

Dissertação de Mestrado

Achados histopatológicos e comportamentais em modelo experimental
de esquizofrenia induzida por - MAM - acetato de metilazoximetanol

Ana Carolina Silva e Valls

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria

Achados histopatológicos e comportamentais em modelo experimental
de esquizofrenia induzida por - MAM - acetato de metilazoximetanol

Ana Carolina Silva e Valls

Orientador: Paulo Belmonte de Abreu

Porto Alegre, Brasil

Março de 2010

Achados histopatológicos e comportamentais em modelo experimental
de esquizofrenia induzida por - MAM - acetato de metilazoximetanol

Ana Carolina Silva e Valls

Orientador: Prof. Dr. Paulo Belmonte de Abreu

Dissertação submetida ao Corpo Docente do curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Médicas: Psiquiatria.

Aprovada em 26 de março de 2010.

Banca Examinadora:

Prof. Flávio Pereira Kapczinski

Prof. Tadeu Mello e Souza

Prof. José Roberto Goldim

Prof. Julio Cesar Walz

Porto Alegre
Março, 2010

V195a Valls, Ana Carolina Silva e

Achados histopatológicos e comportamentais em modelo experimental de esquizofrenia induzida por – MAM – acetato de metilazoximetanol / Ana Carolina Silva e Valls ; orient. Paulo Belmonte-de-Abreu. – 2010.

xiv, 48 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria, Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Esquizofrenia 2. Modelos animais 3. Acetato de metilazoximetanol 4. Hipocampo 5. Córtex pré-frontal 6. Patologia I I. Abreu, Paulo Silva Belmonte de II. Título.

NLM: WM 203

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Ao meu filho tão querido Marcelo (6 anos),
dedico essa conquista, com imenso amor.

Agradecimentos

Ao Professor Abreu, meu Orientador, pelas oportunidades que me proporcionou, aceitando-me como aluna, com bolsa Reuni (que me deu experiência didática na graduação), e incentivando-me nas viagens de pesquisa, e também pela alegria nas festinhas da equipe.

À Professora Betty, uma verdadeira Co-orientadora: obrigada por me receber no laboratório, por me abrir as portas para pesquisa no HCPA.

Aos co-autores do artigo, que foram fundamentais em cada parte do projeto, desde o aceite, nos fins-de-semana dedicados aos animais, nas contagens de neurônios, na parte estatística, na escrita e revisão do texto.

Às colegas de Pós e amigas, Cenita Pereira Borges, Flávia Moreira Lima e Lísia Rejane Guimarães: obrigada por tornarem esses dois anos ainda mais prazerosos, pelas conversas e cafezinhos nos intervalos e por compartilharem dificuldades e soluções.

Aos colegas e amigos de laboratório, Marta, Faby, Paulinha, Aninha e Ivan: obrigada pelo exemplo, ajuda em resumos e pôsters, ensinamentos de técnicas e software e parceria nos congressos.

À UFRGS: obrigada pelo ensino gratuito e de qualidade.

Aos “meus bichinhos de laboratório”: pela contribuição ao avanço da pesquisa.

Às amigas do Piratini, do Anchieta, da Pucrs, e aos amigos do Balnê: obrigada pelas horas de descontração e pelos anos de amizade.

Aos meus pais: obrigada por todo o apoio, tanto de incentivo profissional como financeiro, e também por cuidar do Marcelinho nas muitas horas em que precisei (desde antes do “Projeto MAMAR”). Aos meus irmãos, por me mostrarem a importância de estudar na UFRGS. Às minhas avós de 89 e 91 anos, pelo exemplo e pela companhia nesses dois anos. À minha Dinda: obrigada por tantas ajudas, inclusive suporte técnico.

Ao meu amor, Heriki: obrigada pela companhia, compreensão e pelo carinho.

Meus filhos devem fazer exatamente o mesmo que eu,
ou seja, fazer o que gostam!
Alvaro Luiz Montenegro Valls

Resumo

Esquizofrenia (SZ) é uma doença multifacetada que afeta vários domínios, incluindo sintomas positivos e negativos. Devido a isso, até o momento, não existe um modelo animal adequado de SZ, o que contribui para o fato de sua fisiopatologia ainda ser pouco conhecida. Um dos melhores modelos animais de SZ desenvolvidos usa acetato metilazoximetanol (MAM), no 17º dia embrionário (MAM-E17) de ratas prenhes, o que leva a alguns dos padrões de histopatologia observados em SZ. O objetivo deste estudo é avaliar o uso do MAM-E17 para validar achados histológicos deste modelo animal de SZ. Um total de 4 controles e 13 MAM-E17 foram estudados. Os ratos submetidos ao tratamento MAM-E17 apresentaram uma diminuição no peso do cérebro e na área do hipocampo caudal esquerdo. Não houve diferença na área do hipocampo caudal direito nem no hipocampo dorsal. Os animais submetidos ao MAM-E17 mostraram uma diminuição na espessura do córtex pré-frontal direito. O modelo de roedor MAM-E17 demonstrou reproduzir os principais aspectos dos achados histológicos altamente relevantes na SZ. Assim, a administração do MAM-E17 pode ser um modelo animal apropriado para o estudo de aspectos histológicos de SZ. Isto é de suma importância para o melhor entendimento e tratamento desta devastadora doença no futuro.

Palavras-chave: modelo animal, esquizofrenia, acetato de metilazoximetanol, alterações histopatológicas, espessura cortical, área do hipocampo.

Abstract

Schizophrenia (SZ) is a multifaceted illness that affects multiple domains, including negative and positive symptoms. Because of this, there is no appropriate animal model of SZ, which contributes to its still is poorly understood pathophysiology. One of the best-developed animal models of SZ uses methylazoxymethanol acetate (MAM) in pregnant rat dams on embryonic day 17 (MAM-E17) to procedure patterns of histopathology similar to those observed in SZ. The aim of this study was to evaluate the use of MAM-E17 to validate the histological findings of this animal model of SZ. A total of 4 controls and 13 MAM-E17 were studied. Rats subjected to MAM-E17 treatment presented a decreased in brain weight and in the left caudal hippocampus area. There were no differences in the right caudal hippocampal area or in left and right dorsal hippocampal areas. The animals subjected to MAM-E17 showed a decrease in right prefrontal cortex thickness. The MAM-E17 rodent model reproduced key aspects of histological findings that are highly relevant in SZ. Thus, the admistration of MAM-E17 may be an appropriate animal model for the study of histological aspects of SZ. This is of paramount importance to the better understanding and treatment of this devastating disease in the future.

Key Words: animal model, schizophrenia, methylazoxymethanol acetate, hystopathological alterations, cortical thickness, hippocampus area.

Lista de Figuras

Figura 1 Cortes coronais em hipocampo dorso-rostral e tálamo médio-dorsal _____	10
Figura 2 Densidade neuronal em CPF e outras regiões corticais em ratos controle e ratos MAM-E17 _____	11
Figura 3 Esquema representando a regulação do sistema de dopamina na esquizofrenia _____	14
Figura 4 Gráfico com os resultados do teste do Monitor de Atividades-IR____	46

Lista de Tabelas

Tabela 1 Custo-benefício do tratamento para esquizofrenia em diferentes regiões _____	3
Tabela 2 Modelos animais em esquizofrenia _____	9
Tabela 3 Comparação de déficits relatados em ratos MAM-E17 e pacientes humanos com esquizofrenia _____	13

Lista de Abreviaturas e Siglas

CAPES	- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CH	- Hipocampo Caudal
CNS	- Conselho Nacional de Saúde
DH	- Hipocampo Dorsal
HCPA	- Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HIPP	- Hipocampo
IBTA	- <i>Ibotenic Acid</i>
IC	- Intervalo de Confiança
IP	- Intraperitoneal
IR	- <i>Infra Red</i>
IUGR	- <i>Intrauterine Growth Restriction</i>
MAM	- Acetato de Metilazoximetanol
MWR	- <i>Male Wistar Rat</i>
NA	- Núcleo Accumbens
OCC	- Córtex Occipital
PAR	- Córtex Parietal
PFC	- Córtex Pré-Frontal
PRH	- Córtex Perirrinal
RS	- Rio Grande do Sul
SDR	- <i>Sprague-Dawley Rat</i>
SPSS	- <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SZ	- Esquizofrenia
UFRGS	- Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VH	- Hipocampo Ventral
VS	- <i>Ventral subiculum</i>

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Justificativa e Objetivos	15
1.1.1	Justificativa do Estudo	15
1.1.2	Objetivo Geral	16
1.1.3	Objetivos Específicos	16
1.2	Considerações éticas	17
1.3	Referências	18
2	Artigo	24
3	Considerações Finais	43

1 Introdução

O termo *esquizofrenia* foi utilizado inicialmente pelo psiquiatra suíço, Eugen Bleuler em 1911, aplicando-o para pacientes que apresentavam uma desconexão entre os processos de pensamentos e respostas emotivas, substituindo o termo de “Demência Precoce” definido por Kraepelin, para um quadro com psicose associada à perda de capacidades previamente adquiridas, ocorrendo em adultos jovens (precocemente). O termo de Bleuler chamava mais atenção às alterações na capacidade de pensar e julgar a realidade, mas se prestou a concepções equivocadas de que ocorreria uma cisão de personalidade, ou dissociação em personalidades separadas, o que não é correto. Desta forma, ser portador de esquizofrenia não significa possuir “dupla personalidade”, e sim sofrer e apresentar extremo prejuízo na expressão das emoções, na avaliação do contexto externo e na integração entre experiência interna e externa.

O termo “esquizofrenia” se adequa para descrever um quadro de sintomas típicos, incluindo alucinações, transtornos de pensamento e prejuízo marcado de respostas emotivas, que podem ser vistos como decorrentes da interação entre fatores genéticos e experiências ambientais desfavoráveis. Entretanto, não possui sinais ou sintomas patognomônicos, devendo ser excluídos transtornos decorrentes de uso de drogas e álcool, transtornos metabólicos, tumorais e infecciosos específicos, e transtornos de humor uni e bipolar, com base na observação clínica e curso dos sintomas.

O efeito dessa doença é devastador do aspecto humano no que concerne ao pensamento, emoção e expressão. Não existe, no momento, vislumbre de cura; porém, com tratamento adequado, os sintomas e as reincidências de surtos podem ser reduzidos de forma significativa em mais de 50%. As drogas tradicionais, existentes há 50 anos, apresentam tamanho de efeito perto de 0,5, em relação a placebo, e a droga mais potente apresenta um tamanho de efeito em relação a estas de 0,4; porém, apresenta taxas de 1% de leucotoxicidade. Novas drogas, produzidas a partir dos anos 90, apresentam menor toxicidade e tamanho de efeito intermediário, com vantagem modesta (ES ao redor de 0,25 em relação às tradicionais). Adicionalmente, estudos prospectivos demonstraram que o tratamento precoce e continuado da esquizofrenia, desde o início da expressão dos primeiros sintomas, pode aumentar os índices de remissão de 50% para 80 a 85 %.

O início da esquizofrenia pode ser repentino ou gradual, sendo que no primeiro o prognóstico é levemente mais favorável, regredindo em 1/3 dos pacientes. Nos outros pacientes, a doença segue seu curso numa flutuação entre altos surtos psicóticos, seguidos de remissão (1/3) e persistência de sintomas com marcada deterioração (1/3).

