UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

MODULAÇÃO HORMONAL DAS ALTERAÇÕES
PSICOFISIOLÓGICAS INDUZIDAS PELO USO CRÔNICO DO
ANESTÉSICO DISSOCIATIVO KETAMINA

VERSÃO REVISADA

LÍGIA SANTOS BUENO BRASILINO

RIBEIRÃO PRETO/SP

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

MODULAÇÃO HORMONAL DAS ALTERAÇÕES
PSICOFISIOLÓGICAS INDUZIDAS PELO USO CRÔNICO DO
ANESTÉSICO DISSOCIATIVO KETAMINA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto -
USP, como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Ciências. Área:
Psicobiologia

Orientação: Prof. Dr. Manoel Jorge Nobre do
Espírito Santo

RIBEIRÃO PRETO/SP

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Bueno-Brasilino, L.S.

Modulação Hormonal das alterações Psicofisiológicas induzidas pelo uso crônico do anestésico dissociativo ketamina. 77 p.; 30 cm.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Jorge Nobre do Espírito Santo.

1. Fêmeas. 2. Ciclo estral. 3. Medo condicionado. 4. Sobressalto. 5. Ketamina. 6. Córtex pré-frontal.

*Dedico esta, bem como todas as minhas conquistas, aos meus amados pais, Maria do
Rosário e João, pelo apoio, compreensão e por sempre acreditarem em mim.
Ao meu companheiro de vida, de jornadas e de sonhos, Henrique, que com amor e
sinceridade me faz sorrir até dos meus próprios medos.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Jorge Nobre pela orientação, amizade, confiança, oportunidades e por me ensinar um pouco do muito que sabe.

À toda minha enorme família: meu porto seguro, que vibraram comigo em todos os instantes, obrigada pela força.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Pillar Prado, Roberta Monteiro, Gleice Cardoso, Fran Paliarim, Milene Carvalho, Karina Genaro, Ana Luísa Arantes, Débora Fabris e Professor Prado, obrigada pela ajuda e conselhos, foi muito bom contar com vocês.

À Dr^a Renata Ferreira pela disponibilidade em me ensinar cada detalhe, e me ajudar nos momentos de dificuldades. Você se fez presente em todos os momentos.

À Rebeca Machado, por estar sempre pronta a me ouvir e esclarecer minhas dúvidas, mesmo estando em outro departamento.

À Renata Del Moro pela atenção, conselhos e disponibilidade em nos ajudar.

À todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo a vida valer cada vez mais a pena.

Ao apoio financeiro da CAPES e da FAPESP.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin

RESUMO

BUENO-BRASILINO, L.S. Modulação Hormonal das alterações psicofisiológicas induzidas pela uso crônico do anestésico dissociativo ketamina. 2017. 77 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A ketamina, antagonista não competitivo de receptores NMDA, apresenta potentes efeitos psicomiméticos, sendo capaz de acentuar o estado psicótico de pacientes esquizofrênicos. Uma das áreas cerebrais afetadas por seu uso é o córtex pré-frontal, já que o desempenho em tarefas que dependem de sua atividade é profundamente alterado pela administração aguda de ketamina. Assim como na esquizofrenia, estas alterações podem sofrer influência de fatores hormonais, alterações estas que podem ser explicadas pelos efeitos dos hormônios sexuais femininos, como o estrogênio, os quais apresentam um papel regulador sobre os sistemas dopaminérgicos, serotoninérgicos, glutamatérgicos e GABAérgicos, todos afetados pelos efeitos agudos e crônicos do uso de ketamina. Este projeto, portanto, teve como meta avaliar os possíveis efeitos da administração crônica e retirada de ketamina sobre a expressão de comportamentos relacionados à ansiedade humana em ratas da linhagem Wistar, assim como a influência dos hormônios estradiol e a progesterona sobre esta variável. As possíveis alterações farmacológicas induzidas pela administração crônica de ketamina sobre os sistemas dopaminérgicos e serotoninérgicos da divisão pré-límbica (PrL) do córtex pré-frontal medial serão avaliadas através da injeção local de antagonista/agonista específicos. Nossos dados reforçam a ideia de que a ketamina demonstra de forma significativa a expressão da resposta aprendida de medo. E também, os dados mostram que a abstinência da droga altera este comportamento, particularmente a capacidade cognitiva relacionada ao encadeamento de estímulos. Da mesma forma que outras drogas de abuso, estas alterações parecem envolver tanto o sistema dopaminérgico quanto serotoninérgico do CPFm.

Palavras-chave: Fêmeas; Ciclo estral; Medo condicionado; Sobressalto; Ketamina; Córtex pré-frontal.

ABSTRACT

BUENO-BRASILINO, L.S. Hormonal modulation of the psychophysiological changes induced by the chronic use of the dissociative anesthetic ketamine. 2017. 77 p. Dissertation (Master degree) - Faculty of Philosophy, Sciences and Letters, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Ketamine, a non-competitive antagonist of NMDA receptors, has potent psychomimetic effects, being able to accentuate the psychotic state of schizophrenic patients. One of the brain areas affected by its use is the prefrontal cortex, since performance in tasks that depend on its activity is profoundly altered by the acute administration of ketamine. As in schizophrenia, these changes may be influenced by hormonal factors, which can be explained by the effects of female sex hormones, such as estrogen, which play a role in the dopaminergic, serotonergic, glutamatergic and GABAergic systems, all affected acute and chronic effects of ketamine use. This project therefore aimed to evaluate the possible effects of chronic administration and withdrawal of ketamine on the expression of behaviors related to human anxiety in Wistar rats, as well as the influence of the hormones estradiol and progesterone on this variable. The possible pharmacological changes induced by chronic ketamine administration on the dopaminergic and serotonergic systems of the preambial (PrL) division of the medial prefrontal cortex will be assessed by specific local antagonist / agonist injection. Our data reinforce the idea that ketamine demonstrates significantly the expression of the learned response of fear. Also, the data show that drug abstinence alters this behavior, particularly the cognitive capacity related to the chaining of stimuli. Like other drugs of abuse, these changes appear to involve both the dopaminergic and serotonergic system of CPFm.

Keywords: Females rats; Estrous cycle; Fear conditioning; Startle; Ketamine; Prefrontal cortex.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT = serotonina
8-OH-DPAT = 8-hidroxi-2-(dipropilamina) tetralina
ANOVA = análise de variância
CPF = córtex pré-frontal
CPF_l = córtex pré-frontal lateral
CP_rL = córtex pré-límbico
CPF_m = córtex pré-frontal medial
CPF_o = córtex pré-frontal orbital
CS = estímulo condicionado
DA = dopamina
Dei 1 = diestro 1
Die 2 = diestro 2
Est = estro
EPM = erro padrão da média
IL = Infra-límbico
PrL = Pré-límbico
Pro = Proestro
PBS = tampão fosfato salina
s.c. = subcutânea
SNC = sistema nervoso central
SPM = sobressalto potencializado pelo medo
US = estímulo incondicionado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Ketamina	12
1.2 Drogas de abuso	14
1.3 Abstinência de Ketamina	15
1.4 Córtex pré-frontal	18
1.4.1 Estrutura e Funções	18
1.4.2 Efeitos da Ketamina	19
1.5 Modelos animais	21
1.5.1. Sobressalto potencializado pelo medo (SPM)	22
1.6 Diferença de gênero e influências hormonais	22
2. OBJETIVO E HIPÓTESE	25
3. MATERIAS E MÉTODOS	27
3.1 Sujeito experimental	28
3.2 Ética experimental	28
3.3 Procedimento para esfregaço vaginal e análise do ciclo estral	28
3.4 Drogas e doses	30
3.5 Grupos experimentais	30
3.6 Delineamento experimental	30
3.6.1. Experimento 1	30
3.6.2. Experimento 2	30
3.6.3. Experimento 3	31
3.6.4. Experimento 4	31
3.6.5. Experimento 5	31
3.7 Efeitos crônicos e sintomas da retirada de ketamina	32
3.8 Cirurgia	32
3.9 Procedimento para microinjeção	33
3.10 Equipamentos	33
3.10.1 Caixas de condicionamento	33
3.10.2 Caixas de medida do sobressalto	34
3.11 Procedimento experimental	35
3.11.1 Sessões de balanceamento (Matching)	35
3.11.2 Sessões de condicionamento	35
3.11.3 Sessão teste	36
3.12 Perfusão e histologia	36
3.13 Análise estatística	37
	10

4. RESULTADOS.....	38
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÃO	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ketamina

A ketamina, antagonista não competitivo de receptores de glutamato do tipo NMDA que apresenta potentes efeitos psicomiméticos tanto em seres humanos quanto em animais de laboratório (KRYSTAL *et al.*, 1994), é uma substância com propriedades dissociativas originalmente utilizada como anestésico. Sua biodisponibilidade quando ingerida por via oral é de apenas 16%, devido ao acentuado metabolismo de primeira passagem, o que pode explicar o porquê desta droga não ser comumente utilizada por esta via de administração. Por outro lado, a biodisponibilidade por via intramuscular, sublingual, aérea (por aspiração, a mais comum) ou endovenosa é francamente maior, alcançando nesta última até 99% (POTTER, CHOUDHURY, 2014). Por esse motivo, os usuários de ketamina geralmente inalam a fórmula pulverizada da droga para aumentar suas experiências sensoriais (DILLON, COPELAND, JANSEN, 2003; JANSEN, 2004).

Em roedores, doses subanestésicas de ketamina produzem um amplo espectro de efeitos que incluem perturbações sensório-motoras (MANSBACH; GEYER, 1991), déficits de memória (IMRE *et al.*, 2006; KOS *et al.*, 2006), hipermotilidade (CARLSSON, 1993), estereotipia e ataxia (TRICKLEBANK *et al.*, 1989). A ketamina apresenta também a característica de acentuar o estado psicótico de pacientes esquizofrênicos (LAHTI *et al.*, 1995b), sendo utilizada rotineiramente como um modelo clínico e animal de esquizofrenia (GEYER, 1998). Em doses anestésicas, alucinações, sonhos vívidos, erros de percepção e distorções do tempo, espaço e imagem corporal são os sintomas emergentes (MORGAN *et al.*, 2012).

Muitos estudos demonstram que uma dose aguda de ketamina produz sintomas de esquizofrenia e ampla disfunção cognitiva, como citado anteriormente, em voluntários saudáveis, ou seja, que nunca usaram a droga (FLETCHER; HONEY, 2006; MORGAN; CURRAN, 2006). Muitos desses indivíduos demonstraram gostar e querer usar novamente a substância (MORGAN *et al.*, 2004). Quando utilizada em doses mais elevadas, a ketamina apresenta efeitos similares aos da Fenciclidina (droga dissociativa que também causa alucinações e usada como anestésico) no cérebro, incluindo os sistemas colinérgicos, monoaminérgicos e gabaérgicos (CASTELLANI; ADAMS, 1981; MALARE *et al.*, 1982; NABESHIMA *et al.*, 1981; RAJA; AUJENET, 1980).

Em pesquisas de laboratório, foi demonstrado também que a administração de apenas uma única dose de ketamina induz efeitos antidepressivos em algumas tarefas

comportamentais, tais como nos modelos animais do nado forçado e no modelo crônico de estresse, em roedores (FRANCESCHELLI *et al.*, 2015). Mas, em contrapartida, estudos evidenciaram um aumento nos sintomas depressivos em usuários frequentes como também nos abstinentes de ketamina (MORGAN; MUETZELFELDET; CURRAN, 2009).

Do ponto de vista comportamental, o impacto da ketamina, na função cognitiva, afeta diretamente tarefas que envolvem funções frontais ou executivas, sendo que esses efeitos parecem persistir durante vários dias (MORGAN; MUETZELFELDT; CURRAN, 2010; HONEY *et al.*, 2004; FLETCHER; HONEY, 2006).

Em um estudo de neuroimagem sobre o impacto da infusão de ketamina aguda em respostas frente a desafios cognitivos, foi mostrado perturbações na memória de trabalho e à longo prazo (HONEY *et al.*, 2004), memória episódica de codificação e recuperação (HONEY *et al.*, 2005), bem como na aprendizagem associativa (CORLETT *et al.*, 2006).

A tolerância aos efeitos sedativos da Ketamina já é conhecida (TOBIAS, 2000), e se dá de forma rápida. Por exemplo, um estudo demonstrou que a partir dos dois primeiros meses consecutivos de uso os dependentes relataram um aumento de seis a oito vezes na dosagem, e os usuários que não usaram de forma contínua também relataram aumentar a dosagem em até três vezes (MUETZELFELDT *et al.*, 2008). Além disso, seu uso continuado produz uma série de efeitos físicos e psicológicos, dentre os quais cistite ulcerativa (SHAHANI *et al.*, 2007), dor abdominal (MUETZELFELDT *et al.*, 2008), depressão (MORGAN *et al.*, 2010) e psicose (KRYSTAL *et al.*, 1994), além de danos cognitivos (MORGAN; CURRAN, 2006) e alterações neurológicas (LIAO *et al.*, 2011). Apesar disso, poucos estudos pré-clínicos foram conduzidos para tentar detectar potenciais efeitos físicos, psicofisiológicos e comportamentais decorrentes de sua abstinência após exposição crônica. Também pouco se sabe sobre o impacto de seu uso repetido sobre as estruturas encefálicas e seu funcionamento.

De acordo com pesquisas realizadas, o perfil psicológico de um usuário de ketamina é de um indivíduo com prejuízos cognitivos profundos, principalmente relacionados às memórias de curto e longo prazo, e que se apresenta em estado “delirante” e perturbado no seu dia a dia (MORGAN; REES; CURRAN, 2008). Em doses muito elevadas, a droga torna o usuário completamente insensível para mundo ao seu redor e vulnerável a muitos perigos físicos (MORGAN; MUETZELFELDT; CURRAN, 2010).

1.2 Drogas de abuso

A toxicodependência é um termo que se refere ao uso abusivo e crônico de drogas. Os termos mais específicos de abuso e dependência de substância incluem critérios diagnósticos como tentativas repetidas e mal-sucedidas em parar de usar, consumo em quantidades maiores ou por períodos mais longos, mesmo sabendo das consequências adversas da droga (OLMESTEAD, 2006).

Segundo Koob & Lea Moal (2008), a toxicodependência é conceituada como uma desordem que envolve elementos de impulsividade e compulsão. Esses elementos produzem um ciclo composto de dependência que compreende três estágios: preocupação/antecipação, excesso/intoxicação, e abstinência/efeito negativo (figura 1), em que a impulsividade geralmente está presente nos estágios iniciais e a compulsão nos estágios finais (KOOB, 2004).

Figura 1: Diagrama descrevendo o ciclo da dependência. Extraído de Koob (2008).

Indivíduos dependentes frequentemente escolhem recompensas imediatas da droga e são incapazes de abster-se delas, principalmente quando estão sob seus efeitos (BRUNNER; HEN, 1997). Estudos experimentais confirmam esses achados mostrando que indivíduos dependentes mostram maior tendência para escolher pequenas recompensas mesmo que imediatas comparadas àquelas maiores e mais demoradas (KIRBY, PETRY, BICKEL, 1999; MOELLER *et al.*, 2002; PETRY, 2001; VUCHINICH, SIMPSON, 1998).

Pesquisas tem demonstrado que o uso compulsivo de drogas se deve a alguma combinação de respostas habituais, como sensibilidade alterada, interrupções na

aprendizagem e comportamentos variados como resposta a estresse ambiental (OLMESTEAD, 2006). E este uso compulsivo está associado ao desejo de reexperimentar os efeitos psicoativos da substância (MARKOU *et al.*, 1993).

