

EFEITO DO FENTANIL EM RATOS NA SENSIBILIZAÇÃO  
COMPORTAMENTAL, NA PREFERÊNCIA CONDICIONADA POR  
LUGAR E NA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ARC EM ÁREAS  
ENCEFÁLICAS LIGADAS À DEPENDÊNCIA QUÍMICA.

VICTORIA BENAZIO DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E  
BIOTECNOLOGIA

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MAIO de 2025



EFEITO DO FENTANIL EM RATOS NA SENSIBILIZAÇÃO  
COMPORTAMENTAL, NA PREFERÊNCIA CONDICIONADA POR  
LUGAR E NA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ARC EM ÁREAS  
ENCEFÁLICAS LIGADAS À DEPENDÊNCIA QUÍMICA.

VICTORIA BENAZIO DA SILVA

**Dissertação apresentada ao Centro de Biociências  
e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte  
Fluminense, como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em Biociências e  
Biotecnologia.**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E  
BIOTECNOLOGIA

**ORIENTADORA:** PROFA. DRA. MARINETE PINHEIRO CARRERA

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MAIO/2025

### **FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S586

Silva, Victoria Benazio da.

O efeito do fentanil na sensibilização comportamental e na preferência condicionada por lugar : avaliação da expressão da proteína ARC em áreas encefálicas ligadas a dependência e em ratos / Victoria Benazio da Silva. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2025.

99 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2025.

Orientadora: Marinete Pinheiro Carrera.

1. Sensibilização Comportamental. 2. Condicionamento. 3. Fentanil. 4. ARC. 5. Neuroplasticidade. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

EFEITO DO FENTANIL EM RATOS NA SENSIBILIZAÇÃO  
COMPORTAMENTAL, NA PREFERÊNCIA CONDICIONADA POR  
LUGAR E NA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ARC EM ÁREAS  
ENCEFÁLICAS LIGADAS À DEPENDÊNCIA QUÍMICA.

VICTORIA BENAZIO DA SILVA

**Dissertação apresentada ao Centro de Biociências  
e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte  
Fluminense, como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em Biociências e  
Biotecnologia.**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

Aprovada em 30 de maio de 2025.

Comissão Examinadora:

---

Profa. Dra. Alba Lucínia Peixoto Rangel - LBR/CBB/UENF

---

Prof. Dr. Henrique Rocha Mendonça- UFRJ-Macaé

---

Profa. Dra. Rosemary Bastos- CCTA/UENF

---

Profa. Dra. Marinete Pinheiro Carrera – LMPA/CCTA/UENF

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao meu pai, que partiu durante a sua execução. Mesmo ausente fisicamente, sei que sua presença, força e amor continuam me guiando. Tenho certeza de que, onde quer que esteja, está torcendo por mim e orgulhoso da minha caminhada.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ter me concedido força e saúde ao longo desta jornada.

À minha orientadora, pelo apoio, paciência, dedicação e orientação durante todas as etapas deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, pelo companheirismo e trocas valiosas. Em especial, agradeço a Joaquim e Gabriela, pela participação ativa no desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Enrrico Bloise pelo apoio técnico e científico. Sua colaboração contribuiu significativamente para o desenvolvimento e aprimoramento deste trabalho.

À minha mãe e às minhas irmãs, pelo amor incondicional, pela torcida constante e por acreditarem em mim mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado, por todo o companheirismo, compreensão e apoio emocional.

À CAPES, pelo apoio financeiro por meio da concessão de bolsa.

Ao Programa de Pós Graduação em Biociência e Biotecnologia pelas oportunidades de formação e à toda a coordenação, professores e colegas do programa, cujo incentivo foram fundamentais para o desenvolvimento desta dissertação.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), pela formação acadêmica e estrutura oferecida para a realização deste trabalho.

## Sumário

|                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>RESUMO</b>                                                                                                                                 | i   |
| <b>ABSTRACT</b>                                                                                                                               | iii |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                                                                          | 1   |
| <b>2. JUSTIFICATIVA</b>                                                                                                                       | 3   |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>                                                                                                               | 5   |
| <b>3.1. Dependência de Opioides, Sensibilização Comportamental</b>                                                                            | 5   |
| 3.1.1. Conceito de Dependência e Sensibilização                                                                                               | 5   |
| 3.1.2. Mecanismos Neurais da Dependência em Opioides                                                                                          | 9   |
| 3.1.3. Áreas do Circuito de Recompensa                                                                                                        | 10  |
| <b>3.2. Proteína Associada ao Citoesqueleto Regulada por Atividade (ARC)</b>                                                                  | 13  |
| <b>3.3. Preferência Condicionada de Lugar</b>                                                                                                 | 15  |
| <b>3.4. Fentanil</b>                                                                                                                          | 17  |
| <b>4. OBJETIVOS</b>                                                                                                                           | 21  |
| 4.1. Objetivos Gerais                                                                                                                         | 21  |
| 4.2. Objetivos Específicos                                                                                                                    | 21  |
| <b>5. METODOLOGIA</b>                                                                                                                         | 21  |
| 5.1. Sujeitos                                                                                                                                 | 22  |
| 5.2. Fármaco                                                                                                                                  | 22  |
| 5.3. Ambiente Experimental                                                                                                                    | 22  |
| 5.4. Procedimento Experimental                                                                                                                | 23  |
| 5.4.1. Experimento 1: Efeito do tratamento com fentanil na arena experimental no desenvolvimento da locomoção sensibilizada e na proteína Arc | 23  |
| 5.4.2. Experimento 2: Efeito do tratamento com fentanil na expressão da locomoção condicionada e na proteína Arc.                             | 26  |
| 5.5. Análise de Proteína                                                                                                                      | 29  |
| 5.5.1. Imunoistoquímica                                                                                                                       | 29  |



|                                            |           |
|--------------------------------------------|-----------|
| 5.5.2. Contra-coloração:.....              | 31        |
| <b>5.6. Estatística.....</b>               | <b>32</b> |
| <b>6. RESULTADOS.....</b>                  | <b>33</b> |
| 6.1. Experimento 1: .....                  | 33        |
| 6.2. Experimento 2: .....                  | 61        |
| <b>7. DISCUSSÃO .....</b>                  | <b>65</b> |
| <b>8. CONCLUSÃO .....</b>                  | <b>74</b> |
| <b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b> | <b>75</b> |

## RESUMO

A dependência química é uma doença crônica e complexa, caracterizada por recaídas frequentes. Estímulos ambientais associados ao uso de substâncias psicoativas reforçam o comportamento de busca e consumo. O fentanil, um potente opioide, pode modificar a associação entre os efeitos da droga e o ambiente, promovendo alterações nos circuitos neurais da recompensa e consolidando memórias patológicas. Entre os mecanismos envolvidos, destaca-se a plasticidade sináptica mediada pela proteína Arc (Proteína Associada ao Citoesqueleto Regulada por Atividade), essencial para processos de memória e aprendizagem relacionados à dependência, como a sensibilização comportamental e o condicionamento. Este estudo investigou os efeitos do fentanil (10 e 20  $\mu\text{g/kg}$ ) na sensibilização locomotora, na formação de uma memória de contexto e na expressão da Arc em regiões cerebrais associadas à dependência: córtex pré-frontal medial (CPF), núcleo accumbens (NAc), amígdala basolateral (BLA), hipotálamo lateral (LH), hipocampo dorsal (dCA1) e área tegmental ventral (VTA). Para isso foram realizados dois experimentos com ratos Wistar. No Experimento 1, os animais foram submetidos a diferentes protocolos de exposição à arena de campo aberto: sessões de 30 minutos por 6 dias (1A), sessão única de 30 minutos (1B), sessões de 5 minutos por 6 dias (1C) e sessão única de 5 minutos (1D), todos precedidos por três dias de habituação. Observou-se sensibilização locomotora com a dose de 10  $\mu\text{g/kg}$  no protocolo de 5 minutos (1C). A dose de 20  $\mu\text{g/kg}$  também produziu sensibilização (1D), embora com menor magnitude inicial. A expressão da Arc aumentou de forma dependente da dose, especialmente com 20  $\mu\text{g/kg}$  no NAc, CPF e VTA. No Experimento 2, o protocolo de preferência condicionada por lugar (PCL) demonstrou que ambos os grupos tratados com fentanil passaram a preferir o compartimento associado à droga, indicando formação de memória associativa. A expressão de Arc acompanhou os dados comportamentais, sendo elevada nos grupos condicionados, mas não no grupo controle avaliado após o pré-condicionamento. Assim, é mostrado que o fentanil induz plasticidade

sináptica em regiões-chave do sistema de recompensa, com ativação da Arc. Essa ativação sugere alterações moleculares duradouras associadas à dependência. Arc pode atuar como marcador funcional de vulnerabilidade à neuroadaptação por opioides.

**Palavras-chaves:** Sensibilização comportamental; Condicionamento; Fentanil; ARC; Neuroplasticidade; Opioides.

## ABSTRACT

Addiction is a chronic and complex disease, characterized by frequent relapses. Environmental stimuli associated with the use of psychoactive substances reinforce drug-seeking and consumption behaviors. Fentanyl, a potent opioid, can alter the association between the drug's effects and environmental cues, leading to changes in neural circuits involved in reward and the consolidation of pathological memories. Among the underlying mechanisms, synaptic plasticity mediated by the Arc protein (Activity-regulated cytoskeleton-associated protein) stands out as essential for learning and memory processes related to addiction, such as behavioral sensitization and contextual conditioning. This study investigated the effects of fentanyl (10 and 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) on locomotor sensitization, contextual memory formation, and Arc expression in brain regions associated with addiction: prefrontal cortex (PFC), nucleus accumbens (NAc), basolateral amygdala (BLA), lateral hypothalamus (LH), dorsal hippocampus (dCA1), and ventral tegmental area (VTA). Two experiments were conducted using Wistar rats. In Experiment 1, animals were subjected to different open-field arena exposure protocols: 30-minute sessions for 6 consecutive days (1A), a single 30-minute session (1B), 5-minute sessions for 6 days (1C), and a single 5-minute session (1D), all preceded by three days of habituation. Locomotor sensitization was observed with the 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dose in the 5-minute protocol (1C). The 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dose also induced sensitization (1D), although with lower initial magnitude. Arc expression increased in a dose-dependent manner, especially with 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in the NAc, PFC, and VTA. In Experiment 2, the conditioned place preference (CPP) protocol showed that both fentanyl-treated groups preferred the drug-paired compartment, indicating associative memory formation. Arc expression paralleled behavioral results, being elevated in the conditioned groups but not in the control group assessed after pre-conditioning. Thus, fentanyl is shown to induce synaptic plasticity in key reward system regions, with prominent Arc activation. This activation suggests long-lasting molecular changes associated with addiction. Arc may serve as a functional marker of vulnerability to opioid-induced neuroadaptation.

**Keywords:** Behavioral sensitization; Conditioning; Fentanyl; ARC; Neuroplasticity; Opioids.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Arc** – Proteína Associada ao Citoesqueleto Regulada por Atividade

**BLA** – Amígdala Basolateral

**CPF** – 0000000000 Pré-Frontal Medial

**dCA1** – Hipocampo dorsal (área CA1)

**FEN** – Fentanil

**HL** – Hipotálamo Lateral

**NAc** – Núcleo Accumbens

**PCL** – Preferência Condicionada por Lugar

**RMTg** – Área Tegmental Rostromediana

**s.c.** – Subcutâneo

**VTA** – Área Tegmental Ventral

**VEI** – Veículo (grupo controle)

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                         |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <b>Figura 1-</b> Ondas da crise dos opioides nos Estados Unidos.....                                    |  |
| <b>Figura 2-</b> Aumento das prescrições de opiáceos no Brasil.....                                     |  |
| <b>Figura 3-</b> Circuito de recompensa: cérebro saudável <i>versus</i> no contexto da dependência..... |  |
| <b>Figura 4-</b> Aparato de preferência condicionada por lugar.....                                     |  |
| <b>Figura 5-</b> Esquema mecanismo de ação dos opioides.....                                            |  |
| <b>Figura 6-</b> A ação do fentanil sobre receptores $\mu$ -opioides na RMTg.....                       |  |
| <b>Figura 7-</b> Esquematização da metodologia do experimento 1.....                                    |  |
| <b>Figura 8-</b> Esquematização da metodologia do experimento 2.....                                    |  |
| <b>Figura 9-</b> Atividade locomotora experimento 1A.....                                               |  |
| <b>Figura 10-</b> Atividade locomotora em 6 intervalos de 5 minutos experimento 1A.....                 |  |
| <b>Figura 11-</b> Expressão da proteína Arc nas áreas encefálicas do experimento 1A.....                |  |
| <b>Figura 12-</b> Imunomarcagem da proteína Arc do experimento 1A.....                                  |  |
| <b>Figura 13-</b> Atividade locomotora experimento 1B.....                                              |  |
| <b>Figura 14-</b> Expressão da proteína Arc nas áreas encefálicas do experimento 1B.....                |  |
| <b>Figura 15-</b> Imunomarcagem da proteína Arc do experimento 1B.....                                  |  |
| <b>Figura 16-</b> Atividade locomotora experimento 1C.....                                              |  |

|                                                                                               |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <b>Figura 17-</b> Expressão da proteína Arc nas áreas encefálicas do experimento 1C.....      |  |
| <b>Figura 18-</b> Imunomarcação da proteína Arc do experimento 1C.....                        |  |
| <b>Figura 19-</b> Atividade locomotora experimento 1D.....                                    |  |
| <b>Figura 20-</b> Expressão da proteína Arc nas áreas encefálicas do experimento 1D.....      |  |
| <b>Figura 21-</b> Imunomarcação da proteína Arc do experimento 1D.....                        |  |
| <b>Figura 22-</b> Comparação da expressão da proteína Arc entre os Experimentos 1A e 1B.....  |  |
| <b>Figura 23-</b> Comparação da expressão da proteína Arc entre os Experimentos 1C e 1D.....  |  |
| <b>Figura 24-</b> Resultados do teste de preferência condicionada por lugar.....              |  |
| <b>Figura 25-</b> Expressão da proteína Arc nas áreas encefálicas do experimento 2A e 2B..... |  |
| <b>Figura 26-</b> Imunomarcação da proteína Arc do experimento 2A e 2B.....                   |  |



## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) dependência química é uma doença crônica, progressiva e multifatorial, que envolve alterações neurobiológicas e psicossociais. Essa condição é caracterizada por uma compulsão persistente para o uso de substâncias psicoativas, mesmo diante de consequências adversas, além de uma elevada propensão à recaída (Koob e Le Moal, 1997; Volkow, 2010). As opções terapêuticas atualmente disponíveis são limitadas, em parte devido ao conhecimento ainda insuficiente sobre as modificações neurais subjacentes ao desenvolvimento e manutenção da dependência. Essa condição resulta de uma interação complexa entre fatores genéticos, neurobiológicos, ambientais e sociais, que modulam a vulnerabilidade individual à instalação da doença e sua progressão. (Volkow; Koob; Mclellan, 2016).

A dependência de opioides representa um dos maiores desafios de saúde pública na atualidade, especialmente em países como os Estados Unidos. A chamada "crise dos opioides" tem sido marcada por um crescimento alarmante no uso, abuso e dependência dessas substâncias, sejam elas prescritas ou ilícitas, resultando em consequências devastadoras para indivíduos, famílias e comunidades (Ciccarone, 2018). De acordo com o Relatório Mundial sobre Drogas (UNODC, 2023), o fentanil — um opioide sintético altamente potente — transformou significativamente o mercado de opioides na América do Norte. Em 2021, a maioria das quase 90 mil mortes por overdose relacionadas a opioides na região envolveu fentanil de fabricação ilícita.

No Brasil, embora a crise relacionada ao uso de opioides ainda não atinja os mesmos níveis observados em países como os Estados Unidos, os dados apontam uma tendência preocupante de crescimento. Segundo informações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), o número de prescrições médicas de opiáceos comercializados em farmácias aumentou de 1.601.043 em 2009 para 9.045.945 em 2015, representando um crescimento de 465% (Krawczyk et al., 2018). Além do uso terapêutico, nos últimos anos, a Polícia Federal tem registrado apreensões significativas

de fentanil e outras substâncias opioides, indicando também sua circulação ilícita no país.

O fentanil é um agonista potente dos receptores  $\mu$ -opioides e induz dependência por meio de mecanismos neurobiológicos complexos. A sua ligação a esses receptores desencadeia a liberação de neurotransmissores, como a dopamina, em circuitos cerebrais relacionados à recompensa e à motivação (Han et al., 2019). A ativação repetida desses circuitos ocorre por meio de processos de aprendizagem e promove neuroplasticidade sináptica, facilitando a formação de memórias associativas entre os efeitos do fentanil e os estímulos ambientais relacionados ao seu uso. Essas memórias mal adaptadas são consolidadas em regiões como o córtex pré-frontal e o núcleo accumbens, sustentando o comportamento compulsivo de busca pela droga (Milton e Everitt, 2012).

Os processos de aprendizagem envolvidos no condicionamento e na sensibilização comportamental são mediados por mecanismos de neuroplasticidade. Durante o condicionamento clássico e operante, a formação de associações entre estímulos e respostas desencadeia modificações na conectividade sináptica entre neurônios (Volkow et al., 2019). O crescimento dendrítico, em particular, é uma manifestação estrutural importante da neuroplasticidade induzida por aprendizagem, envolvendo a expansão e a ramificação dos dendritos — estruturas especializadas na recepção de sinais sinápticos. Esse processo amplia a área disponível para formação de novas sinapses, facilitando a comunicação entre neurônios envolvidos na consolidação da memória (Kutlu e Gould, 2016).

A proteína Proteína Associada ao Citoesqueleto Regulada por Atividade (Arc), é uma molécula de expressão induzida por atividade neuronal, que desempenha papel central na regulação da plasticidade sináptica e na consolidação da memória. Sua expressão é rapidamente induzida por estímulos que provocam atividade neuronal intensa e prolongada, como nos processos de aprendizagem (Tzingounis e Nicoll, 2006). Uma vez sintetizada, a Arc é transportada para as sinapses, onde

influencia a morfologia dendrítica e a composição sináptica. Estudos demonstram que essa proteína promove a formação de novas espinhas dendríticas e modula a força sináptica, destacando-se como um elo fundamental entre atividade neural, plasticidade sináptica e memória (Nikolaienko et al., 2017).

A preferência condicionada de lugar (PCL) é um modelo experimental amplamente utilizado para investigar aprendizagem associativa, no qual o animal associa determinado ambiente aos efeitos de uma substância ou estímulo específico. No contexto dos opioides, estudos demonstram que animais expostos a essas drogas em ambientes específicos desenvolvem preferência pelos locais associados ao uso, refletindo o poder reforçador e os efeitos prazerosos induzidos por essas substâncias. A compreensão dos mecanismos envolvidos na PCL induzida por opioides fornece subsídios importantes sobre os circuitos neurais e processos de aprendizagem relacionados à dependência (Piccin et al., 2022).

O presente estudo tem como objetivo investigar o efeito de diferentes doses de fentanil na habituação ao ambiente experimental e no desenvolvimento de uma resposta locomotora sensibilizada, dependente do contexto. Além disso, pretende-se examinar o papel do fentanil na aquisição de uma memória associativa à droga, por meio do modelo de preferência condicionada de lugar, e avaliar a expressão da proteína Arc em regiões encefálicas relacionadas à dependência: córtex pré-frontal medial (CPF), núcleo accumbens (NAc), área tegmental ventral (VTA), amígdala basolateral (BLA), hipotálamo lateral (LH) e hipocampo dorsal (dCA1). Ao explorar esses aspectos, o estudo busca contribuir para o entendimento dos mecanismos neurobiológicos que sustentam os efeitos comportamentais e moleculares do fentanil em estruturas cerebrais envolvidas nos circuitos de recompensa e no desenvolvimento da dependência a opioides.

## **2. JUSTIFICATIVA**

A exposição repetida a drogas de abuso pode induzir alterações duradouras no sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, o qual

desempenha papel crucial na modulação de estímulos relacionados à recompensa. Essas mudanças neuroadaptativas afetam a sensibilidade dos circuitos neurais envolvidos na percepção e busca por recompensas, favorecendo o uso compulsivo de substâncias e o desenvolvimento da dependência (Robinson e Kolb, 1997).

O sistema mesocorticolímbico, com origem na área tegmental ventral (VTA), projeta-se para diversas regiões encefálicas, incluindo o núcleo accumbens (NAc), o córtex pré-frontal medial (CPF), a amígdala basolateral (BLA) e o hipotálamo lateral (LH), constituindo um circuito fundamental para os processos de motivação, recompensa, tomada de decisão e aprendizagem associativa. A amígdala basolateral está envolvida na atribuição de valor emocional aos estímulos, especialmente no processamento de pistas associadas ao uso de drogas, contribuindo para a formação de memórias relacionadas ao reforço. O hipotálamo lateral, por sua vez, integra sinais motivacionais e homeostáticos, modulando a busca por recompensas e a ativação de comportamentos dirigidos à obtenção da droga (Steketee, 2003; Baik, 2013; Mai et al., 2019; Nieh et al., 2016).

O hipocampo, por sua vez, exerce papel central na orientação espacial e na formação de memória contextual. A ação dos opioides pode alterar a plasticidade sináptica nessa região, desencadeando comportamentos relacionados ao desejo intenso e à busca por drogas. Evidências indicam que as conexões do hipocampo com a concha do NAc são essenciais para o controle funcional dessa estrutura (Britt et al., 2012).

A morfologia dendrítica é considerada uma medida fundamental da plasticidade sináptica, uma vez que os espinhos dendríticos representam os principais locais de contato sináptico entre neurônios. Alterações estruturais nesses espinhos — como o aumento de seu volume — estão associadas ao fortalecimento sináptico por meio da potenciação de longo prazo (LTP). Tais mudanças refletem adaptações funcionais nos circuitos neurais e influenciam diretamente a eficiência da comunicação sináptica e o processamento da informação no sistema nervoso central (Matsuzaki et al., 2004).

A proteína Arc exerce papel central na plasticidade sináptica, atuando como reguladora da expressão gênica e da internalização de receptores de neurotransmissores. Sua expressão está associada a estímulos de longa duração e a processos de aprendizagem e consolidação da memória. Adicionalmente, aspectos morfológicos dendríticos — como a densidade e a forma dos espinhos — afetam diretamente a eficácia da transmissão sináptica. Assim, a análise integrada da expressão da proteína Arc e da morfologia dendrítica permite uma compreensão mais abrangente dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nos processos de aprendizagem e memória (Yakout et al., 2020).

Apesar de alterações na complexidade dendrítica induzidas por morfina e pelo contexto ambiental nas estruturas do circuito de recompensa já estarem bem descritas na literatura (Robinson; Kolb, 1999; Kobrin et al., 2016; Spiga et al., 2005; Diana, 2006), ainda se sabe pouco sobre essas alterações induzidas pelo fentanil — um opioide sintético com potência estimada entre 50 a 100 vezes superior à da morfina —, que tem se tornado um grave problema de saúde pública nos últimos anos (Han et al., 2019).

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

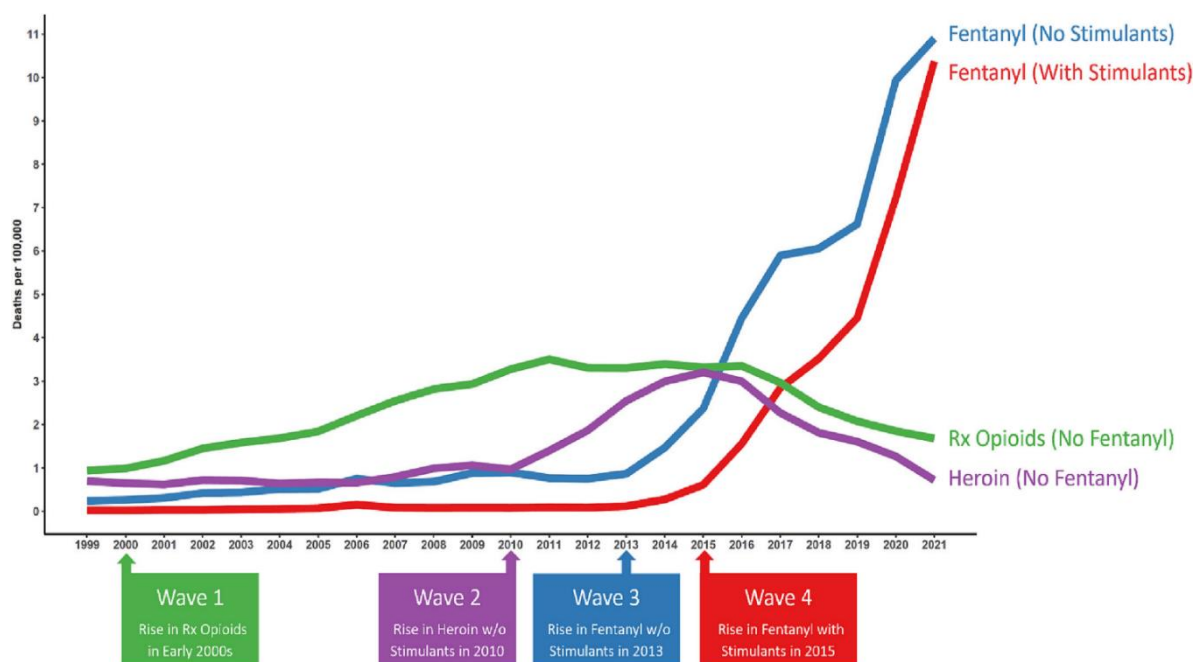
#### **3.1. Dependência de Opioides, Sensibilização Comportamental**

##### **3.1.1. Conceito de Dependência e Sensibilização**

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a dependência química é definida como um "conjunto de fenômenos comportamentais, cognitivos e fisiológicos que se desenvolvem após o uso repetido de uma substância". Essa condição envolve uma série de mudanças no encéfalo e no comportamento do indivíduo, tornando compulsiva a busca e o consumo da droga apesar das consequências adversas. A dependência química é classificada como uma doença crônica e progressiva, ou seja, se desenvolve lentamente, piora ao longo do tempo e pode perdurar por toda a vida. Além disso, é marcada por uma alta propensão à recaída, o que significa que mesmo após períodos sem o uso da substância, a pessoa pode voltar ao uso da droga devido à compulsão

e à incapacidade de controlar o impulso, e por isso, é de difícil tratamento (Hornberger e Chhatwal, 2021).

A dependência, embora possa se desenvolver em relação a diferentes tipos de substâncias, tem ganhado destaque, especialmente no cenário norte americano, em torno do uso de opioides. Os Estados Unidos, têm enfrentado uma grave crise de opioides, o uso dessas substâncias, especialmente o fentanil, uma das formas mais potentes, tem resultado em um alarmante número de overdoses no país (Friedman e Shover, 2023.). Os Estados Unidos registraram um número recorde de mais de 106 mil mortes por overdose, resultado tanto do uso de drogas ilícitas quanto de opioides prescritos. Esse número marcou o pior índice já observado na crise de opioides e outras substâncias no país. (UNODC, 2021). Entre os principais fatores que contribuíram para essa crise estão a prescrição excessiva de opioides por profissionais de saúde, a falta de conscientização sobre os riscos associados a essas substâncias e a crescente disponibilidade de opioides ilícitos, como a heroína.

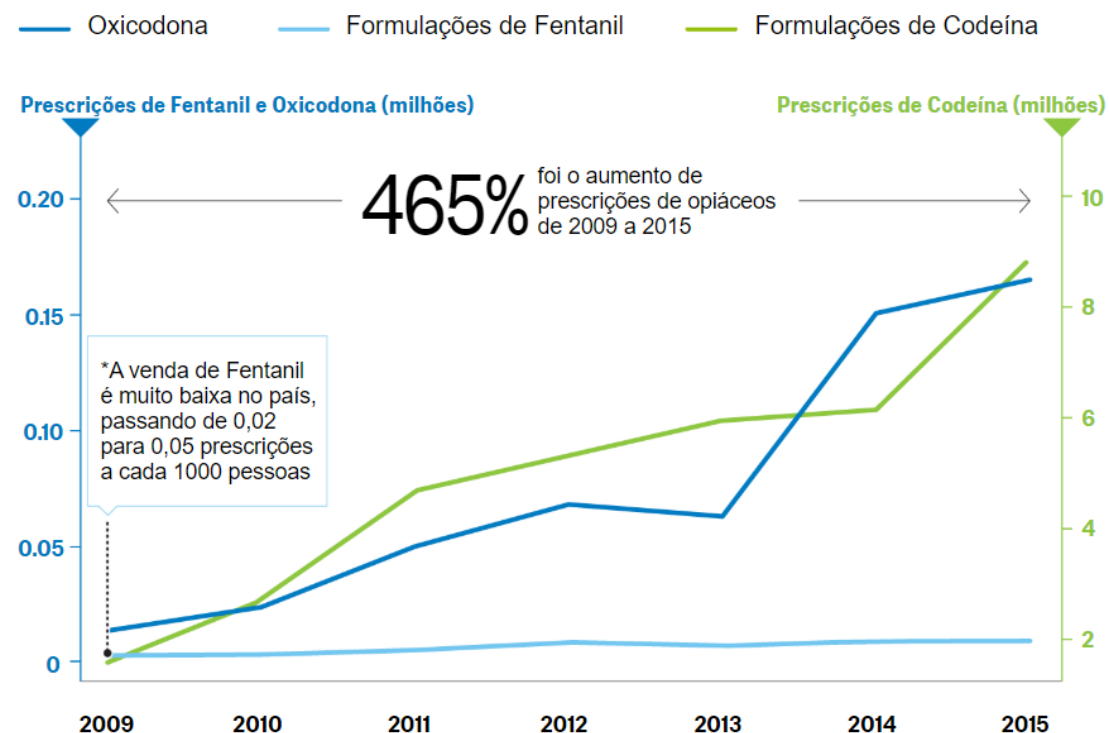


**Figura 1.** Este gráfico mostra as quatro ondas da crise dos opioides nos Estados Unidos. A faixa azul representa as mortes por overdose de fentanil, enquanto a vermelha, a soma de fentanil e estimulantes. Fonte: Addiction, First published: 13 September 2023.

