UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

LUIZ GUSTAVO SOARES DE CARVALHO CRESPO

O EFEITO DA INDUÇÃO E EXTINÇÃO DE UMA RESPOSTA LOCOMOTORA CONDICIONADA E SENSIBILIZADA PRODUZIDA POR MORFINA NA PLASTICIDADE SINÁPTICA

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

2026

LUIZ GUSTAVO SOARES DE CARVALHO CRESPO

O EFEITO DA INDUÇÃO E EXTINÇÃO DE UMA RESPOSTA LOCOMOTORA CONDICIONADA E SENSIBILIZADA PRODUZIDA POR MORFINA NA PLASTICIDADE SINÁPTICA

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor em Biotecnologia.

ORIENTADORA: Profª. Drª. Marinete Pinheiro Carrera

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

2026

O EFEITO DA INDUÇÃO E EXTINÇÃO DE UMA RESPOSTA LOCOMOTORA CONDICIONADA E SENSIBILIZADA PRODUZIDA POR MORFINA NA PLASTICIDADE SINÁPTICA

LUIZ GUSTAVO SOARES DE CARVALHO CRESPO

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor em Biotecnologia.

Aprovado em 08 de setembro de 2026.

Membros da Comissão examinadora:

Prof. Dr Norberto Cysne Coimbra
(Sc.D., Morfologia-Biologia Celular) – FMRP-USP

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCELA BERMUDEZ ECHEVERRY
Data: 23/10/2026 13:47:03-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profª. Drª Marcela Bermúdez Echeverry
(Sc.D., Fisiologia Humana) – FMRP-USP / UFABC

Documento assinado digitalmente
gov.br SHEILA ESPIRITO SANTO ARAUJO
Data: 24/10/2026 13:19:58-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profª. Drª Sheila Espirito Santo Araújo
(Sc.D., Ciências Biológicas – Biofísica) – UFRJ / UENF

Documento assinado digitalmente
gov.br MARINETE PINHEIRO CARRERA
Data: 25/10/2026 09:55:20-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profª. Drª Marinete Pinheiro Carrera
(Sc.D., Psicobiologia – Biofísica) – UENF
(Orientadora)

FICHA CATALOGRÁFICA
UENF - Bibliotecas
Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

C921 Crespo, Luiz Gustavo Soares de Carvalho.

O EFEITO DA INDUÇÃO E EXTINÇÃO DE UMA RESPOSTA LOCOMOTORA CONDICIONADA E SENSIBILIZADA PRODUZIDA POR MORFINA NA PLASTICIDADE SINÁPTICA. / Luiz Gustavo Soares de Carvalho Crespo. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2026.

88 f. : il.
Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2026.
Orientadora: Marinete Pinheiro Carrera.

1. Morfina. 2. Sensibilização Locomotora. 3. Extinção Comportamental. 4. Plasticidade dendrítica. 5. Gefirina. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder força, sabedoria e perseverança para chegar até aqui. Por sustentar meus passos nos momentos mais difíceis, renovar minhas forças diante dos desafios e permitir que um sonho construído ao longo de tantos anos se tornasse realidade. Esta conquista representa muito mais do que a conclusão de uma etapa acadêmica; representa uma caminhada de aprendizado, persistência, renúncias e transformação.

À minha mãe, Regina Crespo, por estar ao meu lado ao longo de toda a minha trajetória. Pelo amor, pelo cuidado, pelo incentivo e por acreditar em mim em cada etapa da minha vida. Sua presença foi fundamental para que eu pudesse seguir em frente, inclusive nos momentos em que o caminho pareceu mais difícil. Carrego comigo seus ensinamentos, sua força e tudo aquilo que recebi de você. Esta conquista também é sua. Minha eterna gratidão e todo o meu amor.

Ao meu pai, por nunca desistir de mim e por sempre permanecer ao meu lado. Obrigado por acreditar nos meus sonhos, apoiar minhas escolhas e me incentivar a continuar. Sua presença, sua confiança e seu exemplo contribuíram para que eu aprendesse a não desistir diante das dificuldades. Chegar até o doutorado também é resultado de tudo aquilo que recebi de você ao longo da vida. Esta conquista também é sua.

À minha esposa, Fabiolla, minha companheira de vida e de caminhada, por estar ao meu lado em cada etapa desta trajetória. Obrigado por compartilhar comigo os sonhos, as dificuldades, as incertezas, os momentos de cansaço e, principalmente, cada conquista. Por compreender as ausências, os dias e as noites dedicados aos estudos e à pesquisa e por me oferecer amor, apoio e incentivo quando mais precisei. Ter você ao meu lado tornou essa caminhada mais leve e deu ainda mais sentido a tudo isso. Este doutorado também carrega muito da nossa história e de tudo o que construímos juntos. Obrigado por acreditar em mim e por caminhar comigo. Amo você.

Aos meus filhos, Valentina, Benício, Lourenço e Liz, meus maiores amores e uma das maiores razões para seguir em frente. Vocês são minha força, minha inspiração e dão verdadeiro significado a cada conquista. Sei que esta caminhada exigiu tempo, dedicação e, muitas vezes, momentos em que precisei estar ausente para estudar, pesquisar e trabalhar. Cada esforço, porém, também foi pensando em vocês e no exemplo que desejo deixar. Espero que esta conquista lhes mostre que os sonhos podem parecer distantes, mas que, com dedicação, coragem e perseverança, é possível alcançá-los. Tudo o que

conquisto tem um significado ainda maior porque tenho vocês em minha vida. Amo vocês infinitamente.