A maioria dos pesquisadores concordam que a compulsão na dependência deve ser mediada por diversas regiões cerebrais, e que a sensibilidade alterada à recompensa está associada a mudanças no sistema mesolímbico dopaminérgico (DA) (EVERITT *et al.*, 2001; ROBINSON; BERRIDGE, 1993; WISE, 1988). Neste caso, a característica comum das drogas de abuso é aumentar a liberação de DA nas regiões estriatais (WISE; BOZARTH 1987), portanto o uso repetido da droga poderia aumentar o valor do incentivo em consumir, como também estimular os comportamentos relacionados (WHITE, 1996).

1.3 Abstinência de Ketamina

Em relação aos mecanismos neurais subjacentes ao uso e abuso de drogas, tanto a impulsividade cognitiva como a impulsividade motora pela droga estão associados à disfunção nos sistemas de serotoninérgicos (5-HT) e/ou do CPF (BIZOT *et al.*, 1996; EVENDEN; RYAN, 1999).

Cada substância de abuso tem o seu próprio mecanismo de ação, mas todas elas atuam, direta ou indiretamente, ativando uma mesma região do cérebro: o sistema de recompensa cerebral. (ESCH, ATEFANO, 2004). Esse sistema é formado por circuitos neuronais responsáveis pelas ações reforçadas positiva e negativamente. Quando nos deparamos com um estímulo prazeroso nosso cérebro lança um sinal (aumento de dopamina – importante neurotransmissor do SNC (Sistema Nervoso Central) – no núcleo *accumbens* – região central do sistema de recompensa e importante para os efeitos das drogas de abuso) (KOOB. 2010).

Como as drogas de abuso aumentam a liberação de dopamina no núcleo *accumbens*, as pessoas podem usar drogas porque querem ter uma sensação de bem-estar, de alegria (reforço positivo). Mas as pessoas também podem usar drogas para reduzir a dor, melhorar o humor deprimido ou reduzir a ansiedade, por exemplo – nesse caso, procuram a droga por seus efeitos reforçadores negativos. Essa propriedade reforçadora da droga, causando prazer ou aliviando sensações ruins (por exemplo, a síndrome de abstinência na ausência da droga), aumenta a chance da reutilização da droga (DRUMMOND, 2001)

A ketamina, por sua capacidade de intensificar as experiências sensoriais (DILLON *et al.*, 2003) e também sexuais (LIM, 2003), vem se tornando incrivelmente popular entre os jovens, sobretudo entre aqueles frequentadores de “Clubs” e “Raves”, já desde os anos 80 (JANSEN, 2004). Este quadro se agrava levando em consideração que boa parte dos indivíduos que fazem uso de ketamina são poliusuários (LANKENAU; SANDERS, 2007; LANKENAU *et al.*, 2007a; 2007b).

Experimentalmente, a ketamina foi testada em humanos normais em infusões sub-anestésicas, induzindo ilusões, alterações perceptuais, distúrbios de pensamento e perturbações emocionais (KRYSTAL *et al.*, 1994).

Um aspecto fundamental da dependência é o uso compulsivo e contínuo de drogas. Atualmente há consideráveis pesquisas, com estudos de neuroimagem, que mostram que o vício está associado a mudanças no CPF, que é determinante para funções executivas, incluindo comportamentos inibitórios. Essas anormalidades no CPF em toxicodependentes podem explicar porque esses indivíduos não conseguem controlar o comportamento motivado pela droga, mesmo quando estão plenamente conscientes das consequências prejudiciais (LIAO *et al.*, 2011).

Nos estados de abstinência das drogas de abuso, em geral, a pessoa apresenta sintomas opostos aos observados quando ela está sob o efeito agudo das drogas. Nesses casos, observa-se uma “depleção” dos níveis de dopamina (isto é, uma redução importante devida ao excesso de liberação que ocorreu durante o uso da droga), principalmente no núcleo *accumbens*. Provavelmente isso desencadeie um forte desejo (fissura) de usar a droga novamente (ESCH, ATEFANO, 2004).

Em um estudo com seres humanos, houve relatos sobre o aparecimento de sintomas de abstinência, tais como tremores, palpitações, suor e ansiedade, após a interrupção da utilização crônica de ketamina (LIM, 2003; CRITCHLOW, 2006; BLACHUT *et al.*, 2009). Estes sintomas se assemelham àqueles observados durante a abstinência de álcool etílico (CRITCHLOW, 2006), na qual a ansiedade intensa (*rebound*) gerada pela interrupção da ingestão responde de forma significativa pela recaída (GILPIN; KOOB, 2008).

Resultados similares foram encontrados em animais de laboratório, nos quais foram observados aumentos significativos na expressão de comportamentos vinculados à ansiedade (*anxiety-like*) em uma série de modelos experimentais, incluindo o labirinto em cruz elevado (RASMUSSEN *et al.*, 2001), o teste de claro-escuro (KLIETHERMES, 2005),

o teste de interação social (OVERSTREET *et al.*, 2002) e aqueles que registram respostas aversivas incondicionadas e condicionadas, dentre os quais o teste de sobressalto potencializado pelo medo (LEITE; NOBRE, 2012; SILVA; NOBRE, 2014). Esta resposta condicionada é francamente modulada, tanto em sua aquisição quanto na extinção, por um circuito cortical que tem como um dos componentes principais o CPF medial (CPFm), através de suas subdivisões pré (PrL) e infra-límbica (IL). Sintomas psiquiátricos induzidos pelo uso de ketamina são concomitantes ao aumento na atividade cerebral desta região, além da ínsula (LAHTI *et al.*, 1995a; 1995b; LANGSJO *et al.*, 2005), que são áreas cerebrais que apresentam a capacidade de modular várias instâncias do comportamento, incluindo orientação espacial e coordenação temporal, comportamentos social e afetivo, aprendizagem associativa, habituação e inibição comportamental, dentre outras (KOLB, 1984).

Alterações estruturais no CPFm de dependentes estão relacionadas aos déficits funcionais observados nesses indivíduos, e são aparentes em até seis semanas de abstinência (FEIN, DISCLAFANI, MEYERHOFF, 2002). Alguns desses indivíduos exibem dificuldade na tomada de decisão, tarefa conhecida por ser sensível a danos no CPF (BECHARA, DAMASIO, 2002). A prevalência de transtornos de controle de impulso e alterações neurais em toxicodependentes levou os pesquisadores à hipótese de que o uso crônico de drogas produz alterações nos sistemas neurais que medeiam a impulsividade, levando com isso, ao uso repetido da droga (JENTSCH, TAYLOR, 1999; KOOB, LEMOAL, 2001).

No que diz respeito às diferenças de gênero, um estudo revelou que, após 24 horas da administração de ketamina, a atividade serotoninérgica no CPF e no hipocampo foi encontrada diminuída em ratas fêmeas (YOUNG *et al.*, 2009; DALLA *et al.*, 2011; PITYCHOUTIS *et al.*, 2012). De nosso conhecimento, este é um dos poucos estudos desenvolvidos para tentar entender o tipo de efeito gerado pelo uso de ketamina em fêmeas.

1.4 Córtex pré-frontal

1.4.1 Estrutura e Funções

O córtex pré-frontal (CPF) corresponde à porção mais anterior do lobo frontal, sendo uma região encefálica muito estudada por fazer parte de linhas de pesquisas correspondentes às áreas de processos cognitivos relacionados à capacidade de planejamento de ações e antecipação de resultados, emoção, atenção e memória (DALLEY; CARDINAL; ROBBINS, 2004; SEAMANS; LAPISH; DURSTEWITZ, 2008).

É uma região composta por diversas sub-regiões que apresentam características anatômicas e funcionais distintas (KOLB, 1984; DALLEY; CARDINAL; ROBBINS, 2004). Em roedores, foram localizadas cinco regiões córtico-frontais, sendo: uma área do cíngulo anterior, uma área pré-límbica (PrL) e outra Infra-límbica (IL), uma área orbital, uma área insular agranular (dorsal e ventral) e uma pequena faixa do córtex pré-central (KOLB, 1984). Essas regiões podem ser ordenadas em três grandes grupos: CPFm, córtex pré-frontal orbital (CPFo) e córtex pré-frontal lateral (CPFf) (KOLB, 1984). Através de suas subdivisões, medial (PrL) e ventral (IL), o CPFm é comumente envolvido no paradigma do medo condicionado, o medo aprendido (LAUZON; LAVIOLETTE, 2010; PAPE; PARÉ, 2010), um sistema de aprendizagem discriminativa baseado no modelo Pavloviano ou condicionamento aversivo clássico (DELAMATER, 2012).

O CPF recebe, diretamente ou através do tálamo, fibras do hipotálamo, da substância cinzenta periaquedutal (SCP) e da amígdala (AM), e envia fibras para praticamente todas as estruturas das quais recebe aferências (FUSTER, 2001). Assim, suas eferências projetam-se para outras áreas corticais e para várias estruturas cerebrais, tais como o hipocampo, os núcleos da base, o hipotálamo, a substância cinzenta periaquedutal e a amígdala (KOLB, 1984; FUSTER, 2001).

O CPF recebe impulsos extremamente densos dos centros neuromoduladores do tronco cerebral e do prosencéfalo, incluindo os núcleos serotoninérgicos da rafe. Destes núcleos, particularmente dos núcleos dorsal e mediano, partem fibras serotoninérgicas que se direcionam para diversas sub-regiões do CPF aí incluídos o cíngulo e os córtices PrL e IL (GROENEWEGEN; UYLINGS, 2000).

Figura 2: Imagem ilustrativa do CPF humano e do rato. Extraído de Gass & Chandler (Front. Psychiatry, 4 (3):1-13, 2013)

1.4.2 Efeitos da Ketamina

Em humanos, uma das áreas cerebrais afetadas pelo uso de ketamina é o córtex pré-frontal, particularmente suas regiões fronto-medial e inferior (HOLCOMB *et al.*, 2001). Por exemplo, um estudo utilizando a técnica de imagem por ressonância magnética mostrou que os efeitos subjetivos (dissociativo) da ketamina se correlacionam significativamente com uma redução na atividade cortical ventromedial mediada por glutamato (DEAKIN *et al.*, 2008). Além disso, alguns trabalhos mostram que o desempenho em tarefas que dependem da atividade cortical pré-frontal é profundamente afetado pela administração aguda de ketamina em seres humanos (HONEY *et al.*, 2004, 2005). Estes efeitos agudos sobre a atividade pré-frontal são comparáveis àqueles encontrados em pacientes esquizofrênicos (NEILL *et al.*, 2010). Em indivíduos adultos voluntários, o uso continuado de ketamina induz uma série de efeitos físicos e psicológicos dentre os principais a cistite ulcerativa (SHAHANI *et al.*, 2007), a dor abdominal (MUETZELFELDT *et al.*, 2008), a depressão (MORGAN *et al.*, 2010) e a psicose (KRYSTAL *et al.*, 1994), além de danos cognitivos (MORGAN; CURRAN, 2006) e alterações neurológicas (LIAO *et al.*, 2011). No entanto, se for o caso, a síndrome de abstinência associada a seu uso contínuo, assim como o regime de tratamento necessário para produzi-las, são questões ainda não definidas.

De acordo com algumas pesquisas, pode-se reconhecer um modelo animal de esquizofrenia administrando ketamina nos dois primeiros meses após o seu nascimento, pois quando ocorre o bloqueio do receptor NMDA na fase neonatal, resultam-se interrupções na migração neuronal, diferenciação e sinaptogênese (REIPRICH *et al.*, 2005),

consequentemente levando a um comprometimento cortical de curto prazo e alterações de comportamentos, assemelhando-se assim a essa desordem neurológica (LECOINTRE *et al.*, 2015),

Estudos de microdiálise revelaram que as doses de ketamina reconhecidas por sua atividade antidepressiva aumentam os níveis extracelulares do aminoácido glutamato no córtex pré-frontal, devido uma possível desinibição local do interneurônio gabaérgico (LORRAIN *et al.*, 2003; DUMAN, 2014). Este mesmo estudo, demonstrou que a administração de ketamina induz um rápido aumento de 5-HT extracelular no CPFm em roedores (NISHITANI *et al.*, 2014), apoiando assim, o papel da serotonina na mediação da atividade antidepressiva mantida pela ketamina em ratos submetidos ao teste de nado forçado (DUMAN *et al.*, 2012; GIGLIUCCI *et al.*, 2013).

Um estudo de tomografia mostrou evidências de alterações no CPFm e inferior após infusão intravenosa aguda de ketamina em voluntários saudáveis, sugerindo que o CPF está relacionado ao seu uso agudo. (HOLCOMB *et al.*, 2001). Em outro estudo, conduzido por Narendran *et al.* (2005), foi encontrada alterações do funcionamento dopaminérgico no CPF dorsolateral, área que está envolvida na memória de trabalho, em um pequeno grupo de usuários de ketamina de baixa frequência. Já um estudo com ressonância magnética funcional, mostrou os efeitos dissociativos da ketamina correlacionados com a redução da atividade cortical frontal ventromedial em repouso, sugerindo uma consequência do aumento da liberação de glutamato (DEAKIN *et al.*, 2008).

Algumas pesquisas demonstraram diferenças na substância cinzenta entre usuários crônicos de ketamina e indivíduos controle. O uso da ketamina foi associado à diminuição de seu volume no giro frontal superior esquerdo e no giro frontal médio direito. Essa redução no volume de substância cinzenta em ambas as regiões foi correlacionada com a duração do uso e com o consumo ao longo da vida (LIAO *et al.*, 2011).

Há evidências também de que os efeitos agudos da ketamina associados aos distúrbios nas funções frontais são devido à ação dopaminérgica pre-frontal alterada em função do uso de ketamina (NARENDHAN *et al.*, 2005). Outros achados mostram que, em termos estruturais, a longo prazo, os efeitos da ketamina na função frontal podem ser profundos (LIAO *et al.*, 2011).

Com o uso crônico da ketamina, delírios se agravam e podem ocorrer mesmo sem a droga (MORGAN; MUETZELFELDT; CURRAN, 2010). Além disso, um estudo de

tomografia revelou sintomas negativos mais severos (apatia e desmotivação) em usuários relacionados com a redução da função do receptor de dopamina D1 no CPF (NARENDRAN *et al.*, 2005).

1.5 Modelos animais

Os modelos animais são ferramentas utilizadas em pesquisa de neurociência para tentar reproduzir várias das características de transtornos psiquiátricos humanos, aí incluídas as alterações comportamentais e fisiológicas. Estes modelos apresentam grande valor na análise causal, como por exemplo, em identificar comportamentos gerados pelo uso de substâncias psicoativas, bem como circuitos neuroanatômicos responsáveis pela mediação desses comportamentos. Além disso, os modelos animais tem sido um passo fundamental para a compreensão da neurobiologia de doenças psiquiátricas (BOURIN *et al.*, 2007).

É importante mencionar que apenas um único modelo animal não permite a análise de todos os aspectos de comportamentos tão complexos quanto as patologias humanas (LISTER, 1990). É por esse motivo que pesquisas utilizam grande número de modelos para validar suas hipóteses.

Existem diferentes tipos de modelos animais, que medem vários padrões de respostas comportamentais, e para que um modelo animal seja construído é necessário fazer uma análise segura, pois precisam englobar aspectos teóricos e sintomatológicos da patologia, e serem sensíveis aos tratamentos farmacológicos utilizados nos experimentos (PALANZA, 2001; CHADMAN; YANG; CRAWLEY, 2009).

Em roedores, os testes de ansiedade geralmente são baseados na avaliação do comportamento medo/ansiedade, criando assim um conflito entre a atividade exploratória inata do animal e uma condição aversiva. E uma vantagem da pesquisa animal é que ela fornece medidas dissociáveis de processos individuais e pode excluir hipóteses alternativas com condições de controle apropriadas (FINN *et al.*, 1999).

Quando o pesquisador tem como objetivo estudar as psicopatologias em fêmeas se deparam com algumas dificuldades, pois a maioria dos modelos animais são validados baseados nas respostas comportamentais de machos, não sendo totalmente sensíveis em detectar as influências da alteração hormonal durante o ciclo estral (PALANZA, 2001).

