents to induce catalepsy in rats: Assessment of a new, commercially available, semi-automated instrument</i>

Fonte: Elaboração própria, 2025.

Quadro 2 – Descrição dos parâmetros adotados nos estudos

Estudo	Animais (peso)	Ambiente	Antipsicótico (dose)	Aparato para o teste	Duração máxima do teste
1	Ratos Sprague-Dawley machos (200-350 g)	Os experimentos foram realizados durante o período claro do ciclo claro/escuro e temperatura controlada a 21+1°C	Clozapina, haloperidol, olanzapina, raclopride, risperidona	Barra horizontal coberta com um tubo de borracha com 1 cm de diâmetro posicionado a 10 cm acima da superfície	60 segundos
2	Camundongos machos ddY (25-35 g)	-	Haloperidol (0,5 mg/kg)	Barra horizontal posicionada a 5 cm acima da superfície	30 segundos
3	Camundongos Swiss machos (18-25 g)	Os experimentos foram realizados entre 8:00 e 15:30 h em uma sala com temperatura controlada (23 ± 1°C), e intensidade luminosa de 20 lux.	Haloperidol (5 mg/kg)	Câmera de madeira (comprimento, 23 cm; largura, 10,5 cm; altura, 9 cm) com uma barra de metal fixada a 9 cm acima do chão, e a 4 cm da parte de trás da caixa	300 segundos

Estudo	Animais (peso)	Ambiente	Antipsicótico (dose)	Aparato para o teste	Duração máxima do teste
4	Ratos Wistar machos (200-250 g)	Os experimentos foram realizados durante o período claro do ciclo claro/escuro e temperatura de 22 a 25°C	Haloperidol (0,5 e 1,0 mg/kg)	Caixa acrílica com dimensões 25 x 25 x 39 cm contendo furos posicionados a 8 cm de altura nas paredes laterais, destinados ao encaixe horizontal de barra acrílica	600 segundos
5	Ratos Sprague-Dawley machos (120-200 g)	Temperatura controlada a 24 ± 2 °C	Haloperidol (0,29 mg/kg), clozapina (até 40 mg/kg), olanzapina (até 40 mg/kg)	Caixa com barra metálica cilíndrica horizontal de 1,3 cm de diâmetro a uma altura de 10 cm com piso de aço inoxidável	30 segundos

Fonte: Elaboração própria, 2025.

2.1. EQUIPAMENTO NECESSÁRIO E DIMENSÕES ESPECÍFICAS DO APARATO

É utilizado uma barra horizontal posicionada a uma determinada altura sobre uma superfície de apoio. O diâmetro da barra foi descrito apenas em um artigo (Bricker; Sampson; Ablordeppey, 2014). Os estudos de Azam *et al.* (2010), Colombo (2011) e Bricker, Sampson, Ablordeppey (2014) utilizaram aparelhos específicos para o encaixe da barra, respectivamente: uma câmara de madeira (23 x 10,5 x 9 cm), uma caixa de acrílico (25 x 25 x 39 cm) e uma metálica.

Em relação a altura, para os camundongos a barra foi colocada 5 e 9 cm acima da superfície, enquanto que para os ratos a altura variou de 8 a 10 cm (Hoffman; Donovan, 1995; Ohno *et al.*, 2008; Azam *et al.*, 2010; Colombo, 2011; Bricker; Sampson; Ablordeppey, 2014). A altura da barra é um parâmetro relevante para o teste, visto que se a barra for muito alta é improvável que o animal permaneça sobre ela por tempo significativo, independente de outros fatores (Sanberg *et al.*, 1996).

2.2. CONDIÇÕES AMBIENTAIS E PARÂMETROS DE CONTROLE

O teste é realizado durante o período claro do ciclo claro/escuro, em local reservado com intensidade luminosa e temperatura controladas (Azam *et al.*, 2010). O ambiente do teste pode influenciar em resultados discrepantes, por isso deve-se considerar a iluminação do ambiente, o cheiro ou a visualização de outro animal, um novo ambiente e ruídos (Sanberg *et al.*, 1996).

2.3. PROCEDIMENTO

2.3.1. Ratos

No estudo de Hoffman e Donovan (1995) foi utilizado ratos Sprague-Dawley machos. Os animais receberam clozapina, haloperidol, olanzapina, raclopride e risperidona, as doses não foram especificadas no artigo. As substâncias foram administradas 15 ou 30 minutos antes do teste. Foi avaliado o tempo que o animal permaneceu com as patas na barra. O teste foi encerrado quando pelo menos uma pata dianteira tocasse a superfície da mesa ou após 60 segundos do início do teste. O teste foi repetido durante 2 horas com intervalo de 30 minutos, ou seja, 0, 30, 60 90 e 120 minutos (Hoffman; Donovan, 1995).

No estudo de Colombo (2011), ratos machos da linhagem Wistar receberam haloperidol intraperitoneal na concentração de 1,0 ou 0,5 mg/ml, nas doses de 0,5 e 1,0 mg/kg, e o grupo controle recebeu salina. Após posicionar o animal no aparato com as patas dianteiras sobre a barra e patas traseiras ao chão, verificou-se a latência para a retirada das patas 15, 30, 45 e 60 minutos após a administração da substância. Foi estabelecida uma latência máxima de 600 segundos para retirada das patas da barra, após esse período o tempo era interrompido (Colombo, 2011).

No estudo de Bricker, Sampson, Ablordeppey (2014) o teste foi realizado com roedores machos da linhagem Sprague-Dawley. Após 60 minutos da administração, por via intraperitoneal, de haloperidol, clozapina, olanzapina ou veículo de ácido láctico a 1% filtrado, foi realizado o teste de barra por 30 segundos. Foi repetida a avaliação aos 3 e 6 minutos do início da primeira tentativa. O sistema de câmara semiautomatizado utilizado mensurou o tempo de contato mantido entre o chão e a barra e coletou os dados mediante um *software* de computador (Bricker; Sampson; Ablordeppey, 2014).