As taxas de doença são semelhantes nos homens e nas mulheres, sendo que nas mulheres as chances de um resultado positivo de tratamento são maiores, atribuindo-se isto aos efeitos de estrogênio no cérebro.

Freqüentemente, diferentes aspectos da cognição (memória de execução, planejamento, raciocínio lógico) são prejudicados depois de 5 a 10 anos de evolução, após o que a doença tende a se estabilizar com tendência a déficit

estável (Keefe *et al.*, 2006). Os estudos indicam que, após a idade de 20 ou 30 anos, 50% dos pacientes esquizofrênicos são capazes de seus próprios cuidados pessoais, trabalhar em ambiente protegido e participar de atividades sociais restritas, quando mantêm uso continuado de medicação em doses adequadas e recebem cuidados de programas e serviços de apoio psicossocial, contribuindo para a melhora dos resultados (tamanho médio de efeito de intervenções psicossociais somadas a drogas de 0,4), com decorrente ganho em custo-efetividade na combinação de medicação e intervenção psicossocial (Chisholm, 2005) (Tabela 1).

Tabela 1 Custo-benefício do tratamento para esquizofrenia em diferentes regiões (Chisholm, 2005).

<i>Total population (million)</i>		Sub-Saharan Africa 640	Latin America & Caribbean 502	World Bank Region		
				Middle East & North Africa 482	Europe & Central Asia 462	
	<i>Coverage</i>					
	Schizophrenia¹					
	Older (neuroleptic) antipsychotic drug	80%	5,202	13,369	6,882	12,260
	Newer antipsychotic drug	80%	18,497	26,199	19,594	25,693
	Older antipsychotic drug + psychosocial treatment	80%	3,314	8,993	4,511	10,089
	Newer antipsychotic drug + psychosocial treatment	80%	11,669	17,352	12,562	20,627

Os portadores de esquizofrenia sofrem na ausência de cuidados especiais. Têm dificuldades para executar trabalhos e seus relacionamentos são prejudicados e difíceis, mesmo com a melhora dos sintomas. Apesar do comportamento do esquizofrênico demonstrar ser assustador, as pessoas com esquizofrenia não são mais violentas do que as pessoas normais; pelo contrário, são mais capazes de abster-se das violências e mais vulneráveis para desfechos

adversos, como assalto, agressão e violência sexual. Calcula-se, porém, que cerca de 15% dos portadores dos sintomas de esquizofrenia podem cometer suicídio; o risco pode aumentar em pacientes mais jovens e desiludidos.

Em pacientes com histórias de outras doenças pode ser difícil o diagnóstico para os sintomas da esquizofrenia, sendo esses sintomas mascarados pelos outros, não recebendo, portanto, a atenção médica e a devida medicação.

Alguns estudos demonstram que um grande número de pessoas com esquizofrenia possui histórias de abuso de álcool, que reduzem os efeitos das drogas antipsicóticas e aumentam os efeitos adversos. Adicionalmente, esquizofrênicos apresentam altas taxas de tabagismo. Diferentes alternativas foram propostas para esse evento, desde hipóteses psicológicas (aliviar solidão), bioquímicas e genéticas ligadas a controle de sintomas delirantes ou melhora de efeitos adversos tipo “Parkinson” de neurolépticos.

Antigamente, a esquizofrenia era tratada em longo prazo com internação em hospícios. Após o início da utilização de drogas antipsicóticas nos meados dos anos 1950 e 1960 e a pressão política econômica de redução de custos, houve a esperança de que essas drogas seriam mais eficientes. Em 1970, milhares de pacientes foram libertos dessas instituições, para a comunidade. A maioria das famílias foi orientada para receber seus doentes e a frequência de esquizofrênicos morando com suas famílias aumentou. Apesar da tentativa de reduzir os gastos com estes pacientes mentais nos hospitais, 40% dos pacientes ainda requerem tratamento com hospitalização em longo prazo e mais da metade dos pacientes necessitam de auxílio público pelo menos durante um ano antes de reingressarem na comunidade.

Os sintomas de esquizofrenia surgem de vários processos físicos e respondem diferentemente aos tratamentos. Alguns especialistas classificam-nos em dois grupos: sintomas negativos e sintomas positivos.

Os chamados “sintomas negativos” (representando perda de comportamentos e capacidades geralmente presentes nos indivíduos normais, de sociabilidade e cognição) são provavelmente devidos à perda de capacidade funcional neuronal, compactação de células nervosas e redução de neurófilos resultando numa capacidade diminuída de funcionamento. Já os “sintomas positivos” (alucinações e delírios) representam disfunção de circuitos estriato-límbico frontais, hiperatividade e hipermetabolismo límbico.

Um paciente pode ter mais de um sintoma, mas raramente ele possui todos os sintomas. Adicionalmente, esses sintomas se sobrepõem, interagem um com o outro e podem corromper a categoria (Positivo-Negativo).

Os sintomas negativos freqüentemente ocorrem cedo no processo da doença e vêm a ser menosprezados devido à proeminência dos sintomas positivos, sendo com freqüência insuficientes para motivar um tratamento. Além disso, podem coexistir com os sintomas positivos e tipicamente persistem após serem tratados os sintomas positivos.

Os sintomas negativos tendem a ser mais comuns em pacientes mais velhos do que nos mais jovens, e se acompanham de diminuição da auto-estima, falta de emoções, baixa regulação nas entonações de voz e perda geral do interesse pela vida. Os pacientes com sintomas negativos podem também exibir reações emotivamente impróprias, condição inadequada dos afetos (rir fora de contexto, frente a um triste acontecimento). Esses sintomas aparecem cedo na

vida dos pacientes, sendo observados em alguns dos pacientes que desenvolveram posteriormente a esquizofrenia, a falta de responsabilidade e pobreza social na sua infância. Em outros, porém, os sintomas negativos só aparecem depois do desenvolvimento dos sintomas positivos.

Sintomas psicóticos, particularmente delírios e alucinações - são os mais amplos sinais reconhecidos de esquizofrenia. As alucinações podem tomar a forma de ver e ouvir coisas que não existem. As alucinações de audição, que são os falsos sentidos de sons, tal como ouvir vozes sem a presença de pessoas, são os sintomas mais comuns. Os delírios são crenças fixamente falsas, que podem ser de eventos bizarros (estrangeiros invisíveis entrando num lugar através da fiação elétrica) ou de prejuízo (ciúme infundado, ou crença paranóica de perseguição ou de ser observado). Os sintomas psicóticos ocorrem normalmente em homens entre as idades dos 17 aos 30 anos e em mulheres entre 20 e 40 anos. A maioria dos pacientes, entretanto, exibe alguma evidência de esquizofrenia antes do primeiro episódio psicótico. Depois deste acontecimento inicial, a ocorrência destes sintomas psicóticos ocorre esporadicamente e é intercalado por períodos de remissão.

Os sintomas de prejuízos cognitivos incluem a falta de atenção, desorganização do pensamento, prejuízo no processamento de informações e associação aberrante entre palavras e frases (chamada de "movimento do cavalo de xadrez"). Por vezes a descontinuidade entre as idéias pode ser tão extrema que o discurso do paciente pode tornar-se incoerente, tal qual uma "salada de palavras". A capacidade abstrata de pensamento também pode ser prejudicada. Estudos mostraram que apesar desse vocabulário, capacidades especiais, tais

como leituras de mapas, não foram prejudicadas. Danos cognitivos podem ocorrer ao longo do desenvolvimento de outros sintomas como, por exemplo, as alucinações que podem aparecer esporadicamente.

O grande prejuízo da esquizofrenia, para pacientes, famílias e sociedade, aliado à modesta resolutividade dos tratamentos farmacológicos e psicossociais existentes, somado à evidência de base cerebral para esta doença (modelo vulnerabilidade-estresse, com múltiplos polimorfismos de genes contribuindo para maior vulnerabilidade a experiências ambientais adversas de gestação - parto e ambiente precoce) motiva a execução de estudos sobre tratamentos inovadores.

Para qualquer tratamento inovador, existe a necessidade ética e metodológica de se iniciar em modelos animais. No caso da esquizofrenia, existem diversos modelos animais (Boksa, 2004; Van Den Buuse *et al.*, 2005) de indução de lesão na gestação e estudo da prole quando adulta; indução de lesão precoce em recém-natos, e em animais adultos (ver tabela 2). A maioria visa à produção de lesão em Hipocampo Ventral, utilizando antimitóticos (Talamini *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 2006); citocinas (Tohmi *et al.*, 2004; Ashdown *et al.*, 2006); privação protéica (Palmer *et al.*, 2004); drogas (Davis, 2005; Tenn *et al.*, 2005); citotóxicos (Lipska, 2004) ou estresse ambiental perinatal (El-Khodor *et al.*, 2004; Lavin *et al.*, 2005; Lipska e Weinberger, 2000; Mitchell *et al.*, 2005); privação materna (Roceri *et al.*, 2004); frio-nado-ruído (Lipska, 2004), sendo em geral a validação do método realizada pela observação de lesão em animal adulto e/ou observação de comportamento sob diferentes paradigmas como através da neurofisiologia, comportamento em campo aberto, etc. (Lipska, 2004). Alguns modelos são úteis para intervenções neuroquímicas (novas drogas para regulação

de neurotransmissão), como o de privação-estresse perinatal ou de lesão perinatal (El-Khodor *et al.*, 2004; Mitchell, 2004). Outros se prestam para intervenções que busquem a modificação de celularidade, como os de lesão pré-natal com substâncias químicas antimitóticas ou tóxicas (Talamini *et al.*, 1998; Flagstad *et al.*, 2004; Fiore *et al.*, 2004; Gourevitch *et al.*, 2004; Jongen-Relo *et al.*, 2004; Leng *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2006).

Tabela 2 Modelos animais em esquizofrenia: revisão Pubmed abril 2006.