Embora no Brasil não se observe um cenário semelhante à crise dos Estados Unidos, o aumento no abuso dessas substâncias e a dependência decorrente desse uso são preocupações relevantes. De acordo com (Piovezan et al. 2021), a literatura médica ainda apresenta poucas informações atualizadas sobre o uso de opioides no contexto brasileiro, porém, o 4º Informe do Subsistema de Alerta Rápido sobre Drogas (SAR) de Maio de 2023 informou que desde 2009, a Polícia Federal registrou diversas apreensões, entre elas 990 frascos de Fentanest na operação "Batizado" em 2015 e a prisão de envolvidos no desvio de fentanil de hospitais para comercialização por traficantes em 2019, durante a "Operação Ampulla". Mais recentemente, em 2023, a Polícia Civil do Espírito Santo apreendeu 31 frascos, reforçando a preocupação com o desvio dessa substância. Esse cenário de apreensões e desvios de opioides no Brasil levanta a necessidade de compreender os processos que tornam essas substâncias tão desejadas e difíceis de abandonar.

## Panorama da droga

Crescimento na demanda gera alerta entre especialistas



Fonte: Anvisa

O GLOBO

**Figura 2.** Aumento de vendas de opiáceos, a partir das prescrições médicas, no período de 2009 a 2015 no Brasil. Em azul, prescrições de Fentanil e Oxycodona, e em verde, prescrições de Codeína. Fonte: "Rising trends of Prescription Opioid Sales in Contemporary Brazil, 2009-2015", publicado no American Journal of Public Health (AJPH) em abril de 2018.

Entre as diversas abordagens para compreender os mecanismos subjacentes a esse problema, surge a teoria da formação de memórias aberrantes ou mal adaptadas. Essa teoria sugere que a dependência química pode, em parte, ser atribuída a alterações na formação e consolidação de memórias associadas ao uso de substâncias (Diciano e Everitt, 2004). Em condições normais, o cérebro humano é capaz de aprender com as experiências, formando memórias que são essenciais para a adaptação e sobrevivência. No entanto, quando se trata da dependência química, esse processo pode ser desviado de maneira prejudicial. A exposição repetida a substâncias psicoativas pode levar à criação de memórias mal adaptadas, que perpetuam o ciclo da dependência (Hyman, Malenka, e Nestler, 2006).



Esse conceito está intimamente relacionado à ideia de sensibilização comportamental, um fenômeno que descreve como a exposição repetida a um estímulo pode intensificar a resposta comportamental a ele. No contexto da dependência, a sensibilização comportamental ocorre quando, após o uso repetido de uma droga, o indivíduo se torna cada vez mais sensível aos estímulos que se associam à droga ou ao seu consumo (Li et al., 2022). Em ratos, a administração repetida de morfina leva a uma sensibilização no comportamento do animal, o que significa que, com o tempo, ele desenvolve uma resposta mais intensa à mesma dose de morfina. Esse aumento nas respostas comportamentais, como a atividade locomotora, é um exemplo claro de sensibilização comportamental (Dias et al., 2021).

### 3.1.2. Mecanismos Neurais da Dependência em Opioides

A dependência em substâncias está correlacionada com alterações generalizadas no encéfalo, sendo crucial destacar um dos sistemas neurais fundamentais afetados pelas drogas de abuso: o circuito cortico-estriatal límbico ou sistema de recompensa (Everitt et al., 2001). Este circuito desempenha um papel essencial na regulação da motivação, recompensa, aprendizagem e memória, e é altamente conservado entre diversas espécies, abrangendo humanos, primatas e roedores. A pesquisa que investiga os circuitos neurais relacionados à dependência frequentemente utiliza modelos de roedores, oferecendo resultados valiosos nesse campo (Milton e Everitt, 2012).

O sistema de recompensa desempenha um papel crucial na formação de memórias associadas ao prazer. Quando um indivíduo realiza atividades que são percebidas como gratificantes, como comer, socializar, ou alcançar metas pessoais, ocorre uma liberação de dopamina no núcleo accumbens. Essa liberação de dopamina cria uma sensação de prazer e recompensa, motivando o indivíduo a repetir o comportamento que levou a essa experiência positiva (Somalwar et al., 2018). A dopamina é um neurotransmissor endógeno que pertence à família das catecolaminas. Sua síntese ocorre tanto na substância nigra quanto na área tegmental ventral (VTA). O sistema dopaminérgico compreende pelo menos cinco tipos de

receptores, conhecidos como D1, D2, D3, D4 e D5. Os receptores D1 estão envolvidos na mediação dos efeitos reforçadores da dopamina, enquanto os receptores D2 estão associados ao controle da motivação e da busca por recompensas. A dopamina desempenha um papel fundamental no controle de diversas funções cerebrais, incluindo cognição, humor, aprendizado, memória e regulação emocional (Matsumoto et al., 2005).

Existem vários tipos de receptores opioides no encéfalo, incluindo os receptores  $\mu$  (mu),  $\delta$  (delta) e  $\kappa$  (kappa). Os receptores  $\mu$ -opíoides são os principais alvos dos opioides exógenos e endógenos (produzidos pelo corpo). Quando os opioides se ligam aos receptores  $\mu$ -opíoides em neurônios, inibe a liberação de neurotransmissores, incluindo a glicina e GABA, levando a um aumento da dopamina circulante no sistema nervoso central (Yamakage e Namiki, 2002). Quando uma substância química é introduzida no organismo, especialmente aquelas que estimulam o sistema de recompensa, o cérebro associa a experiência a sensações agradáveis. Essas associações podem ser tão intensas que o cérebro passa a priorizar a busca por essas substâncias em detrimento de outras atividades essenciais. A exposição repetida a substâncias psicoativas pode alterar a estrutura e a função cerebral, resultando em comportamentos compulsivos. A aprendizagem associativa é um conceito-chave nessa teoria. Quando uma pessoa consome uma substância que causa prazer (como os opioides mencionados anteriormente), o cérebro associa a experiência do uso da substância com sentimentos de recompensa e prazer (Feltenstein e See, 2013).

### 3.1.3. Áreas do Circuito de Recompensa

O circuito de recompensa é composto por uma rede de estruturas encefálicas interconectadas que regulam a motivação, o aprendizado associativo, a tomada de decisão e o comportamento dirigido à recompensa. Esse sistema tem como base a via mesocorticolímbica dopaminérgica, que se origina na área tegmental ventral (VTA) e projeta-se para regiões como o núcleo accumbens (NAc), córtex pré-frontal medial (CPF), amígdala basolateral (BLA), hipotálamo lateral (LH) e hipocampo. A

integração funcional dessas estruturas está diretamente envolvida nos efeitos neurobiológicos das drogas de abuso, inclusive no desenvolvimento da dependência química (Steketee, 2003; Baik, 2013).

A VTA exerce papel central na modulação da atividade dopaminérgica no sistema de recompensa. A ativação dos neurônios dopaminérgicos da VTA por opioides, como o fentanil, promove a desinibição desses neurônios via inibição de interneurônios GABAérgicos, resultando em aumento da liberação de dopamina no NAc e em outras regiões-alvo (DU et al., 2021). Tal mecanismo está associado à ativação reforçadora da droga e ao reforço de comportamentos relacionados à sua busca e consumo (Feltenstein e See, 2013).

O NAc é uma estrutura-chave na avaliação de estímulos prazerosos e no direcionamento da motivação. Em condições fisiológicas, participa da regulação de comportamentos voltados à obtenção de recompensas naturais (Castro e Buchas, 2019). No entanto, no contexto da dependência, o uso repetido de opioides promove uma hipersensibilização do NAc a estímulos associados à droga, intensificando a liberação dopaminérgica e favorecendo o comportamento compulsivo de busca (Liu et al., 2021). A alteração da comunicação funcional entre o NAc e o CPF compromete a capacidade de autocontrole e avaliação de consequências.

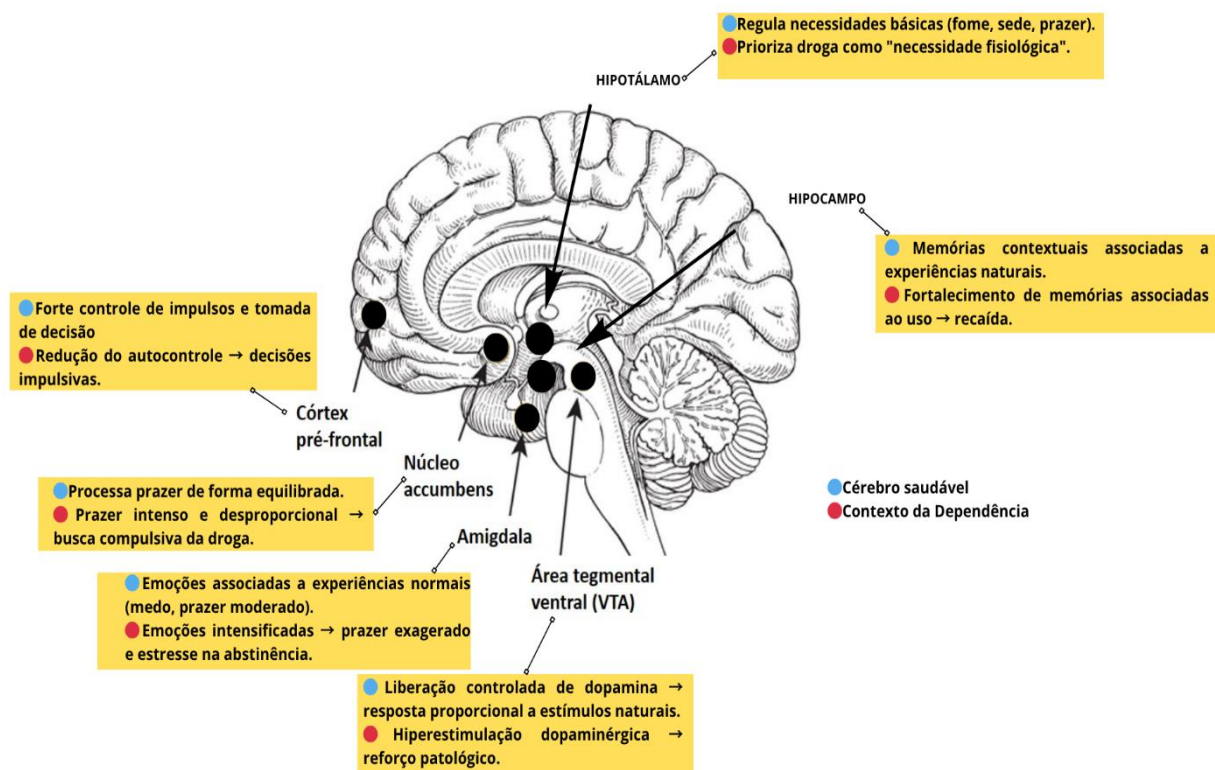
O CPF é responsável por funções executivas, como tomada de decisão, controle inibitório e planejamento. Em cérebros dependentes, sua atividade é prejudicada, o que reduz a capacidade de resistir à busca compulsiva pela droga e intensifica a vulnerabilidade à recaída (Goldstein e Volkow, 2011; Koob e Volkow, 2016). Além disso, a exposição a opioides induz alterações na expressão de proteínas relacionadas à plasticidade sináptica no CPF, como a Arc, indicando seu envolvimento na consolidação de memórias associativas à droga (Li et al., 2013).

A BLA contribui significativamente para a codificação emocional de memórias associadas ao uso de substâncias. Ela participa da formação de associações entre estímulos ambientais e os efeitos reforçadores da droga, influenciando o comportamento de busca e o risco de recaída (Feltenstein e See, 2008). Estudos demonstram que a BLA apresenta aumento na

expressão de proteínas relacionadas à plasticidade, como a Arc, após exposição a opioides (Wang et al., 2019).

O hipocampo, especialmente sua porção CA1 dorsal, é essencial na formação de memórias contextuais associadas à experiência com a droga. Suas projeções glutamatérgicas para a concha do NAc são críticas na modulação do comportamento de busca por substâncias (Portugal et al., 2014; Britt et al., 2012). A inativação seletiva dessas vias reduz a reinstalação do comportamento induzido por contexto, evidenciando seu papel na memória associativa da dependência (Dias et al., 2021).

O LH, embora tradicionalmente relacionado à regulação da ingestão alimentar e da sede, está envolvido em aspectos motivacionais e no comportamento dirigido à recompensa. Ele recebe projeções do CPF, BLA e hipocampo, e se conecta à VTA e ao NAc, influenciando a motivação para buscar a droga (Berthoud, 2002; Nieh et al., 2016). Além disso, há evidências de que opioides modulam a expressão de proteínas como Arc no LH, contribuindo para alterações neuroadaptativas envolvidas na dependência (Yakout et al., 2020).



**Figura 3.** Função do circuito de recompensa, cérebro saudável *versus* no contexto da dependência.

### 3.2. Proteína Associada ao Citoesqueleto Regulada por Atividade (ARC)

A proteína Arc é um produto do gene precoce imediato (IEG) expressa em neurônios em resposta à atividade neural (Yakout et al., 2020). Seu papel principal está vinculado à regulação da plasticidade sináptica. A Arc é uma molécula essencial em processos sinápticos associados à formação e consolidação da memória de longo prazo (Bramham et al., 2010). Durante eventos de aprendizado, a expressão da Arc é induzida, destacando seu papel como marcador molecular para a atividade sináptica. Uma das contribuições proeminentes da Arc é sua influência na organização do citoesqueleto neuronal. Ela desempenha um papel ativo na modulação da morfologia sináptica, impactando a estrutura e a estabilidade das conexões entre neurônios (Nikolaienko et al., 2017).

A plasticidade sináptica refere-se à capacidade das sinapses, as conexões entre os neurônios, de se modificar em resposta à atividade neural. É um fenômeno essencial para o funcionamento do sistema

nervoso, desempenhando um papel fundamental em processos como aprendizagem e memória. Existem dois tipos principais de plasticidade sináptica: a potenciação de longa duração (LTP) e a depressão de longa duração (LTD) (Tzingounis e Nicoll, 2006). A plasticidade sináptica, especialmente a LTP, desempenha um papel crítico na formação e consolidação da aprendizagem e memória no sistema nervoso. Durante a aprendizagem, a exposição a estímulos relevantes ou a tarefas desafiadoras pode levar à indução de LTP em sinapses específicas. Esse fortalecimento sináptico está associado à aquisição de novas informações.

Após a aprendizagem, a consolidação da memória envolve a estabilização de mudanças sinápticas induzidas pela LTP. Sinapses fortalecidas pela plasticidade sináptica proporcionam uma base física para a retenção de informações. A manutenção dessas alterações sinápticas sustenta a memória ao longo do tempo. A proteína Arc desempenha um papel essencial na formação da memória de longo prazo, influenciando diversas formas de plasticidade sináptica. (Korb e Finkbeiner, 2011).

O circuito mesocorticolímbico desempenha um papel crucial na regulação de processos motivacionais, recompensa e emoção no encéfalo. A proteína Arc é um componente importante neste circuito, influenciando a resposta a estímulos de recompensa (Yakout et al., 2020). A atividade neuronal nesse circuito é influenciada por uma variedade de sinais, incluindo estímulos ambientais e neuromoduladores como a dopamina. Estudos indicam que a expressão da proteína Arc é regulada por atividades sinápticas e estímulos de recompensa nesse contexto. Por exemplo, a exposição a drogas de abuso, como a heroína ou a morfina, induz a expressão rápida da Arc em áreas do circuito mesocorticolímbico, como o NAc e o CPF (Li et al., 2013).

Quando os opioides interagem com os receptores opioides no encéfalo, especialmente os receptores  $\mu$ -opioides, eles ativam vias de sinalização intracelular. Essas vias podem incluir a ativação de proteínas G e a modulação da liberação de neurotransmissores, incluindo a dopamina. A dopamina pode influenciar a expressão gênica em neurônios dopaminérgicos e em neurônios pós-sinápticos que expressam receptores

de dopamina (Yamakage e Namiki, 2002). A ativação desses receptores pode desencadear a fosforilação de fatores de transcrição, regulando a transcrição de genes específicos, incluindo genes associados à plasticidade sináptica. Estudos sugerem que a expressão da Arc é aumentada em situações de alta atividade neuronal, como a estimulação dopaminérgica. Isso pode ocorrer por meio da ativação de fatores de transcrição que regulam diretamente o gene ARC (Zhou et al., 2022).

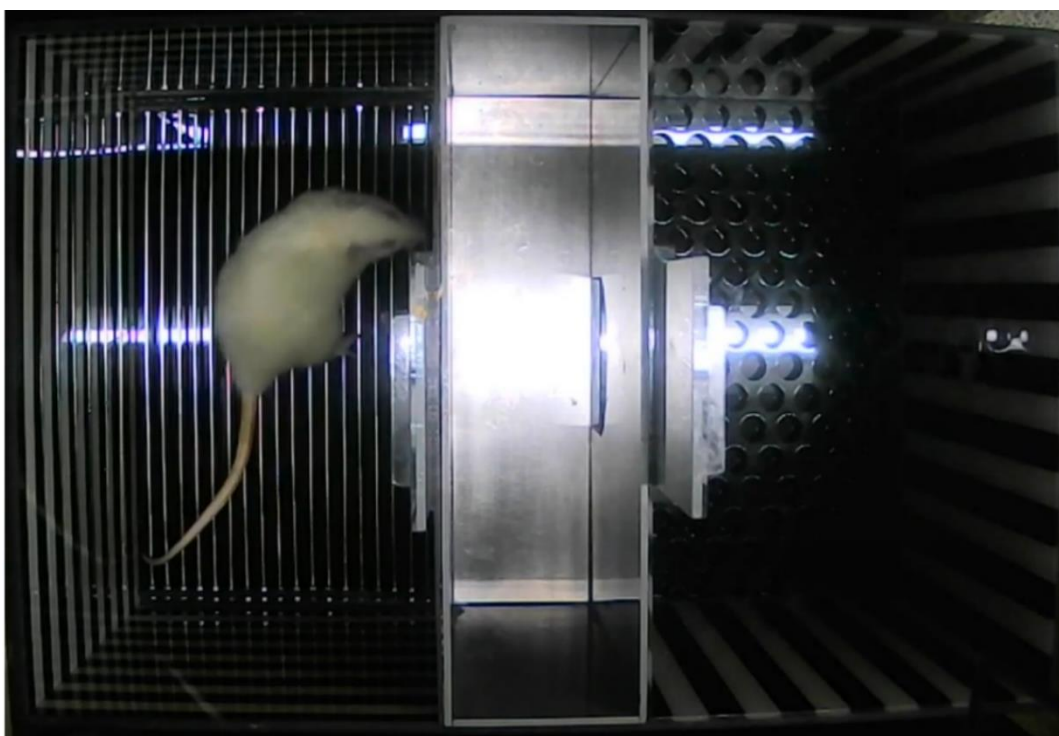
A Arc é encontrada predominantemente no sistema nervoso central, especialmente em regiões do encéfalo relacionadas à memória e ao aprendizado, como o hipocampo, o córtex pré-frontal medial e a amígdala. Ela é expressa em neurônios e transportada para locais específicos dentro da célula, como dendritos e espinhas dendríticas, onde exerce suas funções de modulação da plasticidade sináptica (Li et al., 2013). Uma característica única da proteína Arc é sua semelhança funcional com retrovírus, formando estruturas semelhantes a capsídeos capazes de transferir material genético entre neurônios. Isso sugere que, além de regular a plasticidade sináptica, a Arc desempenha um papel na comunicação intercelular, ampliando sua relevância para processos neurais mais amplos (Mabb e Ehlers, 2017).

Pesquisas recentes têm investigado a relação entre a proteína Arc e os efeitos dos opioides no cérebro (Lv, Han e Cui, 2011; Khalifa et al., 2024). Os opioides são conhecidos por alterar a plasticidade sináptica e a expressão de Arc em regiões cerebrais críticas, como o núcleo accumbens e o hipocampo, influenciando diretamente os circuitos de recompensa e memória associados ao comportamento de busca por drogas. Essas alterações desempenham um papel central nos mecanismos de dependência.

### **3.3. Preferência Condicionada de Lugar**

A preferência condicionada de lugar (PCL) é um fenômeno comportamental comumente observado em animais, onde a exposição a estímulos positivos ou negativos em um local específico leva ao desenvolvimento de uma preferência por esse local. Este tipo de aprendizado está associado a processos de condicionamento clássico e

envolve a formação de associações entre o local e as consequências das experiências (Napier, Herrold e De Wit, 2013) Em experimentos típicos que exploram a preferência condicionada de lugar, um organismo, como um rato, é colocado em um ambiente onde recebe uma recompensa (como comida) ou um estímulo aversivo (como um choque elétrico). Ao longo do tempo, o animal associa esse estímulo com o local específico em que ocorreu. Como resultado, ele desenvolve uma preferência ou evitação por esse lugar, dependendo da natureza do estímulo (Voigt et al., 2011)



**Figura 4.** Aparato de preferência condicionada por lugar composto por três compartimentos: dois laterais distintos onde são feitas as associações entre ambiente e estímulo (droga ou salina), e um compartimento central neutro, que permite o acesso livre entre os lados durante o teste. A preferência é avaliada pelo tempo que o animal passa em cada compartimento.

A PCL em contextos relacionados à dependência química refere-se à associação entre ambientes específicos e o consumo de substâncias psicoativas. Essa relação é particularmente evidente em pesquisas sobre o condicionamento ambiental e seus impactos no comportamento de busca de drogas. O condicionamento clássico desempenha um papel crucial nesse processo, onde um estímulo neutro, como o ambiente, torna-se



associado a um estímulo incondicionado, como os efeitos da droga (Albino, 2014). Essa repetida exposição pode resultar na formação de preferências condicionadas por lugar, onde o ambiente específico está vinculado aos efeitos psicoativos da substância (Voigt et al., 2011). Comportamentos relacionados a drogas podem ser desencadeados e perpetuados por estímulos associados aos efeitos de uma substância. Na ausência da própria droga, esses estímulos são capazes de sustentar e reavivar a busca pelo comportamento de uso de drogas em experimentos com ratos (Mueller, Perdikaris e Stewart, 2002). A Preferência Condicionada de Lugar em ratos é uma metodologia experimental amplamente utilizada em estudos neurocomportamentais para avaliar a relação entre a exposição a substâncias, como drogas de abuso, e as preferências condicionadas associadas a ambientes específicos (Tzschentke, 1995).

Estudos investigaram os efeitos da exposição prolongada à morfina e outros estímulos considerados naturais, como comida, na formação de preferência condicionada por lugar em ratos. Os resultados demonstraram uma associação entre o ambiente experimental e os efeitos reforçadores da morfina que conseguem suprimir os outros estímulos, indicando a formação de preferência condicionada por lugar em resposta à exposição crônica a esse opioide (Piccin et al., 2022).

Os experimentos de PCL ajudam a mapear os circuitos cerebrais e os mecanismos neurobiológicos subjacentes ao desenvolvimento de preferências condicionadas, contribuindo para a compreensão do vício e comportamento associado a substâncias psicoativas. Esse paradigma fornece um modelo comportamental valioso para estudar a relação entre ambientes, experiências e resposta a substâncias, sendo útil para explorar novos tratamentos e estratégias preventivas (Finlay et al., 1988).

### **3.4. Fentanil**

O fentanil, um opioide sintético, foi desenvolvido na década de 1960 por Paul Janssen como uma alternativa à morfina. Destacando-se por sua potência cerca de 50 a 100 vezes maior que a morfina, ele oferece alívio analgésico eficaz em doses relativamente baixas. Apesar de sua utilidade clínica, o fentanil está associado a sérios riscos. Sua elevada potência

aumenta consideravelmente o perigo de overdose e a mistura de fentanil com outras drogas, especialmente em substâncias ilícitas, apresenta sérios riscos à saúde pública. A prática de adulterar drogas com fentanil tem contribuído significativamente para a crise de overdose de opioides (Han et al., 2019).

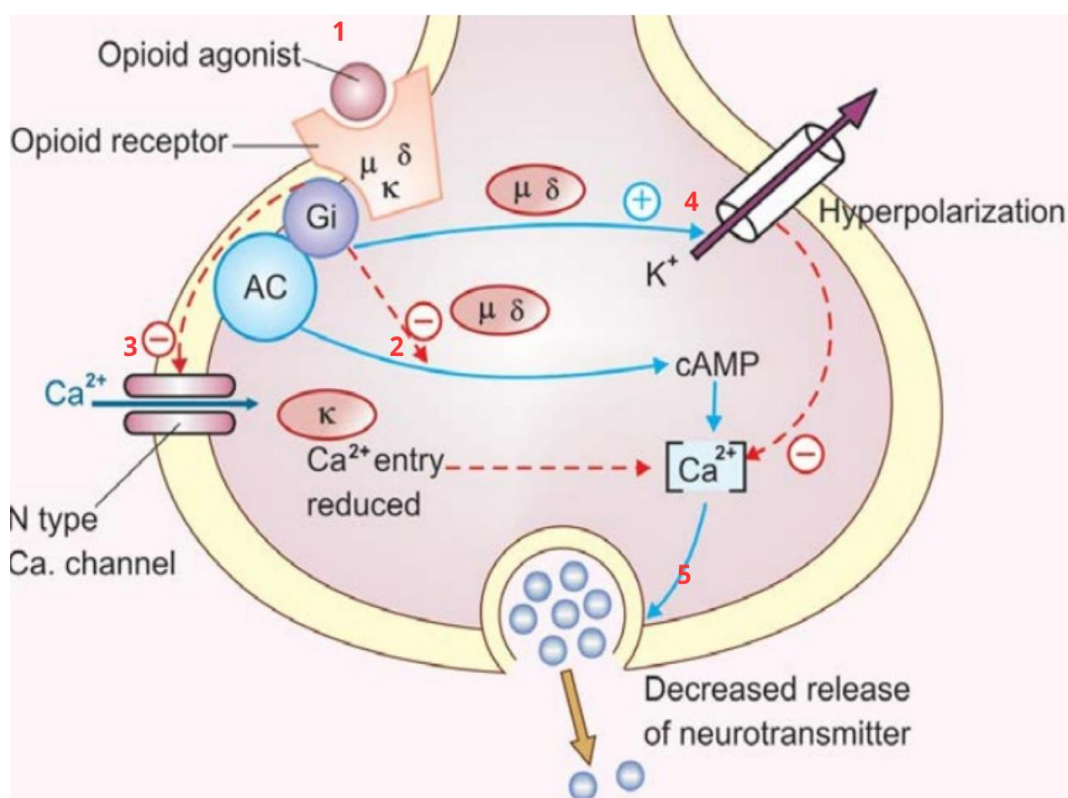
O fentanil é classificado como um agonista opioide sintético e lipofílico, pertencente à classe química da fenilpiperidina, diferentemente da morfina, que é um alcaloide natural extraído da papoula do ópio. Além disso, é interessante observar que a meia-vida de eliminação/depuração é comparável entre fentanil e morfina, com uma  $t_{1/2}$  de 2–4 horas para o fentanil e 2 horas para a morfina (Comer e Cahill, 2019). O fentanil é associado a efeitos recompensadores, indicando um potencial de abuso. A utilização repetida dessa substância conduz à progressiva tolerância e dependência. Os tratamentos disponíveis para a dependência de fentanil, como a terapia medicamentosa com agonistas parciais ou antagonistas opioides, podem ajudar a reduzir os sintomas de abstinência e os desejos, mas ainda há limitações em sua eficácia (Kuczyńska, et al., 2018).

O principal alvo molecular do fentanil é o receptor opioide mu (MOR) que estão acoplados à proteína G. Esses receptores, abundantemente distribuídos no sistema nervoso central, desempenham um papel crucial na regulação da dor. Quando o fentanil se liga aos receptores mu, a proteína G é ativada e, por sua vez, inibe a adenilato ciclase (AC) uma enzima que converte o trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato de adenosina cíclico (cAMP). A redução na atividade da AC leva a uma diminuição nos níveis intracelulares de cAMP, e com isso a redução da atividade da proteína quinase A (PKA). A inibição da PKA interfere em processos como a regulação do metabolismo, transdução de sinal, regulação da expressão gênica e modulação da função celular (Trescot et al., 2008).