2.3.2. Camundongos

No estudo de Ohno *et al.* (2008), camundongos machos ddY receberam haloperidol intraperitoneal, sendo utilizado duas doses: 0,5 e 1 mg/kg. Após o animal ser colocado na barra, o tempo de catalepsia foi monitorado por 30 segundos, sendo considerada a postura cataléptica a imobilidade do roedor com as duas mãos na barra (Ohno *et al.*, 2008).

Em outro estudo, camundongos Swiss receberam haloperidol 5 mg/kg, intraperitoneal. A sessão durou 3 horas e o teste foi repetido a cada 30 minutos. Para medir a catalepsia, o animal foi levantado suavemente até que as patas dianteiras segurassem a barra. Em seguida, após o corpo do camundongo ser liberado, o cronômetro foi iniciado. O tempo que o animal levou para soltar ambas as patas dianteiras da barra, até no máximo 300 segundos, foi definido como o tempo de descida (Azam *et al.*, 2010).

3. BASES NEUROANATÔMICAS E NEUROQUÍMICAS

De acordo com a revisão de escopo elaborada por Mallien *et al.* (2024), os principais sistemas associados a catatonia nos roedores estão relacionados à neurotransmissão, sendo os mais evidenciados entre os estudos os sistemas de neurotransmissores envolvidos aos comportamentos psicomotores, incluindo o dopaminérgico, serotoninérgico e GABAérgico (Mallien *et al.*, 2024).

3.1. SISTEMA DOPAMINÉRGICO

Os antipsicóticos, principalmente aqueles com alta afinidade pelos receptores dopaminérgicos D1 e D2, induzem a catatonia em roedores por meio do bloqueio dos receptores de dopamina no corpo estriado (Wadenberg, 1996). Estudos experimentais demonstraram que os animais que receberam haloperidol apresentaram um estado de hiporreatividade em relação aos animais que receberam o veículo (Bricker; Sampson; Ablordeppey, 2014; Colombo, 2011). Além disso, antipsicóticos com pouca ação inibitória nos receptores dopaminérgicos nigroestriatais, como por exemplo a clozapina, produzem pouca ou nenhuma alteração comportamental nos animais (Sanberg *et al.*, 1988).

3.2. SEROTONINÉRGICO

A revisão de Wadenberg (1996) destacou evidências que sugerem que drogas que ativam determinados receptores de serotonina podem bloquear a catatonia, devido à interação com o sistema dopaminérgico. Segundo o estudo, agonistas dos receptores de serotonina 5-HT1A revertam a catalepsia provocada por antagonistas dos receptores de dopamina D1 e D2 agindo em autorreceptores 5-HT no núcleo da rafe mediana. Enquanto que os agonistas do receptor 5-HT2A/C antagonizam a catalepsia induzida pelo bloqueio do receptor D2 (Wadenberg, 1996).

O estudo de Silva, Futuro-Neto, Pires (1995) testou duas drogas antagonistas do receptor da serotonina 5-HT3, a bemesetrona e a granisetrona. Foi evidenciado que em doses baixas ocorre a redução ou inibição da catalepsia induzida pelo haloperidol, porém, em doses elevadas, o estado de rigidez é aumentado (Silva; Futuro-Neto; Pires, 1995). Investigações complementares verificaram que a buspirona e outros agonistas da serotonina, principalmente, aqueles de maior afinidade aos receptores 5-HT, revertem o efeito cataleptogênico, diferentemente de outros medicamentos com afinidades a outros receptores da serotonina ou com fraca afinidade. Esses achados são sugestivos de que os receptores 5-HT modulam os efeitos motores relacionados a catatonia de forma dose-dependente (McMillen; Scott; Davanzo, 1988).

3.3. GABAÉRGICO

Além dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico, o sistema GABAérgico também exerce influência sobre as alterações motoras associadas a catatonia em roedores (Di Chiara *et al.*, 1978). Conforme descrito por Worms, Willigens, Lloyd (1978), os agonistas dos receptores GABA (ácido gama-aminobutírico) potencializam o efeito cataleptogênico de antipsicóticos por meio da ativação desses receptores. Esse achado sugere que o aumento da atividade dos receptores GABA reduz a excitabilidade de neurônios dopaminérgicos, afetando a liberação de dopamina na fenda sináptica. Esse efeito pode ocorrer a nível da substância negra, visto que os receptores GABA estão presentes nos corpos celulares e dendritos dos neurônios dopaminérgicos (Worms; Willigens; Lloyd, 1978).

4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS

O teste de indução de catatonia em roedores apresenta grande relevância translacional, sendo utilizado para triagem do perfil de novas drogas antipsicóticas para avaliar o potencial de induzirem efeitos extrapiramidais. A diferença entre as doses que apresentam atividade terapêutica e as doses que induzem efeitos colaterais variam a depender do fármaco, a margem de diferença pode ser pequena, como é o caso do haloperidol, ou alta, como observado com a clozapina. Assim, a catalepsia apresentada pelos roedores com a droga equivale aos sintomas extrapiramidais observados em humanos, demonstrando a validade preditiva do teste (Gobira *et al.*, 2013).

Além disso, esse teste também é uma ferramenta para analisar outros distúrbios em roedores, como a Doença de Parkinson (DP) (Castagné; Moser; Porsolt, 2009). A catalepsia induzida por haloperidol é um modelo clássico no qual manifestações motoras comuns da DP são provocadas pela administração de medicamentos, contribuindo para a investigação de novos fármacos com ação protetora (Azam *et al.*, 2010). O haloperidol aumenta os radicais livres levando ao estresse oxidativo. Ocorre o aumento da lipoperoxidação lipídica (LPO), diminuição da glutatona reduzida (GSH) e das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GSH-Px) (Azam *et al.*, 2010).