Autor/ Ano	Área	Método	Animal
(Flores <i>et al.</i> , 1996)	VH	NVH PD7, IBTA	
(Lipska & Weinberger, 2000)	VH	NVH: PD7, IBTA	
(Lipska, 2004)	VH+VS	NVHL PD7: IBTA	SDR
(Alquicer <i>et al.</i> , 2004)	VH	NVH	SDR
(Chambers & Taylor, 2004)	VH	NVHL PD7 3.0 IBTA	SDR
(Mitchell & Goldman, 2004)	VH	NVHL PD7 3.0 IBTA	SDR
(Keilhoff <i>et al.</i> , 2004)	H	Ketamina	SDR 8W
(Becker & Grecksch, 2004)		KA 30 mg/kg/5 dias IP	M SDR
(Howland <i>et al.</i> , 2004)		KA 1,5 mg/Kg PD7	
(Csernansky <i>et al.</i> , 2006)	A+I+PH	KA 6,35 nM PD7	SDR
(Sams-Dodd, 2004)		MK 801 + PCP SC 5 ml/kg	MWR PD3-4M
(Rujescu <i>et al.</i> , 2006)	H	CLD MK801 (0,02 mg/kg/14 days)	LER 32-40 PD
(Boksa, 2004)		Hipóxia Perinatal Pré-Eclampsia, IUGR, rNOSi	
(Lecourtier <i>et al.</i> , 2004)	Habenula	1 mA DC 15 s	MSDR 250g
(Koenig <i>et al.</i> , 2005)		Restrição/Nado /Frio/Luz	F SDR 14-21 DG
(Tohmi <i>et al.</i> , 2004)	Córtex, H	CK (IFNy, IL1a, IL2, IL6) PD2-10	SDR
(Reynolds <i>et al.</i> , 2005) L	CF/T/H/E	PCP- Phenciclidina crônica	LER 12W
(Palmer <i>et al.</i> , 2004)	H-Str	Privação Protéica Pré-natal 5W al	WKR Ex. PD100
(Roceri <i>et al.</i> , 2004)	H-D-V Striatum	Privação Materna 3h/d PD2-14	SDR
(Moore <i>et al.</i> , 2006)	CPPF, CO, CPR	MAM-E17	Fischer dams E17
(Talamini <i>et al.</i> , 1999)			Wistar dams E12

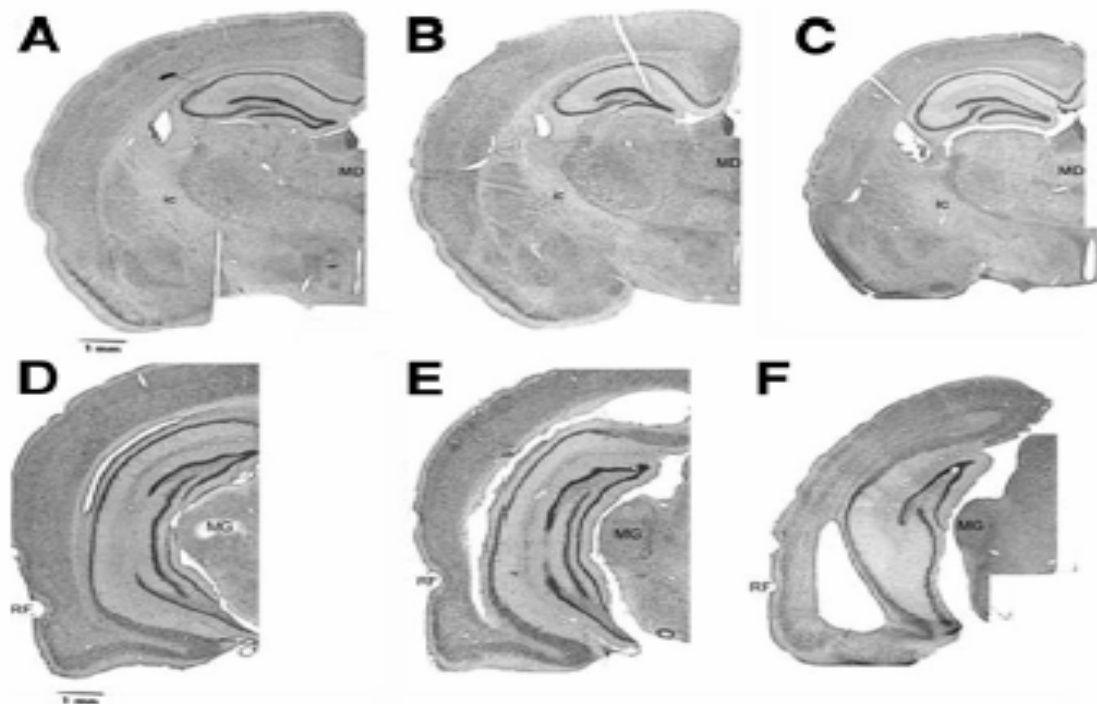


Figura 1 Cortes coronais em hipocampo dorso-rostral e tálamo médio-dorsal (A-C) e hipocampo caudal e núcleo geniculado medial (D-F) em ratos controles (A,D) e ratos com lesão por acetato de metilazoximetanol no 17º dia de gestação (MAM-E17) (B,E) e 15º dia (MAM-E15) (C,F) (Moore *et al.*, 2006).

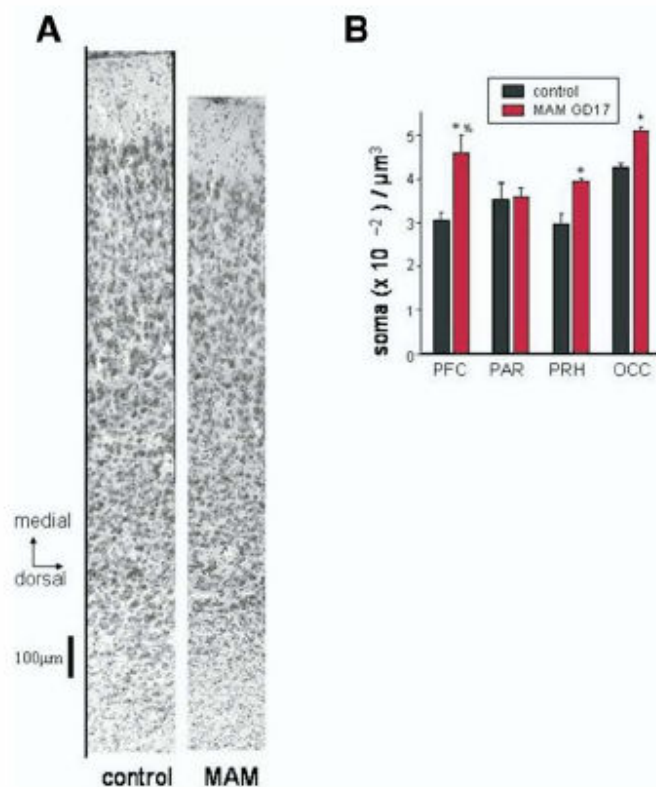


Figura 2 Densidade neuronal em córtex pré-frontal (CPF) e outras regiões corticais em ratos controle e ratos tratados com acetato de metilazoximetanol no 17º dia de gestação (MAM-E17). A: Secção de córtex pré-límbico de rato controle e rato MAM-E17, a 90º de corpo caloso na parte inferior e superfície apical no topo. B: densidade neuronal aumentada em PFC (PFC=AC+PL+IL), Córtex perirrinal (PRH) e córtex occipital (OC), mas não em Córtex fronto-parietal (PAR) em ratos MAM-E17 ($p < 0,05$) e aumento de densidade nestas áreas comparado com PAR ($p < 0,05$) (Moore *et al.*, 2006).

Considerando as alterações histológicas produzidas através da administração de acetato de metilazoximetanol (MAM) evidenciadas nas figuras 1 e 2, propusemos, através do presente projeto, validar um modelo animal para o estudo da esquizofrenia, sendo que a indução da lesão gestacional foi produzida

através da administração da injeção intra-peritoneal de MAM no 17º dia de gestação de ratos Wistar fêmeas.

Em roedores, consideram-se alterações histológicas significativas nos principais sistemas neuronais, que quando comparadas com o contexto do cérebro humano parecem plausíveis e requerem novas investigações sobre essa psicopatologia complexa que é a esquizofrenia. A capacidade de analisar as interações funcionais entre esses sistemas e o modo como a ruptura dentro desses circuitos afeta o processamento de informações é fundamental para se obter uma melhor compreensão da doença e na pesquisa de terapias farmacológicas mais eficientes.

Diversas alterações como a redução de volume do hipocampo, aumento seletivo na densidade neuronal no CPF medial, aumento na atividade de neurônios dopaminérgicos, aumento na média de liberação de neurônios do hipocampo ventral, interação social diminuída, entre outras, têm sido evidenciadas em roedores tratados com MAM. Diversos estudos apontam alterações semelhantes a essas em pacientes com esquizofrenia, como comparado na tabela 3. Os resultados desses estudos são complexos e requerem mais pesquisas nessa área.

Tabela 3 Comparação de déficits relatado em ratos administrados com MAM-E17 e pacientes humanos com esquizofrenia (Lodge & Grace, 2009).

Human schizopfhrenia	References	MAM rodent model	References
Decrease in medial temporal lobe volume	[34,76,78,31]	Reduced hippocampal volume	[11,26,35,101]
Increased neuronal density in prefrontal areas 9 and 46	[34]	Selective increase in neuronal density in mPFC	[11]
Hippocampal neuronal disarray	[36]	Heterotopias and sporadic neuronal packing in hippocampus	[11,26,35]
Sensorimotor gating deficits	[37,102–104]	Deficit in prepulse inhibition of startle	[11,26]
Perseveration	[57,61].	Impaired reversal learning	[11,44]
Impaired attentional processing	[38,41,42].	Deficits in latent inhibition	[44,45]
Hypersensitivity to drugs that exacerbate positive symptoms	[40,47]	Enhanced locomotor response to phencyclidine and amphetamine	[11,35,53,98]
Dopamine hyperfunction	[40,47]	Increased dopamine neuron population activity	[53]
Decreased PV expression in dIPFC and hippocampus	[84]	Decreased PV interneuron number in mPFC and vHipp	[45,98]
Hypofunctionality of dIPFC and hippocampus by functional imaging studies	[57]	Inability to activate mPFC and vHipp assemblies during a latent inhibition paradigm	[45]
Hippocampal hyperperfusion at rest	[79,81]	Increased average firing rate of vHipp neurons	[53]
Increased sensitivity to stress	[105]	Stress-induced disruption in mPFC neuronal plasticity	[106]
Working memory deficits	[41,54–56]	Impaired performance on radial and Y- maze tasks	[11,26,44]
Social withdrawal	[107–109]	Decreased social interaction	[26,35]
Symptoms appear after puberty	[16–20]	Most behavioral deficits emerge post puberty	[11,26]

Além disso, o modelo MAM-E17 também é importante para se testar o comportamento. Há evidências de que esse antimitótico induz características comportamentais na prole, compatíveis com esquizofrenia. Diversos métodos de análise comportamental têm sido utilizados em animais para investigar as consequências de interrupção precoce do desenvolvimento cerebral. A aplicação de Cetamina induz mudanças de comportamento e de parâmetros de neurotransmissores dopaminérgicos, glutamatérgicos e serotoninérgicos (ver figura 3), podendo ser a base de pesquisa em modelo animal desse distúrbio psicótico.

