Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“*Zebrafish* como organismo-modelo para análises de efeitos
comportamentais e toxicológicas da cetamina empregando cromatografia
em fase gasosa e estatística multivariada”**

Eduardo Geraldo de Campos

Dissertação apresentada à
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2016

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“*Zebrafish* como organismo-modelo para análises de efeitos
comportamentais e toxicológicas da cetamina empregando cromatografia
em fase gasosa e estatística multivariada”**

Eduardo Geraldo de Campos

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área:
Química

Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

RIBEIRÃO PRETO - SP

2016

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

De Campos, Eduardo Geraldo

Zebrafish como organismo-modelo para análises de efeitos comportamentais e toxicológicas da cetamina empregando cromatografia em fase gasosa e estatística multivariada. Ribeirão Preto, 2016.

72 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Química.

Orientador: De Martinis, Bruno Spinosa

1. *Zebrafish*. 2. Cetamina. 3. Cromatografia em Fase Gasosa acoplada ao Detector de Nitrogênio-Fósforo. 4. Estatística Multivariada.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: DE CAMPOS, Eduardo Geraldo

Título: ***Zebrafish* como organismo-modelo para análises de efeitos comportamentais e toxicológicas da cetamina empregando cromatografia em fase gasosa e estatística multivariada**

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: **Química**.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus e Jesus Cristo por permitirem que eu conduzisse e concluísse mais essa etapa, superando as dificuldades e obtendo muitas realizações pessoais e profissionais.

Aos meus pais Amaury e Renata e ao meu irmão Gabriel por todo o apoio diário, incondicional e ilimitado, em todos os momentos.

Aos meus avós Valter e Ivone pelo amor, apoio e sábios conselhos ao longo de toda minha vida.

Às minhas tias Ivana e Tatiana pelos conselhos acadêmicos e de vida em todas as horas.

Aos meus tios, aos meus primos Gabriela e João Marcelo, aos meus tios-avós Wilson e Ivete e aos meus demais familiares pelo apoio e incentivo.

Aos meus avós Neuza e Amaury, à minha bisavó Maria e ao meu bisavô Américo (in memoriam).

Ao meu orientador Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis pela compreensão e confiança e pelos conselhos e ensinamentos dispensados em toda minha jornada acadêmica.

Aos amigos do Laboratório de Análises Toxicológicas Forenses, Dayanne, Fernanda, Fabiana, Laís, Nayna, Carolina e Natália por toda e qualquer ajuda e apoio.

A Profª. Drª. Aline Thaís Bruni pela paciência, colaboração e apoio na execução das análises estatísticas do projeto.

Ao Prof. Dr. Silvio Morato de Carvalho pelas orientações para execução do trabalho e pela participação na banca do Exame de Qualificação.

Aos amigos Guilherme, Sanchez, Lígia, Natalia, Fernanda, Giancarlo, Marília, Thaís, Mariella, Hebert, Larissa, Milena, Vinicius, Lais e Giovana pela paciência e compreensão e pelos momentos de descontração.

A Prof^{ta}. Dr^a. Lucimar Aparecida Moreira Falcão, quem me serviu de inspiração e exemplo para seguir a carreira de Químico.

Ao Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta, pelos conselhos e dicas durante o Mestrado.

Aos funcionários do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, em especial Lâmia, Claudinei Dias e Mércia, e à secretária da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Denise Aparecida Silveira, pela ajuda e apoio dispensados durante todo o Mestrado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento e suporte para execução do projeto de pesquisa relativo ao Mestrado (Processo 2014/00272-3) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida no início do Mestrado.

A todos que direta ou indiretamente torceram por mim e me acompanharam em mais essa etapa de minha vida acadêmica.

Meus agradecimentos.

“Leve na sua memória para o resto de sua vida as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo”.

(Chico Xavier)

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CME	Concentração média experimental
CQ	Controle de qualidade
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQM	Controle de qualidade de média concentração
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração
CP	Componente Principal
CV	Coeficiente de variação
DZ	Diazepam
GC-MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
GC-NPD	Cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio-fósforo
HCA	Análise Hierárquica de Agrupamentos
KT	Cetamina
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
PCA	Análise de Componentes Principais
SIMCA	<i>Soft Independent Modelling of Class Analogies</i>

RESUMO

De Campos, E. G. ***Zebrafish* como organismo-modelo para análises de efeitos comportamentais e toxicológicas da cetamina empregando cromatografia em fase gasosa e estatística multivariada**. 2016. 72 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A cetamina é uma droga amplamente utilizada e o seu uso inadequado tem sido associado à graves consequências para a saúde humana. Embora as propriedades farmacológicas deste agente em doses terapêuticas sejam bem conhecidas, existem poucos estudos sobre os efeitos secundários induzidos por doses não-terapêuticas, incluindo os efeitos nos estados de ansiedade e agressividade. Neste contexto, os modelos animais são uma etapa importante na investigação e elucidação do mecanismo de ação a nível comportamental. O *zebrafish* (*Danio rerio*) é um novo organismo-modelo, interessante e promissor, uma vez que apresenta alta similaridade fisiológica, genética e neuroquímica com seres humanos, respostas comportamentais bem definidas e rápida absorção de compostos de interesse em meio aquoso além de apresentar uma série de vantagens em relação aos modelos mamíferos tais como manutenção de baixo custo, prática e executável em espaços reduzidos. Nesse sentido, faz-se necessário a execução de ensaios comportamentais em conjunto com análises estatísticas robustas e rápidas tais como ANOVA e Métodos Multivariados; e também o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis, precisos e rápidos para determinação de compostos de interesse em matrizes biológicas provenientes do animal. Os objetivos do presente trabalho foram a investigação dos efeitos da cetamina sobre a ansiedade e a agressividade em *zebrafish* adulto empregando Testes de Claro-Escuro e Testes do Espelho e métodos estatísticos univariados (ANOVA) e multivariados (PCA, HCA e SIMCA) assim como o desenvolvimento de método analítico para determinação da cetamina em matriz biológica proveniente do animal, empregando Extração Líquido-Líquido e Cromatografia em Fase Gasosa acoplada ao Detector de Nitrogênio-Fósforo (GC-NPD). Os resultados comportamentais indicaram que a cetamina produziu um efeito significativo dose-dependente em *zebrafish* adulto na latência à área clara, no número de cruzamentos entre as áreas e no tempo de exploração da área clara. Os resultados das análises SIMCA e PCA mostraram uma maior similaridade entre o grupo controle e os grupos de tratamento expostos às doses mais baixas (5 e 20 mg L⁻¹) e entre os grupos expostos às doses de 40 e 60 mg L⁻¹. Na análise por PCA, dois componentes principais responderam por 88,74% de toda a informação do sistema, sendo que 62,59% da informação cumulativa do sistema foi descrito pela primeira componente principal. As classificações HCA e SIMCA seguiram uma evolução lógica na distribuição das amostras por classes. As doses mais altas de cetamina induziram uma distribuição mais homogênea das amostras enquanto as doses mais baixas e o controle resultaram em distribuições mais dispersas. No Teste do Espelho, a cetamina não induziu efeitos significativos no comportamento dos animais. Estes resultados sugerem que a cetamina é modulador de comportamentos ansiosos, sem efeitos indutores de agressividade. Os resultados da validação do método cromatográfico indicaram uma extração com valores de recuperação entre 33,65% e 70,89%. A curva de calibração foi linear com valor de R² superior a 0,99. O limite de detecção (LOD) foi de 1 ng e o limite de quantificação (LOQ) foi de 5 ng. A exatidão do método cromatográfico manteve-se entre - 24,83% e - 1,258%, a precisão intra-ensaio entre 2,67 e 14,5% e a precisão inter-ensaio entre 1,93 e 13,9%.

Palavras-chave: *Zebrafish*, cetamina, Cromatografia em Fase Gasosa acoplada ao Detector de Nitrogênio-Fósforo, Estatística Multivariada.

ABSTRACT

De Campos, E. G. **Zebrafish as an organism-model for analysis of behavioral effects and toxicological analysis of ketamine employing gas chromatography and multivariate statistics.** 2016. 72 f. Dissertation (Master's Degree).

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Ketamine is a widely used drug and its inappropriate use has been associated with serious consequences for human health. Although the pharmacological properties of this agent in therapeutic doses are well known, there are few studies about the side effects induced at non-therapeutic doses, including the effects on states of anxiety and aggression. In this context, animal models are an important step in the investigation and elucidation of the mechanism of action at the behavioral level. The zebrafish (*Danio rerio*) is a new organism model, interesting and promising, since it presents high physiological, genetics and neurochemistry similarity in relation to humans, well-defined behavioral responses and rapid absorption of interesting compounds in an aqueous medium, apart from presents several advantages over mammalian models such as practical, low cost maintenance and executable in reduced spaces. In this sense, it is necessary to perform behavioral tests in conjunction with robust and rapid statistical analysis such as ANOVA and multivariate methods; and also the development of sensitive, accurate and rapid analytical methods to determination of compounds of interest in biological matrices from the animal. The objectives of this study were to investigate the effects of ketamine on anxiety and aggression in adult zebrafish using Light-Dark and Mirror Biting tests and univariate (ANOVA) and multivariate (PCA, HCA and SIMCA) statistical methods and to develop an analytical method for determination of ketamine in biological animal matrices using Liquid-Liquid Extraction and Gas Chromatography coupled with Nitrogen-Phosphorus Detector (GC-NPD). The behavioral results of Light-Dark Test indicated that ketamine produced a significant dose-dependent response in the latency to light area, in the number of midline crossings and in the time spent in light area. Results of SIMCA and PCA analysis showed a greater similarity between the control group and treatment groups exposed to lower doses (5 and 20 mg L⁻¹) and between the treatment groups at doses of 40 and 60 mg L⁻¹. In the analysis PCA, two principal components accounted for 88,74% of all the system information and 62,59% of the cumulative information of the system were described for the first principal component. The HCA and SIMCA results showed a logical evolution in the distribution of samples per class. The higher dose of ketamine induced a more homogeneous distribution of the samples while the lower doses and control resulted in more dispersed distribution. In the Mirror Test, ketamine induced no significant effect on the behavior of animals. These results suggest that ketamine is a modulator of anxious behavior without inducing aggressive effects. The results of the validation of chromatographic method indicated an extraction with recovery ranged between 33,65% to 70,89%. Calibration curve was linear with R² value higher than 0,99. The limit of detection (LOD) was 1 ng and the limit of quantification (LOQ) was 5 ng. The accuracy of gas chromatographic method ranged between – 24,83% and – 1,258%, intra-assay precision between 2,67 and 14,5% and inter-assay precision between 1,93 and 13,9%.