5. LIMITAÇÕES E DESAFIOS METODOLÓGICOS

A variabilidade associada à aplicação do teste de barra para avaliar a catatonia destacou-se entre as principais limitações identificadas na literatura. A presença de parâmetros pouco padronizados podem influenciar os resultados, dificultando a comparação entre os estudos e a

reprodução dos achados. Para mais, é válido destacar que a intensidade do efeito de catalepsia é influenciada pelas diferenças metodológicas, colaborando para dificuldades relacionadas à análise dos resultados. Neste contexto, é necessário validar protocolos padronizados visando o controle de variáveis (Sanberg et al., 1988).

Observou-se que a falta de detalhamento dos métodos utilizados em alguns estudos pode resultar em lacunas importantes, visto que algumas particularidades podem não ser mencionadas, podendo influenciar a análise dos efeitos catalépticos. No estudo de Sanberg et al. (1988) evidenciaram que algumas adversidades “sutis” podem influenciar a análise de catalepsia, por exemplo, a manipulação do animal, as características do animal, aspectos singulares ao aparato e ambiente fazem parte das condições que podem interferir nos resultados.

Apesar do teste de barra ser amplamente utilizado para avaliação da catatonia em roedores, ele pode apresentar limitações quanto à sensibilidade para detecção de efeitos catalépticos. Segundo os autores Hoffman e Donovan (1995), o teste em grade demonstrou ser um pouco mais sensível na detecção de efeitos catalépticos em comparação ao teste de barra. Logo, reforça a importância de abordagens complementares para avaliação da catalepsia, o que pode justificar a observação de diferenças metodológicas entre os autores.

Adicionalmente, o uso de sistemas semi-automatizados para o teste de catalepsia demonstra resultados promissores, mas ainda enfrenta desafios técnicos. Bricker, Sampson e Ablordeppay (2014) evidenciaram problemas iniciais relacionados ao *software*, como a recuperação de dados e falha ocasional associada ao registro de tempo, além de desafios associados ao posicionamento do animal. Assim, são recomendadas melhorias no sistema para coleta mais automatizada de dados sem a exigência de comandos adicionais.

AGRADECIMENTOS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

REFERÊNCIAS

AZAM, F. et al. Design, synthesis and anti-Parkinsonian evaluation of 3-alkyl/aryl-8-(furan-2-yl)thiazolo[5,4-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidine-2(3H)-thiones against neuroleptic-induced catalepsy and oxidative stress in mice. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 818–826, 2010.

BRICKER, B.; SAMPSON, D.; ABLORDEPPEY, S. Y. Evaluation of the potential of antipsychotic agents to induce catalepsy in rats: assessment of a new, commercially available, semi-automated instrument. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 120, p. 1-18, 2014.

CASTAGNÉ, V.; MOSER, P. C.; PORSOLT, R. D. Preclinical Behavioral Models for Predicting Antipsychotic Activity. **Preclinical Requisites for Antipsychotics**, v. 57, p. 381-418, 2009.

CASTRO, R. A. M.; LEAL, L. R.; DEL-BEN, C. M. Catatonia. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 57, n. 1, p. 1-8, 2024.

CHAVES, C. S. L. O.; OLIVEIRA, A. A.; MELO, F. R. M. Avaliação do potencial antipsicótico da lamotrigina em camundongos. **Interbio**, v. 6, n.1, p. 46-53, 2012.

COLOMBO, A. C. **Avaliação do estado emocional associado à catalepsia causada pela administração intraperitoneal de haloperidol**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu. São Paulo, p. 56. 2011.

DI CHIARA, G. *et al.* Evidence that nigral GABA mediates behavioural responses elicited by striatal dopamine receptor stimulation. **Life Sci.**, v. 23, p. 2045-2052, 1978.

GOBIRA, P. H. *et al.* Animal models for predicting the efficacy and side effects of antipsychotic drugs. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, p. 132-139, 2013.

HIRJAK, D. *et al.* Catatonia. **Nature reviews disease primers**, v. 10, n. 49, p. 1-18, 2024.

HOFFMAN, D. C.; DONOVAN, H. Catalepsy as a rodent model for detecting antipsychotic drugs with extrapyramidal side effect liability. **Psychopharmacology**, v. 120, n.2, p. 128-133, 1995.

KAHLBAUM, K. L. **Die Katatonie oder das Spannungssirresein**. Berlin, Germany: Verlag August Hirshwald, 1874.

KUSCHINSKY, K.; HORNYKIEWICZ, O. Morphine catalepsy in the rat: relation to striatal dopamine metabolism. **European Journal of Pharmacology**, v. 19, p. 119-122, 1972.

MALLIEN, A. S. *et al.* A systematic scoping review of rodent models of catatonia: Clinical correlations, translation and future approaches. **Schizophrenia Research**, v. 263, p. 109-121, 2024.

MCMILLEN, B. A.; SCOTT, S. M.; DAVANZO, E. A. Reversal of neuroleptic-induced catalepsy by novel aryl-piperazine anxiolytic drugs. **J Pharm Pharmacol**, v. 40,n. 12, p. 885-887, 1988.

NUNES, A. L. S. **Classificação e avaliação da síndrome catatônica**. Dissertação (Mestrado em Psiquiatria e Saúde Mental) - Instituto de Psiquiatria, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p. 66. 2015.

OHNO, Y. *et al.* Anticataleptic 8-OH-DPAT preferentially counteracts with haloperidol-induced Fos expression in the dorsolateral striatum and the core region of the nucleus accumbens. **Neuropharmacology**, v. 55, n.5, p. 717-23, 2008.

RASMUSSEN, S. A.; MAZUREK, M. F.; ROSEBUSH, P. Catatonia: Our current understanding of its diagnosis, treatment and pathophysiology. **World J Psychiatry**, v. 6, n. 4, p. 391-398, 2016.