À minha orientadora, Prof.ª Dr.ª Marinete Pinheiro Carrera, pela orientação, confiança, dedicação e pelos conhecimentos compartilhados durante esta trajetória. Agradeço por sua contribuição para a construção deste trabalho, pelas oportunidades de aprendizado e por sua participação fundamental em minha formação acadêmica e científica. Minha gratidão por todo o caminho percorrido até a conclusão desta tese.

Ao Prof. Dr. Norberto Coimbra, por caminhar comigo nesta trajetória desde o início, quando o desejo de me tornar mestre ainda era um sonho e representava o começo de um caminho que eu sequer poderia imaginar onde me levaria. Agradeço pelo incentivo, pelos ensinamentos, pela confiança e, sobretudo, pela inspiração. Sua presença em minha trajetória acadêmica contribuiu para que aquele primeiro desejo de seguir na vida científica se transformasse em novas possibilidades e conquistas. Do sonho de ser mestre à realização do doutorado, existe uma história construída com muito aprendizado, e você faz parte dela. Minha sincera gratidão por ter acreditado, incentivado e caminhado comigo desde o início dessa trajetória.

Aos professores, pesquisadores, colegas e colaboradores que participaram direta ou indiretamente desta pesquisa. Uma pesquisa nunca é construída de maneira verdadeiramente solitária, e este trabalho também é resultado da colaboração de muitas pessoas que estiveram presentes em diferentes momentos de sua realização.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de formação acadêmica e científica e por proporcionarem as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho e para meu crescimento como pesquisador.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro durante minha trajetória acadêmica, fundamentais para a dedicação à pesquisa e para a realização deste trabalho.

A todos os amigos e pessoas que, mesmo não mencionados nominalmente, estiveram presentes, torceram por mim, ofereceram uma palavra de incentivo ou contribuíram de alguma maneira para que eu chegasse até aqui, deixo registrada minha sincera gratidão.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da organização molecular de uma sinapse inibitória ----------22
Figura 2. Organização estrutural da gefirina em seus domínios G, C e E---------- 23
Figura 3. Representação esquemática da interação diferencial da gefirina com receptores inibitórios ----------24
Figura 7. Delineamento experimental da fase de indução----------31
Figura 8. Delineamento experimental da fase de extinção da sensibilização locomotora induzida pela morfina----------32
Figura 9. Delineamento experimental do Teste Final e Recuperação da Resposta Condicionada----------33
Figura 10. Atividade locomotora após exposição aguda à morfina 37
Figura 11. Complexidade dendrítica e densidade de espinhos no núcleo accumbens após exposição aguda à morfina ----------37
Figura 12. Densidade de gefirina e fotomicrografias representativas das regiões cerebrais após exposição aguda à morfina----------38
Figura 13. Atividade locomotora durante a fase de indução da sensibilização locomotora ----------39
Figura 14. Complexidade dendrítica e densidade de espinhos no núcleo accumbens após a fase de indução da sensibilização locomotora à morfina---------- 40
Figura 15. Densidade de clusters imunorreativos para gefirina após a fase de indução-41
Figura 16. Atividade locomotora durante as fases de indução e extinção da sensibilização locomotora induzida por morfina ---------- 42
Figura 17. Complexidade dendrítica e densidade de espinhos no núcleo accumbens após a fase de extinção---------- 43
Figura 18. Avaliação da complexidade dendrítica de neurônios espinhosos médios do núcleo accumbens ao longo das diferentes fases experimentais---------- 44
Figura 19. Avaliação da complexidade dendrítica: interseções dendríticas e densidade total de espinhos ao longo das diferentes fases experimentais---------- 45
Figura 20. Análise de Sholl da complexidade dendrítica de neurônios espinhosos médios do núcleo accumbens ao longo das diferentes fases experimentais ----------46

Figura 21. Densidade de gefirina e fotomicrografias representativas das regiões cerebrais durante a fase de extinção 47
Figura 22. Resposta locomotora condicionada e sensibilização induzida pela morfina no teste final 48
Figura 23. Densidade de marcação imunorreativa para gefirina no núcleo accumbens, área tegmental ventral e córtex pré-frontal após o teste final com morfina 49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 8
2 REVISÃO DE LITERATURA 11
2.1 Morfina 11
2.2 Sensibilização comportamental 14
2.3 Extinção comportamental 17
2.4 Gefirina e plasticidade inibitória 21
3 HIPÓTESE 27
4 OBJETIVOS 27
4.1 Objetivo geral 27
4.2 Objetivos específicos 28
5 METODOLOGIA 28
5.1 Animais 28
5.2 Fármacos 29
5.3 Ambiente experimental comportamental 29
5.4 Procedimentos comportamentais gerais 29
5.5 Experimentos 30
5.5.1 Experimento 1 30
5.5.1.1 Exposição aguda à morfina 30
5.5.1.2 Indução da sensibilização locomotora 31
5.5.1.3 Extinção da sensibilização locomotora 32
5.5.1.4 Teste final e expressão da resposta sensibilizada 33
5.6 Perfusão e coleta tecidual 34
5.7 Técnica de Golgi-Cox 34
5.8 Imuno-histoquímica para gefirina (GPHN) 35
5.9 Análise estatística 36
6 RESULTADOS 37
6.1 Exposição aguda à morfina 37
6.2 Indução da sensibilização locomotora 43
6.3 Extinção da sensibilização locomotora 48
6.4 Comparação da morfologia dendrítica entre as fases experimentais 52
6.5 Teste Final e Recuperação da Resposta Condicionada 57
7 DISCUSSÃO 63
7.1 Exposição aguda à morfina 63
7.2 Indução da sensibilização locomotora 68
7.3 Extinção da sensibilização locomotora 73
7.4 Teste final e expressão da resposta sensibilizada 76
8 CONCLUSÃO 80
9 REFERÊNCIAS 83