Keywords: zebrafish, ketamine, Gas Chromatography coupled with Nitrogen-Phosphorus Detector, Multivariate Statistics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da KT.	1
Figura 2. <i>Zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>).	3
Figura 3. Aparato experimental para execução do Teste de Claro-Escuro em <i>zebrafish</i>	5
Figura 4. Interação do <i>zebrafish</i> com sua imagem especular.	6
Figura 5. Representação esquemática do procedimento de cálculo do método PCA.	7
Figura 6. Representação esquemática do método de agrupamento SIMCA	8
Figura 7. Ilustração esquemática do aparato experimental para realização o Teste de Claro-Escuro. .	15
Figura 8. Representação esquemática do aparato experimental para realização do Teste do Espelho.	16
Figura 9. Esquema representativo das etapas do preparo de amostras de <i>zebrafish</i>	17
Figura 10. <i>Endpoints</i> comportamentais para a investigação do comportamento ansiolítico induzido pela KT.	26
Figura 11. Resultados da análise HCA para agrupamento do conjunto de dados	28
Figura 12. Diagnóstico de <i>outliers</i> da matriz de dados.	30
Figura 13. Resultados da análise de PCA para os primeiros três componentes principais do conjunto de dados..	31
Figura 14. <i>Outliers</i> , <i>scores</i> e <i>loadings</i> obtidos para cada classe.	32
Figura 15. Alterações comportamentais induzidas pela exposição aguda à KT de acordo com o Teste do Espelho.	38
Figura 16. Cromatograma de íons totais da KT proveniente de amostra fortificada de globo ocular de animal não-exposto.	39
Figura 17. Cromatograma de matriz “branco”, proveniente de amostra de globo ocular de animal não exposto e isenta de KT.	39
Figura 18. Cromatograma de globo ocular de <i>zebrafish</i> exposto à KT.	40
Figura 19. Cromatograma referente à análise de solução padrão de KT e de DZ (padrão interno) em metanol para determinação dos tempos de retenção.	40
Figura 20. Cromatograma referente à análise de uma amostra de <i>zebrafish</i> isenta de KT (“amostra branco”) após extração líquido-líquido.	41
Figura 21. Cromatograma referente à análise de amostra de <i>zebrafish</i> fortificada com 400 ng de KT e 200 ng de DZ (padrão interno) após extração líquido-líquido.	41
Figura 22. Curva de calibração para KT em amostras de <i>zebrafish</i>	42
Figura 23. Cromatograma resultante da análise de amostra isenta de KT injetada após amostra fortificada com 800 ng de KT.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Possíveis efeitos provocados pela KT.	2
Tabela 2. Condições cromatográficas do método empregando GC-MS	18
Tabela 3. Programação da temperatura da coluna no método GC-MS	18
Tabela 4. Íons de identificação, quantificação e tempo de retenção da KT.	18
Tabela 5. Condições cromatográficas do método	19
Tabela 6. Programação da temperatura da coluna cromatográfica.	19
Tabela 7. Porcentagem de amostras classificadas em cada classe de acordo com o agrupamento pela análise HCA.	27
Tabela 8. Percentual de classificação das amostras em cada classe SIMCA.	33
Tabela 9. Distâncias interclasses obtidas pela análise SIMCA	34
Tabela 10. Resíduos interclasses obtidos pela análise SIMCA	35
Tabela 11. Poder de modelagem das variáveis empregadas na análise	35
Tabela 12. Poder discriminatório das variáveis empregadas na análise	36
Tabela 13. Resultados do ensaio de recuperação do método empregando GC-NPD	42
Tabela 14. Resultados dos ensaios de precisão do método empregando GC-NPD	43

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. Cetamina (KT)	1
1.2. <i>Zebrafish</i> como modelo de experimentação animal	2
1.3. Modelos comportamentais em <i>zebrafish</i> adulto	4
1.3.1. Teste de Claro-Escuro	4
1.3.2. Teste do Espelho.....	5
1.4. Métodos Estatísticos de Análise Comportamental	6
1.4.1. Análise de Componentes Principais (PCA)	6
1.4.2. Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA)	7
1.4.3. <i>Soft Independent Modelling of Class Analogy</i> (SIMCA)	8
2. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	110
3. OBJETIVOS	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1. Animais	14
4.2. Padrões Analíticos e Reagentes	14
4.3. Manipulação Farmacológica e Ensaio Comportamentais	14
4.4. Teste de Claro-Escuro	15
4.5. Teste do Espelho	15
4.6. Estatística Univariada e Multivariada.....	16
4.7. Preparo de Amostras empregando Extração Líquido-Líquido	16

4.8. Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)	17
4.9. Cromatografia em Fase Gasosa com Detector de Nitrogênio-Fósforo (GC-NPD)	18
4.10. Validação Analítica	19
4.10.1. Linearidade	19
4.10.2. Limites de Detecção e de Quantificação	20
4.10.3. Exatidão	21
4.10.4. Precisão	21
4.10.5. Recuperação	22
4.10.6. Estabilidade	22
4.10.6.1. Estabilidade de Curta Duração	22
4.10.6.2. Estabilidade Pós-Processamento	23
4.10.6.3. Estabilidade de Longa Duração	23
4.10.7. Efeito Residual (Efeito <i>Carry Over</i>)	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1. Teste de Claro-Escuro	25
5.1.1. Análise de Variância (ANOVA)	25
5.1.2. Análises Multivariadas	27
5.1.3. Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA)	27
5.1.4. Análise de Componentes Principais (PCA)	29
5.1.5. <i>Soft Independent Modeling of Class Analogies (SIMCA)</i>	31
5.2. Teste do Espelho	37
5.3. Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)	38
5.4. Cromatografia Gasosa com Detector de Nitrogênio-Fósforo (GC-NPD)	40
5.5. Validação Analítica do Método empregando GC-NPD	41
5.5.1. Limites de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ)	41
5.5.2. Linearidade	42
5.5.3. Recuperação	42

5.5.4. Precisão e Exatidão	43
5.5.5. Estabilidade.....	43
5.5.6. Efeito Residual (Efeito <i>Carry Over</i>).....	43
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
8. ANEXOS.....	55

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Cetamina (KT)

A KT ((*RS*)-2-(2-clorofenil)-2-metilamino-ciclohexan-1-ona) foi inicialmente desenvolvida e introduzida como um agente anestésico, cujo uso atualmente é restrito à sedação de animais, e é química e farmacologicamente semelhante à fenciclidina (1-(1-fenilciclohexil)piperidina, PCP) (KARCH, 2009; RANG et al., 2011; SHBAIR et al., 2010) (**Figura 1**).

Figura 1. Estrutura molecular da KT.

No cérebro, existem diferentes sítios ativos de ligação à KT (NEGRUSZ et al., 2005). O mecanismo de ação dessa substância consiste no bloqueio do receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato (NMDA) mediante a inibição de modo não-competitivo com o receptor da PCP, com ambas as formas isoméricas da KT possuindo afinidade por esse receptor (RANG et al., 2011; SMITH, 2002; VASCONCELOS, 2005). A KT bloqueia o canal iônico mediado pelo receptor NMDA, impedindo o fluxo dos íons Na⁺ e Ca²⁺ para o neurônio, induzindo a disrupção da transmissão sináptica mediada pelo glutamato (NEGRUSZ et al., 2005). A nível neuroquímico, a KT também é responsável pela inibição da recaptação dos neurotransmissores dopamina, norepinefrina e serotonina, resultando em um acúmulo destes nas sinapses nervosas (NEGRUSZ et al., 2005).

A metabolização da KT ocorre através da ação de enzimas hepáticas, por meio do sistema citocromo P-450, sendo biotransformada principalmente à norcetamina por N-desmetilação (LEUNG, BAILLIE, 1986; KARCH, 2009). Posteriormente, a norcetamina é biotransformada por hidroxilação do sistema de anéis alicíclicos nas posições 4, 5 e 6, configurando uma série de isômeros de hidroxinorcetamina (LEUNG, BAILLIE, 1986).

Devido à complexidade farmacológica da KT, esse agente pode provocar diferentes tipos de efeitos (**Tabela 1**) desde anestesia dissociativa (anestesia em que o indivíduo pode permanecer consciente embora insensível a dor) até alucinação pós-operatória, psicose e

distúrbios cognitivos semelhantes àqueles tipicamente observados em pacientes com esquizofrenia (ZAKHARY et al., 2011; RIEHL et al., 2011). Mais recentemente, tem-se investigado e discutido o efeito de doses subanestésicas da KT em estados de depressão (ENGİN et al., 2009).

Tabela 1. Possíveis efeitos provocados pela KT.

Tipo	Efeito
Cognitivo	Perda de atenção e perda de memória.
Psicomotor	Redução da função motora, agitação psicomotora.
Respiratório	Depressão respiratória.
Cardiovascular	Aumento da pressão intracraniana, taquicardia ou bradicardia.
Humor	Sensação de perda da realidade, despersonalização, alucinações.

Fonte: VASCONCELOS et al., 2005.

Embora tenha sido concebida como um agente terapêutico, por volta dos anos de 1970 e 1980, a KT passou a ser utilizada como droga recreativa em festas sendo chamada por nomes tais como *Special K*, *Vitamina K* ou *K*. Originalmente, a KT era empregada, de forma ilegal, apenas como componente adulterante em tabletes de *ecstasy*, mas com a “familiaridade” dos usuários para com os efeitos induzidos pela KT, esta passou a ser utilizada como agente único (SHBAIR et al., 2010). Diferentes vias de administração podem ser utilizadas para o consumo da KT, sendo as vias intranasal e/ou oral as mais utilizadas para fins recreativos.

Devido ao uso como droga de abuso, a KT tem sido classificada de modo regulado em muitos países. Desde 1999, a KT é regulamentada como substância controlada pelo *Drug Enforcement Administration* (DEA) dos Estados Unidos (KARCH, 2009). Em 2014, o Reino Unido reclassificou a KT passando-a da Classe C para Classe B, mesma categoria dos canabinóides e anfetaminas, no *The Misuse of Drugs Act* de 1971. No Brasil, a KT é classificada na Lista C1 (Lista de Substâncias Sujeitas a Controle Especial) da Portaria 344 da ANVISA.

1.2. Zebrafish como modelo de experimentação animal

Em Toxicologia e Farmacologia, a avaliação *in vitro* e *in vivo* do efeito total de compostos químicos tem grande importância pois pode possibilitar a estimativa ou previsão

dos efeitos adversos induzidos em seres humanos (OLSON et al., 2000). Nesse sentido, faz-se uso de modelos animais. Por exemplo, o desenvolvimento de fármacos consiste em um complexo e longo processo, que consiste em inúmeros ensaios bioquímicos e celulares, testes em modelos animais, e finalmente em humanos (ZON, PETERSON, 2005). Além disso, os resultados e dados provenientes dos bioensaios realizados em modelos animais são fundamentais para avaliação e estudo da toxicidade de substâncias químicas (KLAASSEN, WATKINS III, 2012). Na avaliação de toxicidade de um composto químico, a elucidação dos mecanismos de ação, estabelecimento de níveis de toxicidade e avaliação da toxicodinâmica de uma substância são dados extremamente importantes. Ainda, um fator que deve ser adequadamente estudado é a previsão de interação entre diferentes compostos e a possível toxicidade derivada dessas interações (HILL, 2005).

Mamíferos são tradicionalmente mais empregados em pesquisas. Contudo, modelos mamíferos são de alto custo, necessitam de grandes espaços e envolvem o consumo de grandes quantidades de compostos (ZON, PETERSON, 2005). Como uma proposta de substituição a modelos mamíferos, o peixe conhecido por *zebrafish* tem sido utilizado no estudo e desenvolvimento de fármacos (ZON, PETERSON, 2005; STEWART et al., 2011; RUBINSTEIN et al., 2006).

Nativo do sudoeste da Ásia, o peixe conhecido popularmente por *zebrafish* pertence à espécie *Danio rerio* (**Figura 2**), possui alta similaridade fisiológica com os seres humanos, apresenta respostas comportamentais robustas e tem seu genoma inteiramente sequenciado e caracterizado (CACHAT, 2013).

Figura 2. *Zebrafish* (*Danio rerio*) (Retirado de <http://info.noldus.com/how-zebrafish-regenerate>).

São muitas as vantagens do uso do *zebrafish* em pesquisas em relação a outras espécies de vertebrados, como o seu tamanho reduzido, a fácil criação e manutenção em laboratório e a morfologia desenvolvida de maneira rápida (HILL, 2005; STREISINGER et al., 1981). Em contraste com espécies maiores, o tamanho reduzido do *zebrafish* tanto em seu

estágio larval quanto em fase adulta torna reduzidas as quantidades das substâncias a serem estudadas e dosadas – limitando o volume de resíduos produzidos – assim como as quantidades de reagentes e materiais utilizados no tratamento e manutenção dos animais (HILL, 2005). Além disso, devido às suas dimensões corporais reduzidas, o *zebrafish* possui uma alta sensibilidade quando expostos à substâncias químicas devido à rápida absorção das mesmas (SANT’ANNA, 2009). Outra vantagem do uso do *zebrafish* é que cerca de 70% dos genes humanos codificados por proteínas tem um correspondente presente no material genético do peixe, tornando possível que estudos de fisiologia e patologia humanas sejam modelados e conduzidos em *zebrafish* (ABLAIN, ZON, 2013).

1.3. Modelos comportamentais em *zebrafish* adulto

Estudos recentes tem reportado efeitos de várias drogas em *zebrafish* adulto (GROSSMAN et al., 2010; STEWART et al., 2011; DARLAND, DOWLING, 2001; CARVAN III et al., 2004; MATHUR et al., 2011; BILOTTA et al., 2004) enfatizando as respostas comportamentais específicas, de acordo com locais de preferência no ambiente aquático, padrão de posição no aquário e movimentação dos peixes. Por exemplo, Zakhary et al. (2011) e Riehl et al. (2011) realizaram estudos comportamentais em *zebrafish* após exposição aguda à KT.