ROGERS, J. P. *et al.* Evidence-based consensus guidelines for the management of catatonia: Recommendations from the British Association for Psychopharmacology. **Journal of Psychopharmacology**, v. 37, n. 4, p. 327-369, 2023.

ROGERS, J. P.; WILSON, J. E.; OLDHAM, M. A. Catatonia in ICD-11. **BMC Psychiatry**, v. 25, n. 1, p. 1-10, 2025.

SAMAL, J. REBELO, A. L. PANDIT, A. A window into the brain: Tools to assess pre-clinical efficacy of biomaterials-based therapies on central nervous system disorders. **Advanced drug delivery reviews**, v. 148, p. 68-145, 2019.

SANBERG, P. R. *et al.* The catalepsy test: its ups and downs. **Behavioral Neuroscience**, v. 102, n. 5, p. 748-759, 1988.

SANBERG, P. R. *et al.* The Catalepsy Test Is a Standardized Method Possible? **Motor Activity and Movement Disorders**, p. 197-211, 1996.

SILVA, S. R.; FUTURO-NETO, H. A.; PIRES, J. G. P. Effects of 5-HT3 Receptor Antagonists on Neuroleptic-induced Catalepsy in Mice. **Neuropharmacology**, v. 34, n. 1, p. 91-99, 1995.

WADENBERG, M. Serotonergic Mechanisms in Neuroleptic-Induced Catalepsy in the rat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 20, n. 2, p. 325-339, 1996.

WORMS, P.; Willigens, M. T.; LLOYD, K. G. GABA involvement in neuroleptic-induced catalepsy. **J. Pharm. Pharmac.**, v. 30, n. 11, p. 716-718, 1978.

CAPÍTULO XXII

TESTE DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO: UM MODELO CLÁSSICO PARA AVALIAÇÃO DE ANALGÉSICOS E MECANISMOS DE DOR VISCERAL

ACETIC ACID-INDUCED WRITHING TEST: A CLASSIC MODEL FOR THE
EVALUATION OF ANALGESICS AND MECHANISMS OF VISCERAL PAIN

DOI: 10.51859/amplla.nat298.1126-22

Yury Nascimento Abreu ¹
Gerllanny Mara de Souza Lopes ²

Camila Nogueira dos Santos ³
Vitória Emily Guimarães do Nascimento ³
Gislei Frota Aragão ⁴

¹ Graduando do curso de Biotecnologia. Universidade Federal do Ceará – UFC

² Doutoranda em Medicina Translacional. Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional- UFC

³ Mestranda em Medicina Translacional. Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional- UFC

⁴ Professor Adjunto do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) - Universidade Federal do Ceará – UFC

RESUMO

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (TCAA) é um dos modelos experimentais mais tradicionais e sensíveis para a avaliação de fármacos analgésicos e mecanismos de dor visceral. Baseia-se na administração intraperitoneal de ácido acético em roedores, o que desencadeia respostas comportamentais de contorção mediadas pela liberação de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, bradicinina e citocinas pró-inflamatórias. O método destaca-se pela simplicidade, baixo custo e alta reprodutibilidade, sendo amplamente empregado em estudos pré-clínicos para triagem de compostos sintéticos e naturais com potencial antinociceptivo. Do ponto de vista neurofisiológico, o modelo envolve a ativação coordenada de vias aferentes viscerais, mecanismos espinhais e modulação neuroquímica por neurotransmissores, como glutamato, substância P e noradrenalina. Tais processos refletem aspectos da fisiopatologia da dor visceral humana, conferindo ao TCAA

relevância translacional. Apesar de suas vantagens, o teste apresenta limitações metodológicas, como subjetividade na contagem de contorções e predomínio da resposta reflexa periférica, exigindo associação com outros modelos para maior validade clínica. Aperfeiçoamentos recentes, como a redução da concentração de ácido acético e o uso de análises comportamentais complementares, buscam aumentar sua sensibilidade e reduzir o sofrimento animal. Assim, o TCAA permanece uma ferramenta essencial na investigação de mecanismos nociceptivos e no desenvolvimento de novos agentes analgésicos.

ABSTRACT

The acetic acid-induced writhing test (AAWT) is one of the most traditional and sensitive experimental models for evaluating analgesic drugs and mechanisms of visceral pain. It is based on the intraperitoneal administration of acetic acid in rodents, which triggers characteristic writhing behaviors mediated by the release of inflammatory mediators such as prostaglandins,

bradykinin, and pro-inflammatory cytokines. This method stands out for its simplicity, low cost, and high reproducibility, being widely employed in preclinical studies for the screening of synthetic and natural compounds with antinociceptive potential. From a neurophysiological perspective, the model involves the coordinated activation of visceral afferent pathways, spinal mechanisms, and neurochemical modulation by neurotransmitters such as glutamate, substance P, and noradrenaline. These processes reflect key aspects of human visceral pain pathophysiology, giving the AAWT significant translational

relevance. Despite its advantages, the test presents methodological limitations, including subjectivity in the counting of writhes and the predominance of peripheral reflex responses, requiring combination with other models for greater clinical validity. Recent methodological refinements, such as the reduction of acetic acid concentration and the incorporation of complementary behavioral analyses, aim to increase its sensitivity while minimizing animal distress. Therefore, the AAWT remains an essential tool for investigating nociceptive mechanisms and supporting the development of new analgesic agents.