1.5.1. Sobressalto potencializado pelo medo (SPM)

Um modelo animal muito utilizado é o sobressalto potencializado pelo medo, que é caracterizado por uma resposta defensiva reflexa súbita do animal, e que envolve padrões comportamentais, tais como: fechamento dos olhos, contração do pescoço e músculos esqueléticos; sendo provocado por variados tipos de estímulos aversivos, como por exemplo o som alto (BROWN; KALISH; FARBER, 1951; KOCH, 1999).

No protocolo experimental de SPM, o volume do som, que se apresenta de forma alta e induz o sobressalto é apresentado junto com um estímulo condicionado (luz) que foi anteriormente emparelhado com um estímulo aversivo (choque nas patas). E com isso, mesmo na ausência do estímulo aversivo, a amplitude da resposta de sobressalto se torna maior (DAVIS, 1986). Este modelo é muito utilizado para medir respostas comportamentais de medo e ansiedade, sendo capaz de fazer com que o animal emita uma resposta de defesa na ausência do estímulo aversivo. A utilização do modelo de sobressalto em estudos clínicos envolvendo diferença de gêneros mostrou que mulheres apresentam um aumento da resposta de sobressalto durante a fase lútea do ciclo menstrual. No entanto um resultado oposto foi encontrado em estudo utilizando ratos, mostrou que há um aumento do sobressalto em machos comparado com as fêmeas (BŁASZCZYK; TAJCHERT, 1996).

1.6 Diferença de gênero e influências hormonais

O encéfalo feminino, oposto ao masculino, trabalha em um ambiente de mudanças químicas causadas pela produção cíclica de hormônios sexuais durante o ciclo menstrual em mulheres e ciclo estral em animais (LOVICK, 2012). Com isso, sabe-se que a oscilação dos hormônios ovarianos, como o estrógeno e a progesterona, tem sido associada à prevalência da mudança de humor em mulheres (HIROI; NEUMAIER, 2006).

O impacto das questões de gênero sobre a psicopatologia em geral, tanto no seu prognóstico, quanto tratamento e resposta a intervenção farmacológica está bem documentado. Por exemplo, no que diz respeito à esquizofrenia sabe-se que há importantes diferenças entre homens e mulheres em relação a variáveis como idade de início, funcionamento pré-morbido, característica sintomatológica e evolução da doença (LEUNG; CHUE, 2000). Nos homens, os sintomas negativos se apresentam mais acentuados, sendo que nas mulheres a incidência dos sintomas positivos é maior, e em grupos de idade mais avançadas estão em maior risco de desenvolver o distúrbio quando comparadas a eles

(ALEMAN *et al.*, 2003). Dentre outras razões, estas diferenças de gênero podem ser explicadas pelos efeitos profiláticos dos hormônios sexuais femininos, como o estrogênio, o que justificaria o aparecimento tardio destes sintomas em mulheres (RIECHER-ROSSLER, 2002; RIECHER-ROSSLER; SEEMAN, 2002). Os hormônios esteroidais apresentam papel regulador específico sobre os sintomas dopaminérgicos, serotoninérgicos, glutamatérgicos e GABAérgicos. Além disso, o prognóstico dos escores psicopatológicos é positivo quando aumentados os níveis dos hormônios esteroidais endógenos (RIECHER-ROSSLER, 2002; RIECHER-ROSSLER; SEEMAN, 2002). Curiosamente, sabe-se também que a ketamina apresenta padrão diferenciado de efeitos em ratos machos e fêmeas, sendo mais acentuado nestas últimas (WINTERS *et al.*, 1986).

Devido as flutuações hormonais cíclicas das fêmeas, a instabilidade hormonal entre os sexos pode causar grande impacto, e por esse motivo exige um estudo mais detalhado sobre o ciclo reprodutivo das ratas (HUBSCHER; BROOKS; JOHNSON, 2005).

O ciclo estral em ratas dura aproximadamente 4 dias para a maior parte das ratas e possui quatro fases: proestro, estro, diestro 1 (mestaestro) e diestro 2. (EVANS; LONG, 1992; MANDL, 1951). Pesquisadores consideram que o animal esteja com o ciclo estral irregular quando as fases não se encontram na sequência ou quando uma única fase dura de 4 a 5 dias seguidos (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

Determina-se a fase do ciclo estral pela visualização microscópica de amostras de células obtidas a partir da superfície do epitélio vaginal, cujas diferenças aparecem nas alterações morfológicas das células (EVANS; LONG, 1922).

A fase do proestro dura aproximadamente de 12 a 14 horas e sua principal característica são células nucleadas de tamanhos iguais. Se caracteriza pelo aumento das concentrações de estradiol e progesterona. O próximo ciclo, o estro, dura de 25 a 27 horas e se diferencia pelo surgimento de células de características não-nucleadas, cornificadas de forma irregular, essa fase é quando ocorre a ovulação e a queda das concentrações hormonais (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007). A fase estral diestro 1, considerada a fase mais rápida, tem duração de 6 a 8 horas, é caracterizada pelo pequeno número de células nucleadas e predominância de leucócitos, e apresenta baixos níveis plasmáticos de estradiol acompanhado por um segundo aumento dos níveis de progesterona (SPORNITZ; SOCIN; DRAVID, 1999; MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). E por último, o diestro 2 é considerada a fase mais longa, durando de 55 a 57 horas, chegando a ser mais do que a

metade de todo o ciclo, nesse momento é que ocorre a queda abrupta da concentração de progesterona, e é caracterizada por leucócitos, células nucleadas e cornificadas (EVANS; LONG, 1922; SPORNITZ; SOCIN; DRAVID, 1999; LOVICK, 2014).

Sabendo que fêmeas apresentam sensibilidade maior aos efeitos da ketamina que ratos machos, assim como observado em humanos (guardadas as devidas proporções), é curioso que trabalhos investigando os efeitos desta droga, utilizando fêmeas de animais de laboratório, sejam tão raros. Vale ressaltar que é importante determinar o quão suscetível as fêmeas são, em relação aos machos, aos sintomas de abstinência de ketamina e outras drogas (assim como seus efeitos adversos), especialmente quando se fala de déficits cognitivos e alterações emocionais já que estas questões estão associadas ao sucesso do tratamento e prognóstico clínico, mas ainda, há poucos estudos que investigam as diferenças do ciclo estral em relação aos modelos animais, particularmente pelos problemas gerados para o controle das diversas fases do ciclo.

2. OBJETIVO E HIPÓTESE

O presente trabalho teve como meta avaliar os possíveis efeitos da administração crônica e retirada de ketamina sobre a expressão de comportamentos relacionados à ansiedade humana em ratas da linhagem Wistar, assim como a influência dos hormônios estradiol e a progesterona sobre esta variável. As possíveis alterações farmacológicas induzidas pela administração crônica de ketamina sobre o sistema dopaminérgico e serotoninérgico do CPF foram avaliadas através da injeção local do antipsicótico haloperidol (HAL) e do agonista seletivo de receptores 5-HT_{1A} 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin (8-OH-DPAT). Neste estudo temos como foco os efeitos das variáveis independentes utilizadas exclusivamente sobre a divisão pré-límbica (PrL) do córtex pré-frontal. Como hipótese de trabalho, sugerimos que ratas testadas após a interrupção do tratamento crônico com ketamina irão apresentar aumento na intensidade da expressão da resposta condicionadas de medo, efeitos estes que devem ser atenuados, ou bloqueados, com a utilização das drogas em estudo.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Sujeito experimental

Foram utilizadas 202 ratas Wistar, com peso inicial aproximadamente de 210g no início dos experimentos, provenientes do Biotério Central da USP- RP. Os animais foram mantidos em número de quatro em caixa de polipropileno (45 cm de largura x 65cm de comprimento x 30cm de altura), nas quais foram adicionados rapas de madeira, água e ração à vontade, alojadas em um biotério setorial com temperatura controlada (23+ ou -1° C), ventilação, exaustão, luminosidade e umidade, em um ciclo claro-escuro de 12 horas, com luzes acesas às 7h00min da manhã.

3.2 Ética experimental

Os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações do Comitê de Ética Animal (CEUA) da USP-RP (processo 2016.5.739.59.0). Todo o cuidado foi tomado para reduzir ao mínimo o número de animais utilizados, assim como seu sofrimento, sem comprometer, no entanto, a viabilidade dos dados coletados.

3.3 Procedimento para esfregaço vaginal e análise do ciclo estral

Cinco dias antes do início dos experimentos as ratas foram diariamente monitoradas quanto ao seu ciclo estral através do esfregaço vaginal. Esse procedimento era realizado entre 08h00min e 11h00min da manhã, e com uma alça de inoculação, mergulhada em água e inserida na vagina, foi retirado o fluido contendo células nas quais eram espalhadas em uma lâmina. Esta alça foi esterilizada com um isqueiro entre um esfregaço e outro. Em seguida, as lâminas foram coradas com corante para uso hematológico (Panótipo Rápido, Laborclin, Paraná, Brasil) e analisadas em Microscópio. As alterações na aparência citológica dos esfregaços foram usados para identificar as fases do ciclo estral (Figura 3) : proestro (Pro), estro (Est), diestro 1 (Die 1) e diestro 2 (Die 2) (HUBSCHER et al., 2005).

As ratas possuem quatro fases em seu ciclo estral, tendo duração, normalmente de 4 dias (EVANS; LONG, 1922), sendo: proestro (caracterizada por uma abundância de células epiteliais nucleadas), estro (caracterizada por células sem núcleos e cornificadas), diestro 1 (representada pela presença de leucócitos em abundancia, com o núcleo contendo multi-lóbulos) e diestro 2 (caracterizado por poucos leucócitos com o núcleo difuso e com células se desintegrando).

Considera-se que o ciclo esteja irregular quando as fases não estão na devida sequência ou quando um mesmo ciclo se repita por 4 ou 5 dias (MARCONDES *et al.*, 2002).

O mesmo procedimento foi adotado ao longo dos experimentos no qual, diariamente, durante o tempo de tratamento, quinze minutos antes do início de cada teste, a fase do ciclo estral de cada animal foi monitorada. A técnica utilizada para realização deste procedimento é bastante comum e sua descrição pode ser encontrada, por exemplo, no estudo de Milad *et al.* (2009), dentre outros.

De forma a evitar a grande variabilidade induzida pelas diversas fases e levando em consideração também os efeitos da progesterona e do estradiol sobre o comportamento, os grupos foram divididos em Proestro (se caracteriza pelo aumento das concentrações de estradiol e progesterona), Estro (fase em que acontece a ovulação e a queda das concentrações hormonais) (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007), e Diestro (fase caracterizada pelo redução acentuada nos níveis de estradiol e progesterona) (SPORNITZ; SOCIN; DRAVID, 1999).

Figura 3. Fotos representativas de cada fase do ciclo estral de fêmeas. A = proestro; B = estro; C = diestro 1; D = diestro 2 (FERREIRA, 2014).

3.4 Drogas e doses

Neste estudo foram utilizados o antagonista de receptores de glutamato do tipo NMDA ketamina (cloridrato, Agener União, Brasil), administrado por via subcutânea (s.c.) nas doses de 20 e 40 mg/Kg, por quatorze dias consecutivos (CHATTERJEE *et al.*, 2011), o antipsicótico haloperidol (HAL) (Sigma-Aldrich, USA) na dose de 0.5 µg/µl, e o agonista seletivo de receptores 5-HT_{1A} 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin (8-OH-DPAT, Sigma, USA) na dose de 0.3µg/0.2µl, administrados diretamente no PrL, no décimo quarto dia de tratamento, 5 minutos antes do experimento. As drogas foram diluídas com tampão fosfato salina (PBS – pH 7,0) que também foi utilizado como solução controle. A escolha das doses utilizadas foi baseada no trabalho de Tomkins *et al.* (1994), Muthuraju *et al.* (2014), e Rocha *et al.* (1996).

3.5 Grupos experimentais

Foram analisados três grupos principais: controle (salina fisiológica s.c.), experimental 1 (Ketamina s.c. na dose de 20 mg/Kg) e experimental 2 (Ketamina s.c. na dose de 40 mg/kg). Os grupos foram subdividido em: proestro, estro e diestro. Cada animal de cada grupo foi testado em três condições, com três substâncias diferentes (PBS, HAL e 8-OH-DPAT) e sob os efeitos agudos da Ketamina (teste 1), 24 horas após a última injeção (teste 2), e 6 dias após a sua retirada (teste 3.) Cada grupo foi composto de aproximadamente 8 ratas da linhagem Wistar, nas quais a administração local das drogas alcançou as delimitações da área em estudo (PrL).

3.6 Delineamento experimental

3.6.1. Experimento 1

Neste primeiro experimento analisamos o tratamento crônico com ketamina nas doses de 20 e 40 mg/kg nas diferentes fases do ciclo estral sobre as respostas incondicionadas e condicionadas de medo.

3.6.2. Experimento 2

Analisamos as respostas incondicionadas e condicionadas de medo após 24 horas de retirada da ketamina nas doses de 20 e 40 mg/kg nas diferentes fases do ciclo estral.

3.6.3. Experimento 3

Analizamos as respostas incondicionadas e condicionadas de medo após 6 dias de retirada da ketamina nas doses de 20 e 40 mg/kg nas diferentes fases do ciclo estral.

3.6.4. Experimento 4

Analizamos o papel funcional do antipsicótico haloperidol (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), através da microinjeção local no PrL no 14º dia de tratamento, administrado 5 minutos antes do início da sessão teste, sobre a expressão das respostas incondicionadas e condicionadas de medo, em ratas nas diferentes fases do ciclo estral.

3.6.5. Experimento 5

Analizamos o papel funcional da neurotransmissão serotoninérgica do PrL através da microinjeção local do agonista 5HT_{1A} 8-OH-DPAT (de 0.3 $\mu\text{g}/0.2\mu\text{l}$) no 14º dia de tratamento, administrado 5 minutos antes do início da sessão teste, sobre a expressão das respostas incondicionadas e condicionadas de medo, em ratas nas diferentes fases do ciclo estral.

Figura 4. Esquema representativo do delineamento experimental.

3.7 Efeitos crônicos e sintomas da retirada de ketamina

A análise dos efeitos crônicos e possíveis sintomas da abstinência de ketamina foram realizadas após administração subcutânea (s.c.) diária das doses subanestésicas de 20 e 40 mg/kg (CHATTERJEE et al., 2011). Os testes foram realizados 5 minutos, 24 horas e 6 dias após a última administração da droga. Dessa forma, um único animal foi testado por até três vezes. Para análise destes efeitos os animais foram submetidos ao teste do sobressalto potencializado pelo medo. Como variáveis dependentes foram utilizadas a latência e a amplitude (em porcentagem) das respostas incondicionadas e condicionadas de medo.

3.8 Cirurgia

Os animais receberam implante de uma cânula direcionada ao PrL direito, no décimo dia do tratamento crônico. Para esse fim, os animais foram anestesiados com 0.1 ml de Xilazina (10 mg/kg) + 0.1 ml de Ketamina (60 mg/kg) em uma mesma seringa, por via intramuscular e levados a um aparelho estereotáxico digital (Insight, Brasil) onde o crânio foi fixado pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Caso necessário, uma alternativa à tolerância aos efeitos sedativos/anestésico da ketamina foi utilizado o pentabarbital sódico (40 mg/kg – IP). Para iniciar os procedimentos, foi feita a tricotomia, aplicada na área de incisão o anestésico local Lidocaína a 2% (Harvey, Brasil) em dose subcutânea de 0.2 mL. Feito isso o tecido subcutâneo e o periósteo foram retirados com o auxílio de pinça, algodão e hastes flexíveis com ponta de algodão. Já com a superfície craniana exposta e ajustada em posição horizontal, entre o *bregma* e *lambda*, três orifícios foram feitos nos ossos parietais através de uma broca elétrica (Foredom, EUA) para fixação da cânula guia e de dois parafusos para ancorar a prótese. As coordenadas que foram utilizadas, tomadas como base o atlas de Paxinos e Watson (2008): ântero-posterior = +3,24 mm; médio-lateral = -0,6 mm; dorso-ventral = -2,60 mm. O crânio foi então revestido com acrílico dental (JET, Brasil) para fixação da cânula guia. Ao término da cirurgia cada animal recebeu por via intramuscular, uma injeção de pentabiótico (60.000 UI, 0.2 mL) e uma injeção subcutânea do analgésico e anti-inflamatório banamine (2.5 mg/Kg). Depois disso, cada cânula guia foi selada com um fio de aço inoxidável para protegê-la de entupimento. Os animais foram deixados por cinco dias em recuperação pós-operatória antes do início dos experimentos.