1.3.1. Teste de Claro-Escuro

Desenvolvido por Crawley e colaboradores, o *Teste de Claro-Escuro* consiste em um modelo de conflito entre a tendência em explorar ambientes desconhecidos e a aversão inata do animal a áreas abertas e iluminadas (BOURIN; HASCOËT, 2003; CRAWLEY; GODWIN, 1980; DE BRITO, 2011; TREIT; MENARD, 1998). Este teste avalia o comportamento de animais colocados individualmente em uma caixa experimental contendo dois compartimentos – um claro e um escuro – por meio da quantificação das transições realizadas entre os compartimentos, bem como tempo de permanência nos compartimentos (GEBAUER, 2010).

Estudos empregando o Teste de Claro-Escuro em *zebrafish* mostraram que o peixe possui uma preferência natural pela área mais escura do tanque (GEBAUER, 2010; RIEHL et al., 2011; SERRA et al., 1999; STEWART et al., 2010) (**Figura 3**). Nesse sentido, como o comportamento do *zebrafish* é sensível a manipulações ansiolíticas e ansiogênicas, geralmente

drogas com efeitos ansiolíticos induzem o aumento no número de entradas na área iluminada bem como aumentam o tempo de permanência e exploração no compartimento iluminado enquanto que drogas ansiogênicas provocam o efeito contrário (MANSUR et al., 2014; RIEHL et al., 2011; STEWART et al., 2010).

Figura 3. Aparato experimental para execução do Teste de Claro-Escuro em *zebrafish*

1.3.2. Teste do Espelho

A agressão é uma resposta comportamental quantificável através da tendência de um animal para atacar, por exemplo, e que pode ser aplicado para classificar o comportamento de *zebrafish* (EARLEY; HSU; WOLF, 2000; WAY et al. 2015). Diferentes abordagens podem ser utilizadas para avaliação da agressividade em peixes. Os peixes podem ser submetidos à diferentes situações tais como o contato com predadores ou com peixes da mesma espécie ou submetidos à estímulos visuais tais como vídeos ou a sua própria imagem, fazendo uso de um espelho (WAY et al. 2015).

A interação com a imagem refletida no espelho é um parâmetro de avaliação comportamental bem estabelecido em peixes, tradicionalmente usado no estudo de comportamentos social e agressivo (PHAM et al., 2012). A agressividade induzida pelo espelho (em inglês, *mirror-induced aggression*, MIA) possibilita a rápida identificação e mensuração da atividade agressiva de um animal e evita procedimentos invasivos como o uso de espécies predadoras (BALZARINI, 2014; DE FREITAS; MARIGUELA, 2006; JONES; NORTON, 2015; MARKS et al. 2005; PHAM et al., 2012). Como os peixes não reconhecem a própria imagem no espelho, eles interpretam e reconhecem aquela imagem como se fosse um intruso, atacando-a (OLIVEIRA et al. 2005). Assim sendo, a latência ao primeiro contato com o espelho e a duração da interação de “morder” a própria imagem refletida no espelho são parâmetros de quantificação de comportamentos agressivos (PHAM et al. 2012; DE FREITAS e MARIGUELA 2006; FIGLER e EINGHORN 1983) (**Figura 4**).

Figura 4. Interação do *zebrafish* com sua imagem especular (Retirado de PHAM et al. 2012).

1.4. Métodos Estatísticos de Análise Comportamental

Em ensaios comportamentais, vários parâmetros (variáveis) são determinados para cada animal e uma ampla gama de dados é gerada. A análise, validação e interpretação de todos os dados requerem uma abordagem estatística, a fim de descrever o sistema experimental. A análise univariada é uma abordagem estatística em que cada variável é examinada individualmente em um conjunto de dados. Embora seja robusto e eficiente, este método estatístico necessita de um grande número de testes para a otimização do modelo e não leva em consideração durante as análises as possíveis interações entre as variáveis que descrevem o sistema (BIANCHIN et al. 2008; PEREIRA-FILHO et al. 2002).

A análise multivariada consiste na medição de diversas variáveis/parâmetros para cada amostra em estudo, fornecendo informações sobre a interação entre as variáveis (BIANCHIN et al. 2008; BRERETON, 2003; MILLER; MILLER, 2005). De modo geral, a avaliação dos resultados utilizando Análise Multivariada envolve o reconhecimento de padrões para avaliar os dados e determinar a semelhança entre eles. Existem diferentes métodos estatísticos multivariados, dentre eles, PCA, SIMCA e HCA.

1.4.1. Análise de Componentes Principais (PCA)

A **Análise de Componentes Principais (PCA)** é um método que analisa a matriz dos dados, extrai os padrões que descreve a matriz e desenvolve um novo modelo com um novo conjunto de variáveis (chamados Componente Principais, CPs), reduzindo a dimensão do sistema e concentrando a maior parte da informação, sem perda de informação significativa (SABIN; FERRÃO; FURTADO, 2004; WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987). A redução da

dimensão do sistema consiste na redução do número de variáveis em relação ao conjunto original, utilizando uma combinação linear das variáveis originais e agrupando aquelas que fornecem informações redundantes, gerando as componentes principais (MONTANARI, 2011) (**Figura 5**).

Figura 5. Representação esquemática do procedimento de cálculo do método PCA (Adaptado de: http://www.nlpca.org/pca_principal_component_analysis.html)

Os métodos PCA e SIMCA permitem a identificação de resultados de comportamento anômalo com base em todo conjunto de variáveis quantificadas, definidos como *outliers*. *Outliers* são resultados anômalos que distorcem as estatísticas (TINSLEY; BROWN, 2000). O critério para definição de *outliers* multivariados trata-se da distância de Mahalanobis, avaliada como χ^2 com graus de liberdade igual ao número de variáveis (TABACHNICK; FIDELL, 2006). A distância de Mahalanobis é a forma padronizada da distância euclidiana e consiste na resposta de escalonamento em termos de desvio-padrão, com ajustes feitos para intercorrelações entre as variáveis (HAIR et al. 2005).

1.4.2. Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA)

A **Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA)** é um método exploratório que identifica agrupamentos e padrões naturais das amostras, identificando similaridade de acordo com a distância em um espaço bidimensional (MONTANARI, 2011; BRERETON, 2003; PETERSON, 2002). Os resultados são apresentados na forma de um dendograma, onde a similaridade entre as amostras é dada com base no comprimento dos ramos do dendograma, refletindo as propriedades das amostras (BRUNI; TALHAVINI 2012) (**Figura 6**).

Figura 6. Representação esquemática do método de agrupamento SIMCA (Adaptado de <http://www.igiltd.com/ig.NET%20Sample%20Pages/275.html>)

1.4.3. *Soft Independent Modelling of Class Analogy (SIMCA)*

O método *Soft Independent Modelling of Class Analogy (SIMCA)* (sem tradução para língua portuguesa) determina um número ideal de componentes principais de forma independente para cada classe (DE MAESSCHALCK et al. 1999; SABIN; FERRÃO; FURTADO, 2004). Cada classe do conjunto é modelada independentemente empregando uma análise PCA e a discriminação entre as classes é dada em função da distância e o resíduo entre as mesmas (MONTANARI, 2011).

ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

2. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Os protocolos experimentais estão de acordo com a legislação para experimentação animal estabelecida pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), expressa na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. O projeto foi encaminhado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Número de Protocolo 14.1.750.53.6).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Análise toxicológica da KT em *zebrafish* adulto empregando ensaios comportamentais, análise estatística multivariada e cromatografia em fase gasosa.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliação da viabilidade do uso do *zebrafish* como modelo animal para estudos comportamentais e toxicológicos envolvendo a KT, em substituição a modelos mamíferos.
- Determinação dos efeitos comportamentais agudos em estados de ansiedade e agressividade induzidos pela KT empregando estatística univariada e multivariada.
- Desenvolvimento e validação de um método analítico para identificação, detecção e quantificação de KT em *zebrafish* empregando extração líquido-líquido e cromatografia em fase gasosa.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados animais da espécie *Danio rerio* da linhagem *wyld type* (em torno de 6 a 8 meses de idade/3,5 – 4,0 cm de comprimento/50:50 machos:fêmeas). Os animais foram acondicionados em aquários retangulares de 20 L para criação e reprodução. Os aquários foram preenchidos com água sem a presença de cloro previamente tratada com material biológico filtrante líquido Sera® Bio Nitrivec e condicionador de água Sera® Aquatan. Os peixes foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 14h/10h por meio de controle automático de iluminação fluorescente com *timer*. Alimentação foi realizada duas vezes por dia com alimentador automático com ração Sera®.

4.2. Padrões Analíticos e Reagentes

Soluções-padrão de KT e DZ em ampolas de 1 mg.mL⁻¹ em metanol foram obtidos da Cerilliant (USA). 1-clorobutano, acetato de etila e metanol foram obtidos da JT Baker (USA).

4.3. Manipulação Farmacológica e Ensaios Comportamentais

Os animais adultos foram retirados do aquário de acondicionamento e inseridos individualmente em aquários de 1 L. A administração da droga foi realizada por imersão, aplicando-se a solução de KT diretamente na água do aquário de exposição. A água do tanque de exposição foi trocada regularmente entre os testes para assegurar que o peixe foi exposto à concentração de interesse. A KT usada neste estudo foi o medicamento injetável contendo cloridrato de cetamina (Dopalen®, Ceva).

As concentrações de KT selecionadas para este estudo foram 5 mg.L⁻¹, 20 mg.L⁻¹, 40 mg.L⁻¹ e 60 mg.L⁻¹, com base em estudos anteriores (FÉLIX; ANTUNES; COIMBRA, 2014; RIEHL et al. 2011; ZAKHARY et al. 2011). O tempo de exposição de 20 minutos foi selecionado de acordo com estudos anteriores sobre os efeitos da KT em *zebrafish* adulto (RIEHL et al. 2011; ZAKHARY et al. 2011). O grupo controle foi exposto à água isenta de KT de acordo com o mesmo método.

Os testes comportamentais foram realizados no período das 8h às 13h. Os ensaios eram gravados com câmera digital por 5 minutos e quantificados manualmente empregando o software Any-Maze® (Stoelting Co.).

4.4. Teste de Claro-Escuro

O Teste de Claro-Escuro foi realizado de acordo com o método descrito por Stewart et al. (2011c) e Riehl et al. (2011), com algumas modificações. Os testes foram realizados em um aquário retangular (20 x 30 x 15 cm) preenchido com água até uma altura de no máximo 10 cm (**Figura 7**). O aquário teste foi dividido em duas seções verticais iguais e cada seção foi recoberta externamente, de acordo com as dimensões do aquário, sendo uma seção revestida com folha branca e a outra com folha preta. A câmera digital foi posicionada sobre o aquário. Os parâmetros comportamentais quantificados foram a latência no primeiro acesso à área clara, o tempo de permanência na área clara, o número de cruzamentos entre as duas áreas e a duração média das entradas na região clara (RIEHL et al. 2011; STEWART et al., 2011c).

Figura 7. Ilustração esquemática do aparato experimental para realização o Teste de Claro-Escuro.

4.5. Teste do Espelho

O Teste do Espelho foi executado segundo o método proposto por Pham et al. (2012) e Way et al. (2015), com algumas modificações. Os testes foram realizados em um aquário retangular, com as mesmas dimensões do aquário empregado no teste anterior, preenchido com água mantida sob os mesmos parâmetros que a água do aquário de condicionamento e contendo um espelho interno em uma de suas paredes laterais. O movimento do peixe foi registrado por 5 minutos utilizando-se uma câmera digital posicionada frontalmente ao

aquário (**Figura 8**). Os parâmetros avaliados foram a duração do contato com o espelho e a latência ao primeiro contato com o espelho (PHAM et al. 2012; WAY et al. 2015).

Figura 8. Representação esquemática do aparato experimental para realização do Teste do Espelho.

4.6. Estatística Univariada e Multivariada

Os resultados dos testes comportamentais foram avaliados empregando métodos estatísticos univariados (ANOVA) usando o software OriginPro® (OriginLab Co.) e métodos multivariados (PCA, HCA e SIMCA) usando o software Pirouette® (Infometrix Inc.). Os resultados provenientes do Teste de Claro-Escuro foram tratados empregando ANOVA (fator: dose), seguida do Teste de Tukey *post-hoc*, PCA, HCA e SIMCA. Os resultados obtidos com o Teste do Espelho foram tratados empregando-se Análise de Variância (ANOVA) (fator: dose) seguida do Teste de Tukey *post-hoc*.