RESUMO

A exposição repetida à morfina pode produzir sensibilização locomotora e neuroadaptações persistentes em circuitos relacionados à recompensa, à aprendizagem e ao controle comportamental. Quando os efeitos da droga são associados a um contexto específico, estabelecem-se associações droga-contexto que podem continuar influenciando o comportamento após a extinção. Este estudo investigou os efeitos da indução e da extinção de uma resposta locomotora condicionada e sensibilizada por morfina sobre a atividade locomotora, a morfologia dendrítica e a imunorreatividade para gefirina em ratos Wistar. Foram realizados protocolos de exposição aguda, indução durante cinco dias, extinção durante cinco dias e teste final com administração de veículo ou morfina. Na indução, os animais foram distribuídos nos grupos veículo (VEI), morfina não associada ao contexto (MOR-NA) e morfina associada ao contexto experimental (MOR-A). A atividade locomotora foi avaliada em campo aberto pelo sistema EthoVision. A morfologia neuronal foi investigada pela técnica de Golgi-Cox, com análise do comprimento dendrítico total, da densidade de espinhos e das interseções dendríticas no núcleo accumbens. A imunorreatividade para gefirina foi avaliada no córtex pré-frontal medial, no núcleo accumbens e na área tegmental ventral por imuno-histoquímica em campo claro com DAB. Na exposição aguda, a morfina reduziu a atividade locomotora e aumentou a densidade de marcação para gefirina no núcleo accumbens e na área tegmental ventral, sem alterar os parâmetros dendríticos avaliados. Durante a indução, o grupo MOR-A desenvolveu sensibilização locomotora e apresentou as alterações dendríticas mais pronunciadas. A densidade de marcação para gefirina foi menor no grupo MOR-A em comparação ao grupo VEI nas regiões avaliadas, conforme as comparações estatísticas. Durante a extinção, a resposta locomotora condicionada foi expressa nas primeiras sessões e diminuiu progressivamente, indicando aprendizagem de extinção. A complexidade dendrítica do grupo MOR-A permaneceu reduzida, sem evidência de recuperação parcial. A extinção também modificou a marcação para gefirina, particularmente no grupo MOR-A. No teste final, o grupo MOR-A/MOR apresentou a maior resposta locomotora, caracterizando a expressão da sensibilização após o desafio com morfina no contexto previamente associado à droga. A marcação para gefirina apresentou alterações regionais e foi particularmente elevada nos grupos MOR-A/MOR, MOR-A/VEI e MOR-NA/MOR, conforme as comparações entre os grupos. Em conjunto,

os resultados demonstram que a extinção reduz a expressão comportamental previamente estabelecida, mas não reverte de forma uniforme as alterações estruturais e pós-sinápticas associadas à exposição repetida à morfina.

Palavras-chave: morfina; sensibilização locomotora; extinção comportamental; plasticidade dendrítica; gefirina; memória droga-contexto.

ABSTRACT

Repeated exposure to morphine can induce locomotor sensitization and persistent neuroadaptations in circuits involved in reward, learning, and behavioral control. When drug effects are paired with a specific context, drug-context associations are established and may continue to influence behavior after extinction. This study investigated the effects of induction and extinction of a morphine-induced conditioned and sensitized locomotor response on locomotor activity, dendritic morphology, and gephyrin immunoreactivity in Wistar rats. The procedures included acute exposure, five days of induction, five days of extinction, and a final test with vehicle or morphine. During induction, animals were assigned to vehicle (VEI), morphine unpaired with the context (MOR-NA), or morphine paired with the context (MOR-A). Locomotor activity was assessed in the open field using EthoVision. Neuronal morphology was examined using Golgi-Cox staining, including total dendritic length, spine density, and dendritic intersections in the nucleus accumbens. Gephyrin immunoreactivity was evaluated in the medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, and ventral tegmental area using bright-field DAB immunohistochemistry. Acute morphine reduced locomotor activity and increased gephyrin immunoreactivity in the nucleus accumbens and ventral tegmental area without altering the evaluated dendritic parameters. During induction, the MOR-A group developed locomotor sensitization and showed the most pronounced dendritic alterations. Gephyrin immunoreactivity was lower in MOR-A than in VEI across the evaluated regions, according to the statistical comparisons. During extinction, the conditioned locomotor response was expressed in the initial sessions and progressively declined, indicating extinction learning. Dendritic complexity in MOR-A remained reduced, with no evidence of partial recovery. Extinction also modified gephyrin immunoreactivity, particularly in MOR-A. In the final test, MOR-A/MOR showed the highest locomotor response, characterizing the expression of sensitization after morphine challenge in the previously drug-paired context. Gephyrin immunoreactivity showed region-specific alterations and was particularly elevated in MOR-A/MOR, MOR-A/VEI, and MOR-NA/MOR, according to the group comparisons. Together, these findings show that extinction reduces the previously established behavioral response but does not uniformly reverse the structural and postsynaptic alterations associated with repeated morphine exposure.

Keywords: morphine; locomotor sensitization; behavioral extinction; dendritic plasticity; gephyrin; drug-context memory.