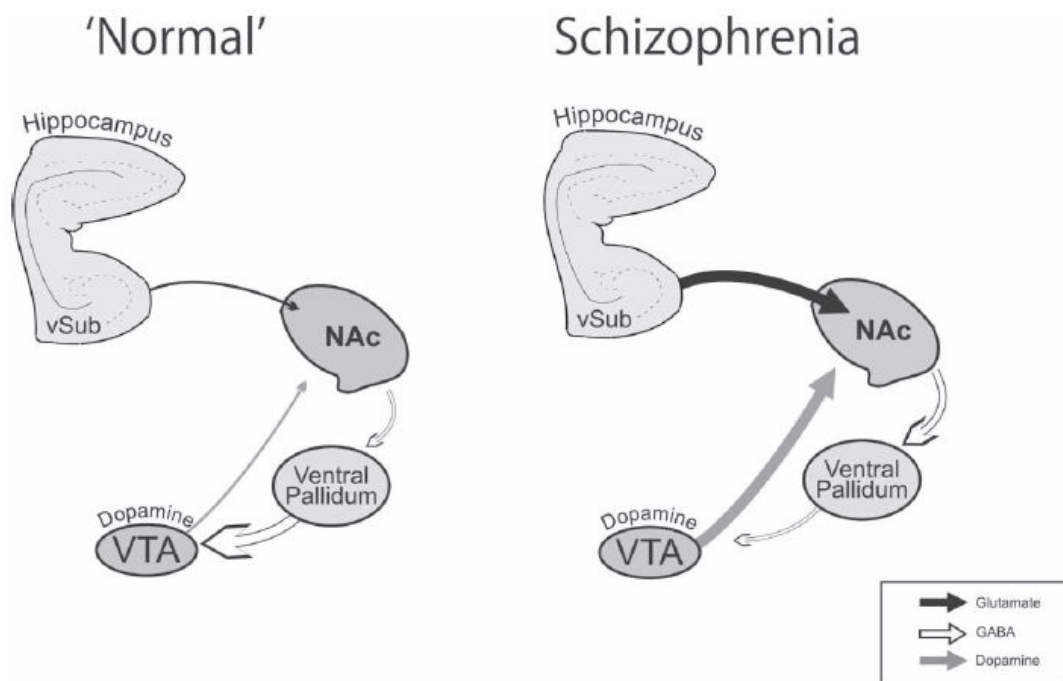


Figura 3 Esquema representando a regulação do sistema de dopamina na esquizofrenia (Lodge & Grace, 2008).

1.1 Justificativa e Objetivos

1.1.1 Justificativa do Estudo

O efeito da esquizofrenia é devastador em relação ao pensamento, expressão e emoção humana. No momento, não se conhece uma cura para essa doença, e isso motiva a realização de estudos sobre tratamentos inovadores. Porém, existe uma necessidade ética e metodológica de se iniciar com aplicação em modelos animais de doença (Decreto 93933/87 CNS). Esse modelo animal de esquizofrenia MAM-E17 poderá ser utilizado futuramente para pesquisas na área de medicina preditiva.

1.1.2 Objetivo Geral

O presente estudo visa a validar um modelo animal para a esquizofrenia, através da injeção intra-peritoneal de acetato de metilazoximetanol (MAM) em ratas prenhes, em que a prole deverá apresentar alterações histológicas no sistema nervoso central, típicas da esquizofrenia, com redução de volume e densidade neuronal na região do córtex pré-frontal (PFC), perirrinal (PRH), hipocampo (HIP) e córtex occipital (OCC).

1.1.3 Objetivos Específicos

Avaliar a perda de volume cerebral na prole de ratos, após a injeção intra-peritoneal de MAM em ratas prenhes, através da análise do peso relativo do cérebro destes.

Avaliar a desorganização e a redução do número de células nervosas no cérebro da prole de ratos cujas mães receberam injeção intra-peritoneal de MAM, através de análises histológicas de lâminas coradas por hematoxilina e eosina (HE). Além disso, o depósito de matriz extracelular será avaliado em cortes histológicos através da coloração de Picrossírius.

Avaliar (adicionalmente, para além do âmbito do artigo) o comportamento de ratos tratados com MAM quando comparados aos ratos com solução salina, sob efeito ou não de Cetamina (dados não incluídos no artigo).

1.2 Considerações éticas

Este projeto, de número 06-191, foi aprovado pelo Comitê de Ética no Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA – GPPG. Além disso, seguiu as normas do *National Research Council, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Academy Press, 1996).

1.3 Referências

Alquicer, G., A. B. Silva-Gomez, *et al.* Neonatal ventral hippocampus lesion alters the dopamine content in the limbic regions in postpubertal rats. *Int J Dev Neurosci*, v.22, n.2, Apr, p.103-11. 2004.

Ashdown, H., Y. Dumont, *et al.* The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol Psychiatry*, v.11, n.1, Jan, p.47-55. 2006.

Becker, A. e G. Grecksch. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v.28, n.8, Dec, p.1267-77. 2004.

Boksa, P. Animal models of obstetric complications in relation to schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev*, v.45, n.1, Apr, p.1-17. 2004.

Chambers, R. A. e J. R. Taylor. Animal modeling dual diagnosis schizophrenia: sensitization to cocaine in rats with neonatal ventral hippocampal lesions. *Biol Psychiatry*, v.56, n.5, Sep 1, p.308-16. 2004.

Chisholm, D. Choosing cost-effective interventions in psychiatry: results from the CHOICE programme of the World Health Organization. *World Psychiatry*, v.4, n.1, Feb, p.37-44. 2005.

Csernansky, J. G., M. V. Martin, *et al.* Neuroprotective effects of olanzapine in a rat model of neurodevelopmental injury. *Pharmacol Biochem Behav*, v.83, n.2, Feb, p.208-13. 2006.

Davis, J. A. e T. J. Gould. Risperidone attenuates MK-801-induced deficits in latent inhibition. *Behav Neurosci*, v.119, n.2, Apr, p.595-602. 2005.

El-Khodor, B. F., G. Flores, *et al.* Effects of birth insult and stress at adulthood on excitatory amino acid receptors in adult rat brain. *Synapse*, v.54, n.3, Dec 1, p.138-46. 2004.

Fiore, M., A. A. Grace, *et al.* Impaired brain development in the rat following prenatal exposure to methylazoxymethanol acetate at gestational day 17 and neurotrophin distribution. *Neuroreport*, v.15, n.11, Aug 6, p.1791-5. 2004.

Flagstad, P., A. Mork, *et al.* Disruption of neurogenesis on gestational day 17 in the rat causes behavioral changes relevant to positive and negative schizophrenia symptoms and alters amphetamine-induced dopamine release in nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology*, v.29, n.11, Nov, p.2052-64. 2004.

Flores, G., D. Barbeau, *et al.* Decreased binding of dopamine D3 receptors in limbic subregions after neonatal bilateral lesion of rat hippocampus. *J Neurosci*, v.16, n.6, Mar 15, p.2020-6. 1996.

Gourevitch, R., C. Rocher, *et al.* Working memory deficits in adult rats after prenatal disruption of neurogenesis. *Behav Pharmacol*, v.15, n.4, Jul, p.287-92. 2004.

Howland, J. G., D. K. Hannesson, *et al.* Delayed onset of prepulse inhibition deficits following kainic acid treatment on postnatal day 7 in rats. *Eur J Neurosci*, v.20, n.10, Nov, p.2639-48. 2004.

Jongen-Relo, A. L., A. Leng, *et al.* The prenatal methylazoxymethanol acetate treatment: a neurodevelopmental animal model for schizophrenia? *Behav Brain Res*, v.149, n.2, Mar 2, p.159-81. 2004.

Keefe, R. S., R. M. Bilder, *et al.* Baseline neurocognitive deficits in the CATIE schizophrenia trial. *Neuropsychopharmacology*, v.31, n.9, Sep, p.2033-46. 2006.

Keilhoff, G., H. G. Bernstein, *et al.* Increased neurogenesis in a rat ketamine model of schizophrenia. *Biol Psychiatry*, v.56, n.5, Sep 1, p.317-22. 2004.

Koenig, J. I., G. I. Elmer, *et al.* Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioral and neuroendocrinological changes in the adult offspring: potential relevance to schizophrenia. *Behav Brain Res*, v.156, n.2, Jan 30, p.251-61. 2005.

Lavin, A., H. M. Moore, *et al.* Prenatal disruption of neocortical development alters prefrontal cortical neuron responses to dopamine in adult rats. *Neuropsychopharmacology*, v.30, n.8, Aug, p.1426-35. 2005.

Lecourtier, L., H. C. Neijt, *et al.* Habenula lesions cause impaired cognitive performance in rats: implications for schizophrenia. *Eur J Neurosci*, v.19, n.9, May, p.2551-60. 2004.

Leng, A., A. L. Jongen-Relo, *et al.* Effects of prenatal methylazoxymethanol acetate (MAM) treatment in rats on water maze performance. *Behav Brain Res*, v.161, n.2, Jun 20, p.291-8. 2005.

Lipska, B. K. Using animal models to test a neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci*, v.29, n.4, Jul, p.282-6. 2004.

Lipska, B. K. e D. R. Weinberger. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology*, v.23, n.3, Sep, p.223-39. 2000.

Lodge, D. J. e A. A. Grace. Hippocampal dysfunction and disruption of dopamine system regulation in an animal model of schizophrenia. *Neurotox Res*, v.14, n.2-3, Oct, p.97-104. 2008.

Lodge, D. J. e A. A. Grace. Gestational methylazoxymethanol acetate administration: a developmental disruption model of schizophrenia. *Behav Brain Res*, v.204, n.2, Dec 7, p.306-12. 2009.

Mitchell, C. P. e M. B. Goldman. Neonatal lesions of the ventral hippocampal formation disrupt neuroendocrine responses to auditory stress in the adult rat. *Psychoneuroendocrinology*, v.29, n.10, Nov, p.1317-25. 2004.

Mitchell, C. P., D. R. Grayson, *et al.* Neonatal lesions of the ventral hippocampal formation alter GABA-A receptor subunit mRNA expression in adult rat frontal pole. *Biol Psychiatry*, v.57, n.1, Jan 1, p.49-55. 2005.

Moore, H., J. D. Jentsch, *et al.* A neurobehavioral systems analysis of adult rats exposed to methylazoxymethanol acetate on E17: implications for the neuropathology of schizophrenia. *Biol Psychiatry*, v.60, n.3, Aug 1, p.253-64. 2006.

Palmer, A. A., D. J. Printz, *et al.* Prenatal protein deprivation in rats induces changes in prepulse inhibition and NMDA receptor binding. *Brain Res*, v.996, n.2, Jan 23, p.193-201. 2004.

Reynolds, L. M., S. M. Cochran, *et al.* Chronic phencyclidine administration induces schizophrenia-like changes in N-acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate in rat brain. *Schizophr Res*, v.73, n.2-3, Mar 1, p.147-52. 2005.

Roceri, M., F. Cirulli, *et al.* Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. *Biol Psychiatry*, v.55, n.7, Apr 1, p.708-14. 2004.

Rujescu, D., A. Bender, *et al.* A pharmacological model for psychosis based on N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction: molecular, cellular, functional and behavioral abnormalities. *Biol Psychiatry*, v.59, n.8, Apr 15, p.721-9. 2006.

Sams-Dodd, F. (+) MK-801 and phencyclidine induced neurotoxicity do not cause enduring behaviours resembling the positive and negative symptoms of schizophrenia in the rat. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, v.95, n.5, Nov, p.241-6. 2004.

Talamini, L. M., T. Koch, *et al.* Interruptions of early cortical development affect limbic association areas and social behaviour in rats; possible relevance for neurodevelopmental disorders. *Brain Res*, v.847, n.1, Nov 13, p.105-20. 1999.

Talamini, L. M., T. Koch, *et al.* Methylazoxymethanol acetate-induced abnormalities in the entorhinal cortex of the rat; parallels with morphological findings in schizophrenia. *Brain Res*, v.789, n.2, Apr 13, p.293-306. 1998.

Tenn, C. C., P. J. Fletcher, *et al.* A putative animal model of the "prodromal" state of schizophrenia. *Biol Psychiatry*, v.57, n.6, Mar 15, p.586-93. 2005.