4.7. Preparo de Amostras empregando Extração Líquido-Líquido

Amostras de globo ocular e corpo total (*whole-body samples*) foram utilizadas dos animais selecionados para os estudos empregando cromatografia em fase gasosa. Para análise empregando GC-MS, amostras de ambos os globos oculares foram coletadas e maceradas. Para análises via GC-NPD, as amostras de corpo total foram maceradas e homogeneizadas e do homogenato resultante foram utilizados 0.1 g por amostra. O método de extração desenvolvido para determinação de KT em amostras de corpo total e de globo ocular de *zebrafish* é sumarizado e apresentado na **Figura 9**.

Figura 9. Esquema representativo das etapas do preparo de amostras de *zebrafish*.

4.8. Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)

Inicialmente, em função da alta sensibilidade da detecção empregando Espectrometria de Massas, um método empregando GC-MS foi desenvolvido para detecção de KT em *zebrafish*, com o objetivo de identificar o analito no animal exposto. Para tanto, essa análise foi conduzida em amostras de globo ocular de *zebrafish*. A escolha da matriz se justifica em função de KT apresentar receptores específicos no globo ocular. Estudos têm observado que o bloqueio do receptor NMDA pela KT em áreas envolvidas nos circuitos frontais-tálamo-cerebelar podem causar perturbações no movimento ocular (RADANT et al. 1998; SCHMECHTIG et al. 2013; WEILER et al. 2000). Nesse sentido, o globo ocular seria uma matriz-alvo indicada para investigar a exposição efetiva do *zebrafish* à KT.

Assim sendo, utilizou-se um cromatógrafo em fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas com analisador de massas quadrupolo (modelo 7890A, Agilent, USA) inicialmente no modo *Full Scan* de detecção, e posteriormente no modo SIM, com monitoramento de íons selecionados, com base no método desenvolvido por Bordin et al. (2014). A separação foi realizada em coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m x 250 µm x 0,25 µm de espessura de filme). As amostras tratadas foram injetadas no modo *splitless*. Utilizou-se gás He como gás de arraste a um fluxo de 0,8 mL.min⁻¹. As condições do

cromatógrafo são expostas na **Tabela 2**. A rampa de temperatura da coluna utilizada é apresentada na **Tabela 3**.

Tabela 2. Condições cromatográficas do método empregando GC-MS

Parâmetro Instrumental	
Tempo total de análise	9,00 min
Temperatura do quadrupolo	150°C
Temperatura do <i>transfer line</i>	230°C
Temperatura do detector	300°C

Tabela 3. Programação da temperatura da coluna no método GC-MS

Temperatura inicial (°C)	Taxa de aquecimento (°C/min)	Tempo de permanência (min)
70	-	2
160	30	5
170	5	-
220	10	-
320	30	3

Os íons monitorados para detecção da KT são apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Íons de identificação, quantificação e tempo de retenção da KT.

Analito	Íons de Identificação (m/z)	Íon de Quantificação (m/z)	Tempo de Retenção (min)
KT	30, 180, 182, 209	180	6,80

4.9. Cromatografia em Fase Gasosa com Detector de Nitrogênio-Fósforo (GC-NPD)

Considerando a especificidade e sensibilidade do detector de nitrogênio-fósforo (NPD) para compostos nitrogenados como a KT, desenvolveu-se então um método para determinação de KT empregando um cromatógrafo em fase gasosa com detector de nitrogênio-fósforo (modelo CP3800, Varian/Agilent, USA) com base no método

desenvolvido por Raikos et al. (2009). A separação foi realizada em coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (30 m x 250 μm x 0.25 μm de espessura de filme). As condições gerais do cromatógrafo são dadas na **Tabela 5**.

Tabela 5. Condições cromatográficas do método

Parâmetro Instrumental	
Tempo total de análise	11,31 min
Fluxo de gás de arraste	2,0 mL.min ⁻¹
Temperatura do injetor	220°C
Temperatura do detector	300°C

A rampa de temperatura da coluna capilar empregada no método cromatográfico é apresentada na **Tabela 6**.

Tabela 6. Programação da temperatura da coluna cromatográfica.

Temperatura inicial (°C)	Taxa de aquecimento (°C/min)	Tempo de permanência (min)
110	-	1
260	30	5

4.10. Validação Analítica

A validação do método cromatográfico foi realizada segundo os parâmetros de linearidade, estabilidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão de acordo com o estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo *Scientific Working Group for Forensic Toxicology* (SWGTOX) (ANVISA 2012; SWGTOX 2013).

4.10.1. Linearidade

A linearidade é o parâmetro que demonstra a capacidade do método em gerar respostas analíticas linearmente proporcionais à concentração do(s) analito(s). Esse parâmetro é avaliado através da construção de uma curva de calibração, relacionando a resposta

instrumental e a concentração do analito. O modelo de calibração deve ser construído a partir da análise de, no mínimo, 6 a 8 concentrações conhecidas do analito (denominadas padrões de calibração) – desde o limite de quantificação até 120% da máxima concentração que se pretende analisar – adicionadas à matriz de investigação para a qual o método foi desenvolvido e será aplicado (CASSIANO et al. 2009). A linearidade é então avaliada de acordo com o coeficiente de correlação linear (R^2) que deve ser igual ou superior a 0.99.

O método de padronização adotado em análises cromatográficas é o método da padronização interna. Os padrões de calibração são preparados pela adição das diferentes concentrações do analito – a constituírem a curva de calibração – e pela adição de uma concentração fixa do padrão interno (PI). A padronização interna permite avaliar a variação da resposta analítica em função de flutuações de condições experimentais (instrumentais ou de manipulação amostral). O modelo de regressão e a curva de calibração são construídos através da relação entre a razão das áreas (área do analito/área do padrão interno) e as concentrações do analito (CASSIANO et al. 2009). Na aplicação do método para determinação de amostras desconhecidas, a adição de PI é também necessária.

4.10.2. Limites de Detecção e de Quantificação

O limite de detecção (LOD) é a menor concentração de um analito que pode ser detectada e diferenciada confiavelmente do ruído de fundo, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas (BRITO et al. 2003; CASSIANO et al. 2009). O limite de quantificação (LOQ) é definido como a menor concentração do analito de interesse que pode ser quantitativamente determinada com valores aceitáveis de precisão e exatidão na amostra, sob condições experimentais bem definidas (BRITO et al. 2003; CASSIANO et al. 2009). A determinação desses limites pode ser realizada pela relação sinal/ruído, pelo método do desvio padrão ou por tratamento estatístico. No presente trabalho, a estimativa de LOD e LOQ foi realizada empregando-se a relação sinal/ruído, sendo aceitáveis as relações sinal/ruído de 3:1 para o LOD e de 10:1 para o LOQ. A determinação experimental foi realizada através da fortificação das amostras “branco” com diferentes concentrações decrescentes de KT, em triplicata.

4.10.3. Exatidão

A exatidão é definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico (BRITO et al. 2003). Esse parâmetro de validação é determinado como o erro padrão relativo expresso de acordo com a equação:

$$\text{Exatidão} = \left(\frac{\text{Concentração média determinada} - \text{Concentração teórica}}{\text{Concentração teórica}} \right) \cdot 100$$

Os ensaios de exatidão foram conduzidos empregando-se três amostras por concentração em três níveis de concentração (CQB, CQM e CQA).

4.10.4. Precisão

A precisão de um método bioanalítico avalia a dispersão e proximidade de resultados obtidos a partir de ensaios independentes de amostragens múltiplas de amostras homogêneas, sob condições experimentais definidas (RIBANI et al. 2004; CASSIANO et al. 2009). É um parâmetro expresso como uma estimativa do desvio padrão ou coeficiente de variação (CV%). No presente trabalho, os resultados foram avaliados mediante o coeficiente de variação e calculado de acordo com a equação (SWGTOX, 2013):

$$\text{Coeficiente de Variação (\%)} = \left(\frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média}} \right) \cdot 100$$

A **precisão intra-ensaio** representa a concordância entre os resultados obtidos em análises dentro de um curto período de tempo e sob a mesmas condições experimentais (mesmos analista, reagentes, instrumentação e laboratório) (CASSIANO et al. 2009). No presente trabalho, os ensaios de precisão intra-ensaio foram realizados em três níveis de concentração, em quintuplicata.

A **precisão inter-ensaio** é a concordância entre os resultados obtidos pelo mesmo laboratório variando-se o dia de realização do experimento, o analista e o equipamento, sendo recomendado dois dias diferentes para as análises (CASSIANO et al. 2009). Neste trabalho, os ensaios de precisão inter-ensaio foram realizados em três níveis de concentração, em três

dias diferentes. O ensaio de precisão foi realizado simultaneamente aos ensaios de exatidão (conforme descrito na seção 4.9.3. *Exatidão*).

4.10.5. Recuperação e Efeito Matriz

A **recuperação** considera a habilidade do método de extração em obter o máximo possível de analito da amostra de análise e foi determinada de acordo com a equação:

$$\text{Recuperação} = \left(\frac{\text{Resposta do analito adicionado antes}}{\text{Resposta do analito adicionado após}} \right)$$

Os ensaios de recuperação foram realizados usando os três controles de qualidade (baixo, médio e alto), em triplicata, comparando-se os resultados da quantificação das amostras fortificadas imediatamente antes ao processo de extração líquido-líquido e imediatamente após a extração líquido-líquido, sendo essas últimas consideradas como amostras provenientes de uma extração com eficiência igual a 100%. O efeito matriz foi avaliado mediante comparação das análises em solução padrão e na amostra de *zebrafish* e calculado de acordo com a equação:

$$\text{Fator Matriz} = \left(\frac{\text{Resposta do analito na matriz} / \text{Resposta do PI na matriz}}{\text{Resposta do analito na solução} / \text{Resposta do PI na solução}} \right)$$

4.10.6. Estabilidade

4.10.6.1. Estabilidade de Curta Duração

A **Estabilidade de Curta Duração** determina a variação da concentração do analito após a amostra ser mantida a temperatura ambiente por 24h. A determinação foi realizada através da injeção das amostras fortificadas dos controles de qualidade baixo (CQB) e alto (CQA) em triplicata.

4.10.6.2. *Estabilidade Pós-Processamento*

A **Estabilidade Pós-Processamento** determina a variação da concentração do analito após a amostra ser processada, isto é, submetida ao processo de preparo. A determinação foi realizada através da reinjeção das amostras fortificadas dos controles de qualidade baixo (CQB) e alto (CQA) aproximadamente 8h após a primeira corrida cromatográfica.

4.10.6.3. *Estabilidade de Longa Duração*

A **Estabilidade de Longa Duração** determina a variação da concentração do analito após a amostra ser mantida por longo período de tempo sob congelamento a -20°C . A determinação foi realizada através da injeção das amostras fortificadas dos controles de qualidade baixo (CQB) e alto (CQA) em triplicata após 30 dias a -20°C .

4.10.7. Efeito Residual (Efeito *Carry Over*)

O efeito residual ou efeito *carry over* é um parâmetro que determina se a análise cromatográfica anterior influencia a análise cromatográfica imediatamente subsequente e a determinação é realizada injetando-se uma amostra desprovida do analito (amostra “branco”) imediatamente após a injeção de uma amostra fortificada com o valor mais alto de concentração da curva de calibração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Teste de Claro-Escuro

5.1.1. Análise de Variância (ANOVA)

Os grupos experimentais empregados foram expostos às doses de 5 mg.L⁻¹ (n = 21), 20 mg.L⁻¹ (n = 17), 40 mg.L⁻¹ (n = 37) e 60 mg.L⁻¹ (n = 33) e o grupo controle (n = 16), de acordo com a disponibilidade de animais para experimentação. A relação entre os efeitos comportamentais induzidos pela administração aguda de KT e a dose administrada em *zebrafish* adulto são apresentados na **Figura 10**. A latência à área clara foi reduzida significativamente inter-grupos ($F_{[4,119]} = 15,20204$, $p < 0.05$), com a análise *post-hoc* mostrando que as concentrações de 20, 40 e 60 mg.L⁻¹ induziram efeitos mais significativos em relação ao grupo controle. Observou-se também aumentos estatisticamente significativos no tempo na área clara ($F_{[4,119]} = 28,95712$, $p < 0.05$) e no número de cruzamentos ($F_{[4,119]} = 30,06462$, $p < 0.05$). Comparativamente, as concentrações de 40 e 60 mg.L⁻¹ provocaram respostas mais significativas em relação aos grupos controle e expostos à 5 e 20 mg.L⁻¹. A duração média das entradas na área clara não foi alterada significativamente segundo a análise via ANOVA.