1 **INTRODUÇÃO**

O transtorno psiquiátrico por uso de opioides constitui uma condição crônica e recorrente, associada a neuroadaptações em circuitos envolvidos na motivação, na aprendizagem, na memória e no controle do comportamento (Koob e Volkow, 2016; Volkow, Michaelides e Baler, 2019). Dentre esses circuitos, destaca-se o sistema mesocorticolímbico, que compreende projeções dopaminérgicas da área tegmental ventral (VTA) para o núcleo accumbens (NAc) e o córtex da parte rostral do lobo frotntal, o córtex "pré-frontal" (CPF), além de suas interações com regiões relacionadas à memória contextual, como o hipocampo. Esse conjunto de estruturas participa da atribuição de saliência motivacional, do reforço e da formação e recuperação de memórias associadas às drogas (Everitt e Robbins, 2016; Volkow, Michaelides e Baler, 2019; Imperio, Levin e Martinez, 2024). Estudos experimentais e clínicos indicam que a exposição repetida a substâncias de abuso pode produzir alterações funcionais e estruturais persistentes nesses circuitos, envolvendo mecanismos dopaminérgicos, glutamatérgicos e GABAérgicos.

A morfina exerce seus principais efeitos por meio da ativação dos receptores μopioides, amplamente distribuídos no sistema nervoso central. Na VTA, um dos mecanismos propostos envolve a inibição de interneurônios GABAérgicos e de aferências inibitórias sensíveis aos opioides, o que pode favorecer a desinibição de subpopulações de neurônios dopaminérgicos e modificar a liberação de dopamina no NAc (Fields e Margolis, 2015; Doyle e Mazei-Robison, 2021). Entretanto, a VTA apresenta heterogeneidade celular e conectiva considerável, e os efeitos dos opioides não podem ser explicados exclusivamente pelo modelo clássico de desinibição dopaminérgica. A morfina também modifica a transmissão glutamatérgica, GABAérgica e outros mecanismos de plasticidade sináptica nesses circuitos neurais (Doyle e Mazei-Robison, 2021).

Embora as adaptações comportamentais e neurais produzidas pela exposição repetida à morfina estejam documentadas, permanece pouco compreendido como a extinção das respostas condicionadas influencia simultaneamente a morfologia dendrítica e a organização molecular das especializações pós-sinápticas inibitórias. Essa lacuna é particularmente relevante porque a redução de uma resposta comportamental durante a extinção não implica, necessariamente, a reversão das neuroadaptações produzidas pela exposição à droga.

O transtorno por uso de substâncias químicas também pode ser compreendido sob a perspectiva da aprendizagem e da memória. Estímulos ambientais repetidamente associados aos efeitos farmacológicos de drogas de abuso podem adquirir propriedades motivacionais e passar a evocar respostas condicionadas mesmo na ausência da substância química (Hyman, Malenka e Nestler, 2006; Everitt e Robbins, 2016). A exposição repetida e intermitente `a droga pode produzir sensibilização comportamental, caracterizada pelo aumento progressivo da resposta a uma mesma dose da droga. Na perspectiva da sensibilização do incentivo, as neuroadaptações induzidas pela droga podem aumentar a saliência motivacional atribuída à substância química e às pistas associadas ao seu consumo (Robinson e Berridge, 2008).

Em modelos experimentais, o pareamento entre a administração de morfina e um ambiente específico permite investigar a contribuição das associações entre droga de abuso e contexto para a expressão da resposta locomotora condicionada e sensibilizada. Evidências experimentais demonstram que a intensidade e a estabilidade dessas associações dependem de fatores como dose, número de exposições, intervalo entre as sessões e correspondência entre o contexto de indução e o contexto de teste (Hámor et al., 2023). Portanto, a atividade locomotora observada após exposições repetidas pode refletir tanto os efeitos farmacológicos da morfina quanto processos de aprendizagem contextual.

A extinção não corresponde ao apagamento completo da memória previamente adquirida. Em vez disso, envolve uma nova aprendizagem capaz de inibir ou reduzir a expressão da resposta condicionada, permanecendo a associação original disponível para recuperação posterior (Bouton, 2004; Lattal e Lattal, 2012; Bouton et al., 2021). Como a aprendizagem de extinção é fortemente dependente do contexto, respostas previamente reduzidas podem reaparecer por renovação, reinstalação, recuperação espontânea ou nova exposição à droga. A expressão e a recuperação das memórias de extinção envolvem a participação integrada do CPF, do hipocampo, do complexo amigdaloide e de regiões estriatais, embora a contribuição específica de cada estrutura varie de acordo com o paradigma comportamental estudado (Quirk e Mueller, 2008; Peters, Kalivas e Quirk, 2009; Bouton et al., 2021).

Entre as neuroadaptações associadas à exposição a drogas estão as alterações da arborização dendrítica, da ramificação e da densidade e morfologia dos espinhos dendríticos. Essas modificações podem afetar a integração dos sinais sinápticos e a capacidade de resposta dos neurônios em regiões mesocorticolímbicas. Estudos com morfina identificaram alterações estruturais nos neurônios espinhosos médios do NAc e

em outras populações neuroniais, embora a direção e a magnitude dos efeitos dependam do regime de administração, da dose, do período de abstinência, da sub-região analisada e do método de quantificação (Robinson e Kolb, 2004; Russo et al., 2010; Guegan et al., 2016; Geoffroy et al., 2019; Thompson et al., 2021).

A técnica de Golgi–Cox possibilita a impregnação estocástica de uma pequena proporção de neurônios, permitindo a identificação detalhada do soma, dos dendritos e dos espinhos dendríticos. Por meio dessa técnica, podem ser quantificados parâmetros como comprimento dendrítico total, número de dendritos, ramificações, interseções obtidas pela análise de Sholl e densidade de espinhos dendríticos (Gibb e Kolb, 1998; Zaqout e Kaindl, 2016). Apesar de sua utilidade, a técnica não permite determinar diretamente a identidade molecular do neurônio, a origem pré-sináptica dos contatos ou a funcionalidade dos espinhos dendríticos observados.