3.9 Procedimento para microinjeção

Na intenção de evitar ao mínimo o dano neuronal promovido pela introdução de uma agulha no tecido encefálico, as drogas foram administradas através de uma agulha gengival curta (30G) localizada, quando introduzida, 1 mm abaixo da ponta da cânula guia. A agulha de injeção foi acoplada a uma seringa Hamilton (5 μ L, EUA) por meio de um fino tubo flexível de polietileno. O volume microinjetado foi de 0.2 μ L de Haloperidol ou 8-OH-DPAT diretamente no PrL, com o auxílio de uma bomba eletrônica de infusão (Insight, Brasil) (Figura 5).

Figura 5. Foto representativa - Bomba eletrônica de infusão (Insight, Brasil).

3.10 Equipamentos

3.10.1 Caixas de condicionamento

Foram utilizadas quatro caixas de acrílico preta (60,0 x 50,0 x 45,0 cm) com estrutura interna diferentes, localizadas cada uma dentro de uma câmara de isolamento acústico (64,0 x 60,0 x 40,0 cm). Dentro de cada caixa alocamos uma gaiola de contenção (17,0 x 8,0 x 8,0 cm) composta de acrílico opaco com piso constituído por 8 barras de metal de 5,0 mm de diâmetro, distando 1,5 cm entre si, através das quais eram liberados os choques nas patas por meio de um gerador de choques (Insight, Brasil) de 0,6 μ A, com 1 segundo de duração, sendo utilizado como estímulo incondicionado. Uma abertura na parede traseira permitiu a apresentação dos estímulos aplicados (luz e som). Um estímulo luminoso proveniente de uma luz de LED branca (6W), localizada acima do alto falante, posicionado a frente da caixa de condicionamento, foi utilizada como estímulo condicionado. Quatro câmeras de vídeo, foram instaladas no interior de cada câmaras de isolamento acústico, permitindo o monitoramento do animal durante os experimentos (Figura 6).

Figura 6. Foto representativa - Caixa de condicionamento aversivo.

3.10.2 Caixas de medida do sobressalto

Para o registro da resposta de sobressalto foram utilizados quatro estabilímetros (16,5 x 7,5 x 7,5 cm) sobre os quais foram anexadas quatro gaiolas de contenção (armação em PVC 25,5 x 12,0 x 9,0 cm, Insight, Brasil). Cada gaiola estava localizada dentro de uma câmara de atenuação sonora (64,0 x 60,0 x 40,0 cm) com revestimento interno de espuma (Insight, Brasil). As amplitudes das respostas de sobressalto eram registradas através de células de carga inseridas na base dos estabilímetros. A resposta de sobressalto foi captada por sensores e amplificada, gerando um sinal analógico, posteriormente digitalizado para análise em um programa computacional (Sobressalto, Insight, Brasil). A resposta de sobressalto foi registrada dentro de uma janela de 200ms. O estímulo sonoro constituiu de um estímulo acústico de alta intensidade (ruído branco de 90, 95 e 105 dB, 50 ms de duração), liberado por um tweeter piezoelétrico localizado a 10 cm de distância da gaiola de contenção. Uma lâmpada branca de 6W, localizada acima do alto falante dentro da caixa experimental, foi utilizada como estímulo condicionado. As plataformas eram calibradas no início de cada sessão experimental para garantir sensibilidade equivalente ao longo do experimento.

Figura 7. Foto representativa - Caixa de medida de sobressalto.

3.11 Procedimento experimental

As sessões de balanceamento (matching) foram iniciadas 2 dias antes do início dos experimentos. As cirurgias para implante das cânulas no PrL foram realizadas no décimo dia. As sessões de condicionamento foram realizadas no 12º e 13º dias, imediatamente antes dos tratamentos. E os testes foram realizados no 14º dia, imediatamente após a última injeção de ketamina, 24 horas e 6 dias após o término do tratamento.

3.11.1 Sessões de balanceamento (Matching)

Foram realizadas duas sessões de balanceamento com intervalo de 24h entre elas. Os animais foram colocados nas caixas experimentais e após 5 minutos, foram submetidos à apresentação de 30 estímulos sonoros, nas intensidades de 90, 95 e 105 dB, com intervalo de 30 segundos entre os estímulos. O tempo de duração de cada sessão foi de 20 minutos. Essas sessões serviram para posteriormente compor grupos de animais com medidas de amplitude de sobressalto similares. A amplitude média de sobressalto ao longo das 30 tentativas da última sessão de balanceamento foram utilizadas para distribuir os animais nos diversos grupos experimentais.

3.11.2 Sessões de condicionamento

Foram utilizadas duas sessões de condicionamento com intervalo de 24h entre elas. Os animais foram colocados dentro de uma gaiolas de acrílico (23,0 x 20,0 x 25,0 cm) com

piso constituído por 18 barras de metal de 3 mm de diâmetro, distando 1,5 cm entre si, através das quais são liberados os choques nas patas. Posteriormente os animais terem sido colocados nas caixas de condicionamento e, após 5 minutos de habituação, foram submetidos a 10 associações luz (CS) x choque nas patas (US). Cada tentativa consistiu em 4 segundos de luz e 1 segundo de choque nas patas. Os choques eram apresentados no último segundo de cada apresentação do CS luz. O tempo de duração de cada sessão foi de 40 minutos.

3.11.3 Sessão teste

Após 24h adicionados a segunda sessão de condicionamento e imediatamente após a última injeção de ketamina os animais foram avaliados no teste de sobressalto potencializado pelo medo (SPM). O placebo ou as drogas foram administrados diretamente no PrL e os animais eram então expostos ao teste de medo condicionado no qual o CS (luz) era apresentado na ausência do choque nas patas. Para isso, cada animal foi então colocado na caixa experimental e após 5 minutos de habituação foi exposto a um total de 60 estímulos sonoros nas intensidades de 90, 95 e 105 dB com intervalos variados. Trinta dessas apresentações consistiram apenas da apresentação do estímulo sonoro (tentativas só – som), intercaladas aleatoriamente com 30 apresentações de som precedido por luz (tentativas luz-som). Os dados foram coletados em 6 blocos de 10 tentativas cada. As sessões teste 2 e 3 obedeceram ao mesmo procedimento. O tempo de duração do teste foi de 45 minutos.

3.12 Perfusão e histologia

Ao final dos experimentos, os animais foram sacrificados, através de exposição a CO₂ ou injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (100 mg/kg). Neste caso, para evitar irritação do peritônio, a dose de pentobarbital utilizada foi diluída numa solução de 4 ml de salina. Os indicativos de morte do animal foram, ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos. A confirmação de morte se deu por perfusão cardíaca (150 ml de PBS seguido de 150 ml de paraformaldeído a 4 %). Posteriormente, os animais foram decapitados para retirada dos encéfalos, que foram mantidos numa solução de paraformaldeído por 3 dias, sendo a seguir mergulhados numa solução de sacarose (30%) a menos 4° C até seu processamento. Os encéfalos foram então fatiados em cortes de 60 µm de espessura no criostato (Leica CM 1850, Nussloch, Alemanha) coletadas em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) de acordo com o atlas de Paxinos & Watson (2008). Posteriormente,

os cortes foram montados em lâminas revestidas por gelatina e corados com vermelho neutro para a localização dos sítios de microinjeção.

3.13 Análise estatística

Os dados dos experimentais estão como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), e obedecidos os critérios de normalidade e homogeneidade das variâncias os dados coletados foram analisados com a Análise de Variância (ANOVA) de dois fatores (tratamento x condição), para a variável em estudo. Comparações a posteriori foram feitas utilizando o teste *post-hoc* de Newman-Keuls. A probabilidade de significância foi estabelecida em $p \leq 0.05$ para todas as comparações.

4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1: Tratamento Crônico (14º dia)

Os gráficos a seguir mostram a amplitude de resposta de sobressalto em ratas, separadas de acordo com as fases do ciclo estral: Proestro (n= 23), Estro (n= 23), Diestro (n= 24) no efeito Crônico (14 dias de tratamento) de Ketamina (s.c.) na dose de 20 e 40 mg/kg e animais controle (salina fisiológica s.c.), sobre a amplitude da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem do sobressalto potencializado pelo medo.

Com relação ao proestro, a ANOVA mostrou diferenças significativas intra grupos (som x luz - som; $F_{1,20} = 36.64$; $p < 0.00001$). No teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que há diferenças entre som e luz x som, nos grupos salina e ketamina 40mg/kg mostrando aumento da amplitude de resposta de SPM. O efeito da ketamina 20mg/kg não foi significativo no que diz respeito ao SPM. Nenhuma alteração foi observada na porcentagem de sobressalto (figura 8).

Figura 8. Gráfico representativo da influência do ciclo estral proestro no efeito crônico (14 dias de tratamento) de ketamina (s.c.) na dose de 20 (n = 8) e 40 (n = 7) mg/kg e animais controle (n = 8) (salina fisiológica s.c.), sobre a amplitude (g = gramas) da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem do SPM. * Diferença significativa entre som x luz-som dentro de cada grupo (Sal ou Ket.). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA com *post-hoc* Newman-Keuls, com $p \leq 0.05$.

No que diz respeito ao estro, a ANOVA também mostrou diferenças significativas intra grupos (som x luz - som; $F_{1,20} = 23.05$; $p < 0.0001$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que há diferenças entre som e luz x som, nos grupos salina e ketamina 20mg/kg mostrando aumento da amplitude de resposta de SPM. O efeito da ketamina 40mg/kg não foi significativo no que diz respeito ao SPM. Nenhuma alteração foi observada na porcentagem de sobressalto (figura 9).

Figura 9. Gráfico representativo da influência do ciclo estral estro no efeito crônico (14 dias de tratamento) de ketamina (s.c.) na dose de 20 ($n = 7$) e 40 ($n = 8$) mg/kg e animais controle ($n = 8$) (salina fisiológica s.c.), sobre a amplitude (g = gramas) da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem do SPM. * Diferença significativa entre som x luz-som dentro de cada grupo (Sal ou Ket.). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA com *post-hoc* Newman-Keuls, com $p \leq 0.05$.

Já no grupo diestro, a ANOVA mostrou diferenças significativas intra grupos (som x luz - som; $F_{1,21} = 34.66$; $p < 0.00001$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que há diferenças entre som e luz x som, nos três grupos, mostrando aumento da amplitude de resposta de SPM. Nenhuma alteração foi observada na porcentagem de sobressalto (figura 10).

Figura 10. Gráfico representativo da influência do ciclo estral diestro no efeito crônico (14 dias de tratamento) de ketamina (s.c.) na dose de 20 ($n = 8$) e 40 ($n = 8$) mg/kg e animais controle ($n = 8$) (salina fisiológica s.c.), sobre a amplitude (g = gramas) da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem do SPM. * Diferença significativa entre som x luz-som dentro de cada grupo (Sal ou Ket.). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA com *post-hoc* Newman-Keuls, com $p \leq 0.05$.

4.2 Experimento 2: Retirada da ketamina (24horas)

Os gráficos, neste experimento, mostram a amplitude de resposta de sobressalto em ratas, separadas de acordo com as fases do ciclo estral: proestro (n= 22), estro (n = 24) e diestro (n = 24) no efeito 24 horas de retirada da ketamina (abstinência) e animais controle, sobre a amplitude da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem do SPM.

Com relação ao proestro, a ANOVA mostrou diferenças significativas intra (som x luz - som; $F_{1,19} = 21.80$; $p < 0.001$) e entre grupos (salina x ketamina; $F_{2,19} = 5.45$; $p < 0.01$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que há diferenças entre som e luz x som no grupo salina, mostrando aumento da amplitude de resposta de SPM. Também revelou aumento do SPM em relação aos grupos de ket. 20 e 40mg/kg. Nenhuma alteração foi observada na porcentagem de sobressalto (figura 11).

Figura 11. Gráfico representativo da influência do ciclo estral proestro no efeito 24 horas de retirada da ketamina (abstinência) nas doses de 20 (n = 8) e 40 (n = 6) mg/kg e animais controle (n = 8) (salina fisiológica s.c.), sobre a amplitude (g = gramas) da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem do SPM. * Diferença significativa entre som x luz-som dentro de cada grupo (Sal ou Ket.). # Diferença significativa entre os grupos (sal e ket.) no mesmo ensaio (som ou luz-som). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA com *post-hoc* Newman-Keuls, com $p \leq 0.05$.

No que diz respeito ao estro, a ANOVA mostrou diferenças significativas apenas intra grupos (som x luz - som; $F_{1,21} = 26.43$; $p < 0.0001$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que há diferenças entre som e luz x som nos grupos salina e ketamina 20mg/kg, mostrando aumento da amplitude de resposta de SPM. Já para o grupo ketamina 40mg/kg não houve diferença entre som e luz-som. Nenhuma alteração foi observada na porcentagem de sobressalto (figura 12).

Figura 12. Gráfico representativo da influência do ciclo estral estro no efeito 24 horas de retirada da ketamina (abstinência) nas doses de 20 ($n = 8$) e 40 ($n = 8$) mg/kg e animais controle ($n = 8$) (salina fisiológica s.c.), sobre a amplitude (g = gramas) da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem do SPM. * Diferença significativa entre som x luz-som dentro de cada grupo (Sal ou Ket.). ANOVA com *post-hoc* Newman-Keuls, com $p \leq 0.05$.

No diestro, a ANOVA mostrou diferenças significativas apenas intra grupos (som x luz - som; $F_{1,21} = 29.58$; $p < 0.0001$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que há diferenças entre som e luz x som nos grupos salina e ketamina 40mg/kg, mostrando aumento da amplitude de resposta de SPM. Já para o grupo ketamina 20mg/kg não houve diferença entre som e luz-som. Nenhuma alteração foi observada na porcentagem de sobressalto (figura 13).

Figura 13. Gráfico representativo da influência do ciclo estral diestro no efeito 24 horas de retirada da ketamina (abstinência) nas doses de 20 ($n = 8$) e 40 ($n = 8$) mg/kg e animais controle ($n = 8$) (salina fisiológica s.c.), sobre a amplitude (g = gramas) da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem do SPM. * Diferença significativa entre som x luz-som dentro de cada grupo (Sal ou Ket.). ANOVA com *post-hoc* Newman-Keuls, com $p \leq 0.05$.

4.3 Experimento 3: Retirada da ketamina (6 dias)

Neste experimento os gráficos mostram a amplitude de resposta de sobressalto em ratas, separadas de acordo com as fases do ciclo estral: proestro (n= 24), estro (n = 24) e diestro (n = 24) no efeito 6 dias de retirada da ketamina (abstinência) e animais controle, sobre a amplitude da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem do SPM.

Com relação ao proestro, a ANOVA mostrou diferenças significativas apenas intra grupos (som x luz - som; $F_{1,21} = 26.41$; $p < 0.0001$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que há diferenças entre som e luz x som apenas nos grupos tratados com ketamina, mostrando aumento da amplitude de resposta de SPM, ou seja, essa resposta foi significativamente afetada pelo tratamento com a droga. Nenhuma alteração foi observada na porcentagem de sobressalto (figura 14).