Agentes ansiolíticos promovem o aumento na atividade exploratória na área clara, com aumento dose-dependente no número de transições entre as áreas e no tempo de permanência na área clara (BOURIN; HASCOËT, 2003; TREIT; MENARD, 1998). Conforme observado, todos os parâmetros comportamentais variaram de maneira dose-dependente, exceto a duração média da entrada na área clara do tanque. A latência ao primeiro acesso à área clara foi reduzida e o tempo gasto na área clara foi aumentado, o que está associado à uma redução do medo e um aumento na audácia do animal para explorar o novo ambiente. O aumento do número de cruzamentos com o aumento da concentração de KT sugere uma indução de hiperatividade no animal. Com relação à duração média das entradas na área clara, observou-se que o *zebrafish* não-exposto à KT passa mais tempo explorando a área por entrada, o que é suportado pelo fato de que estes animais são menos hiperativos (como observado no número de cruzamentos) em relação aos animais expostos. No entanto, entre os grupos expostos, um aumento na duração média de entrada foi notado, provavelmente devido à redução do medo associado com maior atividade locomotora dose-dependente. Contudo, os resultados não foram estatisticamente significativos.

Figura 10. *Endpoints* comportamentais para a investigação do comportamento ansiolítico induzido pela KT: **(A)** latência à área clara, **(B)** tempo na área clara, **(C)** número de cruzamentos entre as áreas e **(D)** a duração média da entrada na área clara. Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey *post-hoc*. Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. Todos os dados foram expressos como a média $\pm$ SEM.

5.1.2. Análises Multivariadas

As análises multivariadas foram realizadas usando um conjunto de 115 amostras devido à retirada de amostras anômalas que não produziram resultados. A matriz de dados ficou então dividida em Classe 1 (grupo controle, $n = 14$), Classe 2 (grupo exposto à 5 mg.L^{-1} , $n = 20$), Classe 3 (grupo exposto à 20 mg.L^{-1} , $n = 17$), Classe 4 (grupo exposto à 40 mg.L^{-1} , $n = 32$) e Classe 5 (grupo exposto à 60 mg.L^{-1} , $n = 32$).

5.1.3. Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA)

No método de **Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA)** empregou-se a distância euclidiana como medida de similaridade e a inserção pela soma dos incrementos dos quadrados (*Incremental Linkage Method*) para agrupamento das amostras em cada *cluster*. De acordo com os resultados obtidos, observou-se uma divisão da matriz de amostras em cinco classes – em concordância com o número de grupos experimentais usado – sem uma clara divisão dessas amostras nas classes (**Figura 11**). A **Tabela 7** apresenta os resultados percentuais de classificação das amostras em cada classe.

Tabela 7. Porcentagem de amostras classificadas em cada classe de acordo com o agrupamento pela análise HCA.

	Amostras (N)	Grupo Experimental e dose administrada de KT				
		Controle	5 mg.L^{-1}	20 mg.L^{-1}	40 mg.L^{-1}	60 mg.L^{-1}
Classe 1	12	33,33	50,00	16,77	0,00	0,00
Classe 2	32	25,00	31,25	31,25	12,50	0,00
Classe 3	23	8,70	8,70	13,04	34,78	34,78
Classe 4	35	0,00	5,72	5,72	42,86	45,71
Classe 5	13	0,00	0,00	0,00	38,46	61,54

Figura 11. Resultados da análise HCA para agrupamento do conjunto de dados: **(A)** Classe 1 e **(B)** da Classe 2, que são compostas predominantemente por animais dos grupos controle e de tratamento expostos a concentrações de 5 e 20 mg.L⁻¹; **(C)** Classe 3, composta majoritariamente por animais dos grupos de tratamento expostos a concentrações de 40 e 60 mg.L⁻¹; **(D)** Classe 4, composta principalmente por animais do grupo de tratamento exposto à concentração de 40 mg.L⁻¹ e **(E)** Classe 5, composta majoritariamente por animais do grupo de tratamento exposto à concentração de 60 mg.L⁻¹.

Conforme mostrado na **Tabela 8**, a análise não-supervisionada HCA baseada na similaridade natural das respostas comportamentais desempenhadas por cada um dos animais testados promove alguns erros de classificação. Contudo, considerando o tratamento experimental (dose) a que cada grupo de animais foi submetido, é possível observar uma evolução lógica na distribuição das amostras por classes. A porcentagem de animais pertencentes aos grupos controle e exposto à dose de 5 mg.L⁻¹ de KT corresponde à maioria nas Classes 1 e 2. Por outro lado, animais expostos às doses de 40 e 60 mg.L⁻¹ de KT não foram classificados na Classe 1, em que há maior número de animais do grupo controle e, na Classe 2, apenas animais do grupo exposto à dose de 40 mg.L⁻¹ são classificados (com a menor porcentagem dentre todos) enquanto que animais do grupo exposto à dose mais alta não foram novamente incluídos. Nesse sentido, conforme esperado, as Classes 4 e 5 não apresentam amostras provenientes dos grupos controle e/ou exposto à menor dose de KT. Por fim, pode-se sumarizar que as doses de 5 mg.L⁻¹ e 60 mg.L⁻¹ de KT foram a menos e a mais efetivas, respectivamente, na indução de variações comportamentais. A dose de 20 mg.L⁻¹ pode ser considerada uma dose intermediária.

5.1.4. Análise de Componentes Principais (PCA)

O pré-processamento dos resultados amostrais foi realizado empregando o método de autoescalamento. No autoescalamento dos resultados, em uma primeira análise os dados são centrados na média e, em seguida, escalonados pela variância (BRUNI; TALHAVINI 2012).

Considerando os resultados obtidos com o Teste de Claro-Escuro, inicialmente foi realizada a detecção da presença de amostras com comportamento anômalo denominadas *outliers*, comparando-se os resíduos das amostras com a distância de Mahalanobis (**Figura 12**). Apenas nove amostras foram classificadas como *outliers*, sendo 3 amostras do grupo controle, 3 amostras do grupo exposto à dose de 5 mg.L⁻¹, 2 amostras do grupo exposto à dose de 20 mg.L⁻¹ e 1 amostra do grupo exposto à dose de 60 mg.L⁻¹. Novas análises foram conduzidas testando a retirada dessas amostras mas a remoção das mesmas da matriz de dados não promoveu melhoras significativas em relação à análise inicial.

Figura 12. Diagnóstico de *outliers* da matriz de dados.

No gráfico de *scores-loadings* para a matriz de dados, podemos observar a tendência de agrupamento entre as amostras bem como a contribuição de cada variável do sistema original para o modelo (**Figura 13**). Pode-se observar a tendência indicada na análise HCA: similaridade comportamental é observada entre os animais dos grupos controle e exposto à dose de 5 mg.L⁻¹ e entre os animais dos grupos expostos às doses mais altas (40 e 60 mg.L⁻¹) (**Figura 13(a)**). Os animais expostos à concentração de 20 mg.L⁻¹ da droga apresentam um perfil comportamental intermediário entre esses dois padrões. Além disso, deve-se ressaltar um aspecto importante. As doses mais altas de KT induziram uma distribuição mais homogênea das amostras enquanto as doses mais baixas e a ausência de droga resultaram em distribuições mais dispersas. Nesse sentido, o efeito comportamental da KT compreende também uma “padronização comportamental”, que não é observada para animais não expostos e submetidos às mesmas condições de teste.

No gráfico de *loadings*, podemos indicar que em nosso modelo a latência à área clara e o número de cruzamentos entre as áreas clara e escura do tanque foram as variáveis mais significativas, isto é, de maior contribuição para separação e distinção dos perfis comportamentais individuais de cada animal (**Figura 13(b)**).

De acordo com a análise por PCA, três CPs permitiram a separação das amostras entre as cinco classes e responderam por 100.00% de toda a informação do sistema, sendo que duas CPs acumularam 88,74% de toda a informação do sistema e 62,59% da informação foram descritos apenas pela primeira CP.

Figura 13. Resultados da análise de PCA para os primeiros três componentes principais do conjunto de dados. (A) No diagrama de *scores*, uma maior similaridade é observada entre os grupos de controle e de tratamento expostos à 5 e 20 mg.L⁻¹ de KT e entre os grupos de tratamento expostos à 40 e 60 mg.L⁻¹. O grupo exposto à 20 mg.L⁻¹ de KT apresentou um comportamento intermediário entre o grupo controle e os grupos de tratamento expostos a concentrações mais elevadas de KT. (B) No diagrama de *loadings*, o número de cruzamentos e a latência ao primeiro acesso à área clara são as variáveis que mais contribuíram para classificar todos os dados.

5.1.5. *Soft Independent Modeling of Class Analogies (SIMCA)*

Para a análise SIMCA, quatro Componentes Principais foram selecionadas para modelagem e definiu-se o nível de probabilidade de 0.95. Dos métodos de pré-processamento para os dados testados, observou-se que o autoescalonamento produziu resultados melhores. Os resultados de *scores* e *loadings* para cada classe são apresentados na **Figura 14**.

Figura 14. Outliers, scores e loadings obtidos para cada classe: (A) amostras do grupo controle, (B) amostras do grupo exposto a 5 mg.L⁻¹ de KT, (C) amostras do grupo exposto à 20 mg.L⁻¹ de KT, (D) amostras do grupo exposto à 40 mg.L⁻¹ de KT e (E) amostras do grupo exposto à 60 mg.L⁻¹ de KT.

Na classificação das amostras de acordo com as classes pré-definidas, as Classes 1, 2, 4 e 5 exibiram a maioria das amostras corretamente classificadas (**Tabela 8**). Pode-se observar uma concordância entre esses resultados com os resultados obtidos pelo agrupamento empregando HCA. A Classe 1 – correspondente ao grupo controle – não exibiu nenhuma de suas amostras classificadas nas Classes 4 e 5 (correspondentes aos grupos tratados com as doses mais altas de KT). Paralelamente, a Classe 4 apresentou apenas 6,25% das amostras classificadas como pertencentes à Classe 1 e a Classe 5 não teve nenhuma de suas amostras classificadas como Classe 1. As Classes 2 e 4 (correspondente aos grupos expostos às doses de 5 e 40 mg.L⁻¹ de KT) apresentaram um padrão coerente de classificação das amostras, gerando um perfil gaussiano de distribuição de amostras em relação à concentração de droga referente à cada grupo, com o máximo correspondendo às classificações corretas, na própria classe. De maneira similar, a Classe 5 apresentou relação linear entre o número de amostras por classe e a concentração de KT administrada aos animais em cada classe.

Tabela 8. Percentual de classificação das amostras em cada classe SIMCA.

	Amostras (N)	Grupo Experimental e dose administrada de KT				
		Controle	5 mg.L ⁻¹	20 mg.L ⁻¹	40 mg.L ⁻¹	60 mg.L ⁻¹
Classe 1	14	64,29	28,57	7,14	0,000	0,000
Classe 2	20	30,00	55,00	15,00	0,000	0,000
Classe 3	17	11,76	41,19	35,29	5,88	5,88
Classe 4	32	6,250	12,50	18,75	46,88	15,62
Classe 5	32	0,000	9,370	9,370	31,25	50,00

A Classe 3 exibiu um padrão classificatório diferente, com a maioria das amostras classificadas como pertencentes à Classe 2. Contudo, dois aspectos devem ser ressaltados. A variação entre o número de amostras pertencentes à Classe 3 e corretamente classificadas na classe apresentou um desvio de 14.32% em relação ao número de amostras da Classe 3 erroneamente classificadas como Classe 2, exibindo um desvio relativamente baixo. Além disso, os resultados das análises por PCA e HCA indicaram diferenças pouco significativas entre as doses de 5 e 20 mg.L⁻¹ – que correspondem às Classes 2 e 3 pré-definidas – o que suporta esse perfil classificatório anômalo observado nos resultados de agrupamento empregando análise SIMCA.

Embora ocorram classificações equívocas das amostras em todas as classes, todos os animais geraram padrões comportamentais compatíveis com uma das cinco classes pré-definidas. Não foram observados padrões comportamentais *outliers*, isto é, padrões que não se encaixaram em nenhuma das cinco classes. Na análise SIMCA com nível de confiança de 95%, espera-se no máximo 5% de amostras definidas como *outliers*. Nesse sentido, como o nosso modelo não detectou qualquer *outlier*, nossos resultados são considerados altamente aceitáveis e, portanto, o modelo é válido.