A plasticidade associada aos opioides, entretanto, não se restringe à morfologia dendrítica. A transmissão GABAérgica participa da regulação da excitabilidade dos circuitos mesocorticolímbicos e pode sofrer reorganização após exposição aguda ou repetida aos opioides, abstinência e reapresentação da droga (Doyle e Mazei-Robison, 2021). Nesse sistema, a gefirina exerce função central como proteína de suporte pós-sináptico, participando da ancoragem, do agrupamento e da estabilização de receptores GABA-A e de glicina nas especializações sinápticas inibitórias (Tyagarajan e Fritschy, 2014; Kasaragod e Schindelin, 2018; Pizzarelli et al., 2020).

Alterações na distribuição ou na imunorreatividade para gefirina podem indicar reorganização molecular das especializações pós-sinápticas inibitórias. Contudo, essas alterações não constituem medidas diretas da liberação de GABA, da corrente mediada pelos receptores GABA-A do número total de sinapses inibitórias ou da eficácia funcional da inibição. Essas interpretações exigiriam análises complementares, como colocalização com marcadores pré-sinápticos, microscopia de maior resolução ou registros eletrofisiológicos.

A análise conjunta da morfologia revelada pela técnica de Golgi–Cox e da imunorreatividade para gefirina permite investigar dimensões complementares da plasticidade neural. A primeira fornece informações sobre a arquitetura dendrítica, enquanto a segunda avalia a distribuição regional de uma proteína associada à organização pós-sináptica inibitória. Na imuno-histoquímica cromogênica em campo claro, os depósitos de diaminobenzidina devem ser descritos de forma conservadora como

perfis imunorreativos para gefirina, pois cada depósito visível não corresponde necessariamente a um cluster sináptico individual.

A comparação entre a exposição aguda e a exposição repetida permite distinguir respostas iniciais aos efeitos farmacológicos da morfina de adaptações relacionadas à repetição do tratamento, à sensibilização e ao condicionamento contextual. Do mesmo modo, a avaliação comportamental durante as fases de indução, extinção e teste final possibilita relacionar a trajetória da resposta locomotora às alterações morfológicas e imunorreativas observadas ao término de cada etapa. Essas associações, entretanto, devem ser interpretadas como relações entre medidas comportamentais e histológicas, sem que se pressuponha causalidade direta entre elas.

Diante dessas evidências, o presente estudo investigou se a indução e a extinção da resposta locomotora condicionada e sensibilizada produzida pela morfina são acompanhadas por alterações persistentes na complexidade dendrítica dos neurônios espinhosos médios do NAc e na imunorreatividade para gefirina em regiões dos circuitos mesocorticolímbicos e áreas funcionalmente associadas. A hipótese central foi a de que o pareamento entre a morfina e o contexto experimental produziria neuroadaptações duradouras, parcialmente mantidas após a redução comportamental promovida pela extinção e passíveis de modificação após uma nova exposição à droga. Ao integrar medidas comportamentais, morfológicas e imuno-histoquímicas, o estudo buscou examinar as relações entre aprendizagem droga-contexto, remodelamento dendrítico e organização molecular pós-sináptica inibitória.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1- MORFINA

A morfina é um agonista opioide prototípico empregado no tratamento da dor intensa. Seus efeitos analgésicos são mediados predominantemente pela ativação dos receptores μ-opioides, amplamente distribuídos no sistema nervoso central. Apesar de sua relevância terapêutica, a exposição repetida à morfina pode produzir tolerância, dependência física e adaptações moleculares e celulares persistentes. No contexto do uso inadequado ou compulsivo, essas adaptações podem participar dos mecanismos neurobiológicos relacionados ao transtorno por uso de opioides (Koob e Volkow, 2016; Darcq e Kieffer, 2018; Volkow, Michaelides e Baler, 2019; Swingler et al., 2025).

Os receptores μ-opioides pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G e sinalizam predominantemente por meio de proteínas Gi/o. Sua ativação inibe a adenilil ciclase, reduz a formação de adenosina monofosfato cíclico — AMPc, ativa canais de potássio e inibe canais de cálcio dependentes de voltagem. Essas ações podem produzir hiperpolarização da membrana, redução da excitabilidade neuronial e diminuição da liberação de neurotransmissores nos terminais pré-sinápticos (Williams et al., 2013; Darcq e Kieffer, 2018; Swingler et al., 2025).

A exposição prolongada à morfina pode recrutar mecanismos de fosforilação, dessensibilização, internalização e reciclagem dos receptores μ-opioides, além de adaptações compensatórias nas vias intracelulares reguladas pelo AMPc. Esses processos podem contribuir para o desenvolvimento de tolerância farmacológica e para manifestações fisiológicas decorrentes da interrupção da exposição. Tolerância, dependência física e transtorno por uso de opioides, entretanto, constituem fenômenos relacionados, mas conceitualmente distintos. A presença de tolerância ou dependência física, isoladamente, não caracteriza o uso compulsivo da substância química (Williams et al., 2013; Darcq e Kieffer, 2018; Swingler et al., 2025).

Estudos estruturais demonstram que diferentes agonistas podem estabilizar conformações específicas dos receptores μ-opioides e produzir padrões distintos de acoplamento às proteínas G e de recrutamento de β-arrestinas (Koehl et al., 2018; Zhuang et al., 2022). Esses dados ampliaram a compreensão da sinalização opioide. Contudo, a relação entre o viés de sinalização e a separação farmacológica entre analgesia e efeitos adversos permanece complexa. Assim, tolerância, dependência física e depressão respiratória não devem ser atribuídas exclusivamente a uma única via intracelular.