Além disso, afeta diretamente os canais iônicos na membrana neuronal. Os canais de potássio dependentes de voltagem (KV) são abertos, resultando na saída de íons potássio ( $K^+$ ) da célula e hiperpolarização da membrana. Por outro lado, os canais de cálcio dependentes de voltagem (CaV) são fechados, reduzindo a entrada de íons

cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). (Comer e Cahill, 2018; Vearrier e Grundmann, 2021). Os íons cálcio desempenham um papel crucial na fusão das vesículas sinápticas com a membrana celular e na liberação do conteúdo das vesículas para a fenda sináptica. Portanto, a diminuição na entrada de cálcio reduz a liberação de neurotransmissores como o ácido gama-aminobutírico (GABA). Como resultado, a atividade neuronal é suprimida, levando aos efeitos farmacológicos desejados do fentanil, incluindo analgesia e sedação. Essa ação ocorre em neurônios das vias nociceptivas situadas na medula espinal dorsal, onde ocorre a modulação da dor antes que os sinais sejam transmitidos ao cérebro (Zhuang et al.,

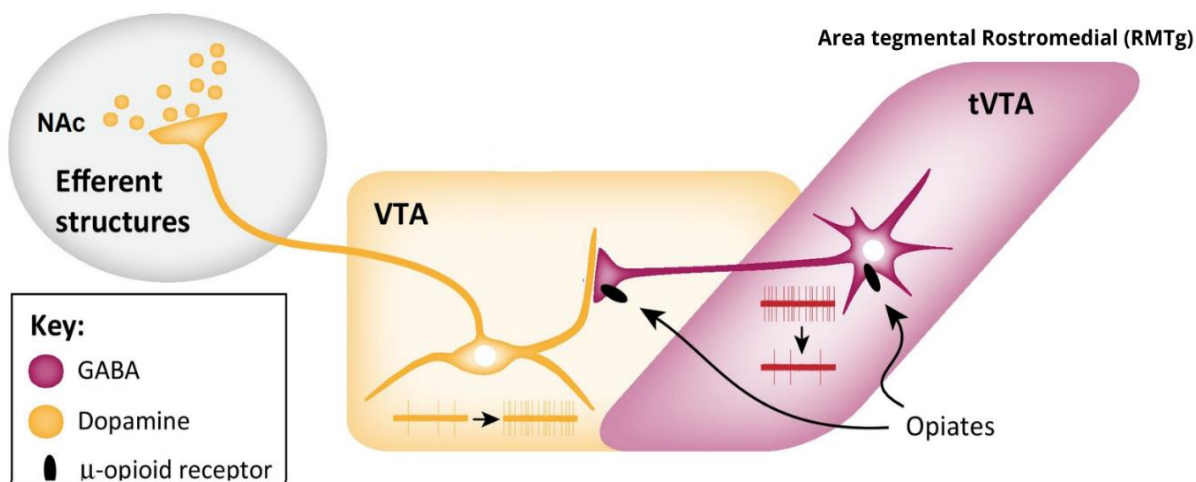
2022).



**Figura 5.** Esquema do mecanismo de ação de opioides. Os opioides ligam-se os receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  (1), ativando proteínas G inibitórias ( $G_i/o$ ), que irão reduzir a atividade da adenilato ciclase e diminui os níveis de AMPc (2 e fechar canais de cálcio (2), reduzindo a liberação de neurotransmissores, e abrir de canais de potássio (4), causando hiperpolarização neuronal. O efeito final é a inibição da transmissão nociceptiva e a analgesia. Fonte: Opioid Receptors. Chapter:

Essential pharmacology: Opioid Analgesics And Antagonists.  
[www.pharmacy180.com/article/opioid-receptors-1170](http://www.pharmacy180.com/article/opioid-receptors-1170)

Com a inibição da atividade dos neurônios que liberam GABA, os neurônios dopaminérgicos são liberados da inibição e tornam-se mais ativos. Esses interneurônios GABAérgicos estão localizados predominantemente na região da área tegmental rostromediana (Rostromedial Tegmental Area – RMTg), que exerce controle inibitório sobre os neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (VTA), situada no mesencéfalo. A ação do fentanil sobre os receptores  $\mu$ -opioides nessas regiões inibe a liberação de GABA, promovendo a desinibição dos neurônios dopaminérgicos do VTA. Como consequência, ocorre uma maior liberação de dopamina em regiões do encéfalo associadas à recompensa e motivação, como o núcleo accumbens e o córtex pré-frontal medial. O aumento da dopamina em resposta ao uso de fentanil leva o encéfalo a associar a droga com sensações de prazer e recompensa, favorecendo o desenvolvimento de comportamentos de busca e consumo da substância, e contribuindo para o estabelecimento da dependência (Du et al., 2021; Feltenstein e See, 2013).



**Figura 6:** A ação do fentanil sobre receptores  $\mu$ -opioides na RMTg inibe a liberação de GABA, desinibindo os neurônios dopaminérgicos da VTA. Isso aumenta a liberação de dopamina em áreas como o núcleo accumbens e o córtex pré-frontal medial, promovendo sensações de recompensa e contribuindo para o desenvolvimento da dependência. Fonte: Ineffective VTA Disinhibition in Protracted Opiate Withdrawal, Michel Barrot- 2015 MODIFICADA

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivos Gerais

- Investigar o efeito do fentanil nas doses de 10ug/kg e 20ug/kg nos processos de sensibilização comportamental e condicionamento, e as possíveis alterações neuroplásticas decorrentes dessas aprendizagens.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos recompensadores do fentanil nas doses de usando o modelo de Preferência Condicionada por Lugar (PCL).
- Verificar o desenvolvimento de sensibilização locomotora.
- Avaliar as alterações na expressão da proteína Arc nas regiões ligadas ao circuito de recompensa: CPF, NAc, HL, BLA, VTA e dCA1.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. Sujeitos

Foram utilizados 125 ratos machos, albinos, Wistar, pesando entre 200-300g, oriundos do Biotério Central da UENF, Campos Dos Goytacazes, RJ. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de plástico com acesso livre à comida e água. As gaiolas estarão em uma sala do setor de Farmacologia do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA), com umidade e temperatura controlada ( $22 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ ), e com ciclo de luz claro e escuro de 12 em 12 horas. O experimento foi conduzido na fase clara, horário entre 09:00 e 14:00 horas. Os animais foram manipulados individualmente, pelo tempo de 5 minutos durante 7 dias antes do início do procedimento experimental. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UENF (CEUA-UENF/Protocolo 461).

### 5.2. Fármaco

Fentanil (FEN) nas doses de 10 e 20 ug/kg por via subcutânea (s.c.), (Cristália, Brasil) adquirida pelo Hospital Veterinário da UENF. A solução salina 0,9% foi usada como veículo (VEI) num volume de administração de 1ml/kg por s.c.

### 5.3. Ambiente Experimental

O experimento de campo aberto foi desenvolvido em quatro salas experimentais contendo iluminação vermelha, temperatura controlada ( $22 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ) e o som de um ventilador ligado como ruído de fundo. Em cada sala conteve uma arena quadrada medindo 60x60x45cm, com assoalho e paredes pintados na cor preta. Para o registro do comportamento locomotor, foram utilizadas câmeras posicionadas 60 cm acima da arena experimental. As câmeras foram acopladas a um computador PC compatível, contendo o programa que fez a análise de imagens EthoVision, o qual estava localizado fora das salas de experimento, esse sistema quantificou a atividade locomotora em distância percorrida (m).

Para o teste de preferência condicionada por lugar (PCL) foram usadas caixas de acrílico (Bonther Equipamentos), constituída de 3 compartimentos: um compartimento central menor (60 X 10 X 45 cm) com paredes na cor cinza claro e assoalho em chapa inox polido e dois compartimentos maiores (60 X 30 X 45 cm), sendo um compartimento com

paredes listradas em branco e preto horizontais e assoalho em chapa de aço inox com furos redondos de 15 mm e o outro compartimento com paredes listradas em branco e preto verticais, com assoalho em barras de aço inox espaçadas em 8 mm. Do compartimento central, pode-se ter acesso aos dois compartimentos maiores através de portas tipo guilhotina. As caixas estarão em uma sala (3 x 2 m) com iluminação vermelha, temperatura  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e um sistema de ruído de fundo. Uma câmera foi posicionada 60 cm acima das caixas e a câmera estava acoplada a um computador PC compatível para os registros dos comportamentos a fim de análise posterior através do sistema EthoVision.

#### **5.4. Procedimento Experimental**

5.4.1. Experimento 1: Efeito do tratamento com fentanil na arena experimental no desenvolvimento da locomoção sensibilizada e na proteína Arc.

##### **5.4.1.1. Experimento 1A- 6 dias de tratamento 30 minutos**

Esse experimento foi constituído das seguintes fases comportamentais:

##### **a) Fase de habituação (1º-3º dias)**

Os animais receberam salina (s.c.) e foram colocados imediatamente na arena experimental por 30 minutos por 3 dias consecutivos, sendo a atividade locomotora registrada. Esta fase teve como objetivo habituar os animais ao ambiente experimental e também para que no final da fase os animais apresentassem locomoção equivalentes.

##### **b) Fase de tratamento farmacológico (4º-9º dias)**

Os animais receberam os tratamentos farmacológicos e foram colocados imediatamente na arena para o registro de sua atividade locomotora por trinta minutos. Os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos:

- Veículo (VEI; n=6) - Os animais receberam salina e foram colocados na arena experimental por 30 minutos, sendo a locomoção registrada.

- Fentanil 10ug/kg (FEN-10; n=6) - Os animais receberam fentanil 10 ug/kg e foram colocados na arena experimental por 30 minutos.
- Fentanil 20ug/kg (FEN-20 n=6) - Os animais receberam fentanil 0,2 mg/kg e foram colocados na arena experimental por 30 minutos.

#### 5.4.1.2. Experimento 1B- 1 dia de tratamento 30 minutos

##### **a) Fase de habituação (1º-3º dias)**

Os animais receberam salina (s.c.) e foram colocados imediatamente na arena experimental por 30 minutos por 3 dias consecutivos, sendo a atividade locomotora registrada. Esta fase teve como objetivo habituar os animais ao ambiente experimental e também para que no final da fase os animais apresentassem locomoção equivalentes.

##### **b) Fase de tratamento farmacológico (4º dia)**

- Veículo (VEI; n=6) - Os animais receberam salina e foram colocados na arena experimental por 30 minutos, sendo a locomoção registrada.
- Fentanil 10ug/kg (FEN-10; n=6) - Os animais receberam fentanil 10 ug/kg e foram colocados na arena experimental por 30 minutos.
- Fentanil 20ug/kg (FEN-20 n=6) - Os animais receberam fentanil 0,2 mg/kg e foram colocados na arena experimental por 30 minutos.

#### 5.4.1.3. Experimento 1C- 6 dias de tratamento 5 minutos

##### **a) Fase de habituação (1º-3º dias)**

Os animais receberam salina (s.c.) e foram colocados imediatamente na arena experimental por 30 minutos por 3 dias consecutivos, sendo a atividade locomotora registrada. Esta fase teve como objetivo habituar os animais ao ambiente experimental e também para que no final da fase os animais apresentassem locomoção equivalentes.

##### **b) Fase de tratamento farmacológico (4º-9º dias)**



- Veículo (VEI; n=6) - Os animais receberam salina e foram colocados na arena experimental por 5 minutos, sendo a locomoção registrada.
- Fentanil 10ug/kg (FEN-10; n=6) - Os animais receberam fentanil 10 ug/kg e foram colocados na arena experimental por 5 minutos.
- Fentanil 20ug/kg (FEN-20 n=6) - Os animais receberam fentanil 0,2 mg/kg e foram colocados na arena experimental por 5 minutos.

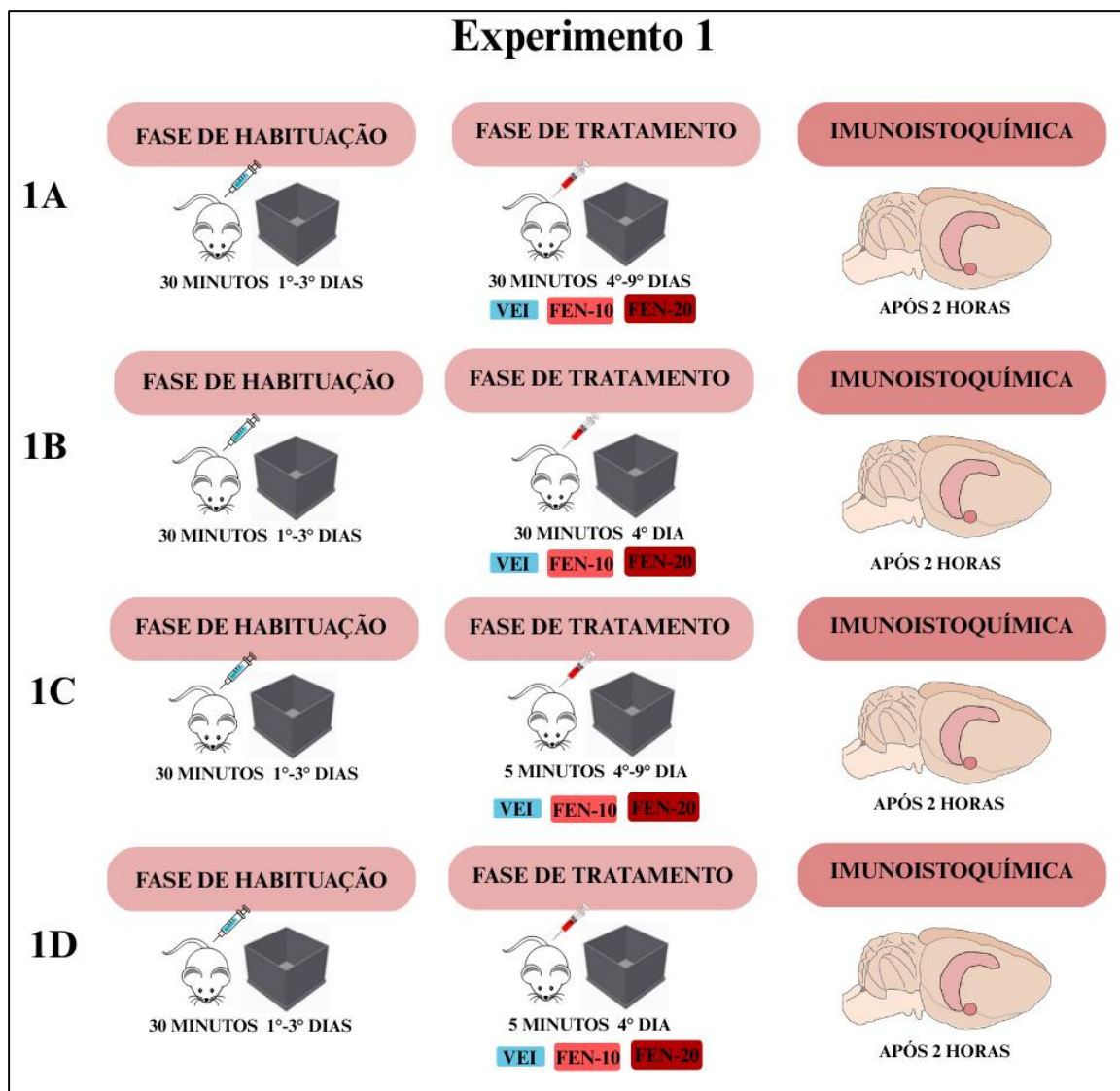
#### 5.4.1.4 Experimento 1D- 1 dia de tratamento 5 minutos

##### **a) Fase de habituação (1º-3º dias)**

Os animais receberam salina (s.c.) e foram colocados imediatamente na arena experimental por 30 minutos por 3 dias consecutivos, sendo a atividade locomotora registrada. Esta fase teve como objetivo habituar os animais ao ambiente experimental e também para que no final da fase os animais apresentassem locomoção equivalentes.

##### **b) Fase de tratamento farmacológico (4º dia)**

- Veículo (VEI; n=6) - Os animais receberam salina e foram colocados na arena experimental por 5 minutos, sendo a locomoção registrada.
- Fentanil 10ug/kg (FEN-10; n=6) - Os animais receberam fentanil 10 ug/kg e foram colocados na arena experimental por 5 minutos.
- Fentanil 20ug/kg (FEN-20 n=6) - Os animais receberam fentanil 0,2 mg/kg e foram colocados na arena experimental por 5 minutos.



**Figura 7.** Esquematização da metodologia do experimento 1 (1A-1D).

5.4.2. Experimento 2: Efeito do tratamento com fentanil na expressão da locomoção condicionada e na proteína Arc.

#### 5.4.2.1 Experimento 2A- 10 dias

Foi utilizado o modelo de preferência condicionada por lugar para medir a memória decorrente do efeito de recompensa (“memória de recompensa”) produzida pelo fentanil durante a fase de condicionamento. Além disso, foi verificado os efeitos da expressão proteica relacionada à Arc produzida pelo fentanil em regiões encefálicas relevantes. O protocolo foi constituído de:

##### a) Pré-condicionamento (1 dia)

Os animais foram colocados no compartimento central da caixa com as portas tipo guilhotina abertas e, assim permitindo o acesso livre aos outros dois compartimentos. A sessão teve a duração de 15 minutos e foi quantificado o tempo (minutos) de permanência em cada compartimento. Além de permitir a familiarização do animal ao ambiente experimental, esse período dissipou alguma preferência, caso exista, do animal por algum compartimento e, assim foi utilizado o protocolo “unbiased”. Entretanto, os ratos que permanecerem mais de 60% (540 s) do tempo total (900 s) em qualquer um dos compartimentos foram eliminados do estudo (Yang et al., 2021).

#### **b) Condicionamento (8 dias)**

Os animais foram designados de forma aleatória e contrabalançada para receber os tratamentos farmacológicos. Para isso, as portas de entrada aos compartimentos estiveram fechadas de modo que cada animal teve acesso e permaneceu somente no compartimento em que foi colocado. Os animais dos grupos fentanil receberam os tratamentos (s.c.) e foram colocados imediatamente em um dos compartimentos maiores onde permaneceram por 30 minutos. No dia seguinte, os animais receberam veículo e foram colocados no compartimento oposto ao do dia anterior. Assim, em um dia o animal recebeu fentanil em um compartimento e no dia seguinte recebeu veículo no outro compartimento, tornando alternados os dias de administração da droga e a ocupação nos compartimentos. O grupo veículo recebeu veículo nos dois compartimentos. Essa fase permitiu o estabelecimento de uma associação entre o compartimento e os efeitos do fentanil, estabelecendo um aprendizado entre o estímulo incondicionado (efeito do fentanil) e o estímulo condicionado (compartimento da caixa).

#### **Os grupos experimentais serão os seguintes:**

- Veículo (VEI; n=5): os animais receberam veículo (s.c.) e foram colocados alternadamente nos dois compartimentos da caixa por 30 minutos.
- Fentanil 10 ug/kg (FEN-10; n=6): nos dias 4, 6, 8 e 10 os animais receberam fentanil 10 ug/kg (s.c.) e foram colocados em um dos

compartimentos da caixa por 30 minutos. Nos dias 5, 7, 9 e 11 os animais receberam veículo (s.c.) e foram colocados no outro compartimento da caixa por 30 minutos.

- Fentanil 20 ug/kg (FEN-20; n=6): nos dias 4, 6, 8 e 10 os animais receberam fentanil 20 ug/kg (s.c.) e foram colocados em um dos compartimentos da caixa e nos dias 5, 7, 9 e 11 receberam veículo (s.c.) e foram colocados no outro compartimento.

### **c) Teste de Preferência Condicionada ao Lugar (1 dia)**

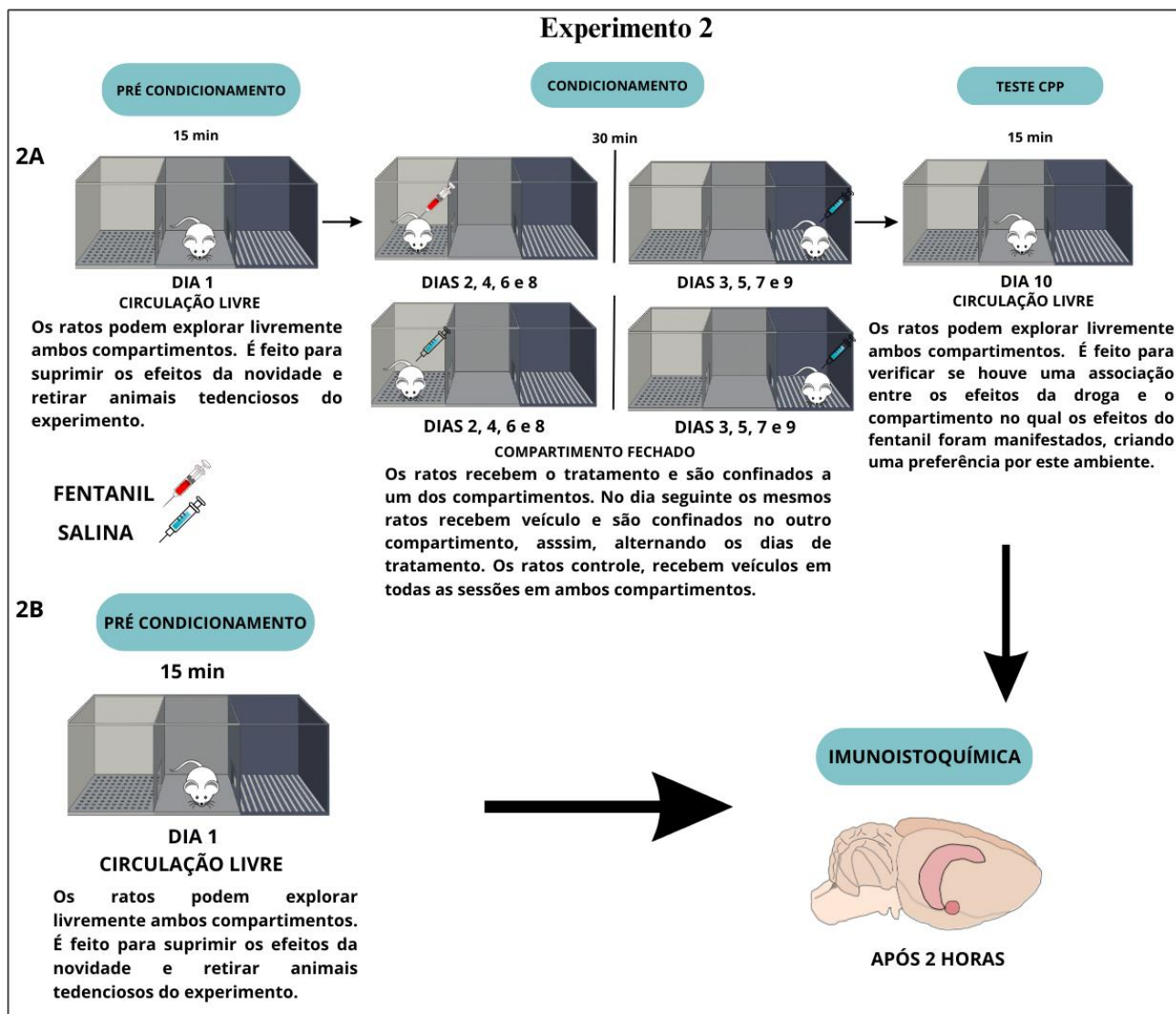
Vinte e quatro horas após o término da fase de condicionamento, os animais foram colocados no compartimento central da caixa sem receber nenhum tratamento farmacológico. As portas guilhotinas estiveram levantadas com acesso livre a toda caixa por 15 minutos. Foi quantificado o tempo, em minutos, que o animal permaneceu em cada compartimento. Foi possível verificar se foi estabelecida uma associação entre os efeitos da droga e o compartimento no qual os efeitos do fentanil foram manifestados, criando uma preferência por este ambiente e, conseqüentemente, resultando numa preferência condicionada ao lugar. A preferência foi determinada pelo tempo gasto no compartimento associado com o fentanil menos o tempo no compartimento associado com o veículo.

#### **5.4.2.2. Experimento 2B- 1 dia**

##### **a) Pré-condicionamento (1 dia)**

Os animais foram colocados no compartimento central da caixa com as portas tipo guilhotina abertas e, assim permitindo o acesso livre aos outros dois compartimentos. A sessão teve a duração de 15 minutos e foi quantificado o tempo (minutos) de permanência em cada compartimento. Mesmo procedimento utilizado no Pré- Condicionamento do experimento 2A. Os animais foram perfundidos 2 horas após a sessão.

Em todos os experimentos, após 2 horas à sessão final, seja arena ou o teste de preferência condicionada por lugar, os animais foram eutanasiados e se procedeu a metodologia de imunistoquímica para a detecção da expressão da proteína ARC.



**Figura 8.** Esquematização do experimento 2 (2A-2B).

## 5.5. Análise da Proteína Arc

### 5.5.1. Imunoistoquímica

Duas horas após a última sessão experimental, os animais foram eutanasiados com carbamato de etila por via intraperitoneal (IP) 3000 mg/kg perfundidos transcardiacamente com solução salina (NaCl 0.9%) seguido de formol (paraformaldeído 4%) por 30 minutos. Imediatamente após a perfusão, os ratos foram decapitados e os encéfalos retirados. Os encéfalos foram colocados em tubos com formol e mantidos sob refrigeração de 2-8°C por um período de 12 horas.

Após esse período, os encéfalos foram mantidos sob refrigeração em solução de Sacarose 20% por 48 horas para crioproteção. Então, os encéfalos foram imersos e crioprotetidos com uma solução de glicóis e resinas hidrosolúveis, Tissue Plus O.C.T.® (Fisher HealthCare®, USA). Em seguida congelados em nitrogênio líquido e posteriormente cortados em um criostato (Leica) mantido a temperatura de -27° C.

Os cortes foram realizados com espessura de 30 µm e recolhidos 4 cortes em sequência para cada estrutura encefálica. As áreas de interesse foram: núcleo accumbens (core e shell aproximadamente +1.70 mm de Bregma), Córtex pré-frontal medial (+2,70 mm de Bregma), Hipotálamo Lateral ( -1,80 mm de Bregma), Amígdala Basolateral (-2,80 mm de Bregma), Hipocampo CA1 dorsal (-3,60 mm de Bregma) e área tegmental ventral (-5,60 mm de Bregma) (Paxinos e Watson, 2007). Os cortes são fixados em lâminas gelatinizadas. Depois, os cortes foram lavados com solução de PBS 10mM por 3 vezes, sob agitação, durante 30 minutos no total. Após a lavagem, foram incubados a 22°C com solução 3% de peróxido de hidrogênio diluído em PBS 10mM. Na sequência, incubados durante 2 horas a 22°C com solução tampão bloqueio (soro normal de cabra 3% e 0,25% de Triton X-100 diluídos em PBS 10mM).

Após, os cortes foram incubados por 12 horas a 2 com anticorpo primário anti- Arc (mouse anti-Arc antibody, 1:500 dilution in 10 % normal goat sérum; sc-166461, Santa Cruz Biotechnology, Inc; Santa Cruz, CA) diluído na solução tampão de bloqueio (Li et al., 2009). Após, lavados com PBS 10mM por 3 vezes com duração de 10 minutos cada lavagem. Os cortes foram incubados a 22°C por 2 horas com solução contendo anticorpo secundário biotinilado de coelho anti-IgG (BA1000 Vector Laboratories®, Burlingame, CA, USA), em uma solução de 1:100 contendo soro normal de cabra 1% e 0,25% de triton X-100 diluída em PBS 10Mm. Após esse tempo, os cortes foram lavados novamente com solução de PBS 10mM por 3 vezes de 10 minutos. Em seguida, os cortes foram processados com kit padrão Vectastain® ABC Elite® (Vector Laboratories®, Burlingame, CA, USA). Após, foram lavados com PBS 10 mM por 3 vezes durante 10 minutos cada. Em seguida, os cortes foram incubados com DAB (SK-4100, Vector Laboratories®, Burlingame, CA, USA) a 22°C por 5 minutos.

### 5.5.2. Contra-coloração:

Depois do processo de revelação com imunistoquímica os cortes foram submetidos à lavagem com água corrente durante 7 minutos. Logo após, foi feita a coloração com Hematoxilina de Harris a 0,5% durante 30 segundos, seguida de lavagem com água corrente por 3 minutos. Foi feita, após a lavagem, a desidratação com Álcool Etílico a 50%, 70%, 80%, 90% por 5 minutos respectivamente. A desidratação com o Álcool Etílico à 100% foi repetida três vezes por 5 minutos. Logo após foi utilizado a mistura de Álcool 100% + Xilol (Xilol 860 G P.A.-A.C.S.- Synth) na proporção de 1:1 por 5 minutos, seguido por Xilol repetida três vezes, também por 5 minutos.

As lâminas foram, imediatamente após serem retiradas do Xilol, montadas com lamínulas usando-se o DPX Mountant for histology® (Sigma®, ST. Louis, MO, USA) como substância de montagem para posterior análise. As fotomicrografias dos cortes cerebrais foram obtidas por meio de câmera CCD (Photometrics cool snap, Roper Scientific Inc., Trenton, NJ) acoplada a um microscópio óptico Nikon usando a ampliação de 10 vezes. A área padronizada para a contagem da densidade da Arc foi de 200 000  $\mu\text{m}^2$  para cada um dos hemisférios a cada estrutura cerebral analisada. A contagem da densidade da Arc foi realizada dentro do espaço delimitado como área padrão segundos as imagens capturadas utilizando.