As distâncias e resíduos interclasses também foram determinados empregando SIMCA. As distâncias interclasses suportam os resultados anteriores, indicando uma similaridade coerente das classes com base nos perfis comportamentais dos animais pertencentes a essas classes (**Tabela 9**). Por exemplo, na Classe 1 pode-se observar claramente o aumento da distância para as outras classes com o aumento da dose de KT administrada ao grupo referente à cada classe.

Tabela 9. Distâncias interclasses obtidas pela análise SIMCA

	Grupo Experimental e dose administrada de KT				
	Controle	5 mg.L ⁻¹	20 mg.L ⁻¹	40 mg.L ⁻¹	60 mg.L ⁻¹
Classe 1	0,000000	1,037045	1,052008	8,169163	13,531142
Classe 2	1,037045	0,000000	0,239544	6,243343	10,517504
Classe 3	1,052008	0,239544	0,000000	3,405077	6,095619
Classe 4	8,169163	6,243343	3,405077	0,000000	0,428426
Classe 5	13,531142	10,517504	6,095619	0,428426	0,000000

Em concordância com os resultados anteriores estão também os resíduos interclasses (**Tabela 10**). Observa-se que os resíduos entre as classes apresentam valores significativamente menores quando as amostras são ajustadas na própria classe. Quanto menor o resíduo interclasse, melhor o ajuste das amostras na classe. A similaridade entre os perfis comportamentais típicos de cada grupo, expressos através das classes, é visualizada através dos resíduos. Dentre as cinco classes, as menores diferenças entre os resíduos são observadas para aquelas classes representativas de grupos de *zebrafish* expostos a doses responsáveis por induzir comportamentos similares.

Tabela 10. Resíduos interclasses obtidos pela análise SIMCA

	Grupo Experimental e dose administrada de KT				
	Controle	5 mg.L ⁻¹	20 mg.L ⁻¹	40 mg.L ⁻¹	60 mg.L ⁻¹
Classe 1	0,504274	0,675979	0,961940	7,833060	12,556337
Classe 2	1,531539	0,648919	0,930685	7,253648	11,335919
Classe 3	1,383256	0,652646	0,647975	4,319491	6,908875
Classe 4	3,262836	1,034167	1,083403	0,775974	1,325924
Classe 5	3,713742	1,155784	1,218846	0,780023	0,746787

As variáveis usadas nas análises foram definidas como os parâmetros comportamentais avaliados no Teste de Claro-Escuro. Embora todos os parâmetros avaliados sejam bem-caracterizados para investigação de efeitos ansiolíticos da KT em *zebrafish*, cada parâmetro possui uma contribuição na modelagem do sistema e na classificação das amostras. Em nosso modelo, as variáveis mais relevantes para modelagem foram o tempo na área clara e o número de cruzamentos. Contudo, a diferença entre o poder de modelagem de cada variável é relativamente baixa e a relevância das variáveis para o modelo é similar (**Tabela 11**). Para a discriminação das amostras em cada classe, as variáveis apresentaram contribuições significativamente diferentes, sendo que a latência à área clara foi o parâmetro comportamental com maior poder de discriminação (**Tabela 12**). Como os parâmetros comportamentais apresentaram valores significativos de poder discriminatório, nenhuma amostra foi classificada como pertencente a mais de uma classe. Esses resultados mostraram-se em acordo com o gráfico de *loadings* observado na análise empregando PCA (**Figura 13(b)**). Como todas as variáveis apresentaram poderes de modelagem e discriminatório adequados, nenhum dos parâmetros comportamentais foi removido do sistema em análise.

Tabela 11. Poder de modelagem das variáveis empregadas na análise

Parâmetro Comportamental	Poder de Modelagem Total
Latência à área clara	0,637504
Tempo na área clara	0,745234
Número de cruzamentos	0,711099
Duração média da entrada	0,687107

Tabela 12. Poder discriminatório das variáveis empregadas na análise

Parâmetro Comportamental	Poder Discriminatório
Latência à área clara	84,774208
Tempo na área clara	6,472140
Número de cruzamentos	27,265001
Duração média da entrada	11,016716

Os resultados deste estudo demonstram que a KT possui propriedades ansiolíticas em *zebrafish* adulto. Em outras espécies, resultados similares foram reportados. A KT também induz comportamentos ansiolíticos em humanos (KRYSTAL et al., 1994) e produz um efeito ansiolítico de “evitação do medo” (BABAR et al., 2001) e aumento da expressão de *c-fos* cerebral em ratos (PENG et al. 2010). O tratamento crônico com KT reverte deficiências comportamentais em ratos, tais como aumento do comportamento de congelamento e ansiedade (ZHANG et al. 2014). Em *zebrafish* adulto, estudos reportaram que a exposição aguda à KT, nas doses de 20 e 40 mg.L⁻¹ induz comportamentos ansiolíticos, diminui os níveis de cortisol total e aumenta a expressão de *c-fos* no cérebro (RIEHL et al. 2011). Nesse sentido, nossos resultados estão suportados por outros estudos descritos na literatura.

Outro aspecto a ser discutido é o uso de estatística multivariada para análise dos resultados provenientes dos ensaios comportamentais em *zebrafish*. A ANOVA é o método mais aplicado para avaliação dos dados de estudos de comportamentos animais, em que os efeitos de cada variável (parâmetro comportamental) são comparados um de cada vez dentre os grupos experimentais. Contudo, a análise estatística univariada permite uma abordagem limitada das interações que ocorrem no conjunto de dados (TINSLEY; BROWN, 2000). Nesse sentido, métodos estatísticos multivariados realizam análises mais profundas da relação entre os múltiplos conjuntos de variáveis em diferentes grupos experimentais (TABACHNIK; FIDEL, 2006; TINSLEY; BROWN, 2000). Neste estudo, utilizando-se da estatística multivariada, foi possível conduzir uma análise mais detalhada do perfil comportamental de um grupo de animais exposto à mesma concentração de KT, considerando todas as variáveis (aqui definidas como os parâmetros comportamentais) e suas interações entre si. Como exemplo, pode-se indicar que, pela ANOVA, observou-se os efeitos ansiolíticos induzidos pela KT em *zebrafish*. Porém, com a abordagem multivariada, observou-se a existência de uma padronização comportamental induzida pela exposição à KT bem como a identificação de animais que exibiram comportamentos anômalos, para todos os parâmetros

comportamentais simultaneamente. Além disso, a interpretação das variáveis é mais robusta empregando-se métodos multivariados. O parâmetro de duração média das entradas na área clara, por exemplo, não produziu efeitos significativos pela análise ANOVA. Na análise SIMCA, esse parâmetro foi a terceira variável mais importante ao modelar o sistema e distinguir as amostras, promovendo a classificação. Nesse sentido, pode-se concluir que o uso da estatística multivariada consiste em uma interessante abordagem e que pode ser complementar à ANOVA para a interpretação de resultados de ensaios comportamentais.

5.2. Teste do Espelho

Os grupos experimentais empregados foram expostos às doses de 5 mg.L⁻¹ (n = 22), 20 mg.L⁻¹ (n = 18), 40 mg.L⁻¹ (n = 39) e 60 mg.L⁻¹ (n = 36) e o grupo controle (n = 34), de acordo com a disponibilidade de animais para experimentação. A latência ao primeiro contato com o espelho foi significativamente alterada pela administração aguda de KT ($F_{(4, 144)} = 4,44205$, $p < 0,05$) (**Figura 15(A)**). Similarmente, o tempo de contato com o espelho também foi modificado significativamente pela administração de KT ($F_{(4, 144)} = 3,55128$, $p < 0,05$) (**Figura 15(B)**). De acordo com o teste de Tukey para comparações múltiplas, pode-se observar um efeito pouco significativo nos grupos experimentais em relação aos dois parâmetros avaliados e quantificados. A dose de 40 mg.L⁻¹ provocou uma redução significativa da latência em relação aos grupos controle e exposto à 60 mg.L⁻¹, sugerindo um aumento nos comportamentos agressivos para os animais expostos à essa concentração. O tempo de interação com o espelho é maior para animais que exibem comportamentos agressivos mais elevados. Assim sendo, a concentração de 20 mg.L⁻¹ reduziu a duração do contato com o espelho significativamente em relação às doses mais altas, sem alteração significativa em relação aos grupos controle e exposto à 5 mg.L⁻¹. Considerando os resultados em conjunto, no presente trabalho a KT não induziu efeitos significativos em ambos os parâmetros avaliados, de acordo com ANOVA, de modo a induzir comportamentos agressivos em relação ao grupo controle. Entretanto, estudos a nível neuroquímico e biomolecular devem ser conduzidos a fim de se entender se de fato seria esperado que KT atuasse sobre e modulasse estados de agressividade.

Figura 15. Alterações comportamentais induzidas pela exposição aguda à KT de acordo com o Teste do Espelho. Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey *post-hoc*. Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. Todos os dados foram expressos como a média $\pm$ SEM.

Outros estudos sobre os efeitos da KT em comportamentos agressivos já foram realizados em modelos mamíferos. Newman et al. (2012) observou que a exposição aguda à KT seguida auto-administração de água em camundongos reduziu a frequência de ataques (mordidas) e que a droga não interage com o etanol no aumento de comportamentos agressivos. Contudo, Takahashi et al. (1984) observou que baixas doses de KT administradas intraperitonealmente em ratos aumentaram a agressividade em animais privados de sono e comida e em camundongos isolados socialmente. Em outro estudo, Becker et al. (2003) verificou que em ratos, 2 semanas após o término de exposição subcrônica à KT, é observada uma diminuição em comportamentos não agressivos.

5.3. Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)

O *zebrafish* é um animal muito orientado visualmente, cuja anatomia local e ultraestrutura dos tecidos e células especializadas do humor aquoso, retina e lente mostram conservação de morfologia em relação a outros vertebrados, incluindo seres humanos (GLASS, DAHM, 2004; GRAY et al., 2009). Nesse sentido e em acordo com essas

observações, os resultados obtidos para amostras de globo ocular de *zebrafish* mostram que o método desenvolvido pode ser extrapolado e aplicado em globo ocular de humanos.

Na **Figura 16** é apresentado o cromatograma obtido no modo SIM (com seleção dos íons característicos da KT em uma análise por MS) referente à análise de uma amostra fortificada com KT de globo ocular de um animal não exposto fortificado. Na **Figura 17** está apresentado o cromatograma de uma matriz de globo ocular isenta de KT, obtido no modo *Scan* de detecção.

Figura 16. Cromatograma de íons totais da KT proveniente de amostra fortificada de globo ocular de animal não-exposto.

Figura 17. Cromatograma de matriz “branco”, proveniente de amostra de globo ocular de animal não exposto e isenta de KT.

A **Figura 18** apresenta o cromatograma obtido em modo SIM de uma amostra de globo ocular de um animal exposto à concentração de KT. Pode-se observar que a análise qualitativa confirma os resultados comportamentais obtidos anteriormente, indicando que de

fato os animais expostos à concentração de KT, consomem efetivamente a substância presente no meio de exposição.

Figura 18. Cromatograma de globo ocular de *zebrafish* exposto à KT.

5.4. Cromatografia Gasosa com Detector de Nitrogênio-Fósforo (GC-NPD)

Uma vez que os resultados obtidos nos ensaios comportamentais e de GC-MS indicaram que o *zebrafish* exposto sofre os efeitos induzidos pela substância, o método para monitoramento e dosagem da substância foi desenvolvido em GC-NPD. Inicialmente, avaliou-se a sensibilidade do sistema cromatográfico à KT e ao padrão interno selecionado para análise, DZ. Para tanto, injetou-se 100 ng de solução padrão de KT em metanol e 100 ng de solução padrão de DZ em metanol no GC-NPD. O cromatograma referente à análise é apresentado na **Figura 19**.

Figura 19. Cromatograma referente à análise de solução padrão de KT e de DZ (padrão interno) em metanol para determinação dos tempos de retenção.

As **Figuras 20 e 21** apresentam, respectivamente, cromatogramas referentes às análises de amostras de *zebrafish* isenta de KT (“amostra branco”) e fortificada com 400 ng de KT e 200 ng de padrão interno.

Figura 20. Cromatograma referente à análise de uma amostra de *zebrafish* isenta de KT (“amostra branco”) após extração líquido-líquido.

Figura 21. Cromatograma referente à análise de amostra de *zebrafish* fortificada com 400 ng de KT e 200 ng de DZ (padrão interno) após extração líquido-líquido.