Nos circuitos mesocorticolímbicos, a morfina modula populações neuroniais envolvidas no reforço, na motivação e na atribuição de saliência. Segundo o modelo clássico, a ativação de receptores μ-opioides em interneurônios GABAérgicos e em aferências inibitórias da área tegmental ventral reduz a inibição exercida sobre determinadas populações de neurônios dopaminérgicos. Essa desinibição pode aumentar a atividade da via dopaminérgica mesolímbica, especialmente da projeção da área tegmental ventral para o núcleo accumbens, e modificar a liberação de dopamina nessa região (Fields e Margolis, 2015; Doyle e Mazei-Robison, 2021).

A área tegmental ventral apresenta elevada heterogeneidade celular, neuroquímica e conectiva. Por essa razão, os efeitos reforçadores e locomotores da morfina não podem ser explicados exclusivamente pelo modelo de desinibição dopaminérgica. Diferentes

populações de neurônios dopaminérgicos, projeções GABAérgicas e glutamatérgicas e mecanismos parcialmente independentes da dopamina também participam das respostas comportamentais aos opioides (Fields e Margolis, 2015; Doyle e Mazei-Robison, 2021).

A exposição aguda ou repetida à morfina pode modificar a transmissão excitatória e inibitória na área tegmental ventral, no núcleo accumbens e em outras estruturas relacionadas à motivação e à memória. Essas modificações podem envolver alterações na força sináptica, na excitabilidade neuronial, na liberação de neurotransmissores e na expressão gênica. A direção e a magnitude das respostas dependem da região encefálica, do subtipo neuronial, da dose, da duração do tratamento e do tempo transcorrido desde a última exposição à droga (Doyle e Mazei-Robison, 2021; Browne et al., 2025).

Browne et al. (2025) demonstraram que diferentes históricos de exposição à morfina podem produzir respostas transcricionais específicas em populações neuroniais do núcleo accumbens. Embora esse estudo não tenha avaliado diretamente a sensibilização locomotora, seus resultados sustentam a ocorrência de adaptações moleculares dependentes do tipo celular após exposição inicial, exposição repetida, retirada prolongada e reexposição à morfina.

Os efeitos comportamentais da morfina também envolvem processos de aprendizagem e memória. Estímulos ambientais repetidamente associados aos seus efeitos farmacológicos podem adquirir propriedades condicionadas e passar a modular respostas comportamentais posteriores (Hyman, Malenka e Nestler, 2006; Everitt e Robbins, 2016). Em modelos animais, a influência do contexto varia de acordo com a dose, o número de exposições, o intervalo entre as sessões e as características do protocolo comportamental (Hámor et al., 2023).

Além de seus efeitos analgésicos, a morfina pode produzir alterações comportamentais persistentes após exposições anteriores. Entre elas, destaca-se a sensibilização locomotora, caracterizada pelo aumento da resposta motora à droga após uma ou mais administrações prévias. Sua indução e expressão dependem de fatores como dose, frequência de administração, intervalo entre as exposições e contexto experimental (Valjent et al., 2010; Steketee e Kalivas, 2011; Delage et al., 2023).

A sensibilização locomotora constitui um modelo de plasticidade comportamental induzida por drogas, mas não deve ser considerada equivalente à dependência, ao uso compulsivo ou à recaída. O aumento da locomoção também pode ser influenciado pela habituação ao ambiente, pelo condicionamento contextual, pelo tempo transcorrido após a administração e pelo desenvolvimento de tolerância aos efeitos motores depressores.

Por essa razão, mudanças na atividade locomotora devem ser interpretadas considerandose as propriedades farmacológicas da morfina e as condições experimentais utilizadas (Steketee e Kalivas, 2011; Delage et al., 2023).

Os efeitos da morfina resultam da interação entre a ativação dos receptores μopioides, as adaptações da sinalização intracelular, a modulação dos circuitos mesocorticolímbicos e os processos de aprendizagem relacionados à droga. A compreensão dessas interações é fundamental para diferenciar seus efeitos analgésicos das adaptações associadas à tolerância, à dependência física e à sensibilização comportamental.

2.2- SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL

A sensibilização comportamental induzida por drogas caracteriza-se pelo aumento da magnitude de determinada resposta após exposições anteriores à substância química. Em modelos experimentais com roedores, sua manifestação mais frequentemente investigada é a sensibilização locomotora, definida como a amplificação progressiva da atividade locomotora após administrações repetidas, geralmente intermitentes, de uma droga. Uma vez estabelecida, a resposta sensibilizada pode persistir durante períodos prolongados sem novas exposições e reaparecer após a administração subsequente da substância química (Robinson e Berridge, 2008; Steketee e Kalivas, 2011; Delage et al., 2023).

Embora seja habitualmente induzida por exposições repetidas, determinados protocolos demonstram que uma única administração de psicoestimulantes ou morfina pode produzir sensibilização locomotora detectável durante um desafio farmacológico posterior. Nesses casos, a sensibilização não corresponde a uma amplificação progressiva durante a exposição inicial, mas ao aumento da resposta observado quando o animal é novamente exposto à droga após determinado intervalo (Valjent et al., 2010).

A intensidade e a persistência da sensibilização dependem da substância química, da dose, da via de administração, do número de exposições, do intervalo entre as sessões, da duração do período sem a droga e do contexto experimental. Também podem ocorrer variações relacionadas à espécie, à linhagem, ao sexo, à idade e às condições de alojamento. Dessa maneira, a ausência de aumento locomotor progressivo em determinado protocolo não demonstra, isoladamente, ausência de neuroadaptações induzidas pela droga (Steketee e Kalivas, 2011; Delage et al., 2023).