Figura 14. Gráfico representativo da influência do ciclo estral proestro no efeito 6 dias de retirada da ketamina (abstinência) nas doses de 20 (n = 8) e 40 (n = 8) mg/kg e animais controle (n = 8) (salina fisiológica s.c.), sobre a amplitude (g = gramas) da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem do SPM. * Diferença significativa entre som x luz-som dentro de cada grupo (Sal ou Ket.). ANOVA com *post-hoc* Newman-Keuls, com $p \leq 0.05$.

No estro, a ANOVA mostrou diferenças significativas apenas intra grupos (som x luz - som; $F_{1,21} = 71.69$; $p < 0.000001$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que há diferenças entre som e luz x som em todos os grupos, mostrando aumento da amplitude de resposta de SPM. Nenhuma alteração foi observada na porcentagem de sobressalto (figura 15).

Figura 15. Gráfico representativo da influência do ciclo estral estro no efeito 6 dias de retirada da ketamina (abstinência) nas doses de 20 ($n = 8$) e 40 ($n = 8$) mg/kg e animais controle ($n = 8$) (salina fisiológica s.c.), sobre a amplitude (g = gramas) da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem do SPM. * Diferença significativa entre som x luz-som dentro de cada grupo (Sal ou Ket.). ANOVA com *post-hoc* Newman-Keuls, com $p \leq 0.05$.

Para o diestro, a ANOVA mostrou diferenças significativas apenas intra grupos (som x luz - som; $F_{1,20} = 21.05$; $p < 0.001$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que há diferenças entre som e luz x som nos grupos salina e ketamina 20mg/kg, mostrando aumento da amplitude de resposta de SPM. Já para o grupo ketamina 40mg/kg não houve diferença entre som e luz-som. Nenhuma alteração foi observada na porcentagem de sobressalto (figura 16).

Figura 16. Gráfico representativo da influência do ciclo estral diestro no efeito 6 dias de retirada da ketamina (abstinência) nas doses de 20 ($n = 8$) e 40 ($n = 8$) mg/kg e animais controle ($n = 8$) (salina fisiológica s.c.), sobre a amplitude (g = gramas) da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem do SPM. * Diferença significativa entre som x luz-som dentro de cada grupo (Sal ou Ket.). ANOVA com *post-hoc* Newman-Keuls, com $p \leq 0.05$.

4.4 Experimento 4: Tratamento Crônico e Haloperidol

Os gráficos a seguir mostram a amplitude de resposta de sobressalto em ratas, separadas de acordo com as fases do ciclo estral: proestro (n= 21), estro (n = 21) e diestro (n = 24) no efeito crônico (14º dia) associado à microinjeção do antipsicótico haloperidol nos grupos experimentais ketamina (20 e 40 mg/kg) e salina, sobre a amplitude da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem do SPM.

No proestro, a ANOVA mostrou diferenças significativas intra (som x luz - som; $F_{1,25} = 53.21$; $p < 0.000001$) e entre grupos (salina x ketamina; $F_{3,25} = 3.44$; $p < 0.03$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que há diferenças entre som e luz x som nos grupos que receberam a microinjeção de haloperidol, tanto salina quanto ketamina, mostrando aumento da amplitude de resposta de SPM. Também houve diferença entre os grupos salina-PBS e ket.40mg/kg-Hal em relação ao SPM. Nenhuma alteração foi observada na porcentagem de sobressalto (figura 17).

Figura 17. Gráfico representativo da influência do ciclo estral proestro no efeito da microinjeção (PrL) de Haloperidol no efeito crônico de ketamina nas doses de 20 (n = 7), 40 (n = 6) mg/kg e salina (n = 8) e controle (salina-PBS) (n = 8), sobre a amplitude (g = gramas) da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem do SPM. * Diferença significativa entre som x luz-som dentro de cada grupo (Sal ou Ket.). # Diferença significativa entre os grupos (sal e ket.) no mesmo ensaio (som ou luz-som). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA com *post-hoc* Newman-Keuls, com $p \leq 0.05$.

No que diz respeito ao estro, a ANOVA mostrou diferenças significativas intra grupos (som x luz - som; $F_{1,25} = 49.65$; $p < 0.000001$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que há diferenças entre som e luz x som apenas no grupo salina-PBS, ou seja, a microinjeção de haloperidol não foi capaz de mudar a respostas incondicionada de sobressalto ou o SPM. Nenhuma alteração foi observada na porcentagem de sobressalto. Nenhuma alteração foi observada na porcentagem de sobressalto (figura 18).

Figura 18. Gráfico representativo da influência do ciclo estral estro no efeito da microinjeção (PrL) de Haloperidol no efeito crônico de ketamina nas doses de 20 ($n = 8$), 40 ($n = 7$) mg/kg e salina ($n = 6$) e controle (salina-PBS) ($n = 8$) sobre a amplitude (g = gramas) da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem do SPM. * Diferença significativa entre som x luz-som dentro de cada grupo (Sal ou Ket.). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA com *post-hoc* Newman-Keuls, com $p \leq 0.05$

Em relação ao diestro, a ANOVA mostrou diferenças significativas intra grupos (som x luz - som; $F_{1,28} = 35.94$; $p < 0.00001$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que há diferenças entre som e luz x som nos grupos salina-hal e ket.20 mg/kg-hal, mostrando aumento da amplitude de resposta de SPM. Nenhuma alteração foi observada na porcentagem de sobressalto (figura 19).

Figura 19. Gráfico representativo da influência do ciclo estral diestro no efeito da microinjeção (PrL) de Haloperidol no efeito crônico de ketamina nas doses de 20 ($n = 8$), 40 ($n = 8$) mg/kg e salina ($n = 8$) e controle (salina-PBS) ($n = 8$) sobre a amplitude (g = gramas) da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem do SPM. * Diferença significativa entre som x luz-som dentro de cada grupo (Sal ou Ket.). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA com *post-hoc* Newman-Keuls, com $p \leq 0.05$

4.5 Experimento 5: Tratamento Crônico e 8-OH-DPAT

Neste próximo experimento os gráficos mostram a amplitude de resposta de sobressalto em ratas, separadas de acordo com as fases do ciclo estral: proestro (n = 21), estro (n = 21) e diestro (n = 24) no efeito crônico (14º dia) associado à microinjeção do agonista serotoninérgico 8-OH-DPAT nos grupos experimentais ketamina (20 e 40 mg/kg) e salina, sobre a amplitude da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem do SPM.

No que diz respeito ao proestro, a ANOVA mostrou diferenças significativas intra grupos (som x luz - som; $F_{1,25} = 52.00$; $p < 0.000001$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que há diferenças entre som e luz x som nos grupos que receberam a microinjeção de 8-OH-DPAT, tanto salina quanto ketamina, mostrando aumento da amplitude de resposta de SPM. Nenhuma alteração foi observada na porcentagem de sobressalto (figura 20).

Figura 20. Gráfico representativo da influência do ciclo estral proestro no efeito da microinjeção (PrL) de 8-OH-DPAT no efeito crônico de ketamina nas doses de 20 (n = 7), 40 (n = 6) mg/kg e salina (n = 8) e controle (salina-PBS) (n = 8) sobre a amplitude (g = gramas) da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem do SPM. * Diferença significativa entre som x luz-som dentro de cada grupo (Sal ou Ket.). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA com *post-hoc* Newman-Keuls, com $p \leq 0.05$.

No estro, a ANOVA mostrou diferenças significativas intra grupos (som x luz - som; $F_{1,25} = 24.24$; $p < 0.00004$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que há diferenças entre som e luz x som apenas no grupo salina-PBS, ou seja, a microinjeção de 8-OH-DPAT não foi capaz de mudar a respostas incondicionada de sobressalto ou o SPM. Nenhuma alteração foi observada na porcentagem de sobressalto. Nenhuma alteração foi observada na porcentagem de sobressalto (figura 21).

Figura 21. Gráfico representativo da influência do ciclo estral estro no efeito da microinjeção (PrL) de 8-OH-DPAT no efeito crônico de ketamina nas doses de 20 ($n = 7$), 40 ($n = 7$) mg/kg e salina ($n = 7$) e controle (salina-PBS) ($n = 8$) sobre a amplitude (g = gramas) da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem do SPM. * Diferença significativa entre som x luz-som dentro de cada grupo (Sal ou Ket.). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA com *post-hoc* Newman-Keuls, com $p \leq 0.05$.

E para o diestro, a ANOVA mostrou diferenças significativas intra grupos (som x luz - som; $F_{1,27} = 42.63$; $p < 0.000001$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que há diferenças entre som e luz x som nos grupos que receberam a microinjeção de 8-OH-DPAT, tanto salina quanto ketamina, mostrando aumento da amplitude de resposta de SPM. Nenhuma alteração foi observada na porcentagem de sobressalto (figura 22).

Figura 22. Gráfico representativo da influência do ciclo estral diestro no efeito da microinjeção (PrL) de 8-OH-DPAT no efeito crônico de ketamina nas doses de 20 ($n = 8$), 40 ($n = 8$) mg/kg e salina ($n = 8$) e controle (salina-PBS) ($n = 8$) sobre a amplitude (g = gramas) da resposta incondicionada (Som) e condicionada (Luz/Som) de sobressalto e a porcentagem do SPM. * Diferença significativa entre som x luz-som dentro de cada grupo (Sal ou Ket.). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA com *post-hoc* Newman-Keuls, com $p \leq 0.05$

5. DISCUSSÃO

A resposta reflexa de sobressalto é um fenômeno primitivo que decorre da apresentação ao organismo de um estímulo súbito e intenso (SWERDLOW *et al.*, 1999). Sabe-se, que flutuações nas concentrações de esteroides endógenos resulta na alteração na cinética do receptor GABA_A e, conseqüentemente, num impacto na excitabilidade neural (GANGISETT; REDDY, 2010; GANGITANO *et al.*, 2009); um efeito não especificamente vinculado à queda de progesterona em si mas, mais especificamente, ao decréscimo nos níveis do seu metabólito allopregnanolone (GULINELLO *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 1998a, 1998b). Portanto, é de se esperar um aumento na amplitude da resposta de sobressalto potencializado pelo medo quando os animais são testados em períodos do ciclo estral onde os níveis hormonais estão deprimidos, assim como uma atenuação dessa resposta se os animais são testados em períodos do ciclo onde os níveis hormonais estão exacerbados, como no caso do proestro.

Em nosso estudo, ratas tratadas com placebo e submetidas ao procedimento de sobressalto potencializado pelo medo não apresentaram alteração na aprendizagem associativa já que a expressão da resposta aprendida de medo foi mantida em todas as fases do ciclo estral. Isto também sugere que o ciclo hormonal não tem qualquer influência sobre a aprendizagem. Entretanto, a amplitude dessa resposta variou entre os ciclos se apresentando aumentada no proestro e estro e reduzida durante a fase do diestro.

A redução da potencialização do sobressalto durante o diestro, entretanto, não pode ser devida a uma redução no tonus emocional nesta fase do ciclo na medida em que diversos trabalhos mostram que o contrário ocorre. Ou seja, ratas de laboratório, assim como as mulheres em geral, apresentam um padrão de comportamento mais agressivo em resposta a estímulos estressores, padrão esse que varia segundo o ciclo hormonal, sendo mais acentuado na fase não-receptiva do ciclo (diestro) quando comparado com a fase receptiva (proestro e estro) (GANGITANO *et al.*, 2009; MARCONDES *et al.*, 2001; MORA *et al.*, 1996). A razão então para a redução na potencialização do sobressalto neste caso se deve a outro fator. A amplitude da resposta de sobressalto potencializado pelo medo é diretamente e inversamente relacionada ao nível de tensão (o que se assemelharia à ansiedade em roedores) presente no indivíduo. Significa dizer que a existência de tensão moderada produz aumento da resposta. Por outro lado, grande tensão (alta ansiedade ou medo intenso) induz uma redução na resposta, o que caracteriza a função não monotônica do sobressalto potencializado (DAVIS; ASTRACHAN, 1978). Com base nisso, supomos que o desconforto emocional intenso gerado pela queda hormonal durante o diestro (que em nosso

trabalho agrupou as duas fases precoce e tardio) levou a uma redução, e não aumento, na potencialização do sobressalto.

Como parte de nosso primeiro experimento, investigamos também os efeitos da ketamina sobre a potencialização do sobressalto induzido pelo medo. Nossos dados mostram uma redução na potencialização para ambas as doses utilizadas, não importando a fase hormonal. Apesar disso, a ketamina parece não afetar o condicionamento dessa resposta já que ambas as doses, 20 e 40 mg/kg, produziram poucos efeitos diferenciais (ou mesmo nenhum efeito) sobre a expressão tanto da resposta incondicionada de sobressalto (resposta ao som) quanto do sobressalto potencializado pelo medo (resposta à associação luz/som). Resultado similar foi encontrado no estudo de Pietersen et al. (2006) onde a indução de um estado hipoglutamatérgico pela administração s.c. de ketamina levou um bloqueio da na expressão do medo condicionado. Importante também notar que a ketamina, mesmo em doses subanestésicas, apresenta a propriedade de induzir distorções perceptuais o que poderia levar a problemas no encadeamento de estímulos resultando num decréscimo da resposta. Cumpre notar, entretanto, e reiterando o que já foi observado mais acima, que as doses utilizadas não produziram qualquer efeito sobre a expressão da resposta à configuração de estímulos luz-som.

Em nosso segundo experimento, analisamos os efeitos da abstinência de 24 horas de ketamina sobre as mesmas variáveis; resposta incondicionada e condicionada de medo, e sobressalto potencializado. Os efeitos da ketamina, no presente caso, foram claramente dependentes do ciclo estral no momento do teste. Os resultados mostram que a interrupção da administração de ketamina levou a uma perturbação na expressão do medo condicionado durante o proestro. Os efeitos da abstinência sobre a potencialização do sobressalto foram similares aos anteriores.

Dentre os hormônios femininos envolvidos com a regulação hormonal e emocional estão os esteroides. Estes são hormônios sintetizados e metabolizados em diversas áreas do sistema nervoso central, por isso mesmo chamados de neuroesteróides (ROBEL; BAULIEU, 1994). Dentre estas substâncias estão o pregnanolone (5-pregnen-3 β -ol-20-one), e o allopregnanolone (3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one). Neuroesteróides em geral apresentam a característica de facilitar a ação do GABA endógeno (GUIDOTTI; COSTA, 1998; MAJEWSKA, 1992), sendo o allopregnanolone conhecido por atuar particularmente como agonista o receptor GABA_A (SCHÜLE *et al.*, 2014). Em nosso trabalho, níveis basais de progesterona parecem influenciar o prejuízo no encadeamento de estímulos observado

nesta fase, onde a expressão do sobressalto durante o pareamento de estímulos luz/som não se diferenciou da resposta apresentada diante estímulo incondicionado somente.

Em virtude da quase inexistência de estudos sobre os efeitos da ketamina em fêmeas, sobretudo dos efeitos da interrupção aguda, sub-crônica ou crônica, discutir os resultados encontrados em nosso trabalho não é uma tarefa fácil. No entanto, desde que os efeitos diferenciais da abstinência de 24 horas de ketamina se acentuam durante o proestro particularmente, parece óbvio que estas alterações se devam a uma interação entre as alterações produzidas pela droga, durante o tratamento, sobre os níveis hormonais e que se expressam como déficit cognitivo durante a abstinência. De fato, em mulheres, foi demonstrado que a retirada de ketamina leva a um declínio cognitivo (CHEN *et al.*, 2014); embora este não tenha sido associado especificamente a um ciclo hormonal. Sabe-se também que em ratas, exceto para o estradiol, a ketamina apresenta a capacidade de reduzir os níveis séricos dos hormônios progesterona e testosterona (LEE *et al.*, 2000). A progesterona também apresenta importante função na modulação dos neurotransmissores serotonina, glutamato, noradrenalina, dopamina (ZHENG, 2009) e, principalmente, GABA (BRINTON *et al.*, 2008), funções estas ligadas a seus efeitos positivos sobre a cognição e coordenação sensório-motora. Estes efeitos, se for o caso, parecem transitórios na medida em que após 6 dias de abstinência tanto as respostas incondicionada e condicionada de sobressalto, quanto sua potencialização, retornam ao basal (e por vezes se acentuam acima deste) no proestro e estro dos grupos previamente tratados com ketamina.