5.5. Validação Analítica do Método empregando GC-NPD

5.5.1. Limites de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ)

Os limites LOD e LOQ do método desenvolvido foram considerados satisfatórios e adequados de acordo com os objetivos do estudo. Entretanto, não há valores de referência na literatura para comparação. O limite de detecção do método empregando GC-NPD é de **1 ng** e o limite inferior de quantificação é de **5 ng**.

5.5.2. Linearidade

Para obtenção da curva analítica, uma série de soluções amostrais fortificadas com as concentrações de 5, 50, 200, 300, 400, 700 e 800 ng de solução padrão de KT foi preparada e processada. A curva de calibração linear obtida apresentou coeficiente de correlação igual a 0.9904 (**Figura 22**).

Figura 22. Curva de calibração para KT em amostras de zebrafish.

5.5.3. Recuperação

Os resultados dos ensaios para constatação da recuperação do método desenvolvido estão expostos na **Tabela 13**. Muito embora sejam melhores os valores de recuperação próximos a 100%, o método de extração desenvolvido e a complexidade da amostra de interesse tornam aceitável os valores de recuperação obtidos. O fator matriz foi avaliado apenas para os CQA e CQB.

Tabela 13. Resultados do ensaio de recuperação do método empregando GC-NPD

Concentração (ng.g ⁻¹)	Recuperação (%)	Fator Matriz
50	70,89	5,0111
200	33,94	-
800	33,65	0,4188

5.5.4. Precisão e Exatidão

Na **Tabela 14** estão apresentados os valores obtidos dos ensaios de precisão e exatidão realizados para os três níveis de concentração (alto, médio e baixo). Os valores são expressos em termos do coeficiente de variação (%CV) e todos estão dentro da faixa aceitável, com um pequeno desvio observado para o CQM.

Tabela 14. Resultados dos ensaios de precisão do método empregando GC-NPD

	Concentração (ng.g ⁻¹)	Precisão Intra-Ensaio (% CV)	Precisão Inter-Ensaio (% CV)	Exatidão (% bias)
CQB	50	14,5212	10,7574	- 4,6713
CQM	200	2,66967	1,92915	- 24,829
CQA	800	12,0871	13,8757	- 1,2581

5.5.5. Estabilidade

Após os ensaios de estabilidade, verificou-se que a KT manteve-se estável somente na condição de pós-processamento, 8h após a primeira corrida. O analito não se manteve estável nas condições de curta e longa duração, sugerindo que o método é recomendável apenas para a realização de análises de amostras recém-preparadas.

5.5.6. Efeito Residual (Efeito *Carry Over*)

Após a análise de uma amostra de *zebrafish* fortificada com a concentração mais elevada do intervalo da curva analítica, uma amostra isenta dos analitos investigados (“amostra branco”) foi injetada para verificação de possíveis efeitos residuais. De acordo com a **Figura 23**, pode-se atestar que não há efeito *carry over* significativo, de modo a interferir na análise.

Figura 23. Cromatograma resultante da análise de amostra isenta de KT injetada após amostra fortificada com 800 ng de KT.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A KT é uma substância psicoativa que induz efeitos comportamentais em *zebrafish*. O *zebrafish* é um organismo-modelo sensível à exposição à KT, exibindo respostas comportamentais mensuráveis.
- Em estados de ansiedade, a KT desempenhou ação ansiolítica, conforme verificado com o Teste de Claro-Escuro. A KT atua reduzindo a latência dos animais à 1ª entrada na área clara e elevando o tempo de exploração da área clara. Além disso, a KT induz hiperatividade conforme indicado pelo aumento no número de cruzamentos entre as áreas.
- Em estados de agressividade, comportamentalmente empregando-se o Teste do Espelho, a KT não induziu variações significativas entre os grupos controle e de tratamento. Nesse sentido, faz-se necessária uma caracterização a nível bioquímico e molecular.
- A ANOVA é o método mais aplicado na análise de resultados provenientes de testes comportamentais e permite um tratamento eficiente dos dados. Contudo, os métodos estatísticos multivariados permitem uma análise mais detalhada e aprofundada dos comportamentos exibidos pelos animais, identificando padrões comportamentais através da correlação entre os diferentes parâmetros comportamentais quantificados. Nesse sentido, a estatística multivariada é uma ferramenta interessante na análise de resultados comportamentais.
- O uso de um método empregando extração líquido-líquido, GC-MS e GC-NPD permite detectar a KT em *zebrafish* de maneira rápida, simples, sensível e precisa no animal, embora resultados melhores sejam esperados usando-se técnicas de extração mais robustas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABLAIN, J., ZON, L. I. Of fish and men: using *zebrafish* to fight human diseases. **Trends in Cell Biology**, v. 23, n. 12, p. 584 – 586, 2013.
- ADVISORY COUNCIL ON THE MISUSE OF DRUGS. **Ketamine: a review of use and harm**. ACMD Report, 2013.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE nº 27 de 17 de maio de 2012**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/legis>>. Acesso em: 23 Mar. 2015.
- BABAR E. et al. Effects of ketamine on different types of anxiety fear and related memory in rats with lesions of the median raphe nucleus. *Eur J Pharmacol* 2001; 431: 315–20.
- BALZARINI V. et al. Mirror, mirror on the wall: the predictive value of mirror tests for measuring aggression in fish. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 68, n. 5, p. 871-8, 2014.
- BECKER A. et al. Ketamine-induced changes in rat behaviour: A possible animal model of schizophrenia. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 27, p. 687 – 700, 2003.
- BIANCHIN J. N. et al. Otimização multivariada e aplicação do sorvente SiO₂-Nb₂O₅ para determinação em linha de Ni(II) em matriz aquosa. **Eclet Quim**, v. 33, n. 4, p. 25 – 32, 2008.
- BILOTTA, J. et al. Ethanol exposure alters *zebrafish* development: A novel model of fetal alcohol syndrome. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 26, p. 737–743, 2004.
- BORDIN, D. et al. A rapid assay for the simultaneous determination of nicotine, cocaine and metabolites in meconium using disposable pipette extraction and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Journal of Analytical Toxicology**, v. 38, n. 1, 2014.
- BOURIN M, HASCOËT M. The mouse light/dark box test. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 55– 65, 2003.
- BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 out. 2008, p. 1.
- BRERETON R. G. **Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**. West Sussex: Wiley; 2003.

- BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129 – 146, 2003.
- BRUNI, A. T., TALHAVINI, M. Quimiometria aplicada a Análises Forenses. In: BRUNI, A. T., VELHO, J. A., DE OLIVEIRA, M. F. (org.) **Fundamentos de Química Forense – Uma análise prática da química que soluciona crimes**. Millenium: Campinas, 2012.
- CACHAT, J. et al. Unique and potent effects of acute ibogaine on *zebrafish*: The developing utility of novel aquatic models for hallucinogenic drug research. **Behav Brain Res**, v. 236, p. 258– 269, 2013.
- CARVAN III, M. J. et al. Ethanol effects on the developing *zebrafish*: neurobehavior and skeletal morphogenesis. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 26, p. 757–768, 2004.
- CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n.4, 2009.
- CHRONISTER, C. W., WALRATH, J. C., GOLDBERGER, B. A. Rapid Detection of Benzoylcegonine in Vitreous Humor by Enzyme Immunoassay. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 25, p. 621 – 624, 2001.
- CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 13, n. 2, p. 167-170, 1980.
- DAMMSKI, A. P. et al. **Zebrafish: manual de criação em biotério**. UFPR, Curitiba, 2011. 106 p.
- DARLAND, T., DOWLING, J. E. Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized *zebrafish*. **PNAS: Neurobiology**, v. 98, n. 20, p. 11691–11696, 2001.
- DE BRITO, T. M. **Validação da preferência claro/escuro como modelo comportamental de ansiedade no *Carassius auratus* (peixe dourado)**. 45 p. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2011.
- DE FREITAS E. G., MARIGUELA T. C. Social isolation and aggressiveness in the Amazonian juvenile fish *Astronotus ocellatus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 1B, p. 233-38, 2006.
- DE MAESSCHALCK R et al. Decision criteria for soft independent modelling of class analogy applied to near infrared data. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems** v. 47, p. 65 – 77, 1999.
- EARLEY, R. L., HSU Y., WOLF L. L. The use of standard aggression testing methods to predict combat behaviour and contest outcome in *Rivulus marmoratus* dyads (Teleostei:

- Cyprinodontidae). **Ethology**, v. 106, p. 743 – 761, 2000.
- ENGIN, E.; TREIT, D.; DICKSON, C. T. Anxiolytic- and antidepressant-like properties of ketamine in behavioral and neurophysiological animal models. **Neuroscience**, v. 161, p. 359–369, 2009.
- FÉLIX L. M., ANTUNES L. M., COIMBRA A. M. Ketamine NDMA receptor-independent toxicity during *zebrafish* (*Danio rerio*) embryonic development. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 41, p. 27 – 34, 2014.
- FIGLER M. H., EINHORN D. M. The territorial prior residence effect in convict cichlids (*Cichlasoma nigrofasciatum* Giinther): Temporal aspects of establishment and retention, and proximate mechanisms. **Behaviour**, v. 85, p. 157-83, 1983.
- GEBAUER, D. L. P. **Avaliação de padrões comportamentais induzidos por ansiolíticos em zebrafish (*Danio Rerio*)**. 52 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- GERLAI, R. *Zebrafish*: An Uncharted Behavior Genetic Model. **Behavior Genetics**, v. 33, n. 5, 2003.
- GLASS, A. S.; DAHM, R. The zebrafish as a model organism for eye development. **Ophthalmic Research**, v. 36, n. 1, 2004.
- GOUVEIA JR., A., MAXIMINO, C. e BRITO, T. M. **Comportamento de peixes: Vantagens e utilidades nas neurociências**. Faculdade de Ciências/UNESP. Bauru: SP, 2006.
- GRAY, M. P. et al. The Aqueous Humor Outflow Pathway of Zebrafish. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 50, n. 4, p. 1515 – 1521, 2009.
- GROSSMAN, L. et al. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on *zebrafish*. **Beha. Brain Res.**, v. 24, n. 2, p. 277 – 284, 2010.
- HAIR, Jr., J. F. et al. Análise Multivariada de Dados. 5 ed. Bookman: Porto Alegre, 2005.
- HILL, A. et al. *Zebrafish* as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 6–19, 2005.
- JONES L. J., NORTON W. H. J. Using *zebrafish* to uncover the genetic and neural basis of aggression, a frequent comorbid symptom of psychiatric disorders. **Behavioural Brain Research**, v. 276, p. 171–180, 2015.
- KARCH, S. B. **Karch's Pathology of Drug Abuse**. 4th ed. New York: CRC Press, 2009. 709 p. Forensics and Criminal Justice. ISBN 978-0-8493-7880-5.
- KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos de Toxicologia de Casarett e Doull**.