A análise da densidade de expressão da proteína Arc foi realizada de forma semiquantitativa, baseada em um sistema de pontuação ordinal. Para cada região encefálica de interesse, atribuiu-se uma nota de 0 a 5, conforme a intensidade relativa de imunorreatividade observada nas lâminas coradas. O escore 0 representava a ausência de marcação detectável (0% de expressão), enquanto o escore 5 correspondia à intensidade máxima de marcação observada (aproximadamente 100% de densidade proteica, considerada como referência interna de saturação para cada corte) (Payano et.al., 2023; Martinelli et.al., 2020).

### 5.6. Estatística

Os resultados comportamentais do período de habituação foram analisados utilizando-se a Análise de Variância (ANOVA) de um fator (dias). Nas análises onde se obteve valores de F de acordo com os critérios estatísticos de  $p < 0,05$ , as diferenças entre os dias foram testadas através do teste de Tukey.

Nos experimentos 1A e 1C, para a análise dos resultados da fase de tratamento farmacológico, utilizou-se ANOVA por medidas repetidas de dois fatores a fim de se avaliar a locomoção ao longo dos dias, determinar o efeito do grupo, bem como a interação entre as variáveis, grupo e dias. Quando se avaliou a locomoção por intervalos (Exp. 1A), a locomoção total de 30 minutos foi dividida em 6 intervalos de 5 minutos cada e utilizou-se a ANOVA por medidas repetidas de três fatores a fim de se avaliar as variáveis grupos, dias e intervalos, bem como a interação entre as variáveis. Para o desdobramento da interação entre intervalos X grupos, utilizou-se a ANOVA de um fator. Nos experimentos 1B e 1D, a ANOVA de um fator foi utilizada para se verificar o efeito dos grupos de tratamento. Nas análises onde se obteve valores de F de acordo com os critérios estatísticos de  $p < 0,05$ , as diferenças foram testadas através do teste de Tukey.

No experimento 2, tanto para a análise dos resultados do dia de pré-condicionamento quanto para a análise do teste de preferência condicionada por lugar utilizou-se o teste t de Student para amostras dependentes para comparar o tempo gasto entre os dois compartimentos da caixa experimental.

Para a avaliação da expressão da proteína Arc nas diferentes estruturas encefálicas, a ANOVA de um fator foi usada para determinar o efeito do grupo. Nas análises onde se obteve valores de F de  $p < 0,05$ , as diferenças foram testadas através do teste de Tukey. Na análise da comparação da avaliação da Arc entre os experimentos, utilizou-se a ANOVA de dois fatores para avaliar o efeito dos grupos, dos experimentos e a interação entre os fatores. Para analisar a interação grupos X



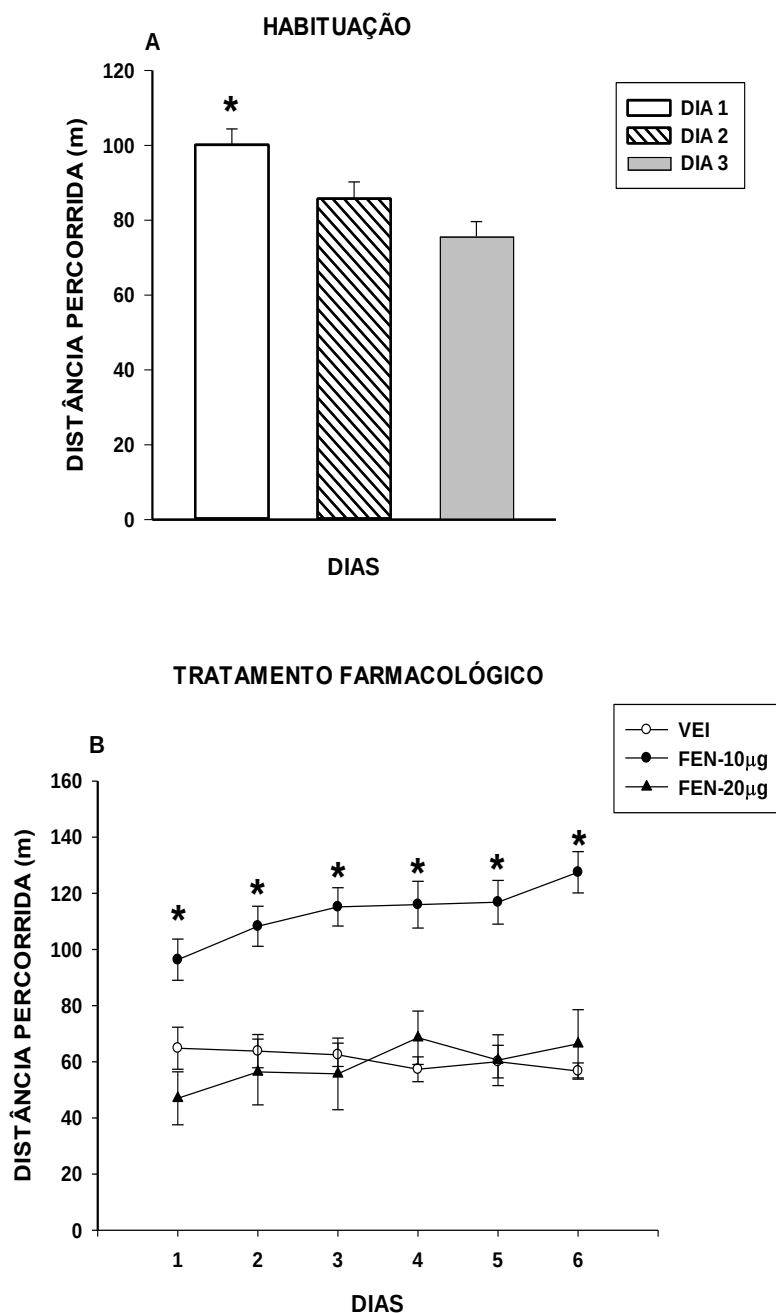
experimentos, o teste t para amostras independentes foi utilizado na comparação entre os mesmos grupos de experimentos diferentes.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Experimento 1: Efeito do tratamento com fentanil na arena experimental no desenvolvimento da locomoção sensibilizada e na proteína Arc.

A Fig. 9 apresenta a resposta locomotora produzida por fentanil durante 6 dias consecutivos, com sessão experimental de 30 minutos (Experimento 1A). Para o período de habituação (Fig. 9A), a ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey mostrou que houve uma diminuição significativa na locomoção ao longo dos dias [ $F(2, 62) = 10,24$ ,  $p < 0,01$ ], com o dia 1 apresentando atividade locomotora superior ao dia 3 ( $p < 0,05$ ). Esses resultados mostram o desenvolvimento da habituação ao ambiente novo e corroboram os resultados do nosso e de outros grupos de pesquisa (Cerbone e Sadile, 1994), assegurando que antes do início do tratamento farmacológico os animais apresentaram atividades locomotoras equivalentes. Para a fase de tratamento farmacológico (Fig. 9B), a ANOVA de medidas repetidas de dois fatores mostrou que houve interação entre grupos e dias [ $F(10, 90) = 5,30$ ;  $p < 0,01$ ], houve efeito dos grupos [ $F(2, 18) = 16,61$ ;  $p < 0,01$ ] e houve efeito dos dias de tratamento [ $F(5, 90) = 5,65$ ;  $p < 0,01$ ]. Para a análise dos grupos dentro dos dias utilizou-se a ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey. Os resultados mostraram que no dia 1 [ $F(2, 18) = 9,41$ ;  $p < 0,01$ ], dia 2 [ $F(2, 18) = 10,60$ ;  $p < 0,01$ ], dia 3 [ $F(2, 18) = 14,10$ ;  $p < 0,01$ ], dia 4 [ $F(2, 18) = 16,20$ ;  $p < 0,01$ ], dia 5 [ $F(2, 18) = 18,13$ ;  $p < 0,01$ ] e dia 6 [ $F(2, 18) = 21,10$ ;  $p < 0,01$ ], o grupo FEN-10 $\mu$ g apresentou maior locomoção do que os grupos VEI e FEN-20 $\mu$ g. Não houve diferença entre os grupos VEI e FEN-20 $\mu$ g ( $p > 0,05$ ). Com relação à análise dos dias dentro dos grupos, a ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey mostrou que para os grupos VEI [ $F(5, 41) = 0,5$ ;  $p > 0,05$ ], FEN-10 $\mu$ g [ $F(5, 41) = 2,0$ ;  $p > 0,05$ ] e FEN-20 $\mu$ g [ $F(5, 41) = 0,53$ ;  $p > 0,05$ ], não houve diferença entre os dias mostrando que não houve o desenvolvimento da sensibilização locomotora.

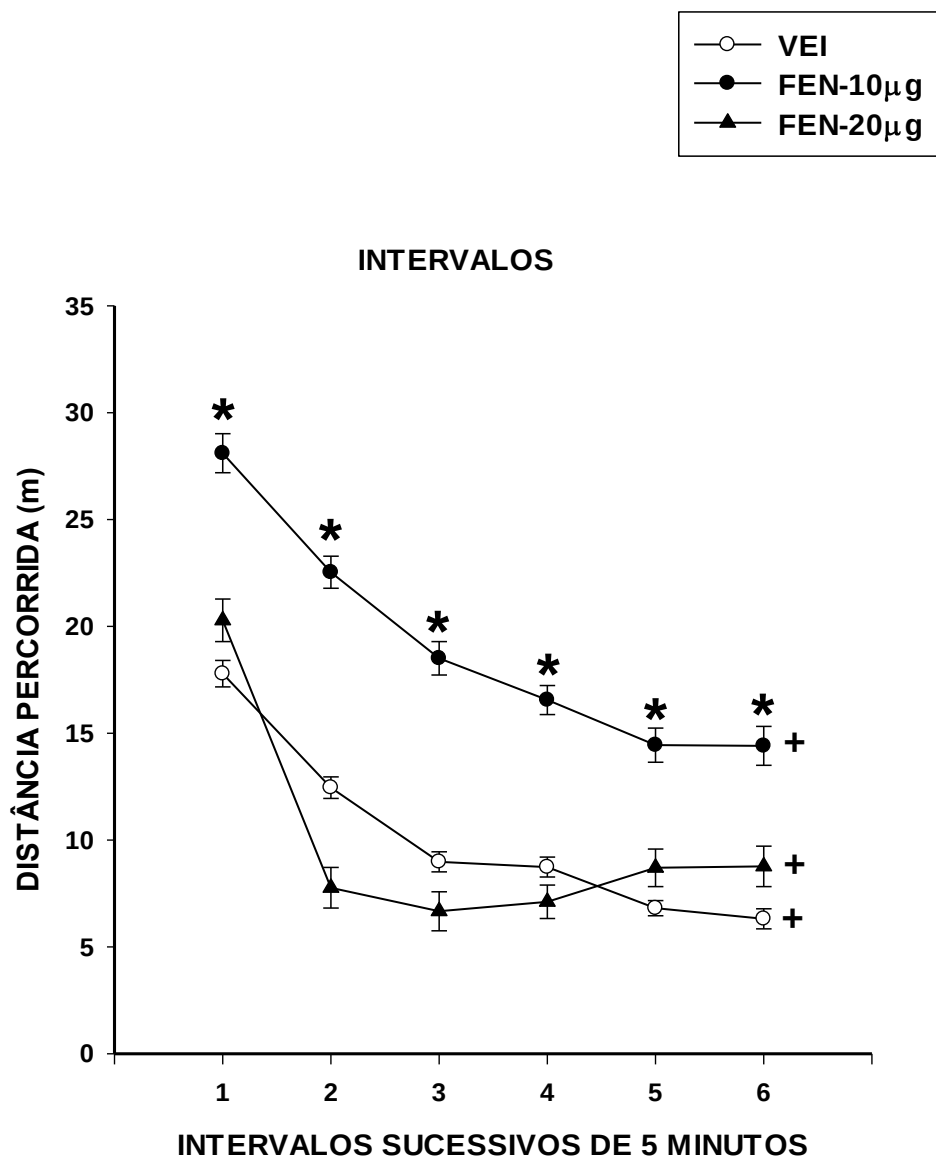
### EXPERIMENTO 1A: LOCOMOÇÃO SESSÃO DE 30 MIN. POR 6 DIAS NA ARENA



**Figura 9.** Efeitos do fentanil sobre a locomoção em arena durante sessões de 30 minutos por 6 dias consecutivos. (A) Durante o período de habitação (dias 1 a 3, sem administração de fármaco), houve redução na distância percorrida ao longo dos dias, indicando habituação ao ambiente novo. \*Indica diferença significativa em relação ao dia 3 ( $p < 0,05$ ). (B) Durante o período de tratamento farmacológico o grupo FEN-10 µg apresentou atividade locomotora significativamente maior em comparação aos grupos VEI e FEN-20 µg em todos os dias de tratamento. \*Indica diferença significativa entre o grupo FEN-10 µg e os demais grupos ( $p < 0,05$ ).

Como não se alcançou significância estatística para a análise do desdobramento dos dias dentro dos grupos, particularmente para o grupo FEN-10 $\mu$ g, que mostraria o desenvolvimento da sensibilização locomotora, decidiu-se realizar a avaliação dos resultados comportamentais e, para isso, o tempo total da sessão na arena (30 min) foi dividido em 6 intervalos de 5 min de duração cada. A ANOVA de medidas repetidas de 3 fatores mostrou que houve efeito dos intervalos [ $F(5, 540) = 217,0$ ;  $p < 0,01$ ], efeito dos grupos de tratamento [ $F(2, 108) = 83,60$ ;  $p < 0,01$ ] e interação entre intervalos X grupos de tratamentos [ $F(10, 540) = 13,0$ ;  $p < 0,01$ ]. Não houve efeito dos dias de tratamento [ $F(5, 108) = 1,0$ ;  $p > 0,05$ ], interação entre intervalos X dias [ $F(25, 540) = 1,25$ ;  $p > 0,05$ ], interação entre grupos X dias [ $F(10, 108) = 0,75$ ;  $p > 0,05$ ] e nem interação entre intervalos X grupo X dias [ $F(50, 540) = 0,93$ ;  $p > 0,05$ ]. Para o desdobramento da interação entre intervalos X grupos, a ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey mostrou que em todos os intervalos o grupo FEN-10 $\mu$ g apresentou maior locomoção do que os grupos VEI e FEN-20 $\mu$ g ( $p < 0,01$ ). Os resultados também mostraram que houve um decréscimo na atividade locomotora ao longo dos intervalos para os grupos VEI [ $F(5, 251) = 77,70$ ;  $p < 0,01$ ], FEN-10 $\mu$ g [ $F(5, 251) = 43,75$ ;  $p < 0,01$ ] e FEN-20 $\mu$ g [ $F(5, 251) = 32,0$ ;  $p < 0,01$ ], mostrando o desenvolvimento da habituação. Entretanto, esses resultados mostram que a locomoção foi maior no primeiro intervalo observado principalmente no grupo FEN-20 $\mu$ g que na análise do tempo total de 30 minutos apresentou atividade locomotora menor do que os outros grupos. A Fig. 22 apresenta a atividade locomotora dos grupos nos intervalos.

## EXPERIMENTO 1A: LOCOMOÇÃO SESSÃO DE 30 MIN. POR 6 DIAS NA ARENA

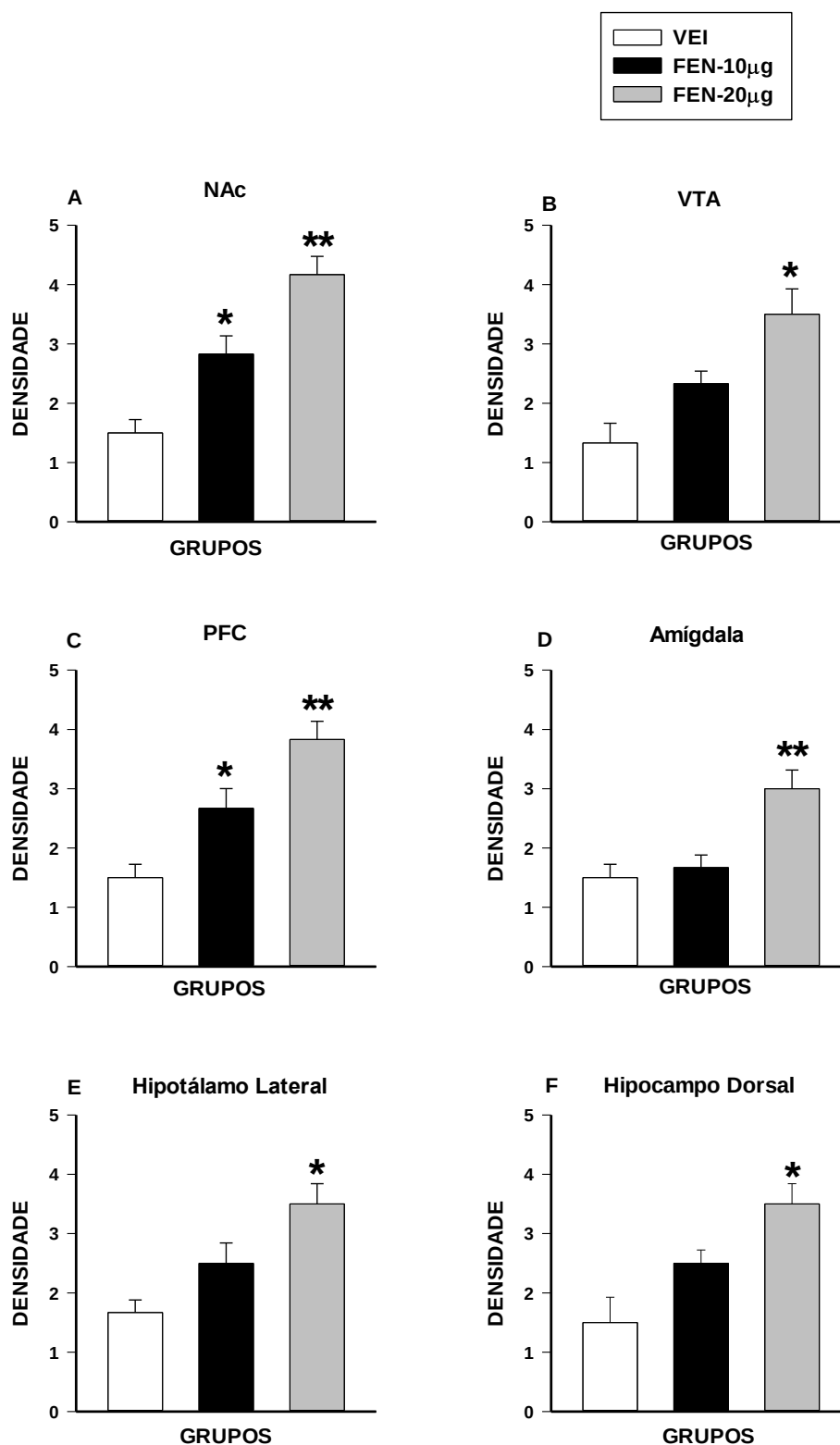


**Figura 10.** Atividade locomotora distribuída em 6 intervalos de 5 minutos durante cada sessão de 30 minutos (Experimento 1A). \* indica maior locomoção do grupo FEN-10 µg em todos os intervalos comparado aos grupos VEI e FEN-20 µg ( $p < 0,01$ ); ANOVA de três fatores e ANOVA de um fator seguidas do teste de Tukey. + indica menor locomoção do último intervalo em relação ao primeiro em todos os grupos.

A Fig. 22 apresenta os resultados da proteína Arc para o experimento 1A. Para o NAc (Fig. 22A), o grupo FEN-20µg apresentou densidade maior

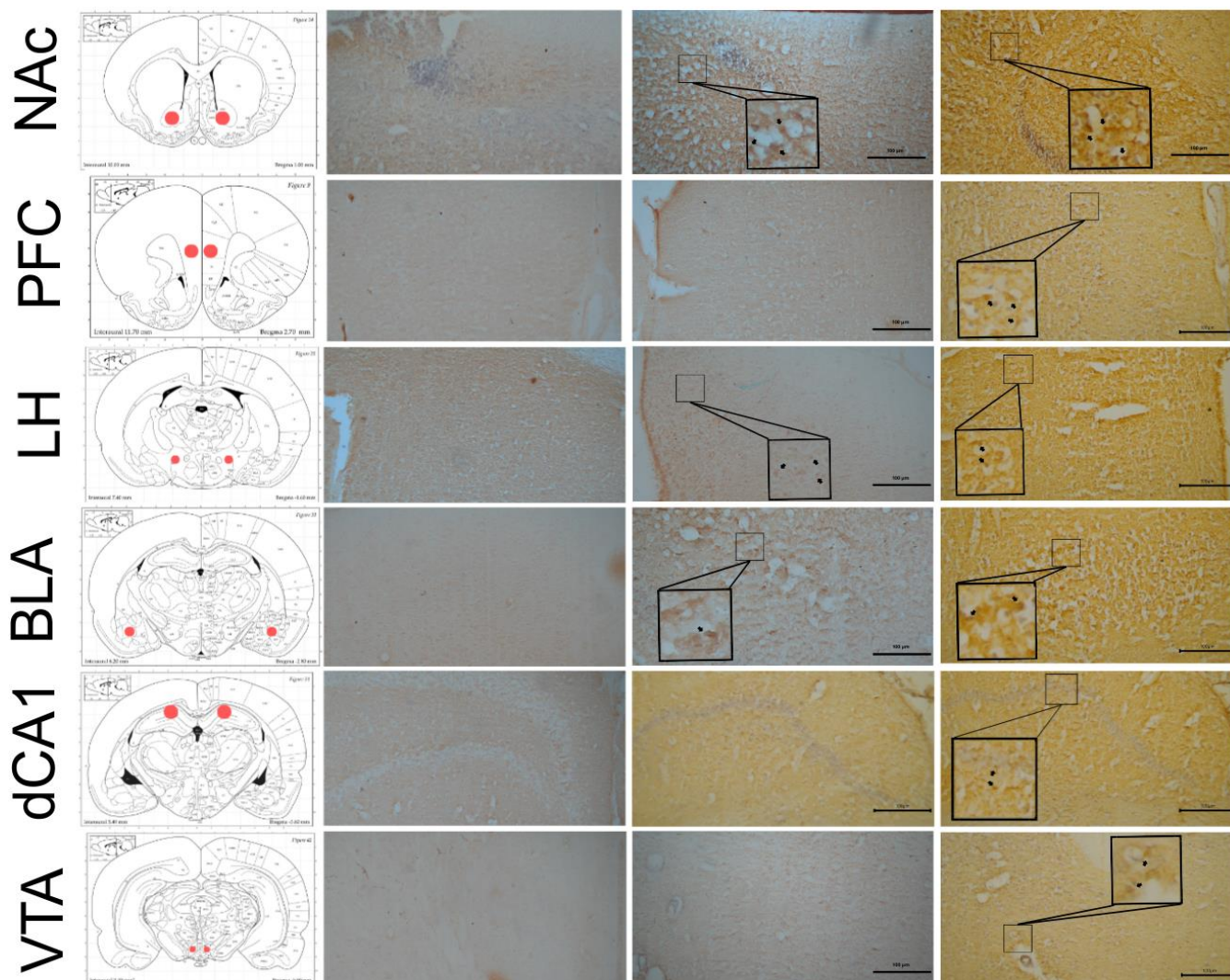
de Arc do que todos os grupos; o grupo FEN-10 $\mu$ g apresentou densidade maior do que o grupo VEI [ $F(2, 17) = 22,33$ ;  $p < 0,01$ ]. Para o VTA (Fig. 22B), a ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey mostrou que houve diferença entre os grupos [ $F(2, 17) = 10,41$ ;  $p < 0,01$ ] e o grupo FEN-20 $\mu$ g apresentou densidade maior de Arc do que o grupo VEI, não havendo diferença entre o grupo FEN-20 $\mu$ g e o grupo FEN-10 $\mu$ g e também não diferença entre os grupos VEI e FEN-10 $\mu$ g. Para o PFC (Fig. 22C), o grupo FEN-20 $\mu$ g apresentou densidade maior de Arc do que todos os grupos ( $p < 0,05$ ). Os resultados também mostraram que o grupo FEN-10 $\mu$ g apresentou densidade maior do que o grupo VEI ( $p < 0,05$ ). Para a amígdala (Fig. 22D), o grupo FEN-20 $\mu$ g apresentou maior densidade do que os demais grupo [ $F(2, 16) = 10,40$ ;  $p < 0,01$ ], não havendo diferença entre os grupos VEI e FEN-10 $\mu$ g. Para o hipotálamo lateral (Fig. 22E), o grupo FEN-20 $\mu$ g apresentou densidade maior de Arc do que o grupo VEI, não havendo diferença entre o grupo FEN-20 $\mu$ g e o grupo FEN-10 $\mu$ g e também não diferença entre os grupos VEI e FEN-10 $\mu$ g [ $F(2, 17) = 9,10$ ;  $p < 0,01$ ]. Para o hipocampo dorsal (Fig. 22F), o grupo FEN-20 $\mu$ g apresentou densidade maior de Arc do que o grupo VEI, não havendo diferença entre o grupo FEN-20 $\mu$ g e o grupo FEN-10 $\mu$ g e também não diferença entre os grupos VEI e FEN-10 $\mu$ g [ $F(2, 17) = 8,60$ ;  $p < 0,01$ ].

**EXPERIMENTO 1A: ARC**  
**SESSÃO DE 30 MIN. POR 6 DIAS NA ARENA**



**Figura 11.** Densidade da proteína Arc nos diferentes grupos (VEI, FEN-10  $\mu$ g e FEN-20  $\mu$ g) após sessões de 30 minutos por 6 dias na arena. (A) Núcleo accumbens (NAc), (B) Área tegmental ventral (VTA), (C) córtex pré-frontal (PFC), (D) amígdala, (E) hipotálamo lateral e (F) hipocampo dorsal. Os dados são

apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  indicam diferenças estatisticamente significativas em comparação com o grupo VEI (controle) ou entre grupos, conforme descrito no texto, determinados por ANOVA de um fator seguida pelo teste de Tukey. \* diferença significativa em relação ao grupo VEI (controle) com  $p < 0,05$ . \*\* diferença significativa em relação a todos os demais grupos com  $p < 0,01$ .

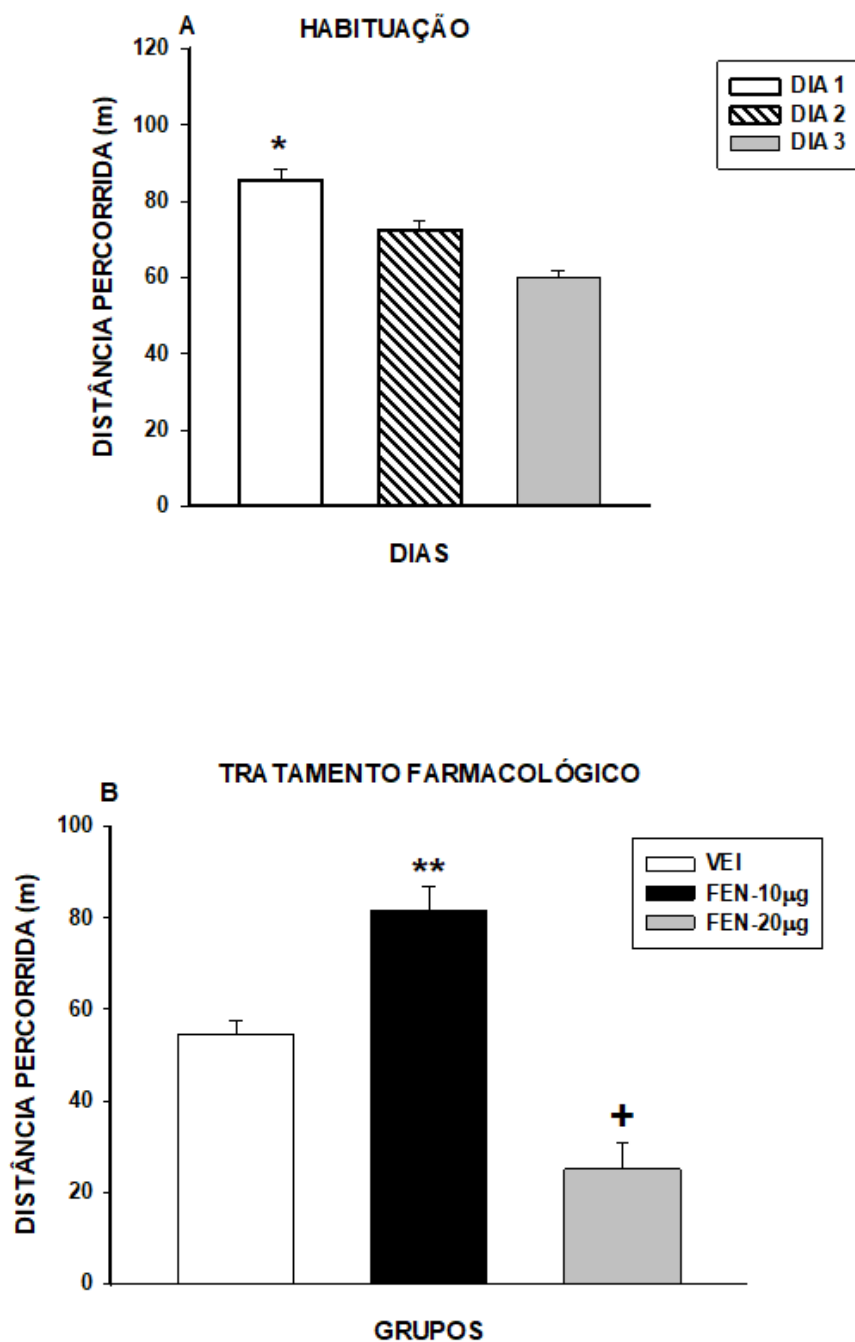


**Figura 12.** Imunomarcacão da proteína Arc em diferentes regiões encefálicas do experimento 1A. Núcleo accumbens (NAC); Área tegmental ventral (VTA); Córtex pré-frontal medial (PFC); Amígdala basolateral (BLA); Hipotálamo lateral (LH); Hipocampo dorsal (dCA1), nos grupos VEI, FEN-10 µg/kg e FEN-20 µg/kg.▲ Indicando marcações de dendritos e ▲ indicando marcações do corpo celular.