Mulheres em geral apresentam um maior risco para desenvolver transtornos de ansiedade, quando comparadas aos homens (LEBRON-MILAD; MILAD, 2012). Estas desordens são principalmente caracterizadas por problemas na inibição da resposta de medo aprendido (JOVANOVIC *et al.*, 2010; MILAD, 2009). Um dos correspondentes neurais principais da expressão deste comportamento é a área do CPFm, o PrL (SIERRA-MERCADO *et al.*, 2011). Nesta região, a ativação de receptores NMDA acentua a resposta de medo condicionado (STERN *et al.*, 2014; VANVOSSSEN *et al.*, 2017) o que reforça a importância desses receptores nos mecanismos de aprendizagem e memória (ANIS *et al.*, 1983). Foi sugerido também a existência de uma forte interação entre aminoácidos excitatórios e aferentes dopaminérgicos no CPF (VERMA; MOGHADDAM, 1996), aferências estas oriundas da ATV do mesencéfalo (HOOVER; VERTES, 2007). Essas projeções, uma vez ativadas por estímulos aversivos induzem um aumento de DA no CPFm (HONDO *et al.*, 1994).

Drogas de abuso em geral produzem seus efeitos acentuando o funcionamento dopaminérgico, particularmente no circuito que se inicia na ATV e se direciona para áreas límbicas, como núcleo accumbens (KOOB, 1992). A fenciclidina, assim como seu derivado sintético ketamina, apresenta intensa ação psicomimética levando ao surgimento de excitação, paranoia, desordens do pensamento, alucinações, e toda a gama de sintomas associados à psicose, particularmente a esquizofrenia (LODGE; MERCIER, 2015). Assim como estressores em geral, esta substância apresenta a propriedade de aumentar significativamente os níveis de dopamina extracelular, e metabólitos, no CPF (HONDO *et al.*, 1994) e núcleo accumbens (CARBONI *et al.*, 1989). Ainda, foi sugerido que os receptores de glutamato do tipo NMDA parecem exercer uma atividade inibitória tônica sobre a neurotransmissão dopaminérgica no CPF medial (HATA *et al.*, 1990).

Na medida em que a ketamina é um antagonista de receptores de glutamato e apresenta potentes efeitos psicomiméticos assim como risco de abuso, investigamos os efeitos da administração local, no PrL, do antagonista de receptores de dopamina e antipsicótico haloperidol sobre as alterações induzidas pela ketamina na resposta de medo aprendido. Nossos dados mostram que o haloperidol isoladamente apresenta um efeito sobre a potencialização do sobressalto que é diretamente correlacionado ao ciclo estral, reduzindo esta variável no proestro e acentuando significativamente a resposta no diestro. A associação ketamina/haloperidol acentua a amplitude de sobressalto ao estímulo luz/som e parece produzir o mesmo efeito sobre o sobressalto potencializado.

A administração de um agonista dopaminérgico no PrL acentua a resposta excitatória destes neurônios, resposta esta bloqueada pela progesterona (FENG *et al.*, 2004). Em nosso trabalho o antagonismo dopaminérgico com haloperidol reduziu a amplitude do sobressalto potencializado, resultado que se adequa ao previamente exposto. Em contrapartida, nos grupos tratados com ketamina a injeção intra-PrL de haloperidol restaura a potencialização do sobressalto aos níveis basais.

Em trabalhos anteriores foi sugerido que a dopamina atuaria em receptores sigma do tipo 1 (σ_1) (WILKE *et al.*, 1999), sendo a progesterona um antagonista para estes receptores (MAURICE *et al.*, 2001). Dessa forma, a progesterona produziria seus efeitos inibitórios sobre o aumento na excitação pós-sináptica mediada por dopamina nos neurônios do PrL, aumento esse induzido pelo bloqueio dos receptores NMDA com ketamina. Vale ressaltar que o haloperidol apresenta pouca afinidade para receptores D1 (BRAND *et al.*, 1996), mas se liga com igual afinidade a receptores σ_1 e receptores D2 de dopamina (BOWEN *et al.*,

1990). Esta configuração complexa de fatores pode ser uma explicação para os efeitos da interação haloperidol/ketamina sobre o sobressalto potencializado pelo medo observado em nosso estudo.

Além da dopamina, a serotonina é outro neurotransmissor capaz de acentuar a excitação pós-sináptica no PrL (MAREK; AGHAJANIAN, 1999).

Como demonstrado através de estudos neuroquímicos e eletrofisiológicos, e neste texto, as alterações relacionadas ao ciclo estral parecem envolver o funcionamento de diversos neurotransmissores sendo, dentre os mais importantes, o sistema GABAérgico (MACKENZIE; MAGUIRE, 2014; PERICIC *et al.*, 1986) e o sistema serotoninérgico (BIEGON *et al.*, 1980; LEBRON-MILAD *et al.*, 2013; WILLIAMS; UPHOUSE, 1989), dentre outros. Ambos neurotransmissores estão ativamente implicados no controle da ansiedade (GRIEBEL; HOLMES, 2013). De fato, a 5-HT, que se apresenta como um neurotransmissor presente em todas as regiões do sistema nervoso central, apesar de produzido e liberado por um sistema neural oriundo principalmente dos núcleos mesencefálicos da rafe, é grandemente modulada ao longo da vida por hormônios ovarianos (KRAJNAK *et al.*, 2003; LOWRY *et al.*, 2008).

A ação dos estrógenos no sistema nervoso central durante o desenvolvimento leva a diferenciação sexual do sistema 5-HT, o que resulta em diferentes níveis de 5-HT em machos e fêmeas (GONZALEZ; LERET, 1992; REZNIKOV; NOSENKO, 1996). Ainda, a 5-HT neuronal é altamente influenciada por alterações nas taxas de estrógeno e progesterona que comumente ocorrem durante o ciclo estral ao longo da vida adulta (MASWOOD *et al.*, 1999, 1995). Estes hormônios ovarianos apresentam a propriedade de manter a saúde e viabilidade de neurônios 5-HT (BETHEA *et al.*, 2002), e ambas, saúde e viabilidade, são condições necessárias para preservar a integridade afetiva e emocional (COOLS *et al.*, 2008). Além disso, sabe-se que a liberação de 5-HT no CPFm depende do sistema excitatório glutamatérgico (LÓPEZ-GIL *et al.*, 2012). Esta região, como já visto, tem papel preponderante nos efeitos farmacológicos da ketamina em função do receptor NMDA, para o qual a ketamina apresenta alta afinidade (MURRAY *et al.*, 2000), ser aí amplamente expresso (KAMIYAMA *et al.*, 2011; SANZ-CLEMENTE *et al.*, 2013). Em função de todas essas peculiaridades a última parte de nosso estudo se destinou a avaliar os efeitos do agonista de receptores de 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT, o qual apresenta alta seletividade por auto-receptores (HJORTH; MAGNUSSON, 1988). Nossos resultados mostram que, no proestro

e diestro, os efeitos do 8-OH-DPAT foram similares aqueles observados com o haloperidol. Efeitos contrários foram encontrados no estro.

Sabemos que a 5-HT cumpre uma função inibitória sobre o comportamento sexual e ovulação. Neste contexto então espera-se que haja uma redução nos níveis de 5-HT nos períodos em que ocorrem o comportamento sexual e a ovulação, ou seja, durante o proestro e o estro (BIEGON *et al.*, 1980). A isso se soma a liberação de 5-HT pré-frontal que é dependente do sistema excitatório glutamatérgico (LÓPEZ-GIL *et al.*, 2012). Dessa forma, a administração de ketamina durante o proestro tende a reduzir ainda mais os níveis de 5-HT no CPFm. Em animais controle, entretanto, sabe-se que as propriedades aversivas do condicionamento são atenuadas no proestro (SMITH *et al.*, 2007), sugerindo que aumentos nas taxas de 5-HT induzidos pela administração de 8-OH-DPAT induzem um estado aversivo, fato este atenuado quando o agonista é pareado com os efeitos da ketamina. Os efeitos do agonista em ratas testados durante o estro são mais difíceis de explicar. Durante esta fase do ciclo estral o estradiol é o tipo de hormônio diretamente envolvido nas respostas do organismo a um ambiente potencialmente ameaçador ou pistas contextuais que sinalizam tais estímulos (MORGAN *et al.*, 2004). Além disso, Os níveis séricos de estradiol são reduzidos com a administração de ketamina (LEE *et al.*, 2000) . Dessa forma, os efeitos inibidores do 8-OH-DPAT sobre a amplitude do sobressalto poderiam resultar ou de uma ação ansiolítica resultante da somatória de efeitos, ou de uma perturbação no encadeamento de estímulos como efeito das doses escalonadas de ketamina. A princípio, esta segunda hipótese não se adequa aos resultados já que a administração de 8-OH-DPAT em animais pré-tratados com ketamina restaura a potencialização do sobressalto.

6. CONCLUSÃO

Apesar de contrastantes e muitas vezes de difícil explicação, nossos dados reforçam a ideia de que a ketamina demonstra de forma significativa a expressão da resposta aprendida de medo. Além disso, os dados mostram que a abstinência da droga altera este comportamento, particularmente a capacidade cognitiva relacionada ao encadeamento de estímulos. Da mesma forma que outras drogas de abuso, estas alterações parecem envolver tanto o sistema dopaminérgico quanto o serotoninérgico do CPFm. As alterações efetuadas pela droga dependem diretamente do momento hormonal em que as ratas de laboratório são testadas. Portanto, o próximo passo de nossa investigação será focado no estudo tanto da aquisição quanto da expressão do medo aprendido em fêmeas testadas com ketamina administrada localmente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel, K.M.; Drake, R.; Goldstein, J.M. Sex differences in schizophrenia. *Int Rev Psychiatry* 22:417–428, 2010.

Aleman, A., Kahn, R.S., Selten, J.P., 2003. Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry* 60, 565–71.
doi:10.1001/archpsyc.60.6.565

Anis, N.A., Berry, S.C., Burton, N.R., Lodge, D., 1983. The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *Br. J. Pharmacol.* 79, 565–575. doi:10.1111/j.1476-5381.1983.tb11031.x

Bechara, A.; Damasio, H. Decision-making and addiction (Part I): Impaired activation of somatic states in substance dependent individuals when pondering decisions with negative future consequences. *Neuropsychologia*, 40, 1675–1689, 2002.

Bethea, C.L., Lu, N.Z., Gundlah, C., Streicher, J.M., 2002. Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system. *Front Neuroendocr.* 23, 41–100.
doi:10.1006/frne.2001.0225

Biegón, A., Bercovitz, H., Samuel, D., 1980. Serotonin receptor concentration during the estrous cycle of the rat. *Brain Res.* 187, 221–225. doi:10.1016/0006-8993(80)90509-0

Bizot, J. C.; Le Bihan, C.; Puech, A. J.; Hamon, M., Thiebot, M.-H. Serotonin and tolerance to delay of reward in rats. *Psychopharmacology*, 146, 400–412, 1996.

Blachut, M., Solowiow, K., Janus, A., Ruman, J., Cekus, A., Matysiakiewicz, J., Hese, R.T., 2009. [A case of ketamine dependence]. *Psychiatr Pol* 43, 593–9.

Bourin, M.; Hascoet, M. The mouse light/dark box test. *European journal of pharmacology*, v. 463, n. 1-3, p. 55–65, 28 fev. 2003.

Bowen, W.D., Moses, E.L., Tolentino, P.J., Michael Walker, J., 1990. Metabolites of haloperidol display preferential activity at σ receptors compared to dopamine D-2 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 177, 111–118. doi:10.1016/0014-2999(90)90260-D

Błaszczak, J.; Tajchert, K. Sex and strain differences of acoustic startle reaction development in adolescent albino Wistar and hooded rats. *Acta neurobiologiae experimentalis*, v. 56, n. 4, p. 919–25, 1996.

Brand, L., Oliver, D.W., van der Schyf, C.J., Pond, S.M., Castagnoli, N., 1996. Dopamine receptor binding of 4-(4-chlorophenyl)-1-[4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutyl]-1, 2,3,6-tetrahydropyridine (HPTP), an intermediate metabolite of haloperidol. *Life Sci.* 59, 815–820. doi:10.1016/0024-3205(96)00372-4

Brinton, R.D., Thompson, R.F., Foy, M.R., Baudry, M., Wang, J., Finch, C.E., Morgan, T.E., Pike, C.J., Mack, W.J., Stanczyk, F.Z., Nilsen, J., 2008. Progesterone receptors: Form and function in brain. *Front. Neuroendocrinol., Rapid Actions of Steroid Hormones* 29, 313–339. doi:10.1016/j.yfrne.2008.02.001

- Brown, J. S.; Kalish, H. I.; Farber, I. E. Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. *Journal of experimental psychology*, v. 41, n. 5, p. 317–28, maio 1951.
- Brunner, D.; & Hen, R. Insights into the neurobiology of impulsive behavior from serotonin receptor knockout mice. *Annals of New York Academy of Sciences*, 836, 8-105, 1997.
- Castellani, S.; Adams, P.M.: Effects of dopaminergic drugs on phencyclidine-induced behavior in the rat. *Neuropharmacology* 20 (4):371-374, 1981.
- Carlsson, M.L. Are the disparate pharmacological profiles of competitive and uncompetitive NMDA antagonists due to different baseline activities of distinct glutamatergic pathways? (Hypothesis). *J Neural Transm Gen Sect* 94:1–10, 1993.
- Carboni, E., Imperato, A., Perezzani, L., Di Chiara, G., 1989. Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuroscience* 28, 653–661.
- Carlsson, M.L., 1993. Are the disparate pharmacological profiles of competitive and uncompetitive NMDA antagonists due to different baseline activities of distinct glutamatergic pathways? (Hypothesis). *J Neural Transm Gen Sect* 94, 1–10.
- Chatterjee, M., Ganguly, S., Srivastava, M., Palit, G., 2011. Effect of “chronic” versus “acute” ketamine administration and its “withdrawal” effect on behavioural alterations in mice: implications for experimental psychosis. *Behav Brain Res* 216, 247–54.
doi:10.1016/j.bbr.2010.08.001
- Chadman, K. K.; Yang, M.; Crawley, J. N. Criteria for validating mouse models of psychiatric diseases. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, v. 150B, n. 1, p. 1–11, 5 jan. 2009.
- Chen, W.-Y., Huang, M.-C., Lin, S.-K., 2014. Gender differences in subjective discontinuation symptoms associated with ketamine use. *Subst. Abuse Treat. Prev. Policy* 9. doi:10.1186/1747-597X-9-39
- Cools, R., Roberts, A.C., Robbins, T.W., 2008. Serotonergic regulation of emotional and behavioural control processes. *Trends Cogn. Sci.* 12, 31–40. doi:10.1016/j.tics.2007.10.011
- Corlett, P.R.; Honey, G.D.; Aitken, M.R.; Dickinson, A.; Shanks, D.R.; Absalom, A.R.; *et al.*: Frontal responses during learning predict vulnerability to the psychotogenic effects of ketamine: Linking cognition, brain activity, and psychosis. *Arch Gen Psychiatry* 63:611-621, 2006.
- Critchlow, D.G., 2006. A case of ketamine dependence with discontinuation symptoms. *Addiction* 101, 1212–3. doi:10.1111/j.1360-0443.2006.01494.x

Dalla, C.; Pitychoutis, P.M.; Kokras, N.; Papadopoulou-Daifoti, Z.: Sex differences in response to stress and expression of depressive-like behaviours in the rat. *Curr Top Behav Neurosci* 8:97-118, 2011.