- 2th ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 2012. 460 p.
- KRYSTAL J. H. et al. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. **Arch Gen Psychiatry**, v. 51, n. 3, 199-214, 1994.
- LEUNG, L. Y., BAILLIE, T. A. Comparative Pharmacology in the Rat of Ketamine and Its Two Principal Metabolites, Norketamine and (2)-6-Hydroxynorketamine. **J. Med. Chem.**, v. 29, p. 2396-2399, 1986.
- MANSUR, B.; DOS SANTOS, B.; GOUVEIA JUNIOR, A. Efeitos da substância de alarme no teste claro/escuro no *Zebrafish*, *Danio rerio*. **Biota Amazônia**, v. 4, n. 1, p. 87-93, 2014.
- MARKS C., WEST T. N., BAGATTO B et al. Developmental Environment Alters Conditional Aggression in *Zebrafish*. **Copeia**, v. 4, p. 901-908, 2005.
- MATHUR, P., BERBEROGLU, M., GUO, S. Preference for ethanol in *zebrafish* following a single exposure. **Behavioural Brain Research**, v. 217, n. 1, p. 128-133.
- MILLER J. N., MILLER J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 5th ed. London: Pearson Education; 2005.
- MONTANARI, C. (Org.). Química Medicinal – Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos. São Paulo: Edusp, 2011.
- MORETZ, J. A.; MARTINS, E. P.; ROBINSON, B. D. The effects of early and adult social environment on *zebrafish* (*Danio rerio*) behavior. **Environ Biol Fish**, v. 80, p. 91-101, 2007.
- NEGRUSZ, A. et al. Detection of Ketamine and Norketamine in Urine of Nonhuman Primates after a Single Dose of Ketamine using Microplate Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and NCI-GC-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 29, 2005.
- NEWMAN E. L. et al. NMDA receptor antagonism: escalation of aggressive behavior in alcohol-drinking mice. **Psychopharmacology**, v. 224, p. 167 – 77, 2012.
- OLIVEIRA R. F., CARNEIRO L. A., CANÁRIO A. V. M. Behavioural endocrinology: No hormonal response in tied fights. **Nature**, v. 437, n. 7056, p. 207-8, 2005.
- OLSON, H. et al. Concordance of the Toxicity of Pharmaceuticals in Humans and in Animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 56-67, 2000.
- PHAM, M. et al. Assessing Social Behavior Phenotypes in Adult *Zebrafish*: Shoaling, Social Preference, and Mirror Biting Tests. In: KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M. (Eds.). **Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research**, Neuromethods, v. 66. Springer

- Protocols. Humana Press, 2012. Cap. 17, p. 231 – 246.
- PEREIRA-FILHO E. R., POPPI R. J., ARRUDA M. A. Z. Emprego de planejamento fatorial para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, Mo e Pb por ETAAS. **Química Nova**, v. 25, n. 2, 2002.
- PETERSON L. E. CLUSFAVOR 5.0: hierarchical cluster and principal-component analysis of microarray-based transcriptional profiles. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, software0002.1–0002.8, 2002.
- PETERSON, R. T., MACRAE, C. A. Systematic approaches to toxicology in the *zebrafish*. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 52, p. 433–453, 2012.
- RADANT, A. D. et al. Does ketamine-mediated N-methyl-D-aspartate receptor antagonism cause schizophrenia-like oculomotor abnormalities? **Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 5, p. 434-44, 1998.
- RAIKOS, N. et al. Analysis of anaesthetics and analgesics in human urine by headspace SPME and GC. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 1018 – 1026, 2009.
- RANG, H. P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. Tradução da 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- RIBANI M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781 – 780, 2004
- RIEHL, R. et al. Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult *Zebrafish*. **Neurotoxicol Teratol**, v. 33, n. 6, 2011.
- RUBINSTEIN, A. L. *Zebrafish* assays for drug toxicity screening. **Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.**, v. 2, n. 2, p. 231 – 240, 2006.
- SABIN J. G., FERRÃO M. F., FURTADO J. C. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 387 – 96, 2004.
- SANT'ANNA, M. C. B. ***Zebrafish (Danio rerio)* como modelo para estudo da toxicidade induzida pelo ferro**. 58 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR FORENSIC TOXICOLOGY. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 37, p. 452–474, 2013.
- SCHMECHTIG, A. et al. The effects of ketamine and risperidone on eye movement control in

- healthy volunteers. **Translational Psychiatry**, v. 3, 2013.
- SERRA, E. L., MEDALHA, C. C., MATTIOLI, R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 12, p. 1551-1553, 1999.
- SHBAIR, M.K.S; ELJABOUR, S; LHERMITTE, M. Drugs involved in drug-facilitated crimes: Part I: Alcohol, sedative-hypnoticdrugs, gamma-hydroxybutyrate and ketamine. A review. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 68, p. 275—285, 2010.
- SMITH, K. M.; LARIVE, L. L.; ROMANELLI, F. Club drugs: methylenedioxymethamphetamine, flunitrazepam, ketamina hydrochloride and γ -hydroxybutyrate. **Am. J. Health-Syst. Pharm.**, v. 59, p. 1067 – 1076, 2002.
- STEWART, A. et al. *Zebrafish* models to study drug abuse-related phenotypes. **Rev. Neurosci.**, v. 22, n. 1, p. 95–105, 2011a.
- _____. et al. Behavioral effects of MDMA (“Ecstasy”) on adult *Zebrafish*. **Behav Pharmacol.**, v. 22, n. 3, p. 275–280, 2011b.
- _____. et al. Neurophenotyping of adult zebrafish using the Light/Dark box paradigm. In: KALUEFF, A. V.; CACHAT, J. M. (Eds.). ***Zebrafish Neurobehavioral Protocols***, Neuromethods, v. 51. Springer Protocols. Humana Press, 2011c. Cap. 13, p. 157 – 167.
- _____. et al. The Developing Utility of *Zebrafish* in Modeling Neurobehavioral Disorders. **International Journal of Comparative Psychology**, v. 23, p. 104-120, 2010.
- STREISINGER, G. et al. Production of clones of homozygous diploid *zebrafish* (*Brachydanio rerio*). **Nature**, v. 291, p. 293 – 296, 1981.
- TABACHNICK B. G., FIDELL L. S. **Using Multivariate Statistics**, 5th ed. Pearson; 2006.
- TAKAHASHI R. N., MORATO S. G., DE LIMA T. C. M. Effects of ketamine on experimental animal models of aggression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 17, n. 2, p. 171-8, 1984.
- TEIXEIRA, H. M. et al. Vitreous humour as a complementary sample to blood for the detection/ confirmation of diazepam: ante-mortem and post-mortem studies in an animal model. **Human & Experimental Toxicology**, v. 23, p. 571- 577, 2004.
- TINSLEY H. E. A., BROWN S. D. **Handbook of Applied Multivariate Statistics and Mathematical Modeling**, 1st Ed. Academic Press; 2000.
- TRWIT, D., MENARD, J. Animal Models of Anxiety and Depression. In: BOULTON, A. A., BAKER, G. B., BATESON, A. N. (eds). **In Vivo Neuromethods**. Humana Press: New Jersey, 1998.
- UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). World Drug Report

2013. Viena, 2013.
- VASCONCELOS, S. et al. Cetamina: aspectos gerais e relação com a esquizofrenia. **Rev. Psiq. Clín.**, v. 32, n. 1, p.10-16, 2005.
- WAY G. P. et al. A Comparison of Methodologies to Test Aggression in *Zebrafish*. ***Zebrafish***, v.12, n. 2, p. 144 – 151, 2015.
- WEILER, M. A. et al. Ketamine effects on eye movements. **Neuropsychopharmacology**, v. 23, p. 645-53, 2000.
- WOLD S., ESBENSEN K., GELADI P. Principal Component Analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, p. 37 – 52, 1987.
- ZAKHARY, S. M. et al. A Behavioral and Molecular Analysis of Ketamine in *Zebrafish*. **Synapse**, v. 65, n. 2, p. 160–167, 2011.
- ZON, L. I.; PETERSON, R. T. In vivo drug discovery in the *Zebrafish*. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 4, p. 35 – 44, 2005.

ANEXOS

ANEXO 1. Artigos publicados derivados da dissertação.

Behavioural Brain Research 292 (2015) 537–546

Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

Ketamine induces anxiolytic effects in adult zebrafish: A multivariate statistics approach

Eduardo Geraldo De Campos^a, Aline Thais Bruni, Bruno Spinosa De Martinis

^a Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

HIGHLIGHTS

- Ketamine is an anesthetic agent with anxiolytic properties.
- Zebrafish is a promising animal model for pharmacological research.
- Anxiolytic effects of ketamine were investigated in zebrafish.
- Ketamine reduces anxiety-like behaviors, inducing a behavioral standardization.
- Multivariate statistics is a suitable method in behavioral data validation.

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 May 2015
Received in revised form 1 July 2015
Accepted 4 July 2015
Available online 15 July 2015

Keywords:
Zebrafish
Ketamine
Anxiety
Behavior analysis
Univariate statistics
Multivariate statistics

ABSTRACT

Ketamine inappropriate use has been associated with serious consequences for human health. Anesthetic properties of ketamine are well-known, but its side effects are poorly described, including the effects on anxiety. In this context, animal models are a safe way to conduct this neurobehavioral research and zebrafish (*Danio rerio*) is an interesting model which has several advantages. The validation and interpretation of results of behavioral assays requires a suitable statistical approach, and the use of multivariate statistical methods has been little explored, especially in zebrafish behavioral models. Here, we investigated the anxiolytic-induced effects of ketamine in adult zebrafish, using Light–Dark Test and proposing the Multivariate Statistics methods (PCA, HCA and SIMCA) to analyze the results. In addition, we compared the processing of data to the one carried out by analysis of variance (ANOVA) ketamine produced significant concentration of exposure-dependent anxiolytic effects, increasing time in white area and number of crossings and decreasing latency to first access to white area. Average entry duration behavior resulted in a slight decrease from control to treatment groups, with an observed concentration-dependent increase among the exposed groups. PCA results indicated that two principal components represent 88.74% of all the system information. HCA and PCA results showed a higher similarity among control and treatment groups exposed to lower concentrations of ketamine and among treatment groups exposed to concentrations of 40 and 60 mg L⁻¹. In SIMCA results, interclasses distances were concentration of exposure-dependent increased and misclassifications and interclasses residues results also support these findings. These findings confirm the anxiolytic potential of ketamine and zebrafish sensibility to this drug. In summary, our study confirms that zebrafish and multivariate statistics data validation are an appropriate and viable behavioral model for the study of psychoactive substances, providing a detailed and reliable analysis.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Introduced as an anesthetic agent in 1965, ketamine (KT) is a noncompetitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist which affects glutamatergic activity blocking the ion influx on the channel controlled by NMDA [1–4]. KT also binds to α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors, GABA_A receptors, opioid receptors, cholinergic receptors, substance P receptors, dopamine D-2 receptors, 5-HT₂

Neuroscience Communications 2015; 1: e1025. doi: 10.14800/nc.1025. © 2015 by Eduardo Geraldo De Campos, et al.
<http://www.smarttech.com/index.php/nc>

BRIEF REPORT

Investigation of ketamine pharmacological modulation of aggressive behavior in adult zebrafish

Eduardo Geraldo de Campos, Bruno Spinosa De Martinis

Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil

Correspondence: Eduardo Geraldo de Campos
E-mail: egeraldocomp@usp.br
Received: September 24, 2015
Published online: October 24, 2015

Ketamine is an anesthetic agent which in recent years has gained prominence due to its antidepressant properties. However, the adverse effects resulting from the acute administration of this drug have been reported and are a challenge for use of ketamine as an antidepressant. The aim of this study was the characterization of the acute effects of ketamine in states of aggressiveness in adult zebrafish (*Danio rerio*). Our results showed that ketamine didn't induce aggressive-like behaviors, at sub-anesthetic doses. However, these findings suggest that biochemical and neurochemical studies must be conducted to investigate the effects of ketamine on aggressiveness at molecular level in adult zebrafish.

Keywords: ketamine; zebrafish; aggressiveness

To cite this article: Eduardo Geraldo de Campos, et al. Investigation of ketamine pharmacological modulation of aggressive behavior in adult zebrafish. *Neurosci Commun* 2015; 1: e1025. doi: 10.14800/nc.1025.

Introduction

Ketamine is a glutamate N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist used as an anesthetic agent [1]. However, in recent years, studies have reported the antidepressant potential of ketamine, which produces fast and robust effect on depressive patients resistant to conventional treatment [2].

Pharmacological parameters of ketamine for use as an antidepressant agent at optimal dose, route of administration and effects of chronic treatment are not yet fully characterized [3]. In general, some NMDA receptor antagonists can cause severe deficiencies and behavioral disorders [4]. In some reported cases, higher doses of ketamine administered for a prolonged period were responsible for inducing various side effects [5].

Aggressiveness is a common behavioral disorder observed after administration of many psychoactive substances. This behavior may be a side effect of administration of ketamine

since it consists of a behavior which is highly regulated by glutamatergic neurotransmission [6–8]. The effects of ketamine on aggressive states are not well characterized and there are studies evaluating this behavior in rats [7,9], mice [4] and humans [6]. In this sense, the zebrafish (*Danio rerio*) is an alternative animal model which has several advantages that enables the characterization of behavioral effects psychoactive substances. The aim of this study is to evaluate the effects of acute exposition to ketamine on aggressiveness in adult zebrafish using the Mirror Biting Test.

Material and Methods

Animals and housing

A total of 149 adult wild type short-fin zebrafish (6 to 8 months / 3.6–4.0 cm long/ all genders) were obtained from a local commercial distributor and housed in groups of 30 fish in a 30 L tank. The system water quality was subjected to mechanical, biological and chemical filtration (using

^a Corresponding author at: Laboratório de Análises Toxicológicas Forenses, Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil.
E-mail address: egeraldocomp@usp.br (E.G. De Campos).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neur.2015.07.017>
0166-4328/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.