A fim de se verificar o efeito agudo dos tratamentos com fentanil na resposta locomotora e na expressão da Arc um outro experimento foi realizado (experimento 1B), no qual houve apenas uma sessão experimental de 30 minutos na arena. A Fig. 25 apresenta os resultados comportamentais. Para os resultados da fase de habituação (Fig. 25A), a ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey mostrou que houve uma diminuição significativa na locomoção ao longo dos dias [ $F(2, 62) = 27,30$ ,  $p < 0,01$ ], com o dia 1 apresentando atividade locomotora superior ao dia 3 ( $p < 0,05$ ). Para a fase de tratamento farmacológico (Fig. 25B), a ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey mostrou que houve diferença entre os grupos [ $F(2, 20) = 33,33$ ,  $p < 0,01$ ], com o grupo FEN-10 $\mu$ g apresentando maior locomoção do que todos os grupos ( $p < 0,05$ ) e o grupo FEN-20 $\mu$ g apresentando a menor locomoção ( $p < 0,05$ ).



**EXPERIMENTO 1B: LOCOMOÇÃO**  
**SESSÃO DE 30 MIN. POR 1 DIA NA ARENA**

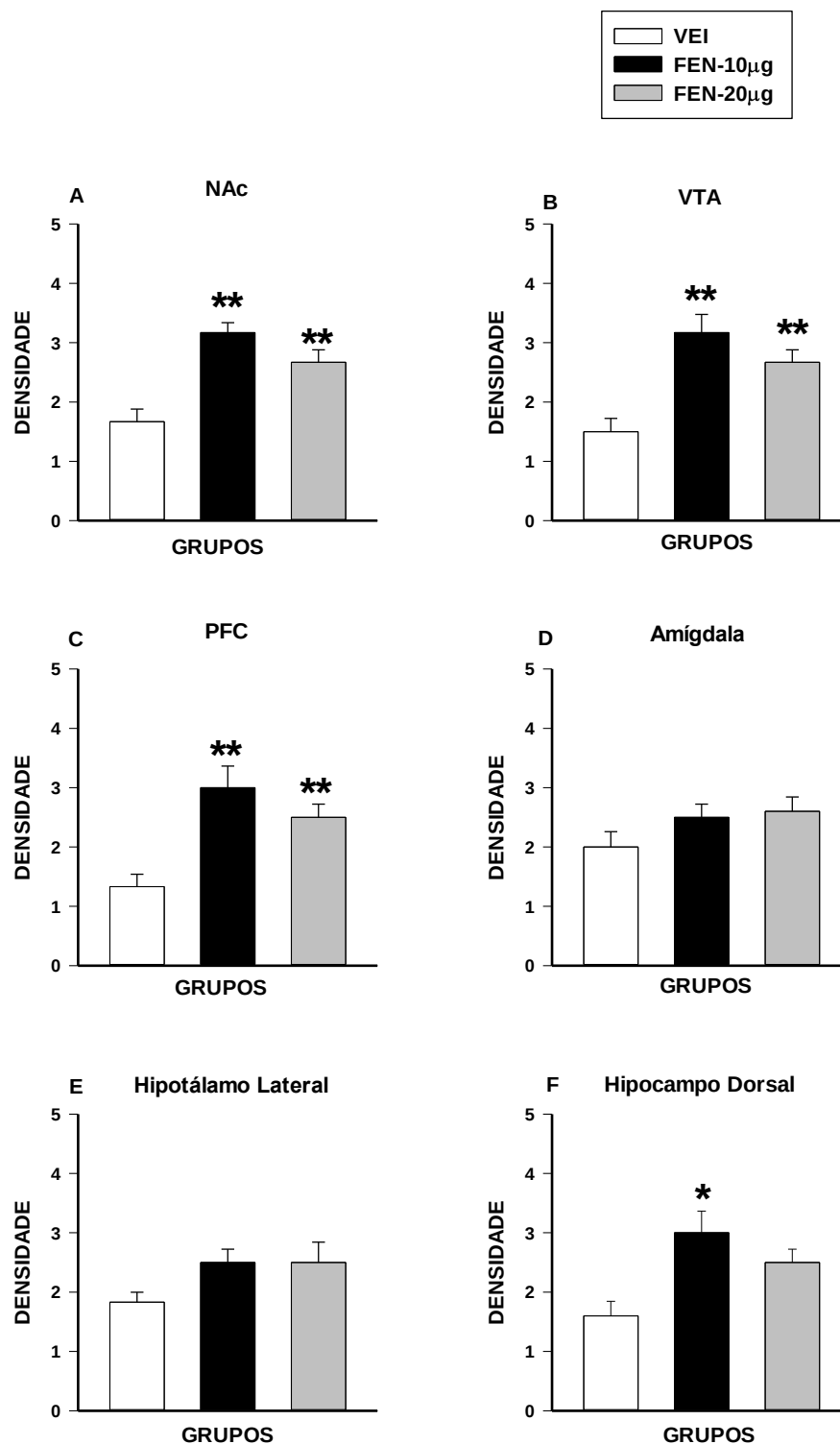


**Figura 13.** Atividade locomotora após exposição aguda ao fentanil (Experimento 1B). (A) Durante a fase de habituação, observou-se redução significativa da locomoção ao longo dos dias, com maior atividade no primeiro dia. \* indica diferença significativa em relação ao dia 3 na fase de habituação ( $p < 0,05$ ). (B) Na fase de tratamento, o grupo FEN-10 µg/kg apresentou maior atividade locomotora em comparação com os demais grupos, enquanto o grupo FEN-20 µg/kg exibiu a

menor locomoção. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).  
\*\* indica aumento significativo da locomoção em relação aos outros grupos. +  
Indica diminuição significativa da locomoção em relação aos outros grupos.

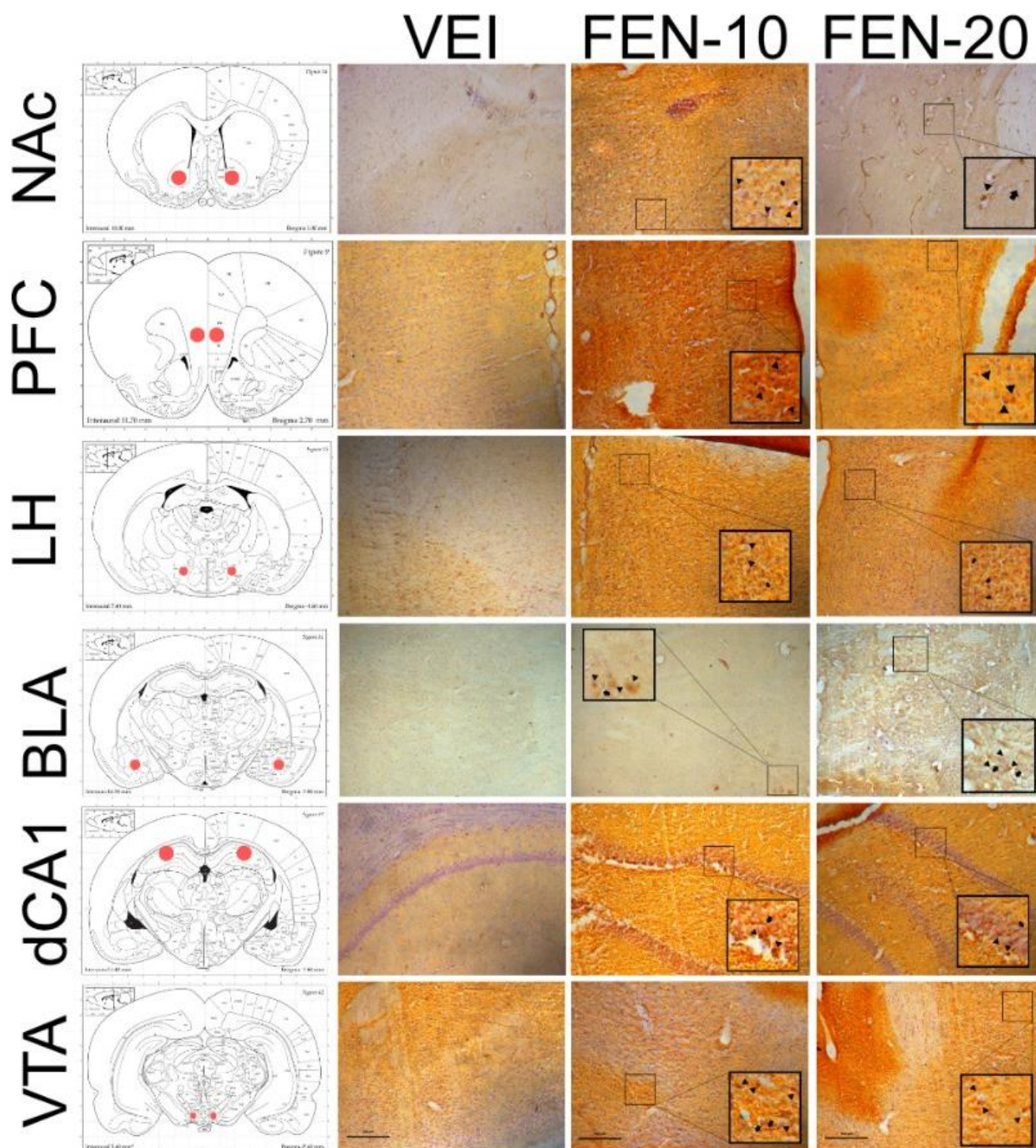
Com relação à expressão da proteína Arc do experimento 1B, a Fig. 20 apresenta os resultados da proteína Arc. Para o NAc (Fig. 20A), a ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey mostrou que houve diferença entre os grupos [ $F(2, 17) = 15,0$ ;  $p < 0,01$ ] e que os grupos FEN-20 $\mu$ g e FEN-10 $\mu$ g apresentaram densidade de Arc equivalentes e maior do que o grupo VEI ( $p < 0,05$ ). Para o VTA (Fig. 20B), a ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey mostrou que houve diferença entre os grupos [ $F(2, 17) = 11,62$ ;  $p < 0,01$ ] e que os grupos FEN-20 $\mu$ g e FEN-10 $\mu$ g apresentaram densidade de Arc equivalentes e maior do que o grupo VEI ( $p < 0,05$ ). Para o PFC (Fig. 20C), os resultados mostraram [ $F(2, 17) = 9,63$ ;  $p < 0,01$ ] que os grupos FEN-20 $\mu$ g e FEN-10 $\mu$ g apresentaram densidade maior de Arc do que o grupo VEI ( $p < 0,05$ ), não havendo diferença entre os dois grupos que receberam fentanil. Para a amígdala (Fig. 20D), não houve diferença entre os grupos [ $F(2, 16) = 0,21$ ;  $p > 0,05$ ]. Para o hipotálamo lateral (Fig. 20E), não houve diferença entre os grupos [ $F(2, 17) = 0,14$ ;  $p > 0,05$ ]. Para o hipocampo dorsal (Fig. 20F), o grupo FEN-10 $\mu$ g apresentou densidade maior de Arc do que o grupo VEI, não havendo diferença entre o grupo FEN-20 $\mu$ g e o grupo FEN-10 $\mu$ g e também não existindo diferença entre os grupos VEI e FEN-20 $\mu$ g [ $F(2, 17) = 6,0$ ;  $p < 0,01$ ].

**EXPERIMENTO 1B: ARC**  
**SESSÃO DE 30 MIN. POR 1 DIA NA ARENA**



**Figura 14.** Expressão da proteína Arc após administração aguda de fentanil (Experimento 1B). Os grupos FEN-10 µg/kg e FEN-20 µg/kg apresentaram maior densidade de Arc no NAc, VTA e PFC em comparação ao grupo VEI. Não houve diferenças na BLA e LH. No dCA1, apenas o grupo FEN-10 µg/kg diferiu do grupo VEI. Valores expressos como média ± EPM. \* indica diferença significativa em

relação ao grupo VEI,  $p < 0,01$ . \*\* indica diferença significativa em relação ao grupo VEI,  $p > 0,05$ .



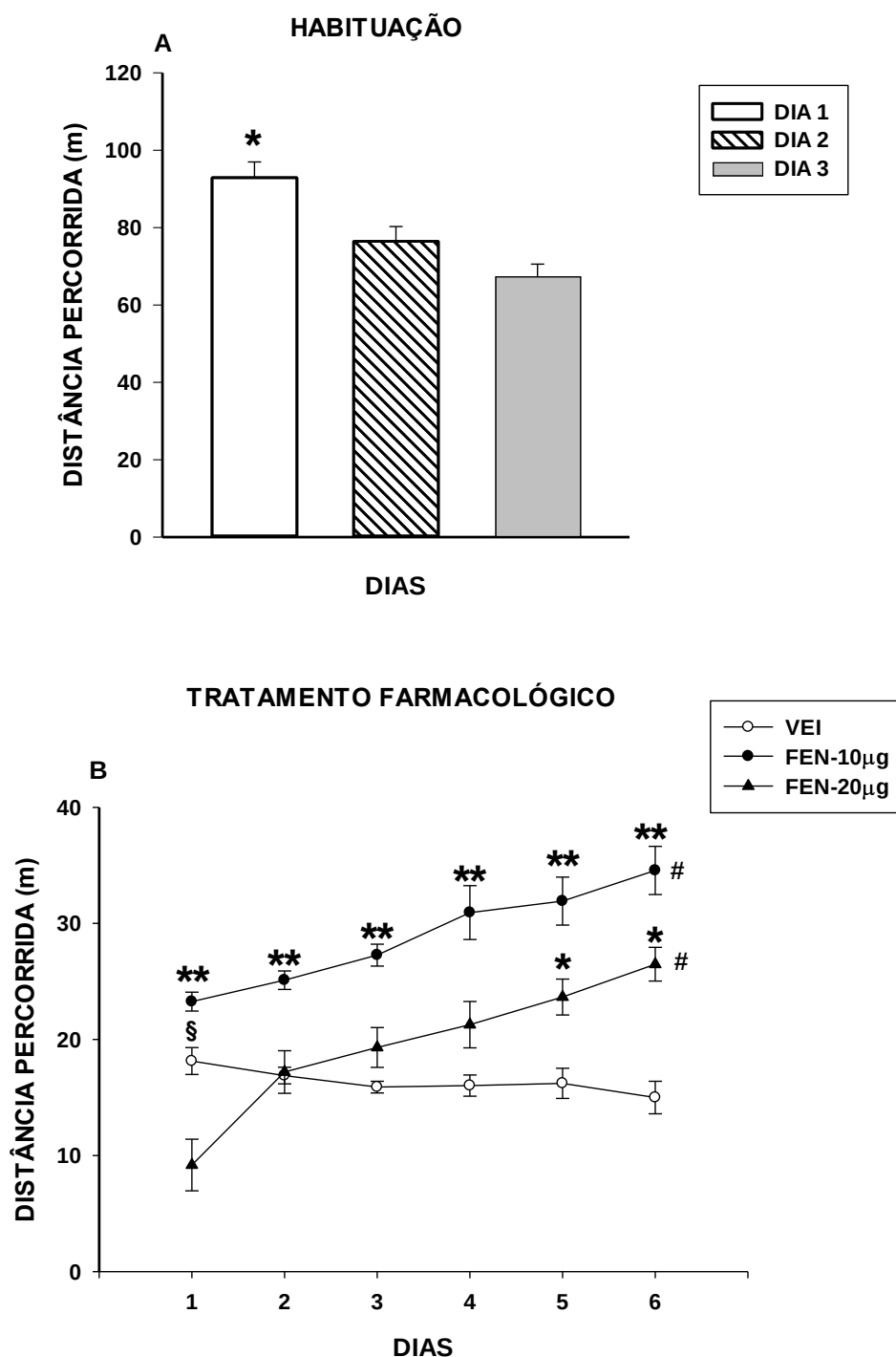
**Figura 15.** Imunomarcacão da proteína Arc em diferentes regiões encefálicas do experimento 1B. Núcleo accumbens (NAC); Área tegmental ventral (VTA); Córtex pré-frontal medial (PFC); Amígdala basolateral (BLA); Hipotálamo lateral (LH); Hipocampo dorsal (dCA1), nos grupos VEI, FEN-10  $\mu\text{g/kg}$  e FEN-20  $\mu\text{g/kg}$ . ↑ Indicando marcações de dendritos e ▲ indicando marcações do corpo celular.

A fim de se verificar se a sensibilização locomotora ocorreria no primeiro intervalo, já que foi observado nos experimentos 1A e 1B que o aumento da locomoção aconteceu nesse intervalo, realizou-se um experimento (experimento 1C) no qual os animais receberam os tratamentos e foram para a sessão experimental de 30 minutos na arena durante 6 dias consecutivos. A Fig. 22 apresenta os resultados da locomoção. Para a fase de habituação (Fig. 22A), a ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey mostrou que houve uma diminuição significativa na locomoção ao longo dos dias [ $F(2, 62) = 12,20$ ,  $p < 0,01$ ], com o dia 1 apresentando atividade locomotora superior ao dia 3 ( $p < 0,05$ ).

Para a fase de tratamento farmacológico (Fig. 22B), a ANOVA de medidas repetidas de dois fatores mostrou que houve interação entre grupos e dias [ $F(10, 90) = 14,24$ ;  $p < 0,01$ ], houve efeito dos grupos [ $F(2, 18) = 27,20$ ;  $p < 0,01$ ] e houve efeito dos dias de tratamento [ $F(5, 90) = 29,20$ ;  $p < 0,01$ ]. Para a análise dos grupos dentro dos dias utilizou-se a ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey. Os resultados mostraram que no dia 1 [ $F(2, 20) = 22,0$ ;  $p < 0,01$ ], o grupo FEN-10 $\mu$ g apresentou maior locomoção do que todos os grupos e o grupo FEN-20 $\mu$ g apresentou locomoção menor do que todos os grupos. Nos dias 2 [ $F(2, 20) = 14,45$ ;  $p < 0,01$ ], 3 [ $F(2, 20) = 25,03$ ;  $p < 0,01$ ] e 4 [ $F(2, 20) = 17,0$ ;  $p < 0,01$ ], o grupo FEN-10 $\mu$ g apresentou maior locomoção do que todos os grupos, não havendo diferença entre os grupos VEI e FEN-20 $\mu$ g. Nos dias 5 [ $F(2, 20) = 22,20$ ;  $p < 0,01$ ] e 6 [ $F(2, 18) = 34,65$ ;  $p < 0,01$ ], o grupo FEN-10 $\mu$ g apresentou maior locomoção do que todos os grupos e o grupo FEN-20 $\mu$ g apresentou locomoção maior do que o grupo VEI. Os resultados também mostraram que para o grupo VEI [ $F(5, 41) = 1,02$ ;  $p > 0,05$ ], não houve diferença na locomoção ao longo dos dias. Entretanto, para os grupos FEN-10 $\mu$ g [ $F(5, 41) = 7,0$ ;  $p < 0,01$ ] e FEN-20 $\mu$ g [ $F(5, 41) = 11,0$ ;  $p < 0,01$ ], a locomoção aumentou ao longo dos dias, mostrando que houve o desenvolvimento da sensibilização locomotora.

## EXPERIMENTO 1C: LOCOMOÇÃO

### SESSÃO DE 5 MIN. POR 6 DIAS NA ARENA

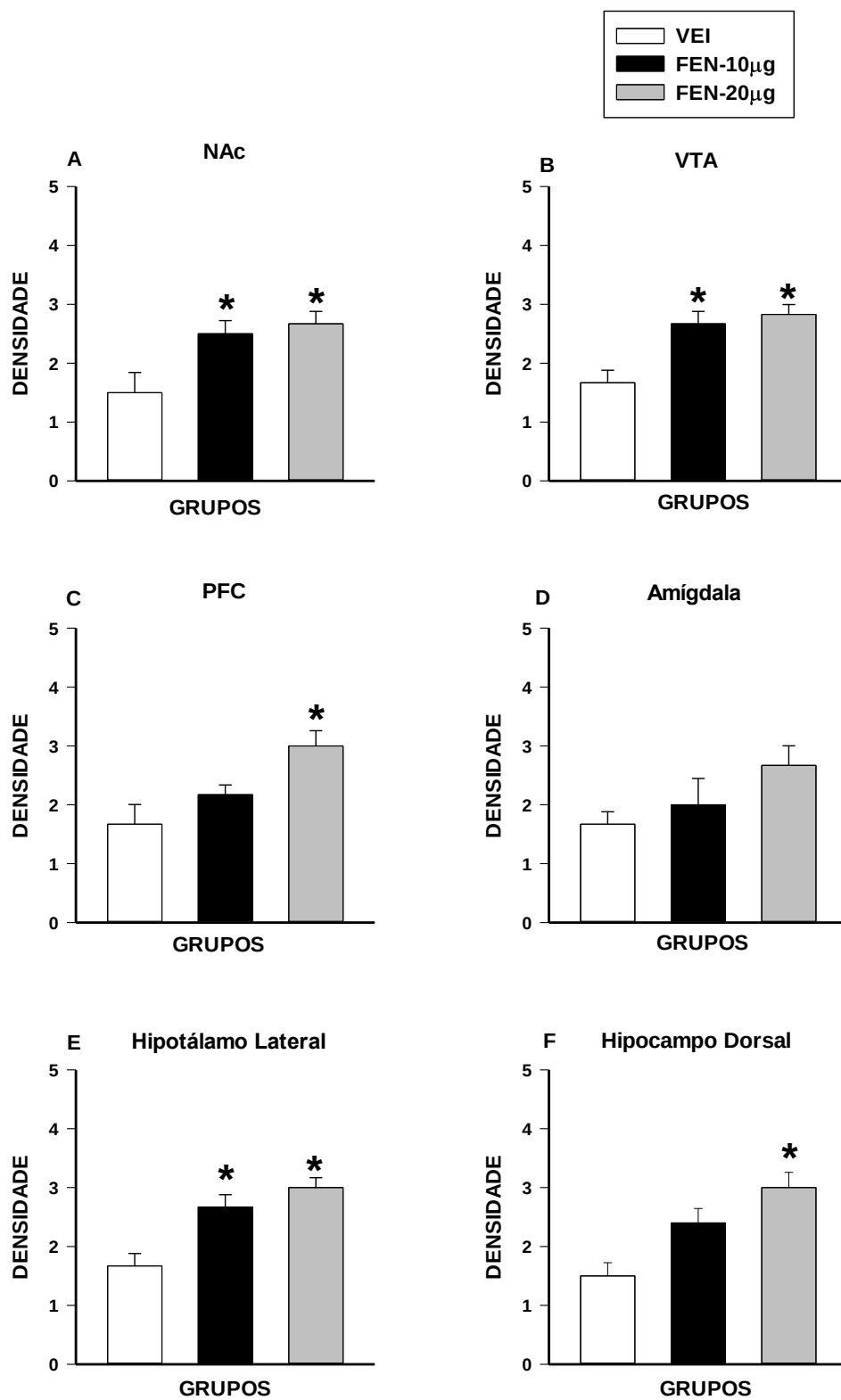


**Figura 16.** Atividade locomotora no Experimento 1C. (A) Durante a fase de habituação, observou-se redução significativa da locomoção ao longo dos dias. (B) Na fase de tratamento, houve interação entre grupos e dias, com aumento progressivo da locomoção nos grupos FEN-10 µg/kg e FEN-20 µg/kg, indicando o

desenvolvimento de sensibilização locomotora. O grupo FEN-10 µg/kg apresentou locomoção superior em todos os dias. \*\* indica maior locomoção em relação aos outros grupos. # indica maior locomoção em relação ao primeiro dia de tratamento. § indica maior locomoção no primeiro dia em relação ao último.

A Fig. 22 apresenta os resultados da expressão da proteína Arc do experimento 1C. Para o NAc (Fig. 22A), a ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey mostrou que houve diferença entre os grupos [ $F(2, 17) = 15,05,7$ ;  $p < 0,01$ ] e que os grupos FEN-20µg e FEN-10µg apresentaram densidade de Arc equivalentes e maior do que o grupo VEI ( $p < 0,05$ ). Para o VTA (Fig. 22B), a ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey mostrou que houve diferença entre os grupos [ $F(2, 17) = 10,24$ ;  $p < 0,01$ ] e que os grupos FEN-20µg e FEN-10µg apresentaram densidade de Arc equivalentes e maior do que o grupo VEI ( $p < 0,05$ ). Para o PFC (Fig. 22C), os resultados mostraram [ $F(2, 17) = 6,62$ ;  $p < 0,01$ ] que o grupo FEN-10µg apresentou densidade maior de Arc do que o grupo VEI, não havendo diferença entre o grupo FEN-20µg e o grupo FEN-10µg e também não existindo diferença entre os grupos VEI e FEN-20µg. Para a amígdala (Fig. 22D), não houve diferença entre os grupos [ $F(2, 16) = 1,10$ ;  $p > 0,05$ ]. Para o hipotálamo lateral (Fig. 22E), houve diferença entre os grupos [ $F(2, 17) = 16,25$ ;  $p < 0,01$ ], os grupos FEN-20µg e FEN-10µg apresentaram densidade equivalentes e maiores do que o grupo VEI ( $p < 0,05$ ). Para o hipocampo dorsal (Fig. 22F), o grupo FEN-10µg apresentou densidade maior de Arc do que o grupo VEI, não havendo diferença entre o grupo FEN-20µg e o grupo FEN-10µg e também não existindo diferença entre os grupos VEI e FEN-20µg [ $F(2, 16) = 4,10$ ;  $p < 0,01$ ].

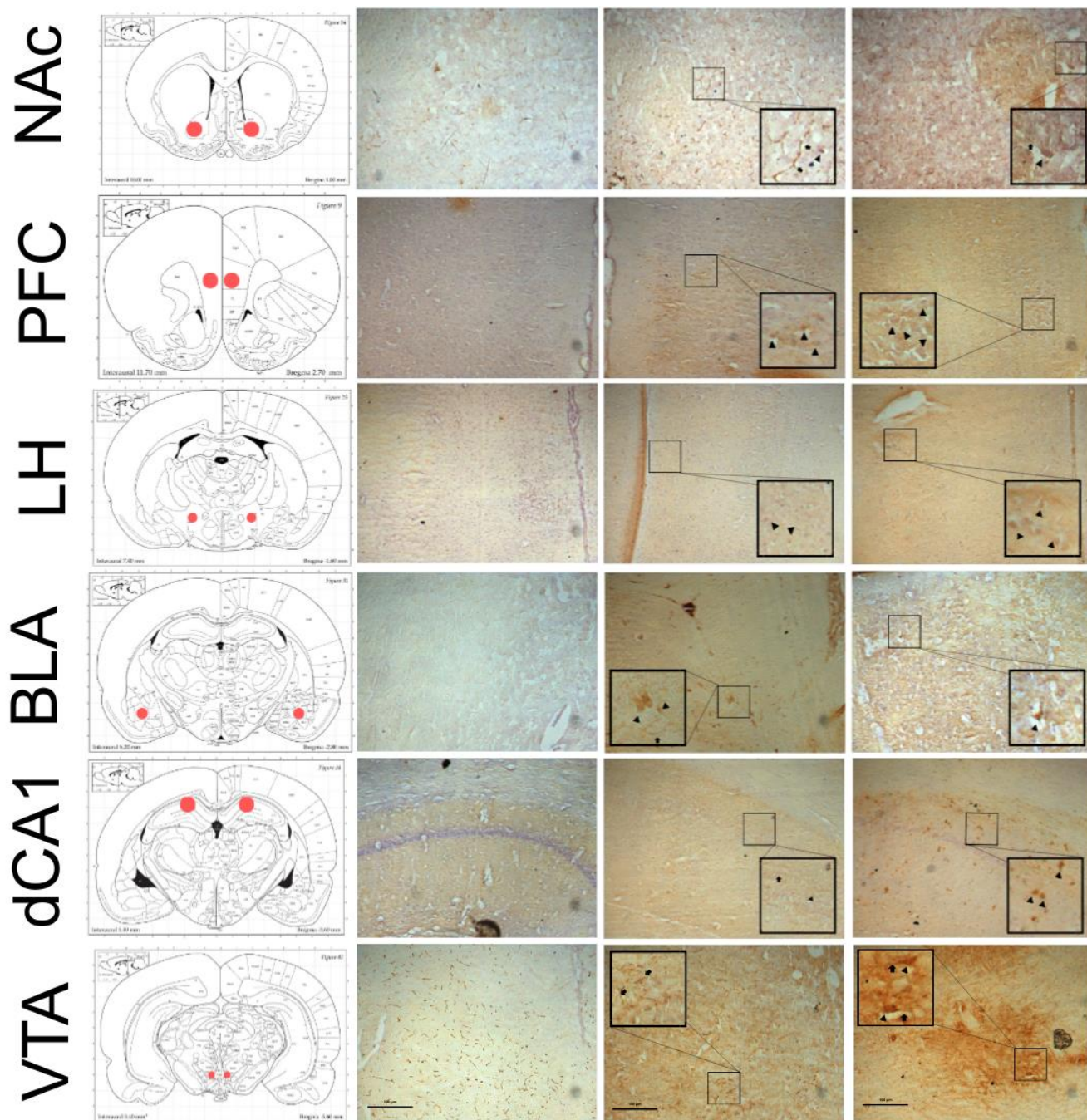
**EXPERIMENTO 1C: ARC**  
**SESSÃO DE 5 MIN POR 6 DIAS NA ARENA**



**Figura 17.** Expressão da proteína Arc após tratamento repetido com fentanil (Experimento 1C). FEN-10  $\mu$ g/kg e FEN-20  $\mu$ g/kg aumentaram a expressão de Arc



no NAc, VTA e LH em relação ao grupo VEI. No PFC e dCA1, apenas FEN-10  $\mu\text{g/kg}$  diferiu do VEI. Não houve diferença na BLA. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao VEI.