1. INTRODUÇÃO

A dor visceral é uma condição multifatorial que é muito estudada tanto fisiologistas quanto patologistas, devido à sua complexidade e impacto clínico. Dentre os métodos pré-clínicos para estudo da dor, o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (*Acetic Acid Writhing Test*), também denominado *Writhing Test*, destaca-se como um modelo robusto e amplamente validado. (Gawade, 2012)

Esse modelo experimental é muito utilizado para o estudo da dor visceral e avaliação da atividade analgésica de substâncias em roedores. Originalmente descrito por Koster, Anderson e De Beer (1959) e posteriormente validado por Collier et al. (1968), esse método consiste na indução de dor inflamatória aguda mediante administração intraperitoneal de ácido acético, desencadeando uma resposta comportamental caracterizada por contrações abdominais, alongamento do corpo e retração das patas traseiras. Essas reações são mediadas pela ativação de vias inflamatórias e nociceptivas, envolvendo a liberação de prostaglandinas, citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores químicos da dor (Gawade, 2012; Guglinski et al., 2016).

O acético acético promove a liberação de mediadores pró-inflamatórios no peritônio, como prostaglandinas, bradicinina, histamina, citocinas (TNF- α , IL-1 β) e serotonina, numa cascata que resulta em ativação de nociceptores viscerais e subsequente sinalização dolorosa ao sistema nervoso central (CNS) (Portillo-Salido et al., 2015); (Pavao-De-Souza et al., 2012). O modelo também ativa vias espinhais de sensibilidade, incluindo quinases MAP (ERK, JNK, p38) e PI3K, além de envolvimento de células gliais espinhais (minocitocina como inibidor reduz essas respostas), o que representa mecanismos moleculares bastante relevantes para o estudo da dor visceral (Yin et al., 2016).

Há especificidade e limitações farmacológicas levaram ao desenvolvimento de variantes complementares, como medidas de comportamento hedônico e locomotor, que podem persistir

além da fase aguda de contorções (até 6 h), demonstrando depressão de comportamentos motivacionais que podem ser revertidos por ibuprofeno, sugerindo relevância prática para avaliação de eficácia analgésica (Portillo-Salido *et al.*, 2015). Essa metodologia oferece dimensão translacional ao modelo, aproximando-o da complexidade da dor visceral humana, que envolve tanto estímulos nociceptivos quanto componentes emocionais.

A relevância desse modelo reside em sua simplicidade, baixo custo e alta sensibilidade para detectar diferentes classes de fármacos analgésicos, incluindo anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), opioides e compostos naturais. Além disso, o teste é amplamente aplicado em estudos pré-clínicos para triagem de novos princípios ativos, avaliação de mecanismos de ação e comparação de potenciais terapêuticos (Collier *et al.*, 1968).

O objetivo deste capítulo é informar sobre o protocolo do Teste de Contorções Abdominais, destacando seus parâmetros experimentais, controles necessários e aplicações na avaliação de compostos com potencial analgésico.

2. PROTOCOLO DO TESTE

Esse protocolo é utilizado para triagem de compostos analgésicos com ação periférica. A técnica envolve a administração intraperitoneal de ácido acético — geralmente em concentração de 0,6–1,2% (v/v), volume de 10 mL/kg — que provoca contrações rítmicas da musculatura abdominal, extensão de membros posteriores e arco dorsal (Rejón-Orantes, 2022). Tradicionalmente, o número de contorções é contado manualmente durante 20-30 minutos após a injeção, gerando uma medida quantitativa da intensidade nociceptiva.

2.1. ANIMAIS E PREPARO EXPERIMENTAL

Usam-se camundongos (*Mus musculus*), preferencialmente da linhagem Swiss ou C57BL/6, com peso entre 20–30 g, mantidos com água e ração ad libitum, em ciclo claro-escuro controlado. Recomenda-se jejum de 3–4 horas antes do teste, evitando mudanças abruptas na homeostase metabólica. O protocolo deve ser aprovado por comitê de ética em pesquisa animal, em consonância com as diretrizes de Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) (<https://arriveguidelines.org/>) e omitê de Etica no Uso de Animais (CEUA) (Batista *et al.*, 2016).

2.2. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO

Prepara-se o ácido acético diluindo-se em solução salina (0,9%). Concentrações comuns são 0,6% (10 mL/kg) ou 0,8–1,2% conforme críticos específicos. A solução deve ser fresca,

preparada no mesmo dia e mantida sob refrigeração até o uso (Rejón-Orantes, 2022). Para evitar variações, recomenda-se pesar os animais antes da administração.

2.3. ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL

O ácido acético é injetado por via intraperitoneal com agulha de calibre 25–27G, em um local livre de gordura e oblíquos. O ponto ideal é no quadrante inferior esquerdo, evitando órgãos internos. A administração deve ser feita com volume máximo de 10 mL/kg, respeitando a dor visceral induzida. Após a injeção, os animais são colocados em caixas de acrílico transparentes para observação (Rejón-Orantes, 2022).

2.4. OBSERVAÇÃO E MEDIÇÃO DAS CONTORÇÕES

Inicia-se a contagem a partir de 5 minutos após a injeção e prossegue por 20–30 minutos. Uma contorção é definida como perfilamento do corpo com arqueamento do dorso e extensão dos membros posteriores (Rejón-Orantes, 2022). A contagem idealmente ocorre em duplicata, com dois observadores cegos aos tratamentos, para reduzir viés. O delineamento experimental deve ser randômico e incluir grupos: veículo (salina), controle positivo (AINE clássico, ex.: indometacina 10 mg/kg ou diclofenaco 20 mg/kg) e grupos experimentais (ex.: extratos vegetais ou fármacos sintéticos) (Rejón-Orantes, 2022).

2.5. PARÂMETROS DE ANÁLISE

O endpoint primário é o número total ou média de contorções por animal. O efeito analgésico é expresso como percentagem de inibição em relação ao controle, calculado pela fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = [(\text{Contorções controle} - \text{Contorções tratadas}) / \text{Contorções controle}] \times 100$$

Para análises estatísticas, utilizam-se ANOVA seguida de testes post-hoc (Tukey ou Dunnett), com nível de significância $p < 0,05$ (Batista *et al.*, 2016). Amostra típica é de 6–10 animais por grupo, suficiente para detecção de diferenças significativas.