A sensibilização locomotora constitui um modelo experimental de plasticidade comportamental persistente, mas não reproduz integralmente o transtorno por uso de substâncias químicas, a dependência física ou o uso compulsivo observado em seres humanos. Sua principal utilidade consiste em investigar como exposições anteriores modificam a resposta subsequente à droga e como fatores farmacológicos e ambientais influenciam a expressão dessas adaptações (Vanderschuren e Kalivas, 2000; Steketee e Kalivas, 2011; Delage et al., 2023).

A interpretação da atividade locomotora exige cautela. O aumento da distância percorrida ao longo das administrações pode refletir sensibilização aos efeitos estimulantes da droga, mas também pode ser influenciado pela habituação ao ambiente, pelo condicionamento contextual, pelo desenvolvimento de tolerância a efeitos motores depressores e por alterações em estereotipias. A avaliação da sensibilização deve, portanto, considerar as propriedades farmacológicas da substância química, o tempo decorrido após a administração e as características do protocolo comportamental (Steketee e Kalivas, 2011; Delage et al., 2023).

A sensibilização locomotora e a sensibilização do incentivo são conceitos relacionados, mas não equivalentes. A primeira corresponde a uma medida experimental fundamentada no aumento da resposta motora. A sensibilização do incentivo refere-se à amplificação dos processos neurais responsáveis pela atribuição de saliência motivacional à droga e às pistas mnemônicas a ela relacionadas. Segundo essa teoria, a exposição repetida pode aumentar o "querer" direcionado à substância química sem elevar proporcionalmente o prazer ou o efeito hedônico por ela produzido (Robinson e Berridge, 2008).

O aumento da atividade locomotora não deve ser interpretado automaticamente como demonstração de maior motivação ou busca pela droga. Essas dimensões exigem paradigmas comportamentais específicos, como autoadministração, preferência condicionada, escolha entre recompensas ou testes de busca pela substância. Embora possam compartilhar determinados mecanismos neurobiológicos, esses comportamentos não constituem medidas equivalentes.

Do ponto de vista neurobiológico, a sensibilização comportamental envolve adaptações persistentes em circuitos mesocorticolímbicos relacionados à motivação, ao reforço e à aprendizagem associativa. Esses circuitos incluem projeções dopaminérgicas da área tegmental ventral para o núcleo *accumbens* e o córtex *pré-frontal*, além de conexões funcionais com estruturas relacionadas ao processamento contextual e

emocional, como o hipocampo e complexo amigdaloide (Everitt e Robbins, 2016; Volkow, Michaelides e Baler, 2019).

A dopamina desempenha papel relevante na indução e na expressão da sensibilização locomotora. Entretanto, o fenômeno não pode ser explicado exclusivamente pelo aumento da liberação desse neurotransmissor no núcleo *accumbens*. Alterações na responsividade neuronial, na transmissão glutamatérgica, nas vias intracelulares, na expressão gênica e na organização funcional dos circuitos também participam das respostas persistentes produzidas pelas drogas (Lüscher e Malenka, 2011; Steketee e Kalivas, 2011).

No caso dos opioides, adaptações na transmissão GABAérgica e glutamatérgica da área tegmental ventral podem modificar a atividade dos neurônios dopaminérgicos após a exposição aguda ou repetida. A contribuição dessas alterações depende da população neuronial, da origem das aferências, do regime de tratamento e do momento da avaliação (Doyle e Mazei-Robison, 2021).

Os mecanismos envolvidos na indução da sensibilização durante as primeiras exposições podem diferir daqueles responsáveis por sua expressão após um período sem a droga. A indução está relacionada às alterações desencadeadas durante as exposições iniciais, enquanto a expressão corresponde à manifestação da resposta aumentada durante exposições posteriores. Essa distinção é importante porque diferentes regiões e mecanismos celulares podem participar dessas duas etapas (Steketee e Kalivas, 2011; Delage et al., 2023).

O contexto experimental exerce influência importante sobre a expressão da sensibilização. Quando uma droga é repetidamente administrada em determinado ambiente, os estímulos contextuais podem adquirir propriedades condicionadas e modular a resposta observada em exposições posteriores. A atividade locomotora registrada no ambiente pareado pode refletir a interação entre os efeitos farmacológicos da droga, a sensibilização decorrente das exposições anteriores e a aprendizagem associativa entre droga e contexto (Bouton, 2002; Hámor et al., 2023).

O regime temporal de administração também influencia o desenvolvimento da sensibilização. Protocolos intermitentes frequentemente favorecem sua expressão, mas não se deve afirmar que todo regime intermitente produza maior sensibilização do que qualquer exposição contínua. O resultado depende da dose, da frequência, do intervalo entre as administrações, das características farmacocinéticas da substância e do momento em que a resposta é avaliada (Steketee e Kalivas, 2011; Delage et al., 2023).

Em conjunto, a sensibilização comportamental constitui um modelo experimental útil para investigar adaptações persistentes produzidas pela exposição a drogas e a influência de fatores farmacológicos e ambientais sobre sua expressão. Sua interpretação deve distinguir sensibilização locomotora, sensibilização do incentivo, condicionamento contextual e comportamentos motivados de busca pela droga.

2.3 EXTINÇÃO COMPORTAMENTAL

A extinção comportamental é caracterizada pela redução progressiva de uma resposta previamente condicionada quando o estímulo condicionado é apresentado repetidamente sem o resultado que antes o acompanhava. A diminuição da resposta não permite concluir, por si só, que a aprendizagem original tenha sido eliminada. Em vez disso, as evidências indicam que o treinamento de extinção produz uma nova aprendizagem, capaz de modificar a expressão comportamental da associação originalmente adquirida (Bouton, 2002, 2004; Delamater, 2004; Quirk e Mueller, 2008; Bouton et al., 2021).