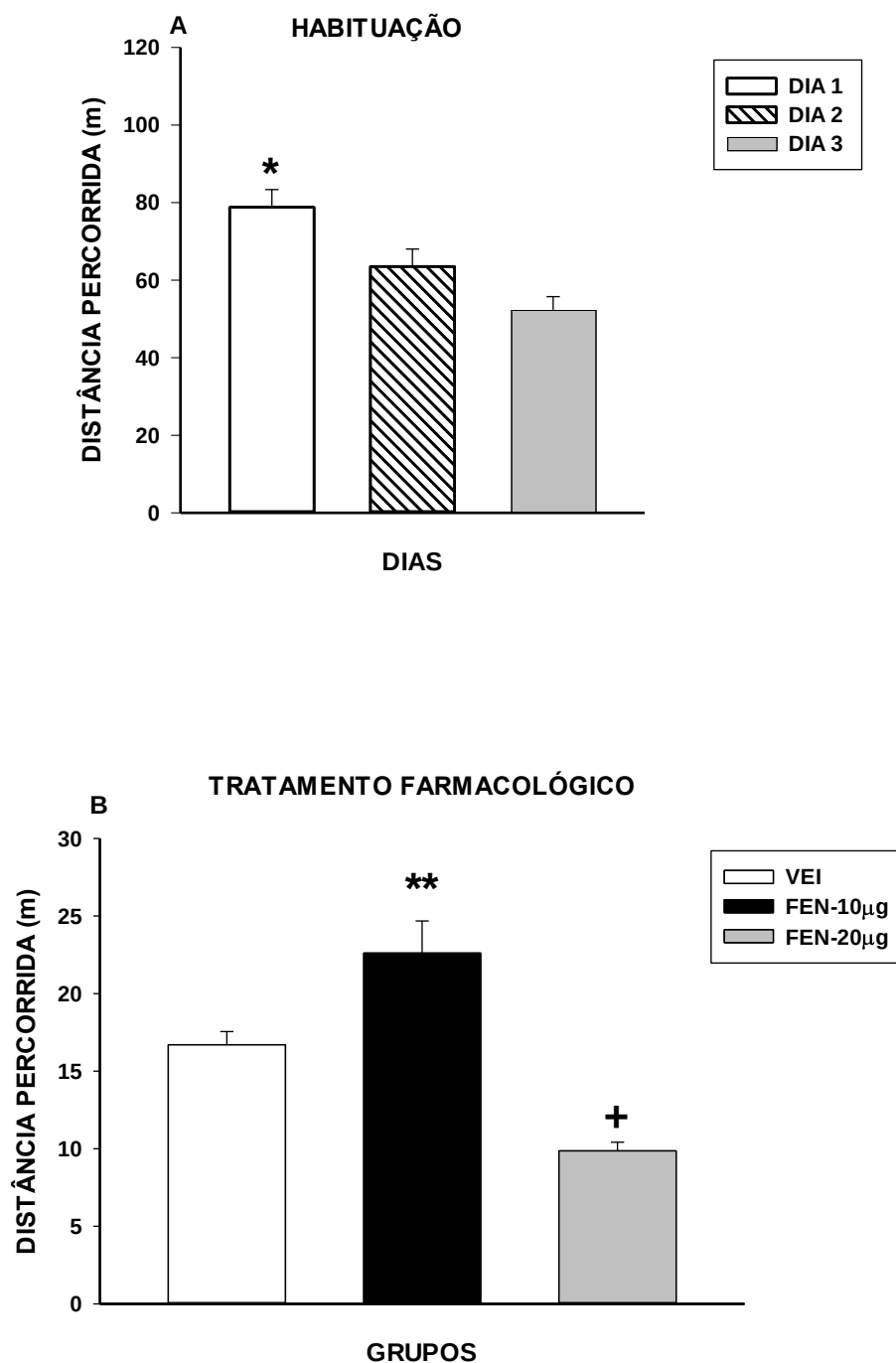


**Figura 18.** Imunomarcacão da proteína Arc em diferentes regiões encefálicas do experimento 1C. Núcleo accumbens (NAc); Área tegmental ventral (VTA); Córtex pré-frontal medial (PFC); Amígdala basolateral (BLA); Hipotálamo lateral (LH);

Hipocampo dorsal (dCA1), nos grupos VEI, FEN-10 µg/kg e FEN-20 µg/kg.   
Indicando marcações de dendritos e  indicando marcações do corpo celular.

A fim de se verificar a expressão da proteína Arc após uma única sessão na arena por um período de 5 minutos, realizou-se o experimento 1D. A Fig. 25 apresenta a atividade locomotora desse experimento. Para a fase de habituação (Fig. 25A), a ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey mostrou que houve uma diminuição significativa na locomoção ao longo dos dias [ $F(2, 53) = 10,0$ ,  $p < 0,01$ ], com o dia 1 apresentando atividade locomotora superior ao dia 3 ( $p < 0,05$ ). Para a fase de tratamento farmacológico (Fig. 25B), a ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey mostrou que houve diferença entre os grupos [ $F(2, 20) = 23,20$ ,  $p < 0,01$ ], com o grupo FEN-10µg apresentando maior locomoção do que todos os grupos ( $p < 0,05$ ) e o grupo FEN-20µg apresentando a menor locomoção ( $p < 0,05$ ).

**EXPERIMENTO 1D: LOCOMOÇÃO**  
**SESSÃO DE 5 MIN. POR 1 DIA NA ARENA**

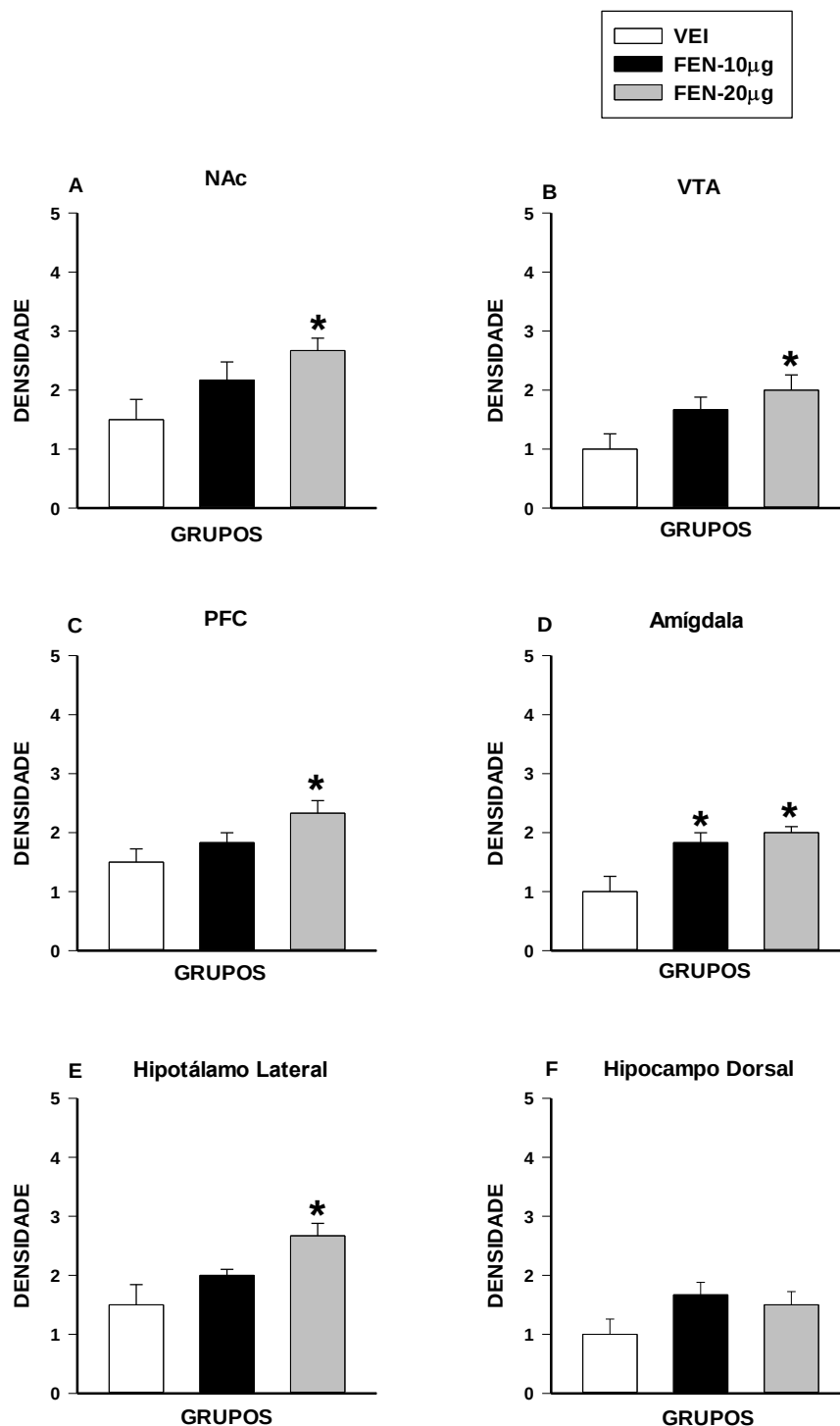


**Figura 19.** Atividade locomotora após exposição única de 5 minutos à arena (Experimento 1D). (A) Durante a fase de habituação, houve redução significativa da locomoção ao longo dos dias. (B) Na fase de tratamento, o grupo FEN-10 µg/kg apresentou maior locomoção do que todos os grupos, enquanto o grupo FEN-20 µg/kg apresentou a menor. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \*\* indica

aumento significativo em relação aos demais grupos. + indica diminuição significativa em relação aos demais grupos.

A Fig. 20 apresenta os resultados da expressão da proteína Arc do experimento 1D. Para o NAc (Fig. 20A), a ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey mostrou que houve diferença entre os grupos [ $F(2, 17) = 4,02$ ;  $p < 0,05$ ] e que o grupo FEN-20 $\mu$ g apresentou densidade maior que o grupo VEI, não havendo diferença entre os grupos FEN-20 $\mu$ g e FEN-10 $\mu$ g e nem diferença entre os grupos FEN-10 $\mu$ g e VEI ( $p < 0,05$ ). Para o VTA (Fig. 20B), a ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey mostrou que houve diferença entre os grupos [ $F(2, 17) = 4,40$ ;  $p < 0,05$ ] e que o grupo FEN-20 $\mu$ g apresentou densidade maior que o grupo VEI, não havendo diferença entre os grupos FEN-20 $\mu$ g e FEN-10 $\mu$ g e nem diferença entre os grupos FEN-10 $\mu$ g e VEI ( $p < 0,05$ ). Para o PFC (Fig. 20C), os resultados mostraram [ $F(2, 17) = 4,32$ ;  $p < 0,05$ ] que o grupo FEN-20 $\mu$ g apresentou densidade maior de Arc do que o grupo VEI, não havendo diferença entre o grupo FEN-20 $\mu$ g e o grupo FEN-10 $\mu$ g e também não existindo diferença entre os grupos VEI e FEN-20 $\mu$ g. Para a amígdala (Fig. 20D), houve diferença entre os grupos [ $F(2, 17) = 9,12$ ;  $p < 0,01$ ] e os grupos FEN-20 $\mu$ g e FEN-10 $\mu$ g apresentaram densidade equivalentes e maiores do que o grupo VEI ( $p < 0,05$ ). Para o hipotálamo lateral (Fig. 20E), houve diferença entre os grupos [ $F(2, 17) = 6,40$ ;  $p < 0,01$ ], o grupo FEN-20 $\mu$ g apresentou densidade maior de Arc do que o grupo VEI, não havendo diferença entre o grupo FEN-20 $\mu$ g e o grupo FEN-10 $\mu$ g e também não existindo diferença entre os grupos VEI e FEN-20 $\mu$ g. Para o hipocampo dorsal (Fig. 20F), não houve diferença entre os grupos [ $F(2, 17) = 2,24$ ;  $p > 0,05$ ].

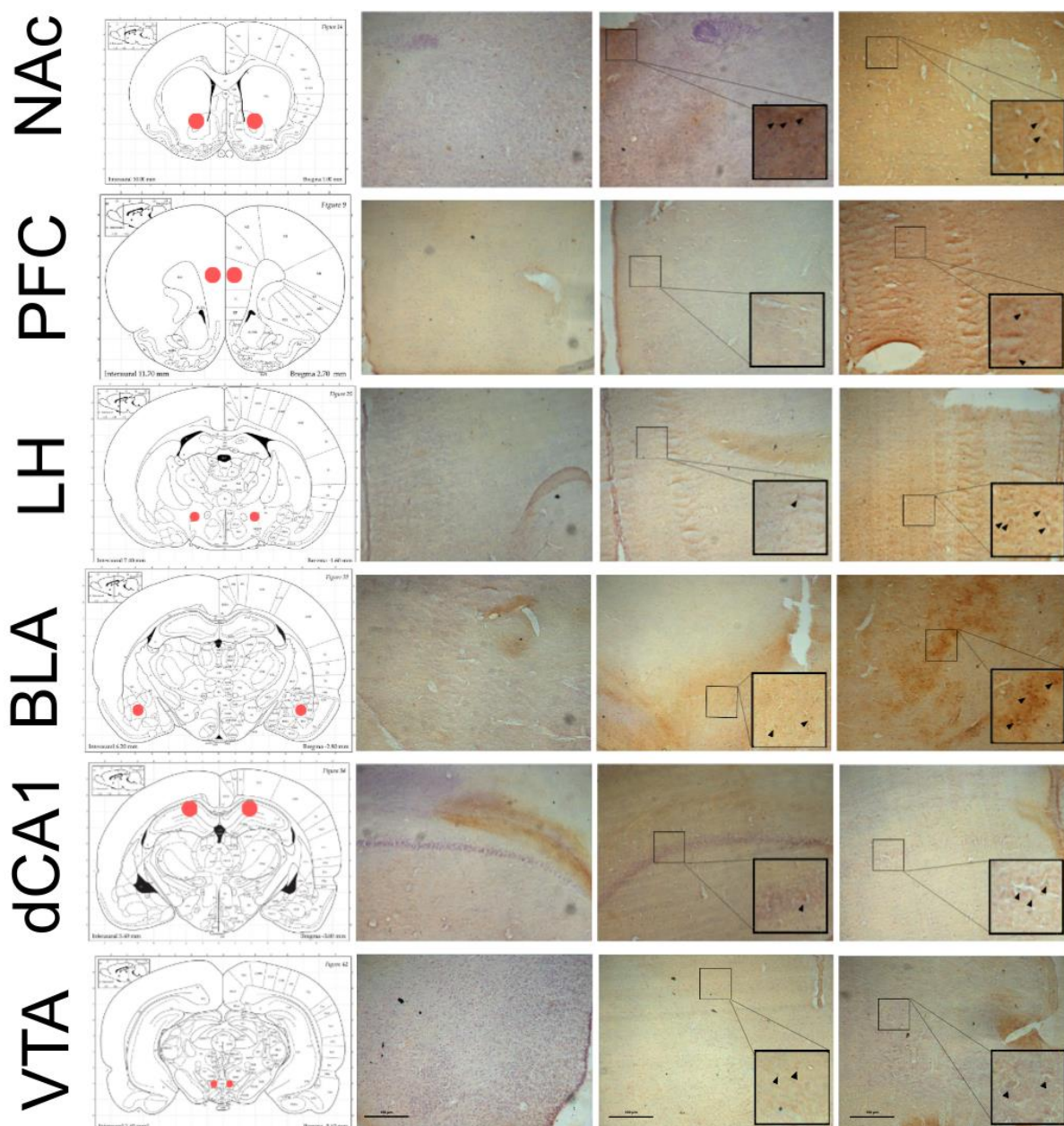
**EXPERIMENTO 1D: ARC**  
**SESSÃO DE 5 MIN. POR 1 DIA NA ARENA**



**Figura 20.** Expressão da proteína Arc após exposição única de 5 minutos à arena (Experimento 1D). O grupo FEN-20  $\mu$ g/kg apresentou maior densidade de Arc no NAc, VTA, PFC, BLA e LH em comparação ao grupo VEI. No PFC e LH, não houve diferença entre FEN-10  $\mu$ g/kg e os demais grupos. Na BLA, ambos os grupos tratados com fentanil apresentaram maior expressão que o VEI. Não houve diferença no dCA1. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* indica diferença



significativa em relação ao VEI.



**Figura 21.** Imunomarcção da proteína Arc em diferentes regiões encefálicas do experimento 1D. Núcleo accumbens (NAc); Área tegmental ventral (VTA); Córtex pré-frontal medial (PFC); Amígdala basolateral (BLA); Hipotálamo lateral (LH); Hipocampo dorsal (dCA1), nos grupos VEI, FEN-10 µg/kg e FEN-20 µg/kg. ↑ Indicando marcações de dendritos e ▲ indicando marcações do corpo celular.

A Fig. 22 apresenta a comparação entre os resultados da Arc do experimento 1A (30 minutos por 6 dias consecutivos na arena) e o

experimento 1B (sessão única de 30 minutos na arena). Para o NAc (Fig. 22A), a ANOVA de dois fatores mostrou que houve interação entre grupos X experimentos [ $F(2, 36) = 12,10$ ;  $p < 0,01$ ], efeito dos grupos [ $F(2, 36) = 38,82$ ;  $p < 0,01$ ] e efeito dos experimentos [ $F(1, 36) = 4,50$ ;  $p < 0,05$ ]. Para analisar a interação grupos X experimentos, o teste t para amostras independentes foi utilizado na comparação entre os mesmos grupos de experimentos diferentes. Os resultados mostraram que o grupo FEN-20 $\mu$ g do experimento 1A (6 sessões diárias de 30 minutos) apresentou densidade de Arc maior do que o grupo FEN-20 $\mu$ g do experimento 1B (uma sessão de 30 minutos) [ $t(10) = 5,60$ ;  $p < 0,01$ ], não havendo diferenças entre os demais pares de grupos. Os resultados também mostraram que o grupo FEN-20 $\mu$ g do experimento 1A apresentou densidade de Arc maior do que todos os grupos [ $F(5, 35) = 21,25$ ;  $p < 0,01$ ].

Para o VTA (Fig. 22B), a ANOVA de dois fatores mostrou que houve interação entre grupos X experimentos [ $F(2, 36) = 4,0$ ;  $p < 0,05$ ], efeito dos grupos [ $F(2, 36) = 17,70$ ;  $p < 0,01$ ], mas não houve efeito dos experimentos [ $F(1, 36) = 0,05$ ;  $p > 0,05$ ]. O teste t para amostras independentes mostrou que o grupo FEN-10 $\mu$ g do experimento 2 (uma sessão de 30 minutos) apresentou maior densidade do que o grupo FEN-10 $\mu$ g do experimento 1A (6 sessões diárias de 30 minutos) [ $t(10) = 2,24$ ;  $p < 0,05$ ]. Por outro lado, o grupo FEN-20 $\mu$ g do experimento 1A (6 sessões diárias de 30 minutos) apresentou densidade maior do que o grupo FEN-20 $\mu$ g do experimento 1B (uma sessão de 30 minutos) [ $t(10) = 2,53$ ;  $p < 0,05$ ]. Os resultados também mostraram que o grupo FEN-20 $\mu$ g do experimento 1 e o grupo FEN-10 $\mu$ g do experimento 1B apresentaram densidades equivalente e maiores do que os demais grupos [ $F(5, 35) = 8,70$ ;  $p < 0,01$ ].

Para o PFC (Fig. 22C), a ANOVA de dois fatores mostrou que houve interação entre grupos X experimento [ $F(2, 36) = 4,54$ ;  $p < 0,05$ ], efeito dos grupos [ $F(2, 36) = 21,44$ ;  $p < 0,01$ ], mas não houve efeito dos experimentos [ $F(1, 36) = 2,82$ ;  $p > 0,05$ ]. O teste t para amostras independentes mostrou que o grupo FEN-20 $\mu$ g do experimento 1A apresentou densidade maior do que o grupo FEN-20 $\mu$ g do experimento 1B [ $t(10) = 3,51$ ;  $p < 0,01$ ].

Para a amígdala (Fig. 22D), a ANOVA de dois fatores mostrou que houve interação entre grupos X experimento [ $F(2, 36) = 4,0$ ;  $p < 0,05$ ], efeito dos grupos [ $F(2, 36) = 18,0$ ;  $p < 0,01$ ], mas não houve efeito dos experimentos [ $F(1, 36) = 0,10$ ;  $p > 0,05$ ]. O teste t para amostras independentes mostrou que o grupo FEN-10 $\mu$ g do experimento 1B (uma sessão de 30 minutos) apresentou densidade maior do que o grupo do experimento 1A (6 sessões diárias de 30 minutos) [ $t(10) = 2,71$ ;  $p < 0,05$ ].

Para o hipotálamo lateral (Fig. 22E), a ANOVA de dois fatores mostrou que houve interação entre grupos X experimento [ $F(2, 36) = 4,51$ ;  $p < 0,01$ ], efeito dos grupos [ $F(2, 36) = 13,40$ ;  $p < 0,01$ ], mas não houve efeito dos experimentos [ $F(1, 36) = 3,02$ ;  $p > 0,05$ ]. O teste t para amostras independentes mostrou que o grupo FEN-20 $\mu$ g do experimento 1A apresentou densidade maior do que o grupo FEN-20 $\mu$ g do experimento 1B ([ $t(10) = 2,90$ ;  $p < 0,05$ ]. Os resultados também mostraram que o grupo FEN-20 $\mu$ g do experimento 1 (6 sessões diárias de 30 minutos) apresentou densidade maior do que os outros grupos [ $F(5, 35) = 7,80$ ;  $p < 0,01$ ].

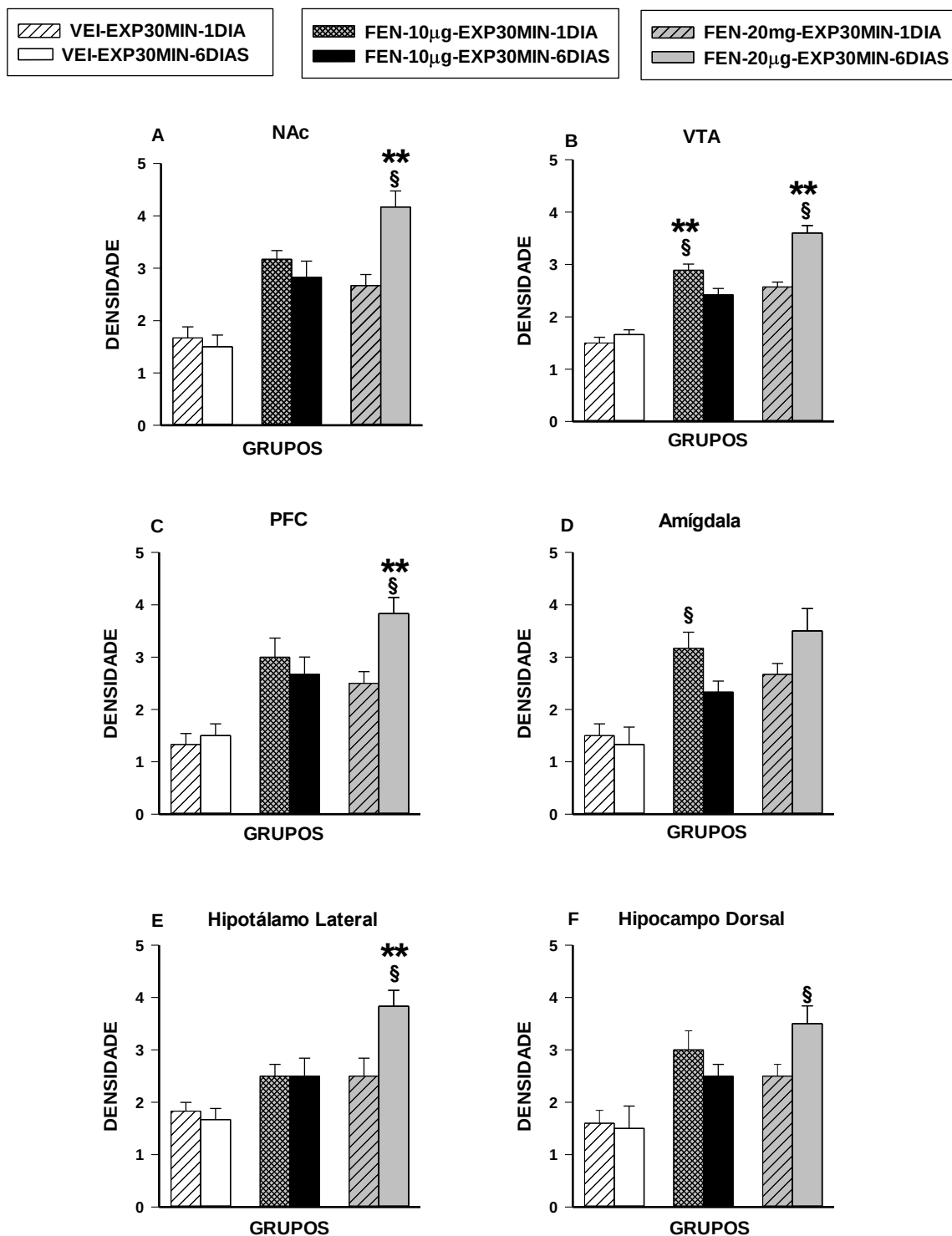
Para o hipocampo dorsal (Fig. 22F), a ANOVA de dois fatores mostrou que houve interação entre grupos X experimento [ $F(2, 36) = 3,10$ ;  $p < 0,05$ ], efeito dos grupos [ $F(2, 36) = 11,42$ ;  $p < 0,01$ ], mas não houve efeito dos experimentos [ $F(1, 36) = 0,30$ ;  $p > 0,05$ ]. O teste t para amostras independentes mostrou que o grupo FEN-20 $\mu$ g do experimento 1A (6 sessões diárias de 30 minutos) apresentou densidade maior do que o grupo FEN-20 $\mu$ g do experimento 1B (uma sessão de 30 minutos) ([ $t(10) = 2,50$ ;  $p < 0,05$ ].

No geral, os resultados mostraram que, exceto na amígdala, houve um aumento na expressão da Arc para o grupo FEN-20 $\mu$ g do experimento 1A (6 sessões diárias de 30 minutos) em todas as áreas encefálicas avaliadas, provavelmente em decorrência do aumento das administrações do fentanil e do aumento da experiência na arena. Na amígdala, o grupo FEN-10 $\mu$ g do experimento 1B (uma sessão de 30 minutos) apresentou maior densidade do que o seu grupo similar do experimento 1. Além disso, no VTA também foi observado um aumento na expressão da Arc para o



grupo FEN-10 $\mu$ g do experimento 1B (uma sessão de 30 minutos) em relação ao experimento 1A (6 sessões diárias de 30 minutos).

### EXP 30 MIN POR 1 DIA *VERSUS* EXP 30 MIN POR 6 DIAS



**Figura 22.** Comparação da expressão da proteína Arc entre os Experimentos 1A e 1B. O grupo FEN-20  $\mu$ g/kg do Experimento 1A apresentou maior expressão de

Arc em quase todas as regiões encefálicas, exceto na amígdala. Na amígdala e na VTA, o grupo FEN-10 µg/kg do Experimento 1B apresentou maior densidade de Arc que seu grupo correspondente do Experimento 1<sup>a</sup>. \*\* indica diferença significativa em relação aos demais grupos. § diferença significativa em relação ao grupo correspondente de 1 dia.

A Fig. 22 apresenta a comparação entre os resultados da Arc do experimento 1C (5 minutos por 6 dias consecutivos na arena) e o experimento 1D (sessão única de 5 minutos na arena). Para o NAc (Fig. 22A), a ANOVA de dois fatores mostrou que houve somente efeito dos grupos [ $F(2, 36) = 9,30$ ;  $p < 0,01$ ]. Não houve efeito dos experimentos [ $F(1, 36) = 0,23$ ;  $p > 0,05$ ] e não houve interação entre grupos X experimentos [ $F(2, 36) = 0,24$ ;  $p > 0,05$ ]. Os resultados mostraram que os grupos que receberam fentanil apresentaram maior densidade de expressão da proteína Arc do que os grupos que receberam veículo ( $p < 0,05$ ).