2.6. APERFEIÇOAMENTOS METODOLÓGICOS RECENTES

Recentemente, propôs-se uma avaliação expandida que separa fases das contorções em leve, moderada, intensa e sequências comportamentais, gerando uma escala compósita e aumentando sensibilidade e precisão estatística — reduzindo número de animais necessários (Rejón-Orantes, 2022). Outro avanço é a redução do protocolo para 10 minutos com concentração

de 0,5%, mantendo sensibilidade a analgésicos, conforme Rejón-Orantes et al. (2022), o que reduz sofrimento animal(Rejón-Orantes, 2022).

3. BASE NEUROANATOMICA E NEUROQUÍMICA

A compreensão do teste de contorções abdominais exige o entendimento das bases neuroanatômicas e neuroquímicas que fundamentam a percepção da dor visceral. As vias aferentes viscerais classificam-se em duas grandes categorias: fibras vagais, que possuem limiar sensorial baixo e levam informações sobretudo fisiológicas ao tronco encefálico, e fibras espinhais (principalmente A δ e C), que transmitem estímulos nociceptivos intensos à medula espinal, terminando nos cornos dorsais I, II e V, e ativando mecanismos de convergência viscerossomática (Chen *et al.*, 2014).

Nos níveis medulares, as fibras aferentes viscerais sinaptam com neurônios de segunda ordem em regiões específicas. Parte dessa informação é encaminhada através de neurônios pós-sinápticos ascendentes na coluna dorsal (PSDC), que ascendem até os núcleos grátil e cuneiforme, posteriormente projetando-se ao tálamo (via gracil-cuneata), enquanto parte é transmitida pela via espinotalâmica (spinothalamic tracts) e espinorreticular, que se encarregam dos aspectos discriminativos e emocionais da dor, respectivamente (Fusayasu *et al.*, 2007); (Cervero *et al.*, 2014).

Essas vias aferentes utilizam uma gama de neurotransmissores e neuromoduladores que determinam a excitabilidade neuronal e a amplificação da dor. Fibras viscerais expressam substância P, neurocinina A/B, calcitonina gene-related peptide (CGRP), glutamato, além de receptores sensitivos, como TRPV1 e canais iônicos (Nav, Kv7). A atividade sináptica destes mediadores é modulada por GABA_B no nível pré-sináptico, reduzindo a liberação de substância P e, assim, atenuando a nocicepção visceral (Fusayasu *et al.*, 2007); (Koopman *et al.*, 2010).

A amplificação central da dor (sensibilização central) nos testes de contorções é evidenciada pela ativação de vias de sinalização inflamatórias — proteínas quinases como ERK, JNK, p38 e PI3-K — e ativação de microglia e astrócitos na medula espinal, demonstrando que a dor visceral induzida por ácido acético envolve mecanismos moleculares clássicos da neuroinflamação (Pavao-De-Souza *et al.*, 2012). Esse fenômeno aumenta a excitabilidade neuronal, diminuindo o limiar de resposta a estímulos subsequentes e contribuindo para a robustez do modelo experimental.

Embora o Teste de Contorções Abdominais seja frequentemente interpretado como predominantemente periférico, evidências indicam que sistemas monoaminérgicos — particularmente vias noradrenérgicas — podem modular tanto a sensibilidade basal quanto a

eficácia analgésica de fármacos testados nesse modelo. Em camundongos, combinações sistêmicas de diclofenaco com agonistas α_1 (fenilefrina) ou α_2 (clonidina) produziram interações supra-aditivas no *writhing* por ácido acético, sugerindo facilitação antinociceptiva por ativação adrenérgica extraespinal e/ou espinal integrada ao efeito anti-inflamatório do AINE (Miranda; Sierralta; Pinardi, 2001).

Achados anteriores já demonstravam que a antinocicepção induzida por clonidina em testes químicos (incluindo contorções por ácido acético) é modulada diferencialmente por antagonistas α_1 , α_2 e opioides, reforçando um papel coordenado entre receptores adrenérgicos e circuitos opioidérgicos na transmissão nociceptiva visceral (Sierralta et al., 1996). De forma complementar, a nortriptilina exibiu atividade antinociceptiva dependente do sistema adrenérgico em modelos comportamentais de dor química em roedores, apoiando a ideia de que o aumento de disponibilidade noradrenérgica por inibição de recaptação pode atenuar a resposta abdominal ao estímulo irritativo (Tavakoli et al., 2018).

Ainda, a melatonina apresentou efeito antinociceptivo visceral cujo bloqueio parcial por antagonistas adrenérgicos e dopaminérgicos indica que múltiplos componentes catecolaminérgicos contribuem para a modulação descendente e/ou periférica da dor visceral induzida quimicamente (AbdeL Salam et al., 2006). Em nível de circuito, dados recentes mostram que projeções noradrenérgicas do locus coeruleus para a medula ventromedial rostral participam da hiperalgesia visceral de cólon precipitada por estresse, oferecendo um arcabouço mecanístico central que pode interagir com respostas periféricas detectadas no Teste de Contorções (Kong et al., 2023).

Em síntese, o teste de contorções abdominais mobiliza um circuito neuroanatômico que integra aferentes viscerais vagais e espinhais, projeções ascendentes via colunas dorsal, vias espinotalâmicas e reticulares, além de mecanismos neuroquímicos envolvendo glutamato, substância P, proteínas quinases e neurotransmissão gabaérgica e adrenérgica. A ativação coordenada desses sistemas explica tanto a resposta comportamental observada quanto sua utilidade para avaliação de compostos analgésicos e estudo de mecanismos fisiopatológicos da dor visceral.

4. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TRANSLACIONAIS

O Teste de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético (TCAA) é amplamente empregado como ferramenta pré-clínica para identificar potenciais compostos analgésicos. Sua sensibilidade a fármacos anti-inflamatórios e moduladores da dor periférica, especialmente os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), faz dele um modelo confiável para explorar os

mecanismos inflamatórios e prostaglandina-dependentes que também são relevantes em condições clínicas como a dismenorreia e dores viscerais inflamatórias (Kirsch et al., 2024; Mckenna; Fogleman, 2021).

Além do uso na triagem farmacológica, o TCAA oferece insights sobre a fisiopatologia da dor visceral, pois mimetiza processos bioquímicos e neuronais que ocorrem em estados inflamatórios abdominais e ginecológicos, como endometriose e síndrome do intestino irritável. Estudos recentes indicam que a liberação de prostaglandinas, bradicinina e citocinas pró-inflamatórias durante o teste é comparável a eventos observados em humanos, reforçando seu valor translacional (Ledford, 2024; (Tian *et al.*, 2023).

A aplicabilidade clínica do TCAA também se estende à avaliação de fitoterápicos e compostos naturais, frequentemente utilizados como alternativas terapêuticas. Pesquisas com extratos vegetais, como de *Ximenia americana* e *Solanum lycocarpum*, mostraram efeitos analgésicos significativos, sugerindo que o teste pode ser útil para identificar novos alvos moleculares e combinações farmacológicas de interesse clínico (Pessoa et al., 2024; Morais et al., 2024).

Por fim, abordagens sugerem integrar o TCAA com outros modelos comportamentais e biomarcadores, visando aumentar a validade translacional. A análise combinada de dados neuroquímicos e comportamentais, bem como o uso de técnicas como neuroimagem funcional, pode aproximar os resultados pré-clínicos das manifestações clínicas da dor visceral em humanos (Asiri et al., 2024; LI et al., 2023).

5. LIMITES E DESAFIOS METODOLÓGICOS

Apesar de sua ampla utilização e validação em pesquisas pré-clínicas, o Teste de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético (TCAA) apresenta limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados e no planejamento experimental.

Uma das principais críticas refere-se à subjetividade na quantificação das respostas comportamentais. A contagem manual das contorções, ainda que realizada por observadores cegos, está sujeita a variações interindividuais, podendo comprometer a reprodutibilidade entre diferentes laboratórios (Gwade, 2012; Rejón-orantes, 2022). A definição do que constitui uma "contorção", caracterizada pelo arqueamento do dorso e extensão dos membros posteriores, pode ser interpretada de forma não uniforme, especialmente em respostas de menor intensidade.

Outro ponto é a natureza predominantemente reflexa da resposta. As contorções abdominais são consideradas uma resposta espinal reflexiva à irritação peritoneal, o que levanta questões sobre a capacidade do modelo em avaliar completamente a dimensão afetivo-emocional

da dor, que envolve estruturas supraespinais (Portillo-salido et al., 2015). Dessa forma, o teste pode ser mais sensível a analgésicos de ação periférica, como os AINEs, e menos sensível a moduladores centrais da dor que atuam em vias cognitivas ou emocionais.

A especificidade farmacológica também é um desafio. Embora o modelo seja sensível a uma variedade de classes analgésicas, respostas falso-positivas podem ocorrer com compostos que induzem sedação ou imobilidade, como alguns psicotrópicos, sem que haja necessariamente um efeito antinociceptivo direto (Collier et al., 1968). Portanto, é essencial associar o TCAA a outros modelos de dor (p. ex., teste da placa quente ou teste de formalina) para confirmar a seletividade da ação analgésica.

Questões éticas relacionadas ao sofrimento animal são relevantes. O estímulo doloroso é intenso e agudo, gerando um quadro de estresse significativo no animal. Esse fator tem buscado por aperfeiçoamentos éticos, como a redução do tempo de observação (para 10 minutos) e o uso de concentrações mais baixas de ácido acético (0,5%), que mantêm a sensibilidade do teste enquanto minimizam o desconforto (Rejón-orantes, 2022).

Por fim, a tradução dos resultados para a clínica (validade translacional) requer cautela. A dor visceral humana é complexa e multifatorial, frequentemente crônica e com fortes componentes psicológicos. O TCAA, por ser um modelo de dor aguda e inflamatória, pode não capturar toda a fisiopatologia (Cervero; Lai, 2014). A integração do teste com modelos complementares que avaliam aspectos afetivos e de longo prazo da dor é uma estratégia importante para superar essa limitação.

REFERÊNCIAS

ABDEL SALAM, O. M. E.; EL-BATRAN, S.; BAIUOMY, A. R. Noradrenergic and dopaminergic modulation of melatonin visceral antinociception in mice. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, v.1, n.3, p.259-269, 2006. DOI:10.3923/jpt.2006.259.269.

ASIRI, Yahya I. *et al.* Advancing Pain Understanding and Drug Discovery: insights from preclinical models and recent research findings. **Pharmaceuticals**, [S.L.], v. 17, n. 11, p. 1439, 28 out. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph17111439>.

BATISTA, E.K.F *et al.* Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de Luehea divaricata. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 433-441, jun. 2016. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/15_140. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/yQQwSx9XzSNB9sx4CdDsXKv/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 15 jul. 2025.

CHEN, Shuping *et al.* Acupuncture for Visceral Pain: neural substrates and potential mechanisms. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2014, n. 1, p. 1-12, jan. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/609594>. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4295157/?utm_source=chatgpt.com. Acesso em: 16 jul. 2025.

CERVERO, Fernando *et al.* Pathophysiology of visceral pain. **Revista Dor**, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 1-15, 2014. GN1 Sistemas e Publicacoes Ltd.. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-0013.20140032>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rdor/a/fcjRkWvWWx9GQD7dR7Y43NP/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

CERVERO, Fernando; LAIRD, Jennifer Ma. Visceral pain. **The Lancet**, [S.L.], v. 353, n. 9170, p. 2145-2148, jun. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(99\)01306-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(99)01306-9).