Tohmi, M., N. Tsuda, *et al.* Perinatal inflammatory cytokine challenge results in distinct neurobehavioral alterations in rats: implication in psychiatric disorders of developmental origin. *Neurosci Res*, v.50, n.1, Sep, p.67-75. 2004.

Van Den Buuse, M., B. Garner, *et al.* Importance of animal models in schizophrenia research. *Aust N Z J Psychiatry*, v.39, n.7, Jul, p.550-7. 2005.

2 Artigo

Artigo submetido à *Neuroscience Letters* em fevereiro de 2010.

Histopathological alterations in an animal model of schizophrenia induced by methylazoxymethanol acetate (MAM) in pregnant dams on embryonic day 17

Ana Carolina Silva e Valls^{1,2}, Brisa Simões Fernandes^{2,3,4,5}, Fabíola Schons Meyer⁶, Francine Hehn de Oliveira⁷, Paula Barros Terraciano¹, Eduardo Pandolfi Passos¹, Maria Inês Lobato^{2,8}, Clarissa Severino Gama^{2,3,4,5,8}, Elizabeth Obino Cirne-Lima¹, Paulo Belmonte-de-Abreu^{2,4,8}

From:

- ¹ Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- ² Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- ³ Bipolar Disorder Program, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- ⁴ Molecular Psychiatry Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- ⁵ INCT Translational Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- ⁶ Unidade de Experimentação Animal, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- ⁷ Serviço de Anatomia Patológica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- ⁸ Schizophrenia Program, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Mail address:

Ana Carolina Silva e Valls

Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Av Ramiro Barcelos 2350, ZIP Code 90035-903.

Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone number: 55 51 33598989.

e-mail: carolvalls@cpovo.net

Number of pages: 14

Number of figures: 5

Number of tables: 1

Abstract

Schizophrenia (SZ) is a multifaceted illness that affects multiple domains, including negative and positive symptoms. Because of this, there is no appropriate animal model of SZ, which contributes to its still is poorly understood pathophysiology. One of the best-developed animal models of SZ uses methylazoxymethanol acetate (MAM) in pregnant rat dams on embryonic day 17 (MAM-E17) to procedure patterns of histopathology similar to those observed in SZ. The aim of this study was to evaluate the use of MAM-E17 to validate the histological findings of this animal model of SZ. A total of 4 controls and 13 MAM-E17 were studied. Rats subjected to MAM-E17 treatment presented a decreased in brain weight and in the left caudal hippocampus area. There were no differences in the right caudal hippocampal area or in left and right dorsal hippocampal areas. The animals subjected to MAM-E17 showed a decrease in right prefrontal cortex thickness. The MAM-E17 rodent model reproduced key aspects of histological findings that are highly relevant in SZ. Thus, the administration of MAM-E17 may be an appropriate animal model for the study of histological aspects of SZ. This is of paramount importance to the better understanding and treatment of this devastating disease in the future.

Key Words: animal model, schizophrenia, methylazoxymethanol acetate, histopathological alterations, cortical thickness, hippocampus area.

Manuscript

Schizophrenia (SZ) is a highly debilitating [21] and multifaceted illness with positive, negative and cognitive symptom domains [3, 4]. It is an illness that affects 1% of the population in the world [9]. SZ in humans arises from multiple etiologies, including both genetic and environmental factors [2, 12]. However its pathophysiology is still poorly understood. This understanding is of paramount importance for the development of new therapies.

The scientific exploration of human disorders has necessitated the development of suitable, if limited, animal models. Animal models are critical for the study of psychiatric disorders since they enable the use of invasive methods to examine the mechanisms underlying pathophysiology of disease states [12]. Since that disruptions in neuronal activity can affect both human and animal behavior, animal models can be developed to test various predictive and causative theories that cannot be addressed in human studies [13]. To date, there is no appropriate animal model of SZ; it is a disease that affects multiple domains, which makes the development of an adequate animal model challenging. Due to this fact, SZ has been only marginally impacted by the study of animal model [9].

One of the best-developed animal models of SZ is the model of Moore et al [14]. This animal model recapitulates a pathodevelopmental process similar to the neuroanatomical and behavioral changes found in SZ. This model uses methylazoxymethanol acetate (MAM) in pregnant rat dams on embryonic day (E) 17. MAM E17 exposure produces the pattern of histopathology observed in SZ, consistent of a reduced thickness of prefrontal cortex (PFC) and hippocampal area (HIP). Furthermore, MAM-E17 increases neuron packing density in PFC.

The aim of this study was to evaluate the use of MAM E17 to validate this animal model of SZ. For this purpose, we evaluated histological changes in rat brain induced by MAM administration in pregnant rat dams on embryonic day 17.

In the present study, four pregnant Wistar dams were injected with MAM (22 mg/Kg), intraperitoneally (IP) on E17. One dam was treated with IP saline as a control. The presence of sperm in vaginal smears was considered Day zero of gestation, and females were then separated from the males. Female rats were handled on days 0 to E17 to minimize distress. Litters were weaned on postnatal day 28. The analysis of brain atrophy was conducted on male animals only. The females were euthanized in carbon dioxide chamber. All procedures were approved by the Research Ethics Committee from Hospital de Clínicas de Porto Alegre and adhered to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press, 1996). The animals received water and food *ad libitum*.

Metylazoxymethanol acetate was obtained from Midwest Research Institute (Kansas City, Missouri). The drug was dissolved in saline.

For the analysis of brain atrophy, 3-month-old animals were euthanized in a carbon dioxide chamber [14, 16]. The brains were removed, carefully dried with absorption paper, weighed and post-fixed in 10% paraformaldehyde. For histological stain analysis, post-fixed tissue was deeped in paraffin and 4- μ m coronal sections were obtained from the PFC and HIPP [14] based on "The Rat Brain Atlas" [15]. Sections were mounted and stained with hematoxilin-eosin (HE) and picosirius to analyze the overall structure of the tissue and to see the extracellular matrix deposits. Subsequently, the slides were evaluated by microscopy using a stereoscopic zoom microscope. Cross-sectional thickness was measured from the PFC and HIPP to determine the overall pattern of neuroanatomical effects of maternal MAM exposure.

Each region was systematically sampled [15]. The PFC was sampled at the level of the anterior commissure [14]. Cortical thickness was defined as the length of the line perpendicular to the pial surface extended to the white matter (Figure 1).

The area at dorsal HIPP at the level of the medial habenula and dorsal hippocampal commissure was calculated from the maximal dorsoventral and mediolateral segments. The area of the caudal HIPP was measured at the level of the substantia nigra pars compacta and medial geniculate body and was defined as the product of the maximal length of a segment along the long axis and the segment perpendicular to the long axis. The maximum area (pixel²) was calculated as the product of the length of the segments (Figure 1).

PFCs were studied to estimate total cortical neuron number. The total number of neuronal profiles in each zone was counted by a pathologist trained in this method. In addition, neuronal density (cell number/sample volume) was calculated in the PFC (anterior cingulate zone). For cortical thickness measurements, the transitional regions were avoided and a systematic sampling of sections determined to be unambiguously within the region of interest were used. Neuron number and volume were determined with Cavalieri estimation methods [19].

The sample size was calculated by PEPI version 4.0. Statistical analysis was performed using SPSS 17.0 for Windows. Since the thickness, area and weight brain analyses followed a normal distribution, the values are presented as mean \pm standard deviation (SD). The 95% confidence interval (95% CI) was also computed. The analysis of neuron number and density showed a nonparametric distribution, and the values are presented as medians, minimums and maximums. For the comparisons of continuous variables between MAM and controls we employed unpaired t test or Mann-Whitney test, as appropriate. Two-tailed *p* values < 0.05 were considered to be statistically significant.

A total of 4 controls and 13 MAM-E17 were included in the analysis. Methylazoxymethanol acetate treatment did not affect gestational period or litter size. The characteristics and results of the population are listed in Table 1. Rats submitted to MAM-E17 treatment presented a decreased in brain weight compared with controls (1.41 ± 0.02 and 1.47 ± 0.04 , respectively, 95% CI 0.006 to 0.110, $p < 0.032$). In this area, the only difference observed was in the left caudal hippocampus (CH) ($49,066.61 \pm 2,077.81$ and $56,159.04 \pm 5,106.15$, respectively, $p < 0.018$), with animals subjected to MAM-E17 showing decreased left CH area. There were no differences in the right CH area and in the left and right dorsal hippocampal (DH) areas (Figure 2). Animals subjected to MAM-E17 showed a decrease in right PFC thickness compared with controls (89.58 ± 5.28 and 98.16 ± 8.05 , respectively, 95% CI 1.32 to 15.81, $p < 0.024$). There were no differences in the left PFC thickness and in the left and right DH area (Table 1, Figure 3).

There was no difference in neuron numbers in PFC between MAM-E17 and controls (median 35, range 0 to 52, and median 39, range 31 to 46, respectively, $p = 0.35$) (Figure 4). Similarly, there was no difference in PFC density (median 0.37, range 0 to 0.54, and median 0.44, range 0.37 to 0.46, respectively, $p = 0.53$). No fibrosis were found in the cortical brain by the picosirius stain in the microscopy analysis (Figure 5).

Rats submitted to MAM on E17 have a reduced brain weight and size and display histological abnormalities [6, 14, 16]. In this paper, we confirmed and extended the histological alterations induced by MAM administered on E17 of pregnant dams described by Moore et al. [14]. In addition, we performed daily handling of pregnant dams, which may reduce the stress and pain caused by the experiment procedures. The handling procedure, even when performed briefly, can act as a stressor, as measured by a rise in the plasma glucocorticoid levels [10], and compromise the study results. The degree of stress can be reduced, however, by increasing the time of handling to familiarize the animals with the handlers. Therefore, our rats were trained to accept handling and restraint

in accordance with Kant et al. [8]. Rats subjected to repeated restraint were habituated to the procedure and were no longer perceived as stressful. Familiarization of animals to the techniques to which they are later exposed should be seen as an important part of the acclimatization period for experiments conducted with animals.

This model induced a significant reduction in right PFC thickness and hippocampal areas in addition to hippocampal heterotopias reported previously [5, 6, 11]. These abnormalities resemble several abnormalities seen in SZ [17]. These findings are consistent with a meta-analysis that showed a reduction of cortical and hippocampal volume in schizophrenic patients [7].

Our result contrast the findings of other MAM models studies because no difference in PFC neuronal density and neuron number was observed. These differences may be explained by a type II error. Prefrontal cortex has major reciprocal connections with the mediodorsal thalamic nucleus, an area implicated in SZ. Morphometric studies have shown alteration in neuronal density and structure parts in parts of the PFC in schizophrenic brains [20].

In addition, we observed a difference in layer distribution and neurons morphology. In MAM-E17 group, the neurons were disorganized, with decreased layer organization compared to the control group. Moreover, the MAM-E17 group showed morphological changes consistent with ischemic damage. As expected, there was no fibrosis in neither groups as assessed by picrosirius staining [1].