Para o VTA (Fig. 22B), a ANOVA de dois fatores mostrou que houve efeito dos grupos [ $F(2, 36) = 13,11$ ;  $p < 0,01$ ] e efeito dos experimentos [ $F(1, 36) = 21,23$ ;  $p < 0,05$ ], mas não houve interação entre grupos X experimentos [ $F(2, 36) = 0,30$ ;  $p > 0,05$ ]. Os resultados mostraram que os grupos FEN-20µg e FEN-10µg ambos do experimento 1C (sessão na arena de 5 minutos por 6 dias consecutivos) apresentaram densidades equivalentes e maiores do que os demais grupos [ $F(5, 35) = 10,81$ ;  $p < 0,01$ ].

Para o PFC (Fig. 22C), a ANOVA de dois fatores mostrou que houve efeito dos grupos [ $F(2, 36) = 10,93$ ;  $p < 0,01$ ] e efeito dos experimentos [ $F(1, 36) = 4,15$ ;  $p < 0,05$ ], mas não houve interação entre grupos X experimentos [ $F(2, 36) = 0,60$ ;  $p > 0,05$ ]. Os resultados mostraram que o grupo FEN-20µg do experimento 1C (sessão na arena de 5 minutos por 6 dias consecutivos) apresentou densidade maior que todos os grupos [ $F(5, 35) = 5,44$ ;  $p < 0,01$ ], exceto do grupo FEN-20µg do experimento 1D (sessão única de 5 minutos na arena), cujas densidades foram equivalentes.

Para a amígdala (Fig. 22D), a ANOVA de dois fatores mostrou que houve efeito dos grupos [ $F(2, 36) = 7,0$ ;  $p < 0,01$ ] e efeito dos experimentos [ $F(1, 36) = 5,0$ ;  $p < 0,05$ ], mas não houve interação entre grupos X experimentos [ $F(2, 36) = 0,6$ ;  $p > 0,05$ ]. Os resultados mostraram que o

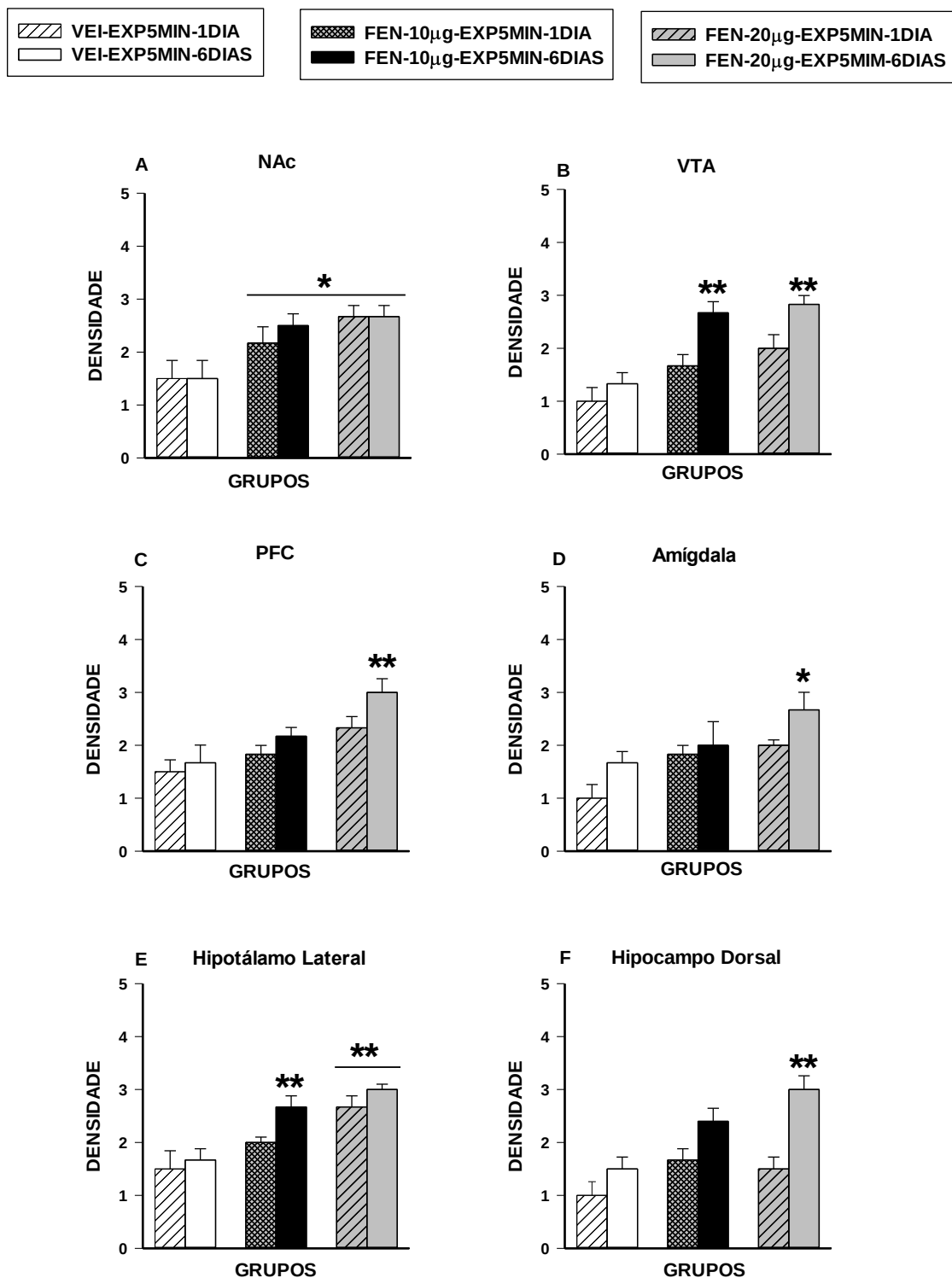
grupo FEN-20 $\mu$ g do experimento 1C (sessão na arena de 5 minutos por 6 dias consecutivos) apresentou densidade maior que os grupos veículos [F (5, 35) = 4,0;  $p < 0,01$ ].

Para hipotálamo lateral (Fig. 22E), a ANOVA de dois fatores mostrou que houve efeito dos grupos [F (2, 36) = 19,0;  $p < 0,01$ ] e efeito dos experimentos [F (1, 36) = 5,44;  $p < 0,05$ ], mas não houve interação entre grupos X experimentos [F (2, 36) = 0,80;  $p > 0,05$ ]. Os resultados mostraram que os grupos FEN-20 $\mu$ g dos dois experimentos e o grupo FEN-10 $\mu$ g do experimento 1C (sessão na arena de 5 minutos por 6 dias consecutivos) apresentaram densidades maiores que os outros grupos [F (5, 35) = 9,0;  $p < 0,01$ ].

Para o hipocampo dorsal (Fig. 22F), a ANOVA de dois fatores mostrou que houve efeito dos grupos [F (2, 36) = 10,04;  $p < 0,01$ ] e efeito dos experimentos [F (1, 36) = 22,0;  $p < 0,01$ ], mas não houve interação entre grupos X experimentos [F (2, 36) = 2,50;  $p > 0,05$ ]. Os resultados mostraram que o grupo FEN-20 $\mu$ g do experimento 1C (sessão na arena de 5 minutos por 6 dias consecutivos) apresentou densidade maior que todos os grupos [F (5, 34) = 9,40;  $p < 0,01$ ], exceto do grupo FEN-10 $\mu$ g do experimento 1C, cujas densidades foram equivalentes.

No geral, a comparação mostrou que para todas as áreas encefálicas avaliadas, a concentração mais elevada de fentanil (FEN-20 $\mu$ g) juntamente com o maior número de sessões diárias na arena (6 dias) produziram a expressão maior da proteína Arc, exceto para o NAc cujo resultado mostrou que houve expressão equivalente da proteína Arc independente da concentração do fentanil e do número de sessões na arena.

### EXP 5 MIN POR 1 DIA *VERSUS* EXP 5 MIN POR 6 DIAS



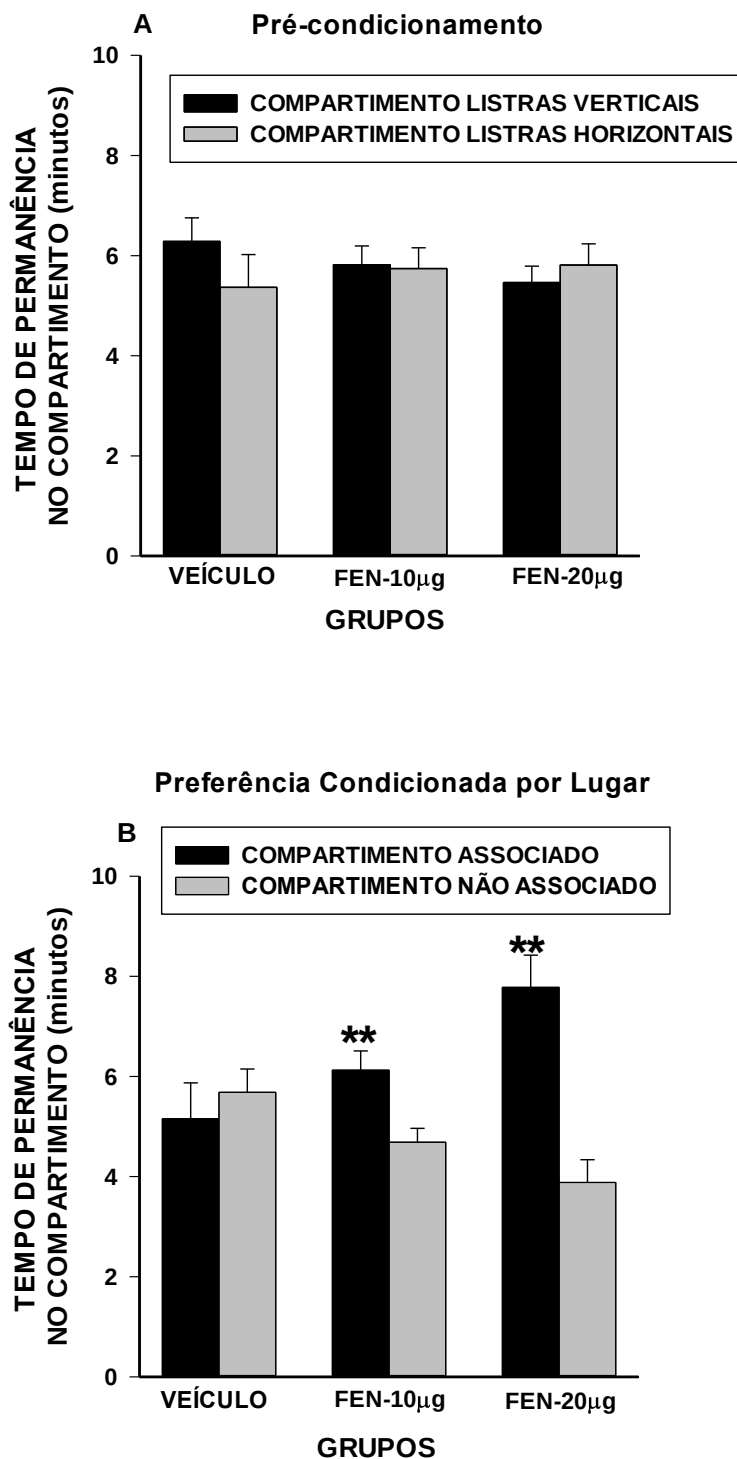
**Figura 23.** Comparação da expressão da proteína Arc entre os Experimentos 1C e 1D. O Experimento 1C consistiu em exposições diárias de 5 minutos por 6 dias consecutivos, enquanto o Experimento 1D envolveu uma única sessão de 5 minutos na arena. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \*indica diferença

significativa em relação ao VEI. \*\* indica diferença significativa em relação aos demais grupos.

**6.2. Experimento 2:** Efeito do tratamento com fentanil na expressão da locomoção condicionada e na proteína Arc.

A Fig. 24 apresenta os resultados do experimento de preferência condicionada por lugar. Para os resultados do dia de pré-condicionamento (Fig. 24A), o teste t de Student para amostras dependentes mostrou que não houve diferenças entre os dois compartimentos para os grupos VEI [ $t(4) = 0,95$ ;  $p > 0,05$ ], FEN-10 $\mu$ g [ $t(6) = 0,14$ ;  $p > 0,05$ ] e FEN-20 $\mu$ g [ $t(6) = 0,51$ ;  $p > 0,05$ ], mostrando que antes do início da fase de condicionamento os animais não apresentaram preferência por nenhum compartimento da caixa experimental. No teste de preferência condicionada por lugar (Fig. 24B), por meio do teste t de Student para amostras dependentes, verificou-se que não houve diferença para os animais experimentais no grupo veículo [ $t(4) = 0,60$ ;  $p > 0,05$ ]. Já para os grupos FEN-10 $\mu$ g [ $t(6) = 3,44$ ;  $p < 0,01$ ] e FEN-20 $\mu$ g [ $t(6) = 4,20$ ;  $p < 0,01$ ], os resultados mostraram que os animais preferiram o compartimento associado ao fármaco, mostrando o estabelecimento de uma resposta condicionada.

## EXP2: PREFERÊNCIA CONDICIONADA POR LUGAR



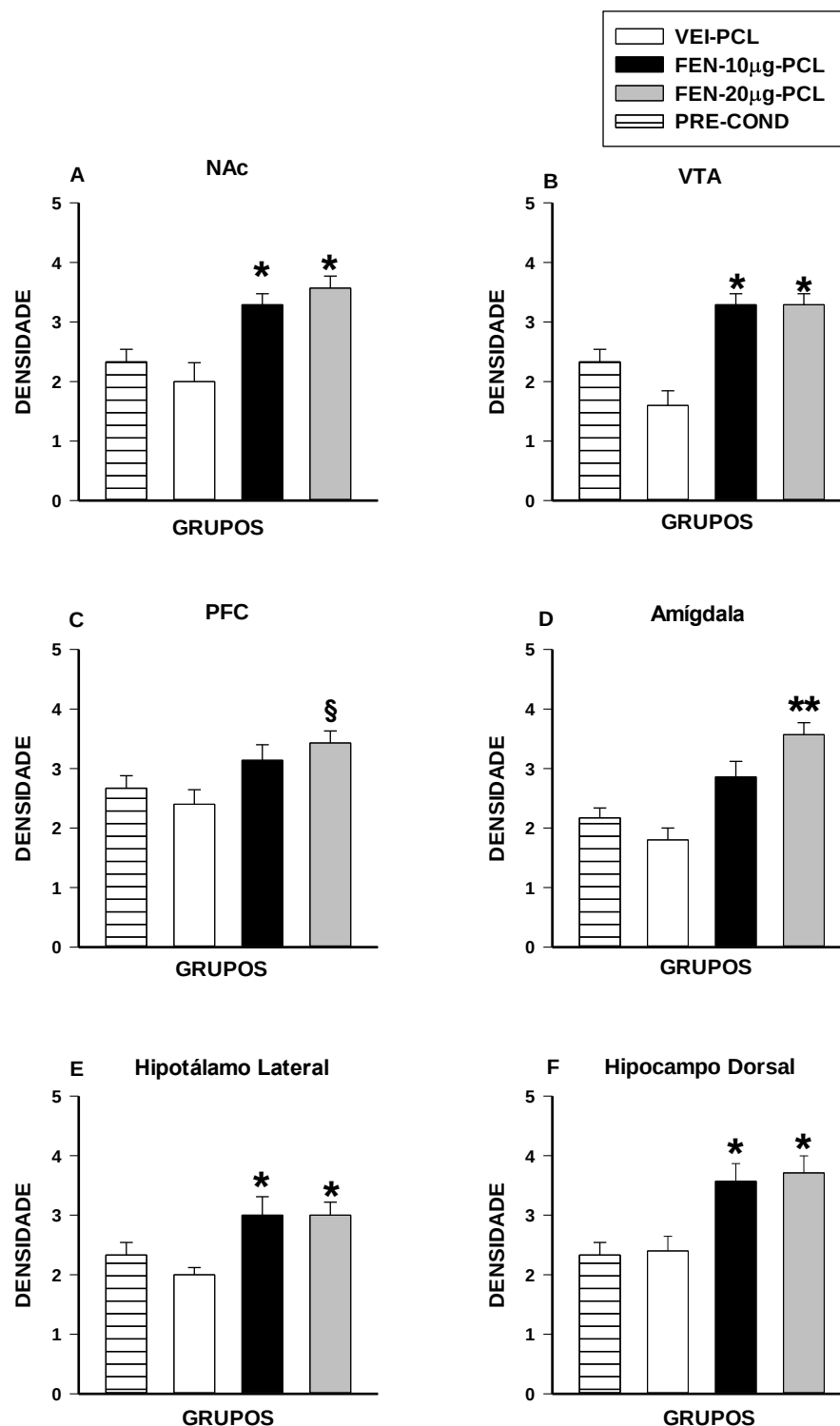
**Figura 24.** Resultados do teste de preferência condicionada por lugar. (A) No dia de pré-condicionamento, não houve preferência por nenhum compartimento nos três grupos. (B) Após o condicionamento, os grupos FEN-10 µg/kg e FEN-20 µg/kg passaram a preferir o compartimento associado ao fentanil, indicando aprendizado

associativo. O grupo VEI não apresentou preferência. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \*\* indicando diferença significativa em relação ao VEI.

A Fig. 25 apresenta os resultados da proteína Arc para os grupos que foram submetidos ao teste de PCL (experimento 2A) e para o grupo pré-condicionamento (PRE) (experimento 2B). Para o NAc (Fig. 25A), a ANOVA de um fator mostrou que houve diferença entre os grupos [ $F(3, 24) = 11,0$ ;  $p < 0,01$ ] e o teste de Tukey mostrou que o grupo FEN-20 $\mu$ g e o grupo FEN-10 $\mu$ g apresentaram densidades equivalentes e superiores ao grupo VEI e ao grupo PRE ( $p < 0,05$ ). Para o VTA (Fig. 25B), a ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey mostrou que houve diferença entre os grupos [ $F(3, 24) = 15,13$ ;  $p < 0,01$ ] e o teste de Tukey mostrou que o grupo FEN-20 $\mu$ g e o grupo FEN-10 $\mu$ g apresentaram densidades equivalentes e superiores ao grupo VEI e ao grupo PRE ( $p < 0,05$ ). Para o PFC (Fig. 25C), o grupo FEN-20 $\mu$ g apresentou densidade maior de Arc do que o grupo VEI [ $F(3, 24) = 4,0$ ;  $p < 0,05$ ] Os resultados também mostraram que o grupo FEN-10 $\mu$ g apresentou densidade maior do que o grupo VEI ( $p < 0,05$ ). Para a amígdala (Fig. 25D), o grupo FEN-20 $\mu$ g apresentou maior densidade do que os demais grupos [ $F(3, 24) = 12,70$ ;  $p < 0,01$ ], exceto o grupo FEN-10 $\mu$ g cujas densidades foram equivalentes. Para o hipotálamo lateral (Fig. 25E), o grupo FEN-20 $\mu$ g e o grupo FEN-10 $\mu$ g apresentaram densidades equivalentes e superiores ao grupo VEI, mas diferentes do PRE [ $F(3, 24) = 4,25$ ;  $p < 0,01$ ]. Para o hipocampo dorsal (Fig. 25F), o grupo FEN-20 $\mu$ g e o grupo FEN-10 $\mu$ g apresentaram densidades equivalentes e superiores ao grupo VEI e ao grupo PRE [ $F(3, 24) = 7,35$ ;  $p < 0,01$ ].

De um modo geral, os resultados da expressão da Arc acompanharam os resultados comportamentais, ou seja, os grupos fentanil apresentaram respostas equivalentes.

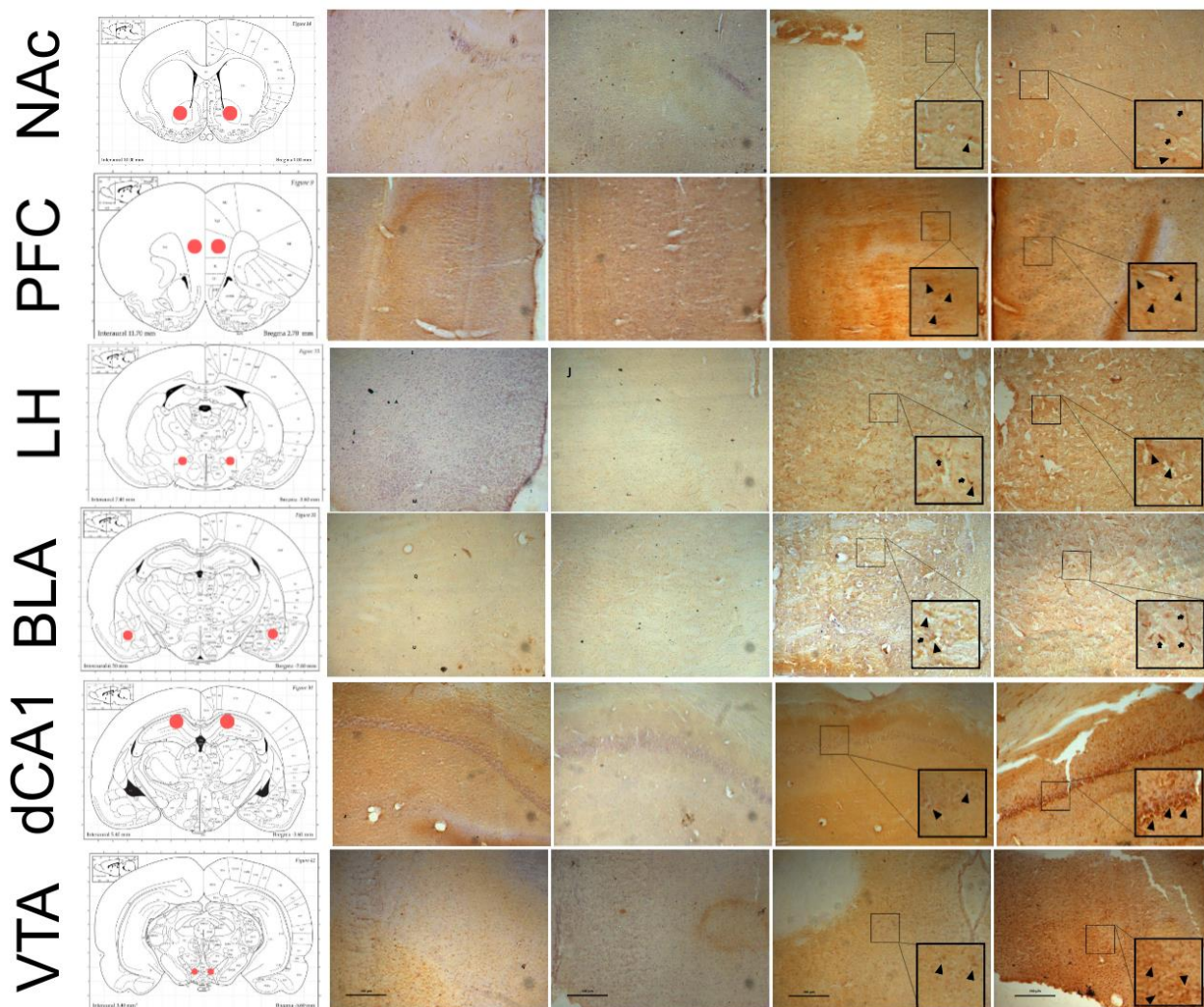
## EXPERIMENTO 2: ARC PRÉ-CONDICIONAMENTO *VERSUS* TESTE PCL



**Figura 25.** Expressão da proteína Arc nos grupos do teste de PCL (Experimento 2A) e grupo PRE (Experimento 2B). Os grupos FEN-10 µg/kg e FEN-20 µg/kg apresentaram maior expressão de Arc em comparação aos grupos VEI e PRE na



maioria das regiões. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \*indica diferença significativa em relação ao VEI e PRE. \*\* indica diferença significativa em relação aos demais grupos. § indica diferença significativa em relação ao VEI.



**Figura 26.** Imunomarcção da proteína Arc em diferentes regiões encefálicas do experimento 2A e 2B. Núcleo accumbens (NAC); Área tegmental ventral (VTA); Córtex pré-frontal medial (PFC); Amígdala basolateral (BLA); Hipotálamo lateral (LH); Hipocampo dorsal (dCA1), nos grupos PRE-COND, VEI, FEN-10  $\mu\text{g/kg}$  e FEN-20  $\mu\text{g/kg}$ .  $\blacktriangle$  Indicando marcações de dendritos e  $\blacktriangle$  indicando marcações do corpo celular.

## 7. DISCUSSÃO

A série de experimentos realizadas no presente trabalho mostraram, de forma geral, que o fentanil produziu o desenvolvimento de uma resposta

locomotora sensibilizada e a expressão de uma resposta condicionada, corroborando assim, dados recentes da literatura que mostram que o fentanil produz sensibilização comportamental e preferência condicionada por lugar (Gaulden et al., 2021; Wang et al., 2022; Wu et al., 2022; Knauss et al., 2023; Chaudun et al., 2024; Du et al., 2024).

A resposta locomotora sensibilizada produzida por fentanil no presente trabalho foi observada em maior magnitude com a dose mais baixa utilizada no trabalho (10 µg) do que com a dose mais elevada (20 µg). Além disso, observou-se também que a resposta locomotora sensibilizada se desenvolveu nos primeiros minutos da exposição do animal à arena já que foi observada somente durante a sessão de 5 minutos do que na sessão de 30 minutos na arena. Na sessão de 30 minutos, observou-se que houve a maior atividade locomotora nos primeiros 5 minutos, visto tanto no experimento com administrações repetidas (1A) quanto no experimento agudo (1B) e essa atividade foi decaindo ao longo da sessão de 30 minutos, mostrando que houve um processo de habituação comportamental ou uma incapacidade dos animais se locomoverem.

A capacidade do fentanil em produzir dependência está também relacionada aos seus efeitos farmacocinéticos (Volkow e McLellan, 2016; Schaefer et al., 2017; Gill et al., 2019). O fentanil é altamente lipofílico em relação a outros agonistas opioides (por exemplo, a heroína), que combinado com o seu peso molecular baixo, facilita uma penetração rápida nas membranas biológicas, incluindo o sistema nervoso central (Bird et al., 2023). A absorção e, conseqüentemente, o início dos efeitos são quase instantâneos, refletido pela experiência subjetiva positiva relatada por pessoas que usam fentanil fabricado ilicitamente (FMI) que frequentemente observam o início rápido e intenso em estudos qualitativos (Ciccarone et al., 2017). Os efeitos positivos ou outros efeitos subjetivos referem-se aos efeitos produzidos por uma substância psicoativa que os usuários recreativos consideram atraentes (como euforia) e podem levar ao uso repetido (Romach et al., 2013). Um início rápido dos efeitos subjetivos positivos pode aumentar a atratividade de um opioide para abuso (Butler et al., 2006). Trabalhos com ratos mostram que o fentanil atinge o pico de concentração plasmática máximo em 30 minutos após a administração

subcutânea (s.c.) decaindo vertiginosamente após esse tempo e atingindo um tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de  $1,12 \pm 0,03$  h (Canfield e Sprague, 2025). Trabalhos mostram que os opioides com rápida absorção no encéfalo e efeitos agonistas completos nos receptores  $\mu$ -opioides, como a heroína e o fentanil, são particularmente recompensadores (Frank e Pollack, 2017; Volkow e Blanco, 2021).

Os nossos resultados mostraram que o fentanil produziu aumento da locomoção com a dose mais baixa tanto com administração aguda quanto repetida por 6 dias. Trabalhos na literatura mostram que a administração aguda de fentanil, em diferentes concentrações/doses, produz aumento da locomoção (Medeiros et al., 2011; Gaulden et al., 2021; Hillman et al., 2025), em especial, um trabalho de Varshneya e colaboradores (2019), no qual avaliou-se o efeito da administração aguda de fentanil nas doses de 0,1, 1,0 e 10 mg/kg na atividade locomotora durante uma sessão no campo aberto (arena) de 120 minutos, os quais foram divididos em 12 intervalos de 10 minutos cada. Os resultados de Varshneya e colaboradores (2019) mostraram que houve um aumento da locomoção produzido pela dose intermediária (1,0 mg/kg), não havendo aumento progressivo ao longo da sessão, ao contrário, a magnitude da locomoção foi decrescendo ao longo do tempo de teste; já com a dose elevada (10 mg/kg), houve aumento da locomoção a partir de 30 minutos após a administração que se manteve ao longo da sessão, mas que não alcançou a magnitude da locomoção produzida pela dose intermediária; ao final da sessão as magnitudes das doses intermediária e elevada foram equivalentes devido ao decréscimo da locomoção da dose intermediária; a locomoção produzida pela dose menor (0,1 mg/kg) não foi diferente da locomoção do veículo. Mantida as devidas diferenças principalmente relacionadas às doses e o tempo de observação na arena, os resultados do nosso trabalho estão de acordo com os resultados de Varshneya e colaboradores (2019) e adicionam mais informações porque mostramos que o início da experiência na arena é fundamental para o desenvolvimento da resposta locomotora sensibilizada. Além disso, nossos resultados estão de acordo com trabalhos da literatura que mostram que concentrações baixas de fentanil produzem aumento da

locomoção em roedores por meio de efeitos de recompensa mediados por receptores dopaminérgicos (Hillman et al., 2025)

No início dos nossos trabalhos utilizamos diferentes doses de fentanil para a construção de uma curva dose-resposta cujas doses foram baseadas em trabalhos da literatura, inclusive uma dose elevada de 200  $\mu\text{g}/\text{mg}$  (dados não mostrados). Entretanto, as doses testadas inicialmente causaram a morte dos animais no decorrer dos testes experimentais, pois o fentanil produz depressão respiratória severa (Hill et al., 2020). Dessa forma, no nosso trabalho a dose de 20  $\mu\text{g}$  foi a dose mais elevada que foi testada que não produziu desconforto aparente nos animais. Talvez, um aspecto que possa contribuir para a diferença entre as doses do nosso trabalho e os da literatura seja o fato de que o fentanil utilizado no nosso trabalho ser uma solução que é usada na clínica e nos trabalhos da literatura ser usado o fentanil no seu estado puro. Nesse sentido, o trabalho de Medeiros e colaboradores (2011), no qual utilizaram uma solução de fentanil similar a utilizada no presente trabalho, ou seja, o mesmo fabricante, mostraram que o fentanil na dose de 0,05 mg/kg, que é considerada uma dose baixa (Alzu'bi et al., 2024), produziu aumento da locomoção observado em 5 minutos de teste, corroborando, assim, os resultados obtidos no nosso trabalho.