COLLIER, H. O. J. *et al.* THE ABDOMINAL CONSTRICKTION RESPONSE AND ITS SUPPRESSION BY ANALGESIC DRUGS IN THE MOUSE. **British Journal Of Pharmacology And Chemotherapy**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 295-310, fev. 1968. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1968.tb00973.x>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1570212/>. Acesso em: 06 jul. 2025.

FUSAYASU, Emi *et al.* Increased plasma substance P and CGRP levels, and high ACE activity in migraineurs during headache-free periods. **Pain**, [S.L.], v. 128, n. 3, p. 209-214, abr. 2007. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2006.09.017>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17123735/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

GAWADE, Shivajip. Acetic acid induced painful endogenous infliction in writhing test on mice. **Journal Of Pharmacology And Pharmacotherapeutics**, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 348, 2012. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.4103/0976-500x.103699>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23326113/>. Acesso em: 10 jul. 2025.

GUGLINSKI, M. *et al.* Changes in saccharin preference behavior as a primary outcome to evaluate pain and analgesia in acetic acid-induced visceral pain in mice. **PHARMACOLOGY BIOCHEMISTRY AND BEHAVIOR**, v. 133, p. 47-54, jun. 2015. DOI: 10.1016/j.pbb.2015.04.008. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26504405/>

KIRSCH, Elayna *et al.* Dysmenorrhea, a Narrative Review of Therapeutic Options. **Journal Of Pain Research**, [S.L.], v. 17, p. 2657-2666, ago. 2024. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/jpr.s459584>.

KONG, Dexu *et al.* The locus coeruleus input to the rostral ventromedial medulla mediates stress-induced colorectal visceral pain. **Acta Neuropathologica Communications**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-22, 17 abr. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40478-023-01537-6>.

KOOPMAN, René *et al.* Cellular mechanisms underlying temporal changes in skeletal muscle protein synthesis and breakdown during chronic β -adrenoceptor stimulation in mice. **The Journal Of Physiology**, [S.L.], v. 588, n. 23, p. 4811-4823, 30 nov. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2010.196725>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20937713/>. Acesso em: 16 jul. 2025.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 18, p. 412, 1959.

LEDFORD, Heidi *et al.* How understudied endometriosis causes pain for hundreds of millions of women. **Nature**, [S.L.], p. 1-22, 6 nov. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/d41586-024-03628-3>.

LI, X.; WANG, J.; ZHOU, H.; et al. Modulation of brain circuits in visceral pain: implications for acupuncture and emerging neuromodulatory strategies. *Frontiers in Neuroscience*, v.17, 1212345, 2023. DOI: 10.3389/fnins.2023.1212345.

McKenna KA, Fogleman CD. Dysmenorrhea. *Am Fam Physician*. 2021 Aug 1;104(2):164-170. PMID: 34383437.

MIRANDA, H. F.; SIERRALTA, F.; PINARDI, G. An isobolographic analysis of the adrenergic modulation of diclofenac antinociception. *Anesthesia & Analgesia*, v.93, n.2, p.430-435, 2001. DOI:10.1097/00000539-200108000-00039.

MORAIS, Melissa G. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory potential, and chemical characterization of the dichloromethane fraction of Solanum lycocarpum (Solanaceae) ripe fruits by LC-DAD-MS. *Journal Of Ethnopharmacology*, [S.L.], v. 322, p. 117640, mar. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2023.117640>.

PAVAO-DE-SOUZA, Gabriela F. *et al.* Acetic acid- and phenyl-p-benzoquinone-induced overt pain-like behavior depends on spinal activation of MAP kinases, PI3K and microglia in mice. *Pharmacology Biochemistry And Behavior*, [S.L.], v. 101, n. 3, p. 320-328, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2012.01.018>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22306747/>. Acesso em: 10 jul. 2025.

PESSOA, Renata Torres *et al.* Antinociceptive Potential of Ximenia americana L. Bark Extract and Caffeic Acid: insights into pain modulation pathways. *Pharmaceuticals*, [S.L.], v. 17, n. 12, p. 1671-1699, 11 dez. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph17121671>.

PORTILLO-SALIDO, Enrique *et al.* Changes in saccharin preference behavior as a primary outcome to evaluate pain and analgesia in acetic acid-induced visceral pain in mice. *Journal Of Pain Research*, [S.L.], p. 663, out. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/jpr.s91230>.

REJÓN-ORANTES, J. del C. Extended evaluation of the acetic acid-induced writhing test in the mice. *Pharmacologyonline*, [S. l.], v. 3, p. 139-146, 2022.

SIERRALTA, F.; NAQUIRA, D.; PINARDI, G.; MIRANDA, H. F. Alpha-adrenoceptor and opioid receptor modulation of clonidine-induced antinociception. *British Journal of Pharmacology*, v.119, n.3, p.551-554, 1996. DOI:10.1111/j.1476-5381.1996.tb15707.x.

TAVAKOLI, F.; HEJAZIAN, S. H.; ANOOSHEH, S. M. Antinociceptive activity of nortriptyline through the adrenergic system: an in vivo study in mice. *International Journal of Clinical and Experimental Physiology*, v.5, n.3, p.120-124, 2018. DOI:10.5530/ijcep.2018.5.3.3.

TIAN, Siyu *et al.* Global research progress of visceral hypersensitivity and irritable bowel syndrome: bibliometrics and visualized analysis. *Frontiers In Pharmacology*, [S.L.], v. 14, p. 1-20, 2 maio 2023. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2023.1175057>.

YIN, Zhi-Yu *et al.* Antinociceptive effects of dehydrocorydaline in mouse models of inflammatory pain involve the opioid receptor and inflammatory cytokines. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-9, 7 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep27129>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep27129#citeas>. Acesso em: 15 jul. 2025.