Schizophrenia is a devastating and prevalent disease. Despite the existence of pharmacological treatments, a substantial number of subjects present with refractory and residual symptoms. This motivates the implementation of further studies seeking more effective pharmacotherapies and innovative treatments. Thus, there is an ethical and methodological need for animal models of the disease. Differing theories of the cause and progression of schizophrenia, as well as the heterogeneity of clinical symptoms, have

made it difficult to develop a coherent framework suitable for animal modeling [13]. The development of increasingly informative animal models of SZ will depend on a more complete understanding of the disease, an integration of findings across animal model, and refinements in the criteria used to assess model validity that better reflect the changing nature and roles of animal models of SZ [9]. These characteristics are referred to as predictive and construct validity, and are quite variable in models of psychiatric disorders, particularly SZ [13]. In this study, we reported the histological alterations of the MAM-E17 model. The behavior and predictive validity are also important and we plan to study these constructs further.

Current animal models of SZ are not intended to serve as the complete animal equivalent of the human disorder. Rather, they are often designed to test specific causative or mechanistic hypotheses regarding SZ. The models can be validated on how well their performance predicts the performance of humans with SZ and on whether the model provides a sound theoretical rationale [13]. Because there are many suggested animal models of SZ, the choice of the most appropriated animal model of the human disease remains questionable. The MAM-E17 model reproduced the histological alterations seen in SZ, which suggests that this model is suitable for studying these types of alterations. Therefore, the MAM-E17 model may be considered a mixed animal model of embryonic and neurodevelopmental changes in SZ.

Some limitations should be acknowledged. First, the evaluation of the predictive validity of the model was not possible due to the absence of treatment of the animals with antipsychotic medication. However, the examination of behaviour and the predictive value was beyond the scope of this study. Second, our control group was relatively small: a type II error in non-significant results cannot be completely excluded. Nevertheless, it is important to emphasize that despite our small sample size, we replicated and extended the scarce literature on this topic.

In conclusion, the study reproduces previous MAM findings in rat brains consistent with the pathology in SZ. Additionally, we described additional changes, including a decrease in left CH area and right PFC thickness that may be attributed to the MAM-E17 model. These histopathological alterations are consistent with those observed in patients with SZ [6, 11, 18]. Thus, the MAM-E17 model provides a valid disruption in key neuronal systems that are seen in SZ patients. The ability to examine the functional interactions among these systems and how disruption within these circuits affects information processing is central to obtaining a better understanding of this disease and the generation of innovative treatments. Further studies are necessary to evaluate the predictive and behavior constructed of this animal model.

Figure Legends

Figure 1. Coronal sections of the brain showing the prefrontal cortex thicknesses and hippocampal area measurements. Size measurements were averaged from a set of coronal sections centered at the position shown. **(A)** Anterior cingulate. **(B)** Dorsal hippocampus. **(C)** Caudal hippocampus.

Abbreviations: AC, anterior cingulate; DH, dorsal hippocampus; CH, caudal hippocampus.

Figure 2. Area of the caudal and dorsal hippocampus. **(A)** Left dorsal hippocampus. **(B)** Right dorsal hippocampus. **(C)** Left caudal hippocampus. **(D)** Right caudal hippocampus.

Area (in pixel²) was defined as the product of the maximal length of a segment along the long axis and the segment perpendicular to the long axis.

Data are expressed as the mean and 95% confidence interval of the mean (95% CI).

* $p < 0.018$ for control vs. MAM-E17 groups (unpaired *t* test).

Figure 3. Coronal section of brain regions. **(A, C)** The dorsal hippocampus was determined at bregma – 3.3 mm. **(B, D)** The caudal hippocampus was determined at bregma – 5.3 mm. **(A, B)** Controls and **(C, D)** MAM-E17 rats.

Abbreviation: MAM-E17, methylazoxymethanol acetate on embryonic day 17.

Figure 4. Analysis of neuron numbers in the prefrontal cortex in controls and MAM-E17.

(A) Neurons arranged uniformly and oriented in layers below glial cells. **(B)** Disorganized and irregular distribution of neurons interspersed by glial cells. (HE, 100X).

Abbreviation: MAM-E17, methylazoxymethanol acetate on embryonic day 17.

Figure 5. Lack of scar process and fibrosis formation in the parenchyma both in the **(A)** control and in the **(B)** MAM-E17 groups, with reference to positive staining in the vessel walls that are formed by collagen fibers (picrosirius, 40X).

Abbreviation: MAM-E17, methylazoxymethanol acetate on embryonic day 17.

Role of funding sources

This study was supported by CAPES and FIFE-HCPA. These agencies had no role in study design, the acquisition and interpretation of data or in the writing of the report.

Financial disclosures

Clarissa S. Gama received Grant/Research Support from CNPq (PQ 305967/2008-8, 477974/2009-0), FIFE-HCPA, and CAPES/GRICES (granted to Professor Belmonte-de-Abreu).

Ana Carolina Valls, Brisa Simões Fernandes, Francine Hehn de Oliveira, Fabíola Schons Meyer, Paula Barros Terraciano, Maria Inês Lobato, Eduardo Pandolfi Passos, Elizabeth Obino Cirne Lima and Paulo Belmonte de Abreu have declared no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was supported by FIFE-HCPA.

We would like to thank Fabiany da Costa Gonçalves and Ana Helena Paz for their support in conducting the experiments and also to Elton Ferlin for technical support.

Ana Carolina Valls is supported by a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Brazil. Brisa Simões Fernandes is supported by a scholarship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

References

- [1] M.S. Buckwalter, T. Wyss-Coray, Modelling neuroinflammatory phenotypes in vivo, *Journal of neuroinflammation* 1 (2004) 10.
- [2] G.S. Dawe, E.H. Hwang, C.H. Tan, Pathophysiology and animal models of schizophrenia, *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 38 (2009) 425-426.
- [3] D. de Lucena, B.S. Fernandes, M. Berk, S. Dodd, D.W. Medeiros, M. Pedrini, M. Kunz, F.A. Gomes, L.F. Giglio, M.I. Lobato, P.S. Belmonte-de-Abreu, C.S. Gama, Improvement of negative and positive symptoms in treatment-refractory schizophrenia: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial with memantine as add-on therapy to clozapine, *The Journal of clinical psychiatry* 70 (2009) 1416-1423.
- [4] D. de Lucena, B.S. Fernandes, M. Kunz, G.R. Fries, L. Stertz, B. Aguiar, B. Pfaffenseller, C.S. Gama, Lack of association between serum brain-derived neurotrophic factor levels and improvement of schizophrenia symptoms in a double-blind, randomized, placebo-controlled trial of memantine as adjunctive therapy to clozapine, *The Journal of clinical psychiatry* 71 91-92.
- [5] P. Flagstad, A. Mork, B.Y. Glenthøj, J. van Beek, A.T. Michael-Titus, M. Didriksen, Disruption of neurogenesis on gestational day 17 in the rat causes behavioral changes relevant to positive and negative schizophrenia symptoms and alters amphetamine-induced dopamine release in nucleus accumbens, *Neuropsychopharmacology* 29 (2004) 2052-2064.
- [6] R. Gourevitch, C. Rocher, G. Le Pen, M.O. Krebs, T.M. Jay, Working memory deficits in adult rats after prenatal disruption of neurogenesis, *Behavioural pharmacology* 15 (2004) 287-292.
- [7] P.J. Harrison, The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation, *Brain* 122 (Pt 4) (1999) 593-624.

- [8] G.J. Kant, T. Eggleston, L. Landman-Roberts, C.C. Kenion, G.C. Driver, J.L. Meyerhoff, Habituation to repeated stress is stressor specific, *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 22 (1985) 631-634.
- [9] C.D. Kilts, The changing roles and targets for animal models of schizophrenia, *Biological psychiatry* 50 (2001) 845-855.
- [10] R. Kvetnansky, C.L. Sun, C.R. Lake, N. Thoa, T. Torda, I.J. Kopin, Effect of handling and forced immobilization on rat plasma levels of epinephrine, norepinephrine, and dopamine-beta-hydroxylase, *Endocrinology* 103 (1978) 1868-1874. *apud* R.W. Kemp, *Handling and Restraint*. In: G.J.B. Krinke, Gillian and Bunton, Tracie (Ed.), *The Laboratory Rat*, Vol. 1, Elsevier, Cheshire, UK, 2000, pp. 31-43.
- [11] G. Le Pen, R. Gourevitch, F. Hazane, C. Hoareau, T.M. Jay, M.O. Krebs, Peri-pubertal maturation after developmental disturbance: a model for psychosis onset in the rat, *Neuroscience* 143 (2006) 395-405.
- [12] D.J. Lodge, A.A. Grace, Gestational methylazoxymethanol acetate administration: a developmental disruption model of schizophrenia, *Behavioural brain research* 204 (2009) 306-312.
- [13] E.R. Marcotte, D.M. Pearson, L.K. Srivastava, Animal models of schizophrenia: a critical review, *J Psychiatry Neurosci* 26 (2001) 395-410.
- [14] H. Moore, J.D. Jentsch, M. Ghajarnia, M.A. Geyer, A.A. Grace, A neurobehavioral systems analysis of adult rats exposed to methylazoxymethanol acetate on E17: implications for the neuropathology of schizophrenia, *Biological psychiatry* 60 (2006) 253-264.
- [15] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.*, Academic Press, Inc. (1986).

- [16] S. Penschuck, P. Flagstad, M. Didriksen, M. Leist, A.T. Michael-Titus, Decrease in parvalbumin-expressing neurons in the hippocampus and increased phencyclidine-induced locomotor activity in the rat methylazoxymethanol (MAM) model of schizophrenia, *The European journal of neuroscience* 23 (2006) 279-284.
- [17] T. Sigmundsson, J. Suckling, M. Maier, S. Williams, E. Bullmore, K. Greenwood, R. Fukuda, M. Ron, B. Toone, Structural abnormalities in frontal, temporal, and limbic regions and interconnecting white matter tracts in schizophrenic patients with prominent negative symptoms, *The American journal of psychiatry* 158 (2001) 234-243.
- [18] L.M. Talamini, T. Koch, G.J. Ter Horst, J. Korf, Methylazoxymethanol acetate-induced abnormalities in the entorhinal cortex of the rat; parallels with morphological findings in schizophrenia, *Brain research* 789 (1998) 293-306.
- [19] J.J. Thune, B. Pakkenberg, Stereological studies of the schizophrenic brain, *Brain Res Brain Res Rev* 31 (2000) 200-204.
- [20] J.J. Thune, H.B. Uylings, B. Pakkenberg, No deficit in total number of neurons in the prefrontal cortex in schizophrenics, *Journal of psychiatric research* 35 (2001) 15-21.
- [21] T.B. Ustun, The global burden of mental disorders, *American journal of public health* 89 (1999) 1315-1318.

Table 1. Results of control and methylazoxymethanol acetate on embryonic day 17 rats (MAM-E17) in the prefrontal cortex and hippocampus.

Results ^a	Group*		p value
	MAM-E17 (n=13)	Control (n=4)	
Brain weight (g)	1.41 ± .04	1.47 ± .01	0.01
Left PFC thickness (px)	96.47 ± 10.65	87.52 ± 8.38	0.09
Right PFC thickness (px)	89.58 ± 5.28	98.16 ± 8.07	0.02
Left DH area (px ²)	27,027.49 ± 7,958.71	30,189.44 ± 6,072.33	0.47
Right DH area (px ²)	28,248.71 ± 6,320.70	29,692.39 ± 7,690.20	0.70
Left CH area (px ²)	49,066.61 ± 5,106.15	56,159.04 ± 2,077.81	0.01
Right CH area (px ²)	50,819.66 ± 5,608.94	53,100.10 ± 4,161.06	0.46

Abbreviations: methylazoxymethanol acetate on embryonic day 17 rats (MAM-17); prefrontal cortex (PFC); dorsal hippocampus (DH); caudal hippocampus (CH).