Dalley, J.W.; Cardinal, R.N.; Robbins, T.W. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28:711-784, 2004.

Davis, M., Astrachan, D.I., 1978. Conditioned fear and startle magnitude: effects of different footshock or backshock intensities used in training. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 4, 95–103.

Davis, M. Pharmacological and anatomical analysis of fear conditioning using the fearpotentiated startle paradigm. *Behavioral neuroscience*, v. 100, n. 6, p. 814–24, dez. 1986.

Delamater, A. R. On the nature of CS and US representations ins Pavlovian learning. *Learning and Behavior*, 40:1-23, 2012.

Deakin, J.F., Lees, J., McKie, S., Hallak, J.E., Williams, S.R., Dursun, S.M., 2008. Glutamate and the neural basis of the subjective effects of ketamine: a pharmaco-magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry* 65, 154–64. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2007.37

De Oliveira, A.R., Colombo, A.C., Muthuraju, S., Almada, R.C., Brandao, M.L., 2014. Dopamine D2-like receptors modulate unconditioned fear: role of the inferior colliculus. *PLoS One* 9, e104228. doi:10.1371/journal.pone.0104228

Dillon, P., Copeland, J., Jansen, K., 2003. Patterns of use and harms associated with non-medical ketamine use. *Drug Alcohol Depend* 69, 23–8.

Duman, R.S., 2014. Pathophysiology of depression and innovative treatments: remodeling glutamatergic synaptic connections. *Dialogues Clin Neurosci*, 16:11-27.

Duman, R.S., Li, N., Liu, R.j., Duric, V., Aghajanian, G., 2012. Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. *Neuropharmacology* 62:35-41.

Drummond, D.C. Theories of drug craving, ancient and modern. *Addiction*, 2001;96(1):33-46.

Esch, T.; Atefano, G.B. The neurobiology of pleasure, reward processes, addiction and their health implications. *Neuro Endocrinol Lett.*, 2004;25(4):235-51.

Evans, H.M., Long, J.A., 1922. Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 8, 38–39.

Evenden, J. L.; Ryan, C. N. The pharmacology of impulsive behaviour in rats: VI. The effects of ethanol and selective serotonergic drugs on response choice with varying delays of reinforcement. *Psychopharmacology*, 146, 413–421, 1999.

Everitt, B. J., Dickinson, A., & Robbins, T. W. The neuropsychological bases of addictive behaviour. *Brain Research Reviews*, 36, 129–138, 2001.

Ezequiel Leite, L., Nobre, M.J., 2012. The negative effects of alcohol hangover on high-anxiety phenotype rats are influenced by the glutamate receptors of the dorsal midbrain. *Neuroscience*. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.04.009

Fein, G.; Di Sclafani, V.; Meyerhoff, D. J. Prefrontal cortical volume reduction associated with frontal cortex function deficit in 6-week abstinent crack-cocaine dependent men. *Drug and Alcohol Dependence*, 68, 87–93, 2002.

Feng, X.-Q., Dong, Y., Fu, Y.-M., Zhu, Y.-H., Sun, J.-L., Wang, Z., Sun, F.-Y., Zheng, P., 2004. Progesterone inhibition of dopamine-induced increase in frequency of spontaneous excitatory postsynaptic currents in rat prelimbic cortical neurons. *Neuropharmacology* 46, 211–222. doi:10.1016/j.neuropharm.2003.08.002

Finn, P. R.; Justus, A. N.; Mazas, C. A.; STEINMETZ, J. E. Working memory, executive processes and the effects of alcohol on go/no-go learning: Testing a model of behavioural regulation and impulsivity. *Psychopharmacology*, 146, 465–472, 1999,

Fletcher, P.C.; Honey, G.D.: Schizophrenia, ketamine and cannabis: Evidence of overlapping memory deficits. *Trends Cogn Sci* 10:167-174, 2006.

Franceschelli, A.; Sens, J.; Herchick, S.; Thelen, C.; Pitychoutis, M.: Sex differences in the rapid and the sustained antidepressant-like effects of ketamine in stress-naïve and "depressed" mice exposed to chronic mild stress. *Neuroscience* 290:49-60, 2015.

Fuster, J.M. The prefrontal cortex: anatomy, physiology, and neuropsychology of the frontal lobe. New York, USA: Raven Press, 2011.

Gangisetty, O., Reddy, D.S., 2010. NEUROSTEROID WITHDRAWAL REGULATES GABA-A RECEPTOR $\alpha 4$ -SUBUNIT EXPRESSION AND SEIZURE SUSCEPTIBILITY BY ACTIVATION OF PR-INDEPENDENT EGR3 PATHWAY. *Neuroscience* 170, 865–880. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.07.037

Gangitano, D., Salas, R., Teng, Y., Perez, E., De Biasi, M., 2009. Progesterone modulation of $\alpha 5$ nAChR subunits influences anxiety-related behavior during estrus cycle. *Genes Brain Behav.* 8, 398–406. doi:10.1111/j.1601-183X.2009.00476.x

Geyer, M.A., 1998. Behavioral studies of hallucinogenic drugs in animals: implications for schizophrenia research. *Pharmacopsychiatry* 31 Suppl 2, 73–9. doi:10.1055/s-2007-979350
Gilpin, N.W., Koob, G.F., 2008. Neurobiology of Alcohol Dependence: Focus on Motivational Mechanisms. *Alcohol Res. Health* 31, 185–195.

Gigliucci, V., O'Dowd, G. Casey, S., Egan, D., Gibney, S., Harkin, A., 2013. Ketamine elicits sustained antidepressant-like activity via a serotonin-dependent mechanism.

Psychopharmacology (Berl) 228:157-166.

Gonzalez, M.I., Leret, M.L., 1992. Extrahypothalamic serotonergic modification after masculinization induced by neonatal gonadal hormones. *Pharmacol Biochem Behav* 41, 329–32.

Griebel, G., Holmes, A., 2013. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 12, 667–87. doi:10.1038/nrd4075

Groenewegen, H.J.; UYLINGS, H.B.M. The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Progress in Brain Research*, 126:3-28, 2000.

Guidotti, A., Costa, E., 1998. Can the antidysphoric and anxiolytic profiles of selective serotonin reuptake inhibitors be related to their ability to increase brain 3 α , 5 α -tetrahydroprogesterone (allopregnanolone) availability? *Biol. Psychiatry* 44, 865–873. doi:10.1016/S0006-3223(98)00070-5

Gulinello, M., Orman, R., Smith, S.S., 2003. Sex differences in anxiety, sensorimotor gating and expression of the α 4 subunit of the GABAA receptor in the amygdala after progesterone withdrawal. *Eur. J. Neurosci.* 17, 641–648.

Hata, N., Nishikawa, T., Umino, A., Takahashi, K., 1990. Evidence for involvement of N-methyl-d-aspartate receptor in tonic inhibitory control of dopaminergic transmission in rat medial frontal cortex. *Neurosci. Lett.* 120, 101–104. doi:10.1016/0304-3940(90)90178-C

Hiroi R, Neumaier JF (2006) Differential effects of ovarian steroids on anxiety versus fear as measured by open field test and fear-potentiated startle. *Behav Brain Res* 166:93–100.

Hjorth, S., Magnusson, T., 1988. The 5-HT 1A receptor agonist, 8-OH-DPAT, preferentially activates cell body 5-HT autoreceptors in rat brain in vivo. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 338, 463–471.

Holcomb, H.H., Lahti, A.C., Medoff, D.R., Weiler, M., Tamminga, C.A., 2001. Sequential regional cerebral blood flow brain scans using PET with H₂(15)O demonstrate ketamine actions in CNS dynamically. *Neuropsychopharmacology* 25, 165–72. doi:10.1016/S0893-133X(01)00229-9

Hondo, H., Yonezawa, Y., Nakahara, T., Nakamura, K., Hirano, M., Uchimura, H., Tashiro, N., 1994. Effect of phenylcyclidine on dopamine release in the rat prefrontal cortex; an in vivo microdialysis study. *Brain Res.* 633, 337–342. doi:10.1016/0006-8993(94)91558-X

Honey, G.D., Honey, R.A., O’Loughlin, C., Sharar, S.R., Kumaran, D., Suckling, J., Menon, D.K., Sleator, C., Bullmore, E.T., Fletcher, P.C., 2005. Ketamine disrupts frontal and hippocampal contribution to encoding and retrieval of episodic memory: an fMRI study. *Cereb Cortex* 15, 749–59. doi:10.1093/cercor/bhh176

Honey, R.A., Honey, G.D., O’Loughlin, C., Sharar, S.R., Kumaran, D., Bullmore, E.T., Menon, D.K., Donovan, T., Lupson, V.C., Bisbrown-Chippendale, R., Fletcher, P.C.,

2004. Acute ketamine administration alters the brain responses to executive demands in a verbal working memory task: an fMRI study. *Neuropsychopharmacology* 29, 1203–14. doi:10.1038/sj.npp.1300438

Hoover, W.B., Vertes, R.P., 2007. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct* 212, 149–79. doi:10.1007/s00429-007-0150-4

Hubscher, C.H., Brooks, D.L., Johnson, J.R., 2005. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotech. Histochem.* 80, 79–87. doi:10.1080/10520290500138422

Imre, G., Fokkema, D.S., Den Boer, J.A., Ter Horst, G.J., 2006. Dose-response characteristics of ketamine effect on locomotion, cognitive function and central neuronal activity. *Brain Res Bull* 69, 338–45. doi:10.1016/j.brainresbull.2006.01.010

Jansen K (2004) Ketamine: Dreams and Realities. Multidisciplinary Association for Psychedelic Studies (M A P S).

Jentsch, J. D.; Taylor, J. R. Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: Implications for the control of behavior by reward-related stimuli. *Psychopharmacology*, 146, 373–390, 1999.

Jovanovic, T., Norrholm, S.D., Blanding, N.Q., Davis, M., Duncan, E., Bradley, B., Ressler, K.J., 2010. Impaired Fear Inhibition is a Biomarker of PTSD but not Depression. *Depress. Anxiety* 27, 244–251. doi:10.1002/da.20663

Kamiyama, H., Matsumoto, M., Otani, S., Kimura, S.-I., Shimamura, K.-I., Ishikawa, S., Yanagawa, Y., Togashi, H., 2011. Mechanisms underlying ketamine-induced synaptic depression in rat hippocampus-medial prefrontal cortex pathway. *Neuroscience* 177, 159–169. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.12.012

Kirby, K. N.; Petry, N. M., & Bickel, W. K. Heroin addicts have higher discount rates for delayed rewards than non-drug using controls. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 128, 78–87, 1999.

Kliethermes, C.L., 2005. Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. *Neurosci Biobehav Rev* 28, 837–50.

Koch, M. The neurobiology of startle. *Progress in neurobiology*, v. 59, n. 2, p. 107–28, out. 1999.

Kolb, B., 1984. Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. *Brain Res* 320, 65–98.

Koob, G.F., 1992. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* 13, 177–84.

Koob, G. F.; Le Moal, M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis.

Neuropsychopharmacology, 24, 97–129, 2008.

Koob, G.F. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropharmacology*, 2010;35(1):217-238

Kos, T., Popik, P., Pietraszek, M., Schafer, D., Danysz, W., Dravolina, O., Blokhina, E., Galankin, T., Bespalov, A.Y., 2006. Effect of 5-HT₃ receptor antagonist MDL 72222 on behaviors induced by ketamine in rats and mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 16, 297–310. doi:10.1016/j.euroneuro.2005.10.001

Krajnak, K., Rosewell, K.L., Duncan, M.J., Wise, P.M., 2003. Aging, estradiol and time of day differentially affect serotonin transporter binding in the central nervous system of female rats. *Brain Res* 990, 87–94.

Krystal, J.H., Karper, L.P., Seibyl, J.P., Freeman, G.K., Delaney, R., Bremner, J.D., Heninger, G.R., Bowers, M.B., Charney, D.S., 1994. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 51, 199–214.

Lahti, A.C., Holcomb, H.H., Medoff, D.R., Tamminga, C.A., 1995a. Ketamine activates psychosis and alters limbic blood flow in schizophrenia. *Neuroreport* 6, 869–72.

Lahti, A.C., Koffel, B., LaPorte, D., Tamminga, C.A., 1995b. Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 13, 9–19. doi:10.1016/0893-133X(94)00131-I

Langsjo, J.W., Maksimow, A., Salmi, E., Kaisti, K., Aalto, S., Oikonen, V., Hinkka, S., Aantaa, R., Sipila, H., Viljanen, T., Parkkola, R., Scheinin, H., 2005. S-ketamine anesthesia increases cerebral blood flow in excess of the metabolic needs in humans. *Anesthesiology* 103, 258–68.

Lankenau, S.E., Sanders, B., 2007. Patterns of Ketamine Use Among Young Injection Drug Users. *J. Psychoactive Drugs* 39, 21–29.

Lankenau, S.E., Sanders, B., Bloom, J.J., Hathazi, D., Alarcon, E., Tortu, S., Clatts, M.C., 2007a. First injection of ketamine among young injection drug users (IDUs) in three U.S. cities. *Drug Alcohol Depend.* 87, 183–193. doi:10.1016/j.drugalcdep.2006.08.015

Lankenau, S.E., Sanders, B., Bloom, J.J., Hathazi, D.S., Alarcon, E., Tortu, S., Clatts, M., 2007b. Prevalence and Patterns of Prescription Drug Misuse among Young Ketamine Injectors. *J. Drug Issues* 37, 717–736.

Lauzon NM, Laviolette SR. Dopamine D4-receptor modulation of cortical neuronal network activity and emotional processing: implications for neuropsychiatric disorders. *Behavioral Brain Research*, 208:12-22, 2010.

Lebron-Milad, K., Milad, M.R., 2012. Sex differences, gonadal hormones and the fear extinction network: implications for anxiety disorders. *Biol Mood Anxiety Disord* 2, 3. doi:10.1186/2045-5380-2-3

Lebron-Milad, K., Tsareva, A., Ahmed, N., Milad, M.R., 2013. Sex differences and estrous cycle in female rats interact with the effects of fluoxetine treatment on fear extinction. *Behav Brain Res* 253, 217–22. doi:10.1016/j.bbr.2013.07.024

Lee, C.J., Do, B.-R., Kim, J.K., Yoon, Y.-D., 2000. Pentobarbital and ketamine suppress serum concentrations of sex hormones in the female rat. *J. Anesth.* 14, 187–190. doi:10.1007/s005400070003

Liao, Y., Tang, J., Corlett, P.R., Wang, X., Yang, M., Chen, H., Liu, T., Chen, X., Hao, W., Fletcher, P.C., 2011. Reduced dorsal prefrontal gray matter after chronic ketamine use. *Biol Psychiatry* 69, 42–8. doi:10.1016/j.biopsych.2010.08.030

Lim, D.K., 2003. Ketamine associated psychedelic effects and dependence. *Singap. Med J* 44, 31–4.

Lister, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & therapeutics*, v. 46, n. 3, p. 321–40, 1990.

Lodge, D., Mercier, M.S., 2015. Ketamine and phencyclidine: the good, the bad and the unexpected. *Br. J. Pharmacol.* 172, 4254–4276. doi:10.1111/bph.13222

López-Gil, X., Jiménez-Sánchez, L., Romón, T., Campa, L., Artigas, F., Adell, A., 2012. Importance of inter-hemispheric prefrontal connection in the effects of non-competitive NMDA receptor antagonists. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 15, 945–956. doi:10.1017/S1461145711001064

Lorrain, D.S., Bacceti, C.S., Bristow, L.J., Anderson, J.J., Varney, M.A., 2003. Effects of ketamine and N-methyl-D-aspartate on glutamate and dopamine release in the rat prefrontal cortex: modulation by a group II selective metabotropic glutamate receptor agonist LY379268. *Neuroscience* 117:697-706.