O que foi interessante no presente estudo é que mostramos que, quando subdividimos a sessão de atividade locomotora de 30 minutos em intervalos sucessivos de 5 minutos, o aumento da locomoção e, conseqüentemente a sensibilização comportamental, ocorreu no primeiro intervalo de 5 minutos. Como o teste foi iniciado imediatamente após a injeção de fentanil, essa resposta comportamental rápida à injeção indicou que o efeito do fármaco foi de ação rápida, o que está de acordo com os dados farmacocinéticos do fentanil. Um trabalho do nosso grupo de pesquisa como morfina mostrou que o aumento da locomoção e o desenvolvimento da sensibilização também ocorreram nos primeiros minutos de teste (Dias et al., 2021). Nesse referido trabalho mediu-se também a ativação da proteína ERK (cinase regulada por sinal extracelular) em áreas encefálicas dopaminérgicas relacionadas aos processos de

recompensa, incluindo VTA e NAc, em 5, 15, 30 e 60 minutos após a injeção de morfina e verificamos que as injeções de morfina aumentaram acentuadamente a ERK após 5 minutos e, em seguida, diminuíram em 30 minutos para níveis similares ao do grupo veículo. Esse curso transitório da ERK pareceu corresponder substancialmente à resposta comportamental produzida pela morfina. No presente trabalho a ativação da proteína ERK não foi avaliada. Entretanto, ao se conectar os aumentos de proteína Arc em áreas encefálicas relacionadas à recompensa nos primeiros 5 minutos ao aumento na atividade comportamental nos primeiros 5 minutos após a injeção de fentanil na dose baixa (10 µg), sugerimos que o aumento comportamental na atividade locomotora pode ser um efeito mediado pela recompensa, corroborando nossos trabalhos com morfina (Dias et al., 2021; Crespo et al., 2022; Leite Júnior et al., 2023).

Os resultados obtidos com fentanil na dose de 20 µg mostraram inicialmente uma diminuição da locomoção abaixo dos limites basais, ou seja, a magnitude da locomoção desse grupo foi inicialmente abaixo da magnitude do grupo veículo. Entretanto com o decorrer das sessões, a magnitude da locomoção do grupo 20 µg foi equivalente ao do grupo veículo (Exp. 1A). Essa diminuição inicial da locomoção abaixo dos níveis basais foi também observada no experimento de 5 minutos na arena (Exp. 1C), mas ao contrário do que ocorreu no Exp. 1A, houve aumento significativo da locomoção para o 20 µg nas últimas sessões, caracterizando o desenvolvimento da sensibilização locomotora. Trabalhos mostram que essa dose de fentanil produz catalepsia em ratos por 15 a 20 minutos após a injeção (Saine et al., 2016). Catalepsia refere-se a um estado de acinesia e rigidez de movimento em que o animal mantém uma postura não natural ou inadequada por um longo período e não consegue se corrigir ou se ajustar rapidamente a ela. A catalepsia é um fenômeno comportamental usado como modelo para sintomas extrapiramidais, particularmente aqueles observados na doença de Parkinson (Banasikowski et al., 2012; Waku et al., 2022). Esse fato pode explicar a ausência de locomoção desse grupo nas sessões de 30 minutos na arena por 6 dias porque ao permanecer na arena no estado cataléptico, o animal seria condicionado a esse estado. Um trabalho do nosso laboratório mostrou que o antipsicótico

haloperidol (antagonista dos receptores dopaminérgicos D1 e D2) produziu catalepsia condicionada (Oliveira et al., 2016). Como a catalepsia resulta do bloqueio dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 e o fentanil aumenta a liberação de dopamina no NAc, essa explicação parece contraditória. Entretanto, foi mostrado que o fentanil (0,1 mg/kg) por 5 semanas consecutivas reduziu a expressão dos receptores D1 e D2 e também do receptor glutamatérgico NMDA no córtex cerebral, o que poderia explicar a diminuição da locomoção vista no nosso trabalho (Alzu'bi et.al., 2024).

Nosso grupo de pesquisa tem mostrado que a sessão breve de 5 minutos na arena é importante para os efeitos da morfina, pois essa sessão breve desencadeia uma reação forte que é associada ao ambiente (arena) e, com o decorrer dos dias de sessão na arena essa associação produz o aumento da locomoção, gerando a sensibilização (Crespo et al., 2022; Leite Júnior et al., 2023). Embora no presente experimento com a dose de 20 µg não foi observada um aumento da resposta locomotora no primeiro dia da sessão de 5 minutos, pelo contrário, houve uma diminuição da locomoção, essa dose produziu aumento da expressão da proteína Arc em quase todas as áreas encefálicas avaliadas, principalmente no VTA e NAc, após a primeira sessão de 5 minutos. No condicionamento operante existe um aumento nos comportamentos/atividades que precedem uma recompensa antes de se observar os efeitos da recompensa em si, ou seja, um comportamento seguido por uma recompensa (reforço) tem maior probabilidade de se repetir no futuro. Este reforço aumenta a probabilidade de o comportamento anterior ocorrer novamente (Papageorgi, 2018). Devido a suas conexões anatômicas e funcionais, o aumento da liberação de dopamina no NAc produzida pelo fentanil provavelmente produziu aumento da atividade dopaminérgica no estriado e esse aumento precedeu o início da locomoção e revigorou os movimentos motores futuros (Juárez Tello et al., 2024). O aumento da atividade dopaminérgica levou ao aumento da expressão da proteína Arc (Yakout et al., 2020; Barry et al., 2023; Rivera-Maya et al., 2024), funcionando como recompensa. Dessa forma, ativação dos sistemas de recompensa forneceu o mecanismo para o aumento da atividade locomotora que ocorreu ao longo dos 6 dias das sessões experimentais de 5 minutos. Esses achados indicam que mesmo

exposições breves ao fentanil são suficientes para estabelecer uma associação entre os efeitos reforçadores da droga e os sinais contextuais

Os resultados do presente trabalho também mostraram que o fentanil, nas duas doses utilizadas, produziu a expressão de uma resposta condicionada observada através do teste de preferência condicionada por lugar (PCL). Resumidamente, o modelo do PCL utiliza os princípios do condicionamento Pavloviano para associar um tratamento farmacológico com um estímulo neutro. No caso, o estímulo neutro é um compartimento que apresenta estímulos contextuais salientes (por ex., tátil e visual). A preferência farmacológica no paradigma do PCL é medida pelo tempo que o animal gasta voluntariamente no compartimento associado ao fármaco *versus* o outro ambiente neutro acessível, geralmente associado ao veículo-controle. Assim, esse modelo permite avaliar a relevância da integração entre o efeito da recompensa (efeito do fármaco) com um contexto neutro (ambiente) que serve como estímulo condicionado, tornando-se um eficiente modelo preditivo da recompensa relacionada a fármacos (Tzschentke, 1998; Kuhn et al., 2019; McKendrick e Graziane, 2020).

Os resultados do Experimento 2 confirmam que o fentanil é capaz de produzir aprendizado associativo contextual, evidenciado pela expressão da preferência condicionada por lugar (PCL). Ambos os grupos tratados com fentanil (10 e 20 µg/kg) demonstraram preferência pelo compartimento associado ao fármaco, enquanto os animais no dia do pré-condicionamento e do grupo veículo não apresentaram tal resposta, reproduzindo um fenômeno amplamente descrito na literatura sobre dependência, que é o condicionamento (Tzschentke, 2007).

O PCL é um modelo amplamente utilizado para estudar a aprendizagem e a memória, particularmente no contexto de recompensas e comportamentos de busca de drogas (McKendrick e Graziane, 2020; Ahmadpour et al., 2025), pois o contexto ambiental associado ao consumo prévio da substância psicoativa, no presente trabalho, o fentanil, é um gatilho potente para a recaída no uso de drogas (Perry et al., 2014; Rubio et al., 2015; LeCocq et al., 2020; Sun e Giocomo, 2022). Um desafio central da recuperação a longo prazo da dependência química é a alta taxa de

recaída, na qual uma pessoa retorna ao uso de drogas após um período de abstinência. Durante o uso repetido de drogas, um determinado contexto ambiental é passivamente associado aos efeitos recompensadores da droga, de modo que um contexto anteriormente neutro pode se tornar um estímulo condicionado que pode restabelecer de forma confiável o comportamento de busca por drogas (Crombag et al., 2008; Hyman, 2005; Badiani et al., 2019; Sun e Giocomo, 2022; Francis et al., 2022).

Embora a dopamina mesolímbica transmita um sinal geral de recompensa que provavelmente apoia esse processo, evidências convergentes também sugerem que a aprendizagem associativa de recompensa depende de múltiplos sistemas de memória, incluindo o núcleo accumbens (NAc), a amígdala e o hipocampo, trabalhando em paralelo para integrar as informações sensório-motoras necessárias desempenhando um papel crítico na aprendizagem associativa de drogas e no restabelecimento do comportamento de busca de drogas, ao fornecer uma representação neural da informação espacial ou contextual associada ao uso anterior de drogas (Berke e Hyman, 2000; Poisson et al., 2021; Lovinger e Gremel, 2021; Feltenstein et al., 2021; Chaudun et al., 2024).

Nos resultados da análise da densidade da proteína, observou-se no núcleo accumbens (NAc) elevação da Arc tanto em exposições únicas quanto repetidas, especialmente na dose mais altas. O NAc é uma estrutura crítica no circuito de recompensa e na mediação da motivação. A rápida ativação da Arc nessa região pode refletir mecanismos moleculares associados ao reforço positivo e à formação de memórias associativas droga-contexto. Esses dados são compatíveis com a literatura que demonstra o envolvimento da Arc no NAc na formação de sensibilização comportamental e na reinstalação da busca por droga (LIU et al., 2021).

Na área tegmental ventral (VTA), aumentos mais consistentes de Arc ocorreram principalmente após exposições repetidas ao fentanil. Como o VTA contém neurônios dopaminérgicos que projetam para o NAc, a ativação dessa região pode estar relacionada à indução da sensibilização e à facilitação de mecanismos dopaminérgicos adaptativos. Estudos anteriores apontam que a Arc no VTA regula a excitabilidade neuronal e a



plasticidade sináptica, contribuindo para a codificação de reforços e o aprendizado associativo (HOU et.al, 2024).

No córtex pré-frontal medial (CPF), o aumento da Arc foi mais evidente com a dose de 20 ug/kg e em condições de exposição repetida. O CPF exerce papel fundamental na integração entre informações cognitivas e emocionais e modulação da tomada de decisão, funções frequentemente comprometidas em quadros de dependência. A elevação da Arc nessa região pode refletir mecanismos de plasticidade sináptica envolvidos na consolidação de memórias associadas ao ambiente de uso da droga, bem como na manutenção de padrões de comportamento de busca pela droga (HEARING, 2019)

No hipotálamo lateral (HL), a Arc apresentou expressão aumentada predominantemente após exposições repetidas e com a dose mais elevada de fentanil. O HL, tradicionalmente associado ao controle de comportamentos relacionados à homeostase energética, tem sido cada vez mais reconhecido por sua participação em circuitos motivacionais e na mediação de comportamentos orientados por recompensas, inclusive drogas de abuso. A ativação de Arc nessa região pode estar relacionada à integração de sinais interoceptivos e contextuais que modulam o comportamento de busca e consumo da droga. Assim, o recrutamento do HL pode refletir mecanismos neuroadaptativos que contribuem para a compulsividade e persistência do comportamento aditivo frente ao fentanil, conforme demonstrado em modelos experimentais de dependência (CARABALLO et.al, 2021).

No hipocampo dorsal (dCA1), a expressão de Arc aumentou principalmente nos grupos submetidos a sessões repetidas com fentanil. Essa região está envolvida na codificação de memória espacial e contextual, e sua ativação indica que experiências repetidas com fentanil são registradas de forma duradoura, o que pode contribuir para o risco de recaída por meio da evocação de memórias associadas ao ambiente de uso da droga (PORTUGAL et al., 2014).

A amígdala apresentou um padrão mais variável de ativação da Arc. O aumento mais robusto foi observado com a dose de 20 ug/kg, ainda que

sem consistência plena entre os experimentos. A amígdala integra informações emocionais e é crucial para o condicionamento Pavloviano aos estímulos relacionados à droga. A variabilidade observada pode refletir diferenças na intensidade emocional atribuída ao contexto ou à própria experiência com o fármaco, bem como efeitos dose-dependentes na modulação afetiva (SIAS, et.al, 2024)

Em síntese, os resultados indicam que o fentanil é capaz de promover plasticidade sináptica significativa em regiões-chave do circuito de recompensa, aprendizagem e memória, com destaque para NAc, VTA, PFC e dCA1. A ativação da Arc nessas regiões reforça a hipótese de que exposições repetidas a opioides potentes induzem alterações moleculares duradouras, potencialmente envolvidas no desenvolvimento e manutenção da dependência. Além disso, a análise integrada entre comportamento e expressão de Arc permite propor que essa proteína possa atuar como um marcador funcional da vulnerabilidade à neuroadaptação induzida por opioides, especialmente quando analisada em contextos de exposição prolongada e repetida.

## **8. CONCLUSÃO**

Houve desenvolvimento da sensibilização locomotora com o fentanil, especialmente com a dose de 10 µg/kg, e essa resposta ocorreu nos primeiros minutos após a administração. A sensibilização foi observada somente nas sessões de curta duração, indicando que a exposição breve ao ambiente é fundamental para o desenvolvimento da resposta.

A dose mais alta (20 µg/kg) inicialmente reduziu a locomoção, sugerindo possível catalepsia, mas com repetições, gerou sensibilização. O fentanil também produziu uma resposta condicionada, confirmada pelo teste de preferência condicionada por lugar, indicando associação entre os efeitos reforçadores da droga e o ambiente.

A expressão da proteína Arc aumentou nas principais regiões do sistema de recompensa, com destaque para NAc, VTA, CPF e dCA1.

Esses aumentos ocorreram principalmente com a dose de 20 µg/kg e em exposições repetidas, sugerindo plasticidade sináptica. A ativação da Arc acompanhou as respostas comportamentais observadas, comprovando que essa proteína pode ser um marcador da neuroadaptação associada à dependência.

A ativação de Arc em regiões como hipocampo e amígdala reforça a importância dos estímulos contextuais no aprendizado associado à droga. A associação entre aumento da dopamina, ativação de Arc e aumento progressivo da locomoção sugere que o sistema de recompensa foi recrutado durante os testes.

Os dados mostram que o fentanil é eficaz em gerar sensibilização e resposta condicionada, e que a Arc está envolvida nesses processos. Esses achados apontam para a importância de sessões iniciais breves e para o papel da Arc como possível marcador funcional da vulnerabilidade à dependência.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmadpour, M., Modaberi, S., Haghparast, A., Fayazmilani, R. (2025). Forced wheel running pre-conditioning diminishes reward learning induced by methamphetamine: Involvement of orexin 1 receptor in the hippocampus. *Physiol. Behav.* —:114892.

Alzu'bi, A., Baker, W. B., Al-Trad, B., Zoubi, M. S. A., AbuAlArjah, M. I., Abu-El-Rub, E., Tahat, L., Helaly, A. M., Ghorab, D. S., El-Huneidi, W., Al-Zoubi, R. M. (2024). The impact of chronic fentanyl administration on the cerebral cortex in mice: Molecular and histological effects. *Brain Res. Bull.* 209:110917.

Badiani, A., Caprioli, D., De Pirro, S. (2019). Opposite environmental gating of the experienced utility ('liking') and decision utility ('wanting') of heroin versus cocaine in animals and humans: Implications for computational neuroscience. *Psychopharmacology (Berl)*. 236(8):2451–2471.

- Baik, J. H. (2013). Dopamine signaling in reward-related behaviors. *Front. Neural Circuits* 7:152.
- Banasikowski, T. J., Beninger, R. J. (2012). Haloperidol conditioned catalepsy in rats: A possible role for D1-like receptors. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 15(10):1525–1534.
- Barry, S. M., Barry, G. M., Martinez, D., Penrod, R. D., Cowan, C. W. (2023). The activity-regulated cytoskeleton-associated protein, Arc, functions in the nucleus accumbens shell to limit multiple triggers of cocaine-seeking behaviour. *Addict. Biol.* 28(10):e13335.
- Berke, J. D., Hyman, S. E. (2000). Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* 25(3):515–532.
- Bird, H. E., Huhn, A. S., Dunn, K. E. (2023). Fentanyl absorption, distribution, metabolism, and excretion: Narrative review and clinical significance related to illicitly manufactured fentanyl. *J. Addict. Med.* 17(5):503–508.
- Bramham, C. R., et al. (2010). The Arc of synaptic memory. *Exp. Brain Res.* 200(2):125–140.
- Britt, J. P., et al. (2012). Synaptic and behavioral profile of multiple glutamatergic inputs to the nucleus accumbens. *Neuron* 76:790–803.
- Butler, S. F., Benoit, C., Budman, S. H., Fernandez, K. C., McCormick, C., Venuti, S. W., Katz, N. (2006). Development and validation of an Opioid Attractiveness Scale: A novel measure of the attractiveness of opioid products to potential abusers. *Harm Reduct. J.* 3:5.
- Canfield, J. R., Sprague, J. E. (2025). In vivo pharmacokinetic, pharmacodynamic and brain concentration comparison of fentanyl and para-fluorofentanyl in rats. *Arch. Toxicol.* 99(1):287–297.
- Cerbone, A., Sadile, A. (1994). Behavioral habituation to spatial novelty: A comparison between high- and low-responding rats. *Behav. Brain Res.* 65(1):113–117.

Chaudun, F., Python, L., Liu, Y., Hiver, A., Cand, J., Kieffer, B. L., Valjent, E., Lüscher, C. (2024). Distinct  $\mu$ -opioid ensembles trigger positive and negative fentanyl reinforcement. *Nature* 630(8015):141–148.

Ciccarone, D., Ondocsin, J., Mars, S. G. (2017). Heroin uncertainties: Exploring users' perceptions of fentanyl-adulterated and -substituted 'heroin'. *Int. J. Drug Policy* 46:146–155.

Crespo, L. G. S. C., Leite Júnior, J. B., de Mello Bastos, J. M., Samuels, R. I., Coimbra, N. C., Carey, R. J., Carrera, M. P. (2022). Context evoked morphine conditioned effects can be equivalent to morphine induced drug effects in terms of behavioral response and ERK activation in reward associated subcortical brain structures. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 214:173356.

Crombag, H. S., Bossert, J. M., Koya, E., Shaham, Y. (2008). Context-induced relapse to drug seeking: A review. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363(1507):3233–3243.

Dias, F. P., Carvalho Crespo, L. G. S., Leite Junior, J. B., Samuels, R. I., Coimbra, N. C., Carey, R. J., Carrera, M. P. (2021). Morphine reward effects and morphine behavioral sensitization: The adventitious association of morphine activation of brain reward effects with ongoing spontaneous activity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 209:173244.

Du, K., Shi, Q., Zhou, X., Zhang, L., Su, H., Zhang, C., Wei, Z., Liu, T., Wang, L., Wang, X., Cong, B., Yun, K. (2024). Melatonin attenuates fentanyl-induced behavioral sensitization and circadian rhythm disorders in mice. *Physiol. Behav.* 279:114523.

Feltenstein, M. W., See, R. E., Fuchs, R. A. (2021). Neural substrates and circuits of drug addiction. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 11(4):a039628.

Feltenstein, M. W., See, R. E. (2008). The neurocircuitry of addiction: An overview. *Br. J. Pharmacol.* 154:261–274.

Francis, T., Wolter, M., Leri, F. (2022). The effects of passive and active administration of heroin, and associated conditioned stimuli, on consolidation of object memory. *Sci. Rep.* 12(1):20351.

Frank, R. G., Pollack, H. A. (2017). Addressing the fentanyl threat to public health. *N. Engl. J. Med.* 376(7):605–607.

Gaulden, A.D. et al. (2021). Effects of fentanyl on acute locomotor activity, behavioral sensitization, and contextual reward in female and male rats. *Drug Alcohol Depend.*, 229(Pt A):109101.

Gill, H.; Kelly, E.; Henderson, G. (2019). How the complex pharmacology of the fentanyls contributes to their lethality. *Addiction*, 114(9):1524–1525.

Goldstein, R.Z.; Volkow, N.D. (2011). Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nat. Rev. Neurosci.*, 12:652–669.

Han, Y. et al. (2019). The rising crisis of illicit fentanyl use, overdose, and potential therapeutic strategies. *Transl. Psychiatry*, 9(1):1–9.

Hearing, M.C. (2019). Prefrontal–accumbens opioid plasticity: implications for relapse and dependence. *Front. Psychiatry*, 10:295.

Hill, R. et al. (2020). Fentanyl depression of respiration: Comparison with heroin and morphine. *Br. J. Pharmacol.*, 177(2):254–266.

Hillman, C. et al. (2025). Neural and Behavioral Dynamics of Acute Fentanyl Administration and Implications for Hazard Assessment of Novel Synthetic Opioids in Larval Zebrafish. *bioRxiv*.  
<https://doi.org/10.1101/2025.04.07.647579>

Hyman, S.E. (2005). Addiction: a disease of learning and memory. *Am. J. Psychiatry*, 162(8):1414–1422.

Juárez Tello, A. et al. (2024). Dopamine-sensitive neurons in the mesencephalic locomotor region control locomotion initiation, stop, and turns. *Cell Rep.*, 43(5):114187.

Knauss, Z.T. et al. (2023). Fentanyl-induced reward seeking is sex and dose dependent and is prevented by D-cysteine ethylester. *Front. Pharmacol.*, 14:1241578.

Korb, E.; Finkbeiner, S. (2011). Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends Neurosci.*, 34(11):591–598.

- Krawczyk, N. et al. (2018). Rising trends of prescription opioid sales in contemporary Brazil, 2009–2015. *Subst. Abuse Treat. Prev. Policy*, 13(1):1–10.
- Kuhn, B.N.; Kalivas, P.W.; Bobadilla, A.C. (2019). Understanding Addiction Using Animal Models. *Front. Behav. Neurosci.*, 13:262.
- LeCocq, M.R. et al. (2020). Considering Drug-Associated Contexts in Substance Use Disorders and Treatment Development. *Neurotherapeutics*, 17(1):43–54.
- Leite Júnior, J.B. et al. (2023). Morphine and dopamine: Low dose apomorphine can prevent both the induction and expression of morphine locomotor sensitization and conditioning. *Behav. Brain Res.*, 448:114434.
- Liu, Y. et al. (2021). The role of nucleus accumbens in opioid addiction. *Front. Psychiatry*, 12:687254.
- Lovinger, D.M.; Gremel, C.M. (2021). A Circuit-Based Information Approach to Substance Abuse Research. *Trends Neurosci.*, 44(2):122–135.
- McKendrick, G.; Graziane, N.M. (2020). Drug-Induced Conditioned Place Preference and Its Practical Use in Substance Use Disorder Research. *Front. Behav. Neurosci.*, 14:582147.
- Medeiros, L.F. et al. (2012). Fentanyl administration in infant rats produces long-term behavioral responses. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 30(1):25–30.
- Milton, A.L.; Everitt, B.J. (2012). The persistence of maladaptive memory: addiction, drug memories and anti-relapse treatments. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 36(4):1119–1139.
- Nikolaïenko, O. et al. (2017). Arc protein: a flexible hub for synaptic plasticity and cognition. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 77:33–42.
- Oliveira, L.R. et al. (2016). Post-trial dopaminergic modulation of conditioned catalepsy: A single apomorphine induced increase/decrease in dopaminergic activation immediately following a conditioned catalepsy response can reverse/enhance a haloperidol conditioned and sensitized catalepsy response. *Behav. Brain Res.*, 311:87–98.

- Papageorgi, I. (2018). Operant Conditioning. In: Shackelford, T.; Weekes-Shackelford, V. (eds) *Encyclopedia of Evolutionary Psychological Science*. Cham: Springer.
- Perry, C.J. et al. (2014). Role of cues and contexts on drug-seeking behaviour. *Br. J. Pharmacol.*, 171(20):4636–4672.
- Poisson, C.L.; Engel, L.; Saunders, B.T. (2021). Dopamine Circuit Mechanisms of Addiction-Like Behaviors. *Front. Neural Circuits*, 15:752420.
- Portugal, G.S. et al. (2014). Hippocampal–nucleus accumbens synapses in context-induced reinstatement of cocaine seeking. *J. Neurosci.*, 34(14):5104–5111.
- Rivera-Maya, O.B. et al. (2024). Dopamine D1-Like Receptor Stimulation Induces CREB, Arc, and BDNF Dynamic Changes in Differentiated SH-SY5Y Cells. *Neurochem. Res.*, 50(1):35.
- Romach, M.K.; Schoedel, K.A.; Sellers, E.M. (2013). Update on tamper-resistant drug formulations. *Drug Alcohol Depend.*, 130(1-3):13–23.
- Rubio, F.J. et al. (2015). Context-induced reinstatement of methamphetamine seeking is associated with unique molecular alterations in Fos-expressing dorsolateral striatum neurons. *J. Neurosci.*, 35(14):5625–5639.
- aine L, Hélie P, Vachon P. (2016). Effects of fentanyl on pain and motor behaviors following a collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *J Pain Res.* 9:1039-1048.
- Schaefer CP, Tome ME, Davis TP. (2017). The opioid epidemic: a central role for the blood brain barrier in opioid analgesia and abuse. *Fluids Barriers CNS.* 14(1):32.
- Shepherd JD, Bear MF. (2011). New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nat Neurosci.* 14:279-284.
- Sias MR et al. (2024). Fentanyl differentially modulates amygdala reactivity depending on dose and context. *Behav Neurosci.* 138(2):120-134.



Steketee JD. (2003). Neurotransmitter systems of the medial prefrontal cortex: potential role in sensitization to psychostimulants. *Brain Res Rev.* 41:203-228.

Sun Y, Giocomo LM. (2022). Neural circuit dynamics of drug-context associative learning in the mouse hippocampus. *Nat Commun.* 13(1):6721.

Tzschentke TM. (1998). Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol.* 56(6):613-672.

Tzschentke TM. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol.* 12(3-4):227-462.

Varshneya NB et al. (2019). Opioid-like antinociceptive and locomotor effects of emerging fentanyl-related substances. *Neuropharmacology.* 151:171-179.

Volkow ND, Blanco C. (2021). The changing opioid crisis: development, challenges and opportunities. *Mol Psychiatry.* 26(1):218-233.

Volkow ND, McLellan AT. (2016). Opioid Abuse in Chronic Pain—Misconceptions and Mitigation Strategies. *N Engl J Med.* 374(13):1253-1263.

Volkow ND et al. (2019). The neuroscience of drug reward and addiction. *Physiol Rev.* 99:2115-2140.

Waku I, Reimer AE, de Oliveira AR. (2022). Effects of Immediate Aversive Stimulation on Haloperidol-Induced Catalepsy in Rats. *Front Behav Neurosci.* 16:867180.

Wang B et al. (2022). Embryonic exposure to fentanyl induces behavioral changes and neurotoxicity in zebrafish larvae. *PeerJ.* 10:e14524.

Wu Y et al. (2022). Fentanyl Induces Novel Conditioned Place Preference in Adult Zebrafish, Disrupts Neurotransmitter Homeostasis, and Triggers Behavioral Changes. *Int J Environ Res Public Health.* 19(20):13533.

Yakout DW, Shree N, Mabb AM. (2020). Effect of pharmacological manipulations on Arc function. *Curr Res Pharmacol Drug Discov.* 2:100013.

Yamakage M, Namiki A. (2002). Cellular mechanisms of action of opioids and their interactions with anesthetics. *J Anesth.* 16:220-228.

Zhuang Q et al. (2022). Mechanisms of opioid-induced analgesia and side effects. *Front Mol Neurosci.* 15:894619.