*Columns show mean ± standard deviation (SD) for all categories.

^a Unpaired *t* test.

Area was defined as the product of the maximal length of a segment along the long axis and the segment perpendicular to the long axis.

Figure 1

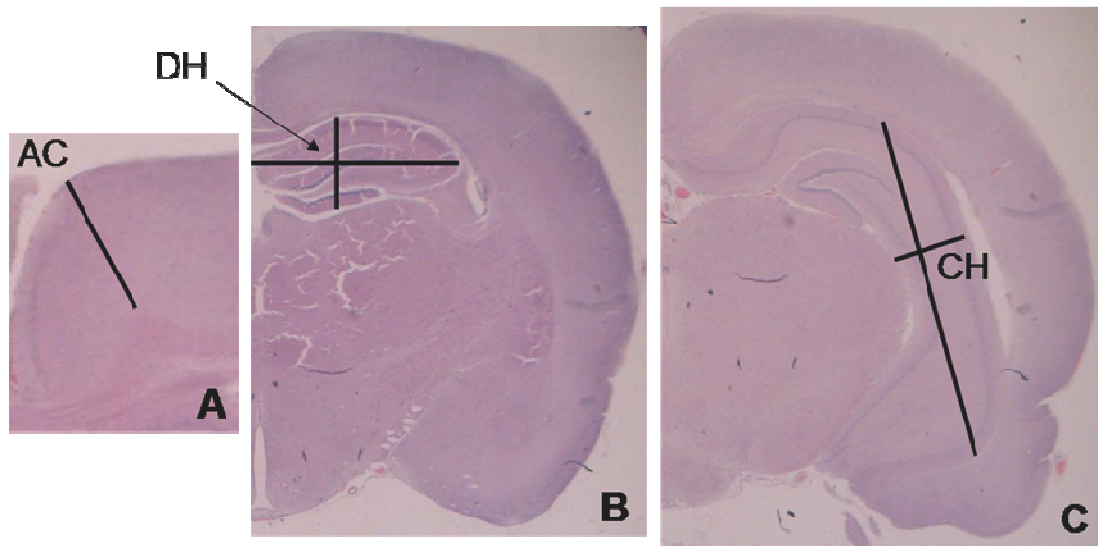


Figure 2

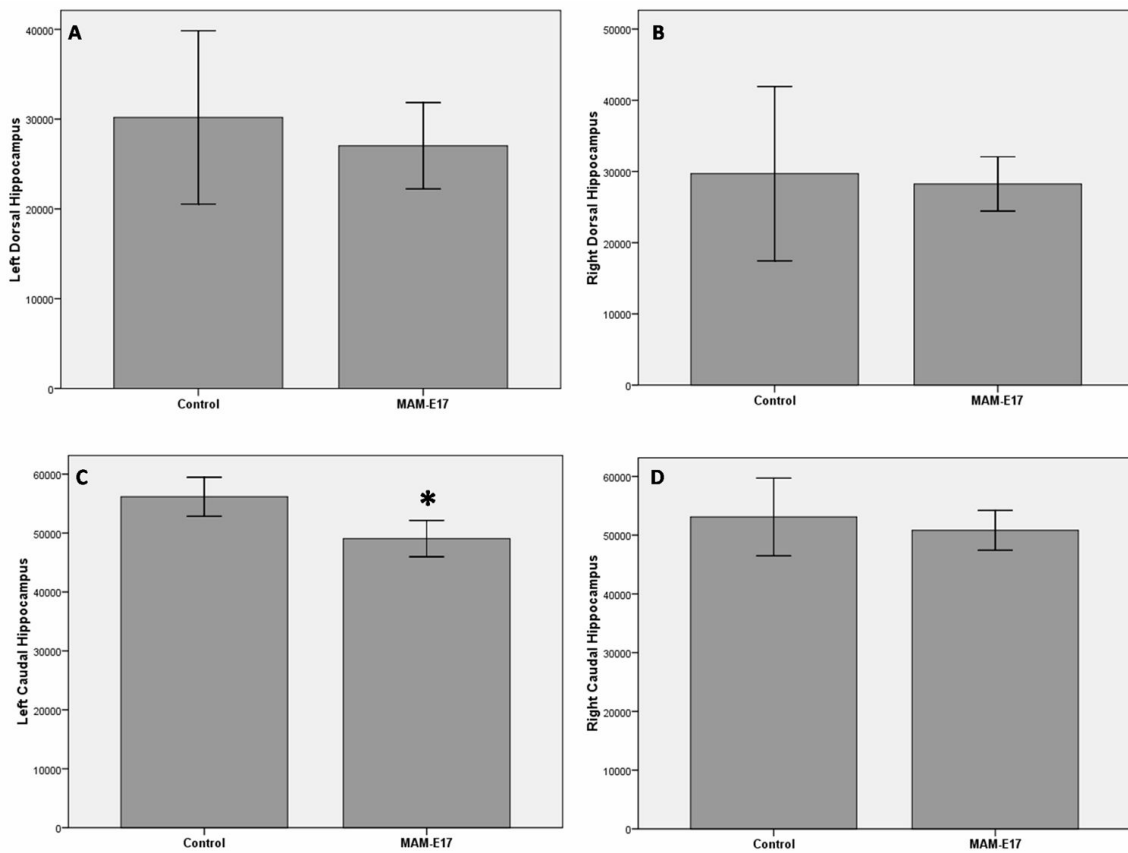


Figure 3

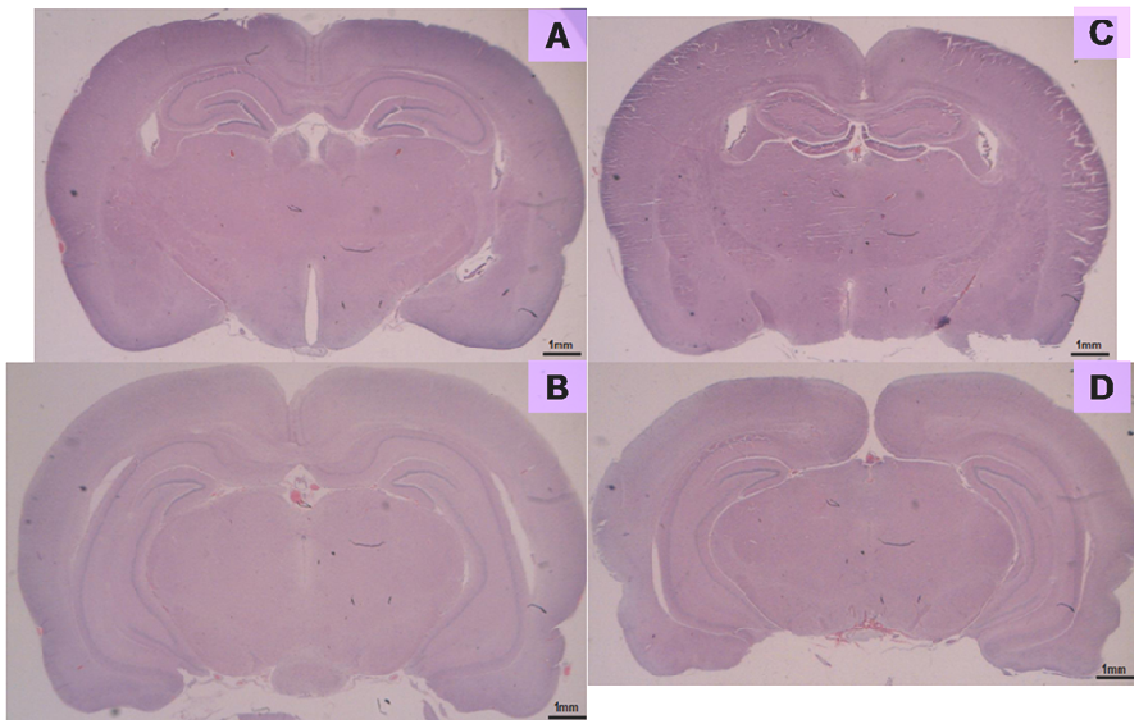


Figure 4

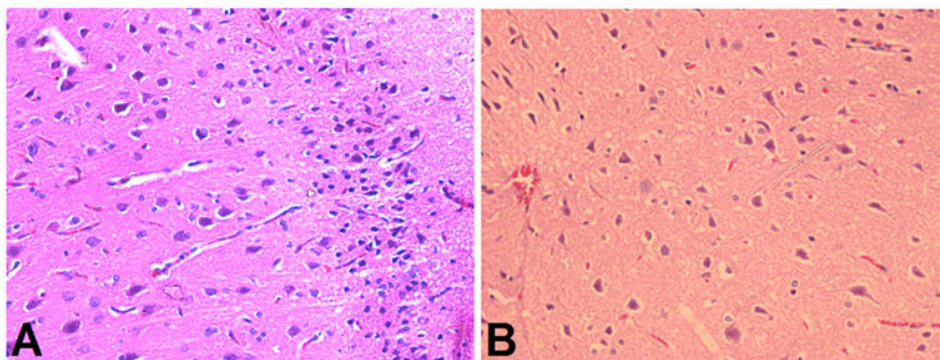
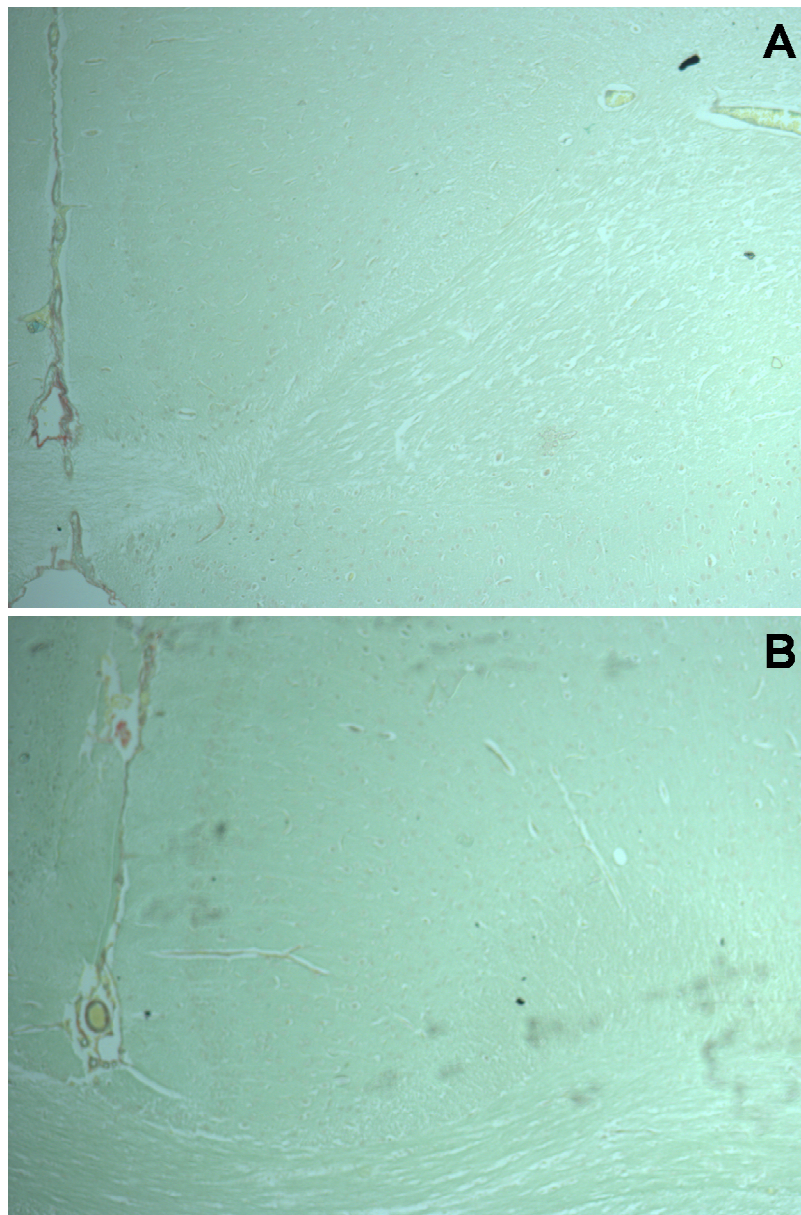