Lovick, T.A. Estrous cycle and stress: influence of progesterone on the female brain. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45:314-320, 2012.

Lowry, C.A., Hale, M.W., Evans, A.K., Heerkens, J., Staub, D.R., Gasser, P.J., Shekhar, A., 2008. Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Acad Sci* 1148, 86–94. doi:10.1196/annals.1410.004

Mackenzie, G., Maguire, J., 2014. The role of ovarian hormone-derived neurosteroids on the regulation of GABA receptors in affective disorders. *Psychopharmacol. Berl.* doi:10.1007/s00213-013-3423-z

Majewska, M.D., 1992. Neurosteroids: Endogenous bimodal modulators of the GABA_A receptor mechanism of action and physiological significance. *Prog. Neurobiol.* 38, 379–394. doi:10.1016/0301-0082(92)90025-A

Malare A, Holsapple MP, Yin GK. Reduction by atropine of phencyclidine hypertension and apneusis. *Life Sci* 30(11):929-034, 1982.

MANSBACH RS, GEYER MA. Parametric determinants in pre-stimulus modification of acoustic startle: interaction with ketamine. *Psychopharmacol Berl* 105:162–168, 1982.

Mansbach, R.S., Geyer, M.A., 1991. Parametric determinants in pre-stimulus modification of acoustic startle: interaction with ketamine. *Psychopharmacol. Berl* 105, 162–8.

Markou, A., Weiss, F., Gold, L. H., Caine, S. B., Schulteis, G., & Koob, G. F. Animal models of drug craving. *Psychopharmacology*, 112, 163–182, 1993.

Marcondes, F.K., Bianchi, F.J., Tanno, A.P., 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol. Rev. Brasleira Biol.* 62, 609–614.

Marcondes, F.K., Miguel, K.J., Melo, L.L., Spadari-Bratfisch, R.C., 2001. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol. Behav.* 74, 435–440. doi:10.1016/S0031-9384(01)00593-5

Marek, G.J., Aghajanian, G.K., 1999. 5-HT_{2A} receptor or α 1-adrenoceptor activation induces excitatory postsynaptic currents in layer V pyramidal cells of the medial prefrontal cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 367, 197–206. doi:10.1016/S0014-2999(98)00945-5

Maswood, S., Stewart, G., Uphouse, L., 1995. Gender and estrous cycle effects of the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, on hypothalamic serotonin. *Pharmacol Biochem Behav* 51, 807–13.

Maswood, S., Truitt, W., Hotema, M., Caldarola-Pastuszka, M., Uphouse, L., 1999. Estrous cycle modulation of extracellular serotonin in mediobasal hypothalamus: role of the serotonin transporter and terminal autoreceptors. *Brain Res* 831, 146–54.

Maurice, T., Urani, A., Phan, V.-L., Romieu, P., 2001. The interaction between neuroactive steroids and the σ 1 receptor function: behavioral consequences and therapeutic opportunities. *Brain Res. Rev., Neuroactive Steroids in the 3rd Millenium* 37, 116–132. doi:10.1016/S0165-0173(01)00112-6

Milad, M.R., 2009. Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. *Neuroscience* 164, 887–95. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.09.011

Moeller, F. G.; Dougherty, D. M.; Barratt, E. S.; Oderinde, V.; Mathias, C. W.; Harper, R. A. *et al.* Increased impulsivity in cocaine dependent subjects independent of antisocial personality disorder and aggression. *Drug and Alcohol Dependence*, 68, 105–111, 2002.

Mora, S., Dussaubat, N., Diaz-Veliz, G., 1996. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology* 21, 609–20.

Morgan, C.J., Curran, H.V., 2006. Acute and chronic effects of ketamine upon human memory: a review. *Psychopharmacol. Berl* 188, 408–24. doi:10.1007/s00213-006-0572-3

Morgan, C.J., Curran, H.V., Independent Scientific Committee on, D., 2012. Ketamine use: a review. *Addiction* 107, 27–38. doi:10.1111/j.1360-0443.2011.03576.x

Morgan, C.J., Muetzelfeldt, L., Curran, H.V., 2010. Consequences of chronic ketamine self-administration upon neurocognitive function and psychological wellbeing: a 1-year longitudinal study. *Addiction* 105, 121–33. doi:10.1111/j.1360-0443.2009.02761.x

Morgan, M.A., Schulkin, J., Pfaff, D.W., 2004. Estrogens and non-reproductive behaviors related to activity and fear. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 55–63. doi:10.1016/j.neubiorev.2003.11.017

Morgan C. J. A.; Rees H.; Curran H. V. Attentional bias to incentive stimuli in frequent ketamine users. *Psychol Med*; 38: 1331–40, 2008.

Muetzelfeldt, L., Kamboj, S.K., Rees, H., Taylor, J., Morgan, C.J., Curran, H.V., 2008. Journey through the K-hole: phenomenological aspects of ketamine use. *Drug Alcohol Depend* 95, 219–29. doi:10.1016/j.drugalcdep.2008.01.024

Murray, F., Kennedy, J., Hutson, P.H., Elliot, J., Huscroft, I., Mohnen, K., Russell, M.G.N., Grimwood, S., 2000. Modulation of [3H]MK-801 binding to NMDA receptors in vivo and in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 397, 263–270. doi:10.1016/S0014-2999(00)00263-6

Nabeshima, T.; Sivam, S.P; Norris, J.C.; Ho, I.K.: Calcium-dependent GABA release from mouse brain slices following acute and chronic phencyclidine administration. *Res Commun Subst Abuse* 2:343, 1981.

Narendran R.; Frankle W. G.; Keefe R.; Gil R.; Martinez D.; Slifstein M. *et al.* Altered prefrontal dopaminergic function in chronic recreational ketamine users. *Am J Psychiatry*; 162: 2352–9, 2005.

Neill, J.C., Barnes, S., Cook, S., Grayson, B., Idris, N.F., McLean, S.L., Snigdha, S., Rajagopal, L., Harte, M.K., 2010. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. *Pharmacol Ther* 128, 419–32. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.07.004

Nishitani, N., Nagayasu, K., Asaoka, N., Yamashiro, M., Shirakawa, H., Nakagawa, T., Kaneko, S., 2014. Rafhe AMPA receptors and nicotinic acetylcholine receptors mediate ketamine-induced serotonin release in the rat prefrontal cortex. *Int J Neuropsychopharmacol* 17:1321-1326.

Overstreet, D.H., Knapp, D.J., Breese, G.R., 2002. Accentuated decrease in social interaction in rats subjected to repeated ethanol withdrawals. *Alcohol Clin Exp Res* 26, 1259–68.

Olmstead, M.C.: Animal models of drug addiction: Where do we go from here? *The Quarterly Journal Of Experimental Psychology* 59(4),625-653, 2006.

Palanza, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different?

Neuroscience and biobehavioral reviews, v. 25, n. 3, p. 219–33, maio 2001.

Pape, H.C.; Paré, D. Plastic synaptic networks of the amygdale for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiological Reviews*, 90:419-463,2010.

PETRY, N. M. Substance abuse, pathological gambling, and impulsiveness. *Drug and Alcohol Dependence*, 63, 29–38, 2001.

Paxinos, G., Watson, C., 2008. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th ed. Academic Press, Sydney.

Pericic, D., Manev, H., Geber, J., 1986. Sex related differences in the response of mice, rats and cats to administration of picrotoxin. *Life Sci* 38, 905–13.

Pitychoutis, P.M.; Dalla, C.; Sideris, A.C.; Tsonis, P.A.; Papadopoulou-Daifoti, Z. 5-HT(1A), 5HT(2A), and 5HT(2C) receptor mRNA modulation by antidepressant treatment in the chronic mild stress model of depression: sex differences exposed. *Neuroscience* 210:152-167, 2012.

Pietersen, C.Y., Bosker, F.J., Postema, F., Fokkema, D.S., Korf, J., den Boer, J.A., 2006. Ketamine administration disturbs behavioural and distributed neural correlates of fear conditioning in the rat. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 30, 1209–1218. doi:10.1016/j.pnpbp.2006.02.019

Potter, D.E., Choudhury, M., 2014. Ketamine: repurposing and redefining a multifaceted drug. *Drug Discov. Today* 19, 1848–54. doi:10.1016/j.drudis.2014.08.017

Raja SN, Guyenet PG (1980): Effects of phencyclidine on the spontaneous activity of monoaminergic neurons. *J Pharmacol* 63(2/3)229-233.

Rasmussen, D.D., Mitton, D.R., Green, J., Puchalski, S., 2001. Chronic daily ethanol and withdrawal: 2. Behavioral changes during prolonged abstinence. *Alcohol Clin Exp Res* 25, 999–1005.

Reznikov, A.G., Nosenko, N.D., 1996. Early postnatal changes in sexual dimorphism of catecholamine and indoleamine content in the brain of prenatally stressed rats. *Neuroscience* 70, 547–51.

Riecher-Rossler, A., 2002. Oestrogen effects in schizophrenia and their potential therapeutic implications--review. *Arch Womens Ment Health* 5, 111–8. doi:10.1007/s00737-002-0003-3

Riecher-Rossler, A., Seeman, M.V., 2002. Oestrogens and schizophrenia--introduction. *Arch Womens Ment Health* 5, 91–2. doi:10.1007/s007370200026

Robel, P., Baulieu, E.-E., 1994. Neurosteroids. *Trends Endocrinol. Metab.* 5, 1–8. doi:10.1016/1043-2760(94)90114-7

Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: An incentive sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews*, 18, 247–291.

Rocha, B.A., Ward, A.S., Egilmez, Y., Lytle, D.A., Emmett-Oglesby, M.W., 1996. Tolerance to the discriminative stimulus and reinforcing effects of ketamine. *Behav Pharmacol* 7, 160–168.

Sanz-Clemente, A., Nicoll, R.A., Roche, K.W., 2013. Diversity in NMDA receptor composition: Many regulators, many consequences. *Neuroscientist* 19, 62–75. doi:10.1177/1073858411435129

Seamans JK, Lapish CC, Durstewitz D (2008). Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: insights from electrophysiology. *Neurotoxicity Research*, 14:249-262.

Schüle, C., Nothdurfter, C., Rupprecht, R., 2014. The role of allopregnanolone in depression and anxiety. *Prog. Neurobiol.*, Allopregnanolone: State of the Art 113, 79–87. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.09.003

Shahani, R., Streutker, C., Dickson, B., Stewart, R.J., 2007. Ketamine-associated ulcerative cystitis: A new clinical entity. *Urology* 69, 810–812. doi:DOI 10.1016/j.urology.2007.01.038

Sierra-Mercado, D., Padilla-Coreano, N., Quirk, G.J., 2011. Dissociable Roles of Prelimbic and Infralimbic Cortices, Ventral Hippocampus, and Basolateral Amygdala in the Expression and Extinction of Conditioned Fear. *Neuropsychopharmacology*.

Silva, L.B., Nobre, M.J., 2014. Impaired fear inhibitory properties of GABAA and mu opioid receptors of the dorsal periaqueductal grey in alcohol-withdrawn rats. *Acta Neurobiol Exp Wars* 74, 54–66.

Smith, S.S., Gong, Q.H., Hsu, F.-C., Markowitz, R.S., French-Mullen, J.M.H., Li, X., 1998a. GABAA receptor $\alpha 4$ subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid. *Nature* 392, 926–929. doi:10.1038/31948

Smith, S.S., Gong, Q.H., Li, X., Moran, M.H., Bitran, D., Frye, C.A., Hsu, F.-C., 1998b. Withdrawal from 3α -OH- 5α -Pregnan-20-One Using a Pseudopregnancy Model Alters the Kinetics of Hippocampal GABAA-Gated Current and Increases the GABAAR Receptor $\alpha 4$ Subunit in Association with Increased Anxiety. *J. Neurosci.* 18, 5275–5284.

Smith, S.S., Shen, H., Gong, Q.H., Zhou, X., 2007. Neurosteroid regulation of GABAA receptors: Focus on the $\alpha 4$ and δ subunits. *Pharmacol. Ther.*, Neurosteroids Special Issue 116, 58–76. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.03.008

Stern, C.A., Gazarini, L., Vanvossen, A.C., Hames, M.S., Bertoglio, L.J., 2014. Activity in prefrontal cortex subserves fear memory reconsolidation over time. *Learn Mem* 21, 14–20. doi:10.1101/lm.032631.113

Swerdlow, N.R., Braff, D.L., Geyer, M.A., 1999. Cross-species studies of sensorimotor gating of the startle reflex. *Ann N Acad Sci* 877, 202–16.

Tobias, J.D., 2000. Tolerance, withdrawal, and physical dependency after long-term sedation and analgesia of children in the pediatric intensive care unit. *Crit Care Med* 28,

2122–32.

Tomkins, D.M., Sellers, E.M., Fletcher, P.J., 1994. Median and dorsal raphe injections of the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, and the GABA_A agonist, muscimol, increase voluntary ethanol intake in Wistar rats. *Neuropharmacology* 33, 349–58.

Tricklebank, M.D., Singh, L., Oles, R.J., Preston, C., Iversen, S.D., 1989. The behavioural effects of MK-801: a comparison with antagonists acting non-competitively and competitively at the NMDA receptor. *Eur J Pharmacol* 167, 127–35.

Vanvossen, A.C., Portes, M.A.M., Scoz-Silva, R., Reichmann, H.B., Stern, C.A.J., Bertoglio, L.J., 2017. Newly acquired and reactivated contextual fear memories are more intense and prone to generalize after activation of prelimbic cortex NMDA receptors. *Neurobiol. Learn. Mem.* 137, 154–162. doi:10.1016/j.nlm.2016.12.002

Verma, A., Moghaddam, B., 1996. NMDA receptor antagonists impair prefrontal cortex function as assessed via spatial delayed alternation performance in rats: Modulation by dopamine. *J. Neurosci.* 16, 373–379.

Vuchinich, R. E.; Simpson, C. A. Hyperbolic temporal discounting in social drinkers and problem drinkers. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 6, 292–305, 1998.

Wilke, R.A., Lupardus, P.J., Grandy, D.K., Rubinstein, M., Low, M.J., Jackson, M.B., 1999. K⁺ channel modulation in rodent neurohypophysial nerve terminals by sigma receptors and not by dopamine receptors. *J. Physiol.* 517, 391–406. doi:10.1111/j.1469-7793.1999.00391.x

Williams, J., Uphouse, L., 1989. Serotonin binding sites during proestrus and following estradiol treatment. *Pharmacol Biochem Behav* 33, 615–20.

Winters, W.D., Hance, A.J., Cadd, G.C., Lakin, M.L., 1986. Seasonal and sex influences on ketamine-induced analgesia and catalepsy in the rat; a possible role for melatonin. *Neuropharmacology* 25, 1095–101.

Wise, R. A., & Bozarth, M. A. (1987). A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychological Review*, 94, 469–492.

Wise, R. A. (1988). The neurobiology of craving: Implications for the understanding and treatment of addiction. *Journal of Abnormal Psychology*, 97, 118–132.

White, N. M. (1996). Addictive drugs as reinforcers: Multiple partial actions on memory systems. *Addiction*, 91, 921–949.

Zheng, P., 2009. Neuroactive steroid regulation of neurotransmitter release in the CNS: Action, mechanism and possible significance. *Prog. Neurobiol.* 89, 134–152. doi:10.1016/j.pneurobio.2009.07.001

Young EA, Kornstein SG, Marcus SM, Harvey AT, Warden D, Wisniewski SR, Balasubramani GK, Fava M, Trivedi MH, John Rush A (2009). Sex differences in response to citalopran: a STAR*D report. *J Psychiatr Res* 43:503-511.