Figure 5



3 Considerações Finais

O estudo mostrou que, em um total de 4 controles e 13 MAM-E17 analisados, o tratamento com MAM não afetou o período gestacional nem o tamanho da ninhada. Nossos achados sugerem que os ratos submetidos ao tratamento MAM-E17 apresentaram uma diminuição no peso do cérebro, quando comparado aos controles. Em relação à área, houve uma diminuição significativa no hipocampo caudal (CH) esquerdo em animais submetidos ao MAM-E17. Não houve diferença na área de CH direita e no hipocampo dorsal (DH). Os animais submetidos ao MAM-E17 também mostraram uma diminuição da espessura da PFC direita quando comparados aos controles. Não houve diferenças na espessura PFC esquerda. Tais resultados podem ser de relevância para o estabelecimento desse modelo, uma vez que essa heterogeneidade de lados do hipocampo é observada em pacientes com esquizofrenia.

Quanto à análise do número de neurônios em PFC, não houve diferença entre os ratos MAM-E17 e controles. Da mesma forma, não houve diferença na densidade. Além disso, nenhuma fibrose foi encontrada no córtex cerebral pela técnica de coloração histológica na análise convencional de microscopia.

Já fora relatado que ratos submetidos ao MAM no décimo sétimo dia de gestação têm peso reduzido do cérebro e mostram anormalidades histológicas. Neste âmbito, nosso estudo confirmou e ampliou resultados referentes às alterações histológicas induzidas pela administração de MAM no décimo sétimo dia de gestação em ratas prenhes descrito por Moore *et al.* Além disso, realizou-se

diariamente a técnica de *handling* (manuseio dos animais) nas fêmeas prenhes, o que pode ter reduzido o estresse originado pelo experimento. Já fora demonstrado que o procedimento de *handling*, quando realizado brevemente, tão pouco quanto 30 segundos, pode atuar como um fator estressante, medido por um aumento nos níveis plasmáticos de glicocorticóides e até mesmo comprometer os resultados do estudo. O grau de estresse pode, no entanto, ser reduzido, aumentando-se o tempo de tratamento e fazendo os animais se familiarizarem com os manipuladores. Portanto, no experimento realizado nesse estudo, os ratos foram treinados para aceitar a manipulação e tornaram-se familiarizados com os seus manipuladores, de acordo com Kant *et al.*, segundo o qual os ratos habituados ao procedimento não mais o percebem como estressante. A familiarização dos animais com técnicas a que mais tarde serão expostos deve, portanto, ser vista como uma parte importante do período de aclimatação da condução de experimentos com modelos animais.

Ampliando descrições anteriores, verificou-se que esse modelo induziu uma redução significativa do PFC e áreas do hipocampo, além de heterotopias hipocampal. Essas anormalidades parecem com as encontradas em SZ. De fato, uma meta-análise revelou redução do volume cortical e hipocampal em pacientes com esquizofrenia (Harrison, 1999).

Neste estudo, não houve diferença na densidade neuronal e no número de neurônios no PFC. Contrastando com relatos de outros autores em modelo MAM, isso pode ser explicado por um erro do tipo II. PFC é a região cortical que tem o maior número de conexões recíprocas com o tálamo médio-dorsal, que está

implicado na SZ. Os estudos morfométricos demonstraram alteração na densidade neuronal e na estrutura do PFC em cérebros esquizofrênicos.

No entanto, percebemos uma alteração na distribuição das camadas e na morfologia dos neurônios. No grupo MAM-E17, os neurônios estavam distribuídos de maneira desorganizada, não respeitando as camadas celulares encontradas no grupo controle. Além disso, este grupo apresentou alterações morfológicas compatíveis com dano isquêmico.

Como esperado, a coloração de picrossírius não demonstrou fibrose em ambos os grupos, uma vez que ainda não foi encontrada uma técnica eficaz para determinar este processo.

Também não houve diferença significativa em espessura, densidade e número de neurônios nos PAR, OCC e PRH (dados não submetidos nesse artigo).

Até aqui, os procedimentos planejados da pesquisa. Conseguiu-se, porém, adiantar ainda um estudo-piloto, para desenvolvimentos futuros, com vistas à validação do constructo comportamental: animais adultos foram colocados no Monitor de Atividades para quantificar deslocamento, movimentos rotatórios e estereotipados, comparando-se casos (n=10) e controles (n=5). Tais análises foram feitas primeiramente em ambientação por 20 minutos, depois administrada solução salina por esse mesmo período e, por fim, Cetamina (25mg/kg) por 40 minutos. Os dados foram avaliados por teste t, com IC de 95%. Os resultados desse estudo-piloto sugerem então que há influência da Cetamina no comportamento dos animais ao longo do tempo (figura 4). Animais controles apresentaram menor hiperatividade quando comparados aos casos, embora essa diferença não seja estatisticamente significativa. Ratos MAM apresentaram

hiperatividade no hipocampo ventral devido à desregulação dopaminérgica, que pode ser consequência da diminuição da sinalização de GABA, enquanto a Cetamina age nos receptores glutamatérgicos. Aumentando-se o tamanho da amostra do grupo controle, poder-se-ia talvez observar o real efeito do somatório de MAM e Cetamina no comportamento (dados não submetidos nesse artigo).

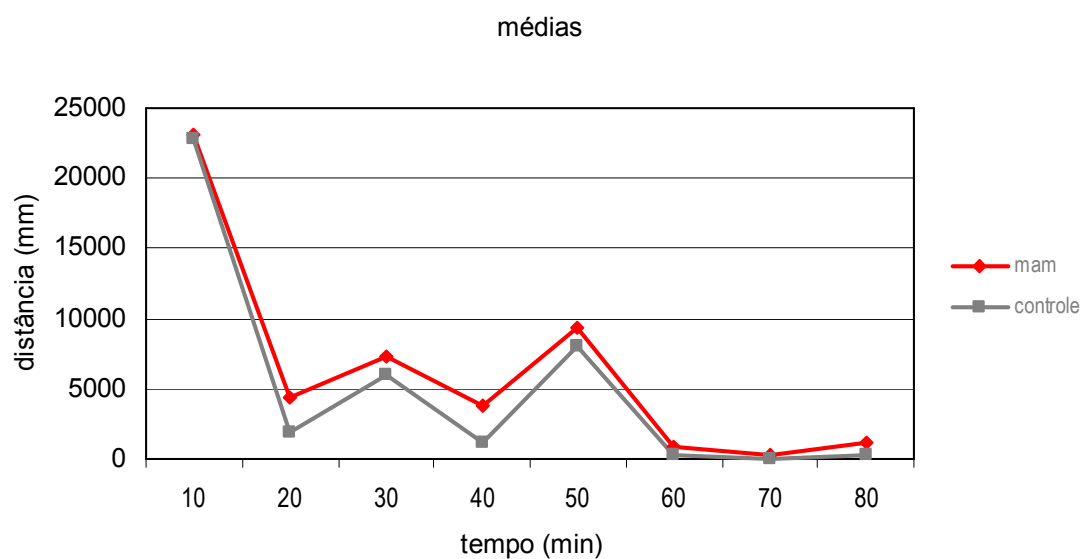


Figura 4 Gráfico com os resultados do teste do Monitor de Atividades - IR. Nos primeiros 20 min., ambientação, seguidos pelo mesmo período de administração de salina e 40 min. de Cetamina.

O desenvolvimento de modelos animais cada vez mais informativos de SZ dependerá de uma compreensão mais completa da doença, de uma integração dos resultados através de modelo animal e de refinamentos nos critérios utilizados para avaliar o modelo de "validação" que melhor reflita a natureza em mudança e os papéis dos animais modelos de SZ. Essas características são referidas como constructo de validade preditiva e são bastante variáveis em modelos de

transtornos psiquiátricos. O presente estudo enfocou as alterações histológicas; o comportamento e a validade preditiva serão temas de um estudo ainda em planejamento.

Diferentes teorias sobre a causa e progressão da esquizofrenia, bem como a heterogeneidade de sintomas clínicos, têm dificultado desenvolver um quadro coerente adequado de modelos animais. Com muitas sugestões de modelos animais de SZ, a questão continua sendo: qual seria o modelo animal mais apropriado dessa doença humana?

Modelos animais atuais da SZ não se destinam a servir de equivalente completo da doença humana. Pelo contrário, muitas vezes destinam-se a testar hipóteses específicas com referência causal ou mecanicista da SZ. Os modelos podem ser validados com base em quão bem seu desempenho em determinado teste prediz o desempenho dos seres humanos com SZ, e se o modelo fornece uma justificativa teórica sólida.

Algumas limitações devem ser reconhecidas. Primeiro, na ausência de tratamento dos animais com medicamentos antipsicóticos, a avaliação da validade preditiva do modelo não foi possível. Em segundo lugar, o nosso grupo de controle é relativamente pequeno, então um erro do tipo II nos resultados não significativos não pode ser completamente descartado. No entanto, é importante ressaltar que, embora com uma amostra pequena, reproduziu-se e ampliou-se o que havia na literatura sobre o tema, e que, além disso, analisar o comportamento e o valor preditivo não pertencia ao objetivo geral do presente estudo.

Pode-se concluir que o presente estudo reproduziu resultados em cérebros de ratos MAM convergentes com a patologia da esquizofrenia. Além disso, que

reforçou a administração do MAM gestacional como um modelo de desenvolvimento de perturbações SZ com base nos resultados histológicos. Essas alterações histopatológicas são compatíveis com aquelas observadas em pacientes com SZ. O modelo MAM-E17 fornece uma ruptura válida nos principais sistemas neuronais que são vistos em SZ. A capacidade de analisar as interações funcionais entre esses sistemas e como a ruptura dentro desses circuitos afeta o processamento de informações é fundamental para obter uma melhor compreensão da doença e da geração de tratamentos inovadores. Mais estudos são necessários para avaliar os constructos preditivos e de comportamento desse modelo animal.