A persistência da aprendizagem original pode ser demonstrada pelo retorno da resposta condicionada após a extinção. Esse retorno pode ocorrer em diferentes condições experimentais, incluindo a passagem do tempo, a mudança de contexto e a reapresentação do resultado incondicionado. Esses fenômenos são denominados, respectivamente, recuperação espontânea, renovação e reinstalação. Sua ocorrência demonstra que o desempenho reduzido ao final da extinção não equivale necessariamente à eliminação da associação anteriormente estabelecida (Bouton, 2004; Vervliet, Craske e Hermans, 2013; Bouton et al., 2021).

A expressão da memória de extinção apresenta importante dependência contextual. Durante o treinamento, o organismo aprende que, em determinadas circunstâncias, o estímulo condicionado deixou de predizer o resultado esperado. Como essa nova aprendizagem pode estar vinculada ao contexto no qual foi adquirida, a apresentação do estímulo em outro ambiente pode favorecer a recuperação da resposta original. O contexto, portanto, funciona como um modulador da expressão das aprendizagens de aquisição e de extinção (Bouton, 2002, 2004; Trask, Thrailkill e Bouton, 2017).

Nos modelos relacionados ao uso de drogas, a extinção é operacionalmente identificada pela redução de uma resposta condicionada durante apresentações repetidas das pistas ou do ambiente previamente relacionados à substância química, agora na

ausência do efeito farmacológico ou do reforço correspondente. Essa redução indica modificação do controle exercido pelos estímulos associados à droga, mas não comprova a reversão completa das adaptações neurais produzidas durante a exposição anterior (Gass e Chandler, 2013; Hearing, 2019).

Estímulos ambientais presentes durante o consumo ou a administração de uma droga podem adquirir controle sobre diferentes respostas comportamentais. Elementos visuais, olfatórios, táteis e espaciais podem integrar a representação contextual da experiência farmacológica e, posteriormente, influenciar a expressão de respostas condicionadas. No caso dos opioides, estudos experimentais mostram que contextos associados à morfina recrutam redes cerebrais distribuídas, envolvendo regiões límbicas, estriatais, sensoriais e corticais (Gomes-Ribeiro et al., 2024).

Gomes-Ribeiro et al. (2024), utilizando um modelo de preferência condicionada por lugar induzida por morfina associado à ressonância magnética funcional, identificaram padrões de atividade e conectividade relacionados à aquisição e à recuperação de memórias contextuais associadas ao opioide. Os resultados mostraram o envolvimento de estruturas como o complexo amigdaloide, a *habenula* lateral, o septo lateral, o hipocampo e componentes estriatais e corticais. Esses resultados sustentam a existência de representações distribuídas da informação droga-contexto, embora devam ser extrapolados com cautela para outros paradigmas comportamentais.

É necessário distinguir a extinção de respostas locomotoras condicionadas de paradigmas como preferência condicionada por lugar e extinção da busca operante pela droga. A resposta locomotora permite avaliar modificações da atividade motora associadas à exposição anterior à substância e ao ambiente experimental. A preferência condicionada por lugar avalia a valência motivacional atribuída ao contexto, enquanto a autoadministração examina comportamentos instrumentais dirigidos à obtenção da droga. Embora esses modelos compartilhem princípios de aprendizagem, eles não avaliam fenômenos comportamentais equivalentes.

A interpretação também deve diferenciar extinção, abstinência e tolerância. A abstinência corresponde a um período sem exposição à droga e pode ocorrer sem apresentações dos estímulos condicionados. A extinção requer contato não reforçado com os estímulos ou respostas anteriormente associadas ao resultado. A tolerância, por sua vez, corresponde à diminuição do efeito produzido por determinada dose após exposições anteriores. Esses processos podem coexistir, mas não devem ser tratados como sinônimos.

A aprendizagem de extinção depende da interação entre regiões envolvidas no processamento contextual, na atribuição de valor motivacional e no controle comportamental. Entre essas regiões estão o córtex *pré-frontal* medial, o hipocampo, o complexo amigdaloide e o núcleo *accumbens*. A contribuição de cada estrutura, contudo, varia conforme o tipo de aprendizagem, a substância química estudada, o estágio do treinamento e as projeções neuroniais recrutadas (Peters, Kalivas e Quirk, 2009; Gass e Chandler, 2013; Hearing, 2019).

No córtex *pré-frontal* medial de roedores, as regiões pré-límbica e infralímbica participam de redes parcialmente diferenciadas. Estudos com busca pela droga relacionaram projeções do córtex pré-límbico para o núcleo *accumbens core* à expressão de respostas de busca, enquanto determinadas projeções do córtex infralímbico para o núcleo *accumbens shell* foram associadas à limitação dessas respostas após o treinamento de extinção (Peters, LaLumiere e Kalivas, 2008; Peters, Kalivas e Quirk, 2009). Entretanto, essa organização não constitui uma divisão absoluta entre uma região promotora e outra supressora do comportamento.

A atuação do córtex *pré-frontal* depende do paradigma e da projeção neuronial examinada. Em um modelo de autoadministração de heroína, Heinsbroek et al. (2021) demonstraram que a via do córtex infralímbico para o núcleo *accumbens shell* participa da limitação da escolha pela heroína e da recaída. A manipulação seletiva dessa projeção produziu efeitos diferentes daqueles esperados a partir de uma interpretação baseada apenas na ativação global da região infralímbica. Esses resultados reforçam a necessidade de interpretar a função da parte rostral do lobo frontal com base em circuitos específicos.

O hipocampo participa da codificação e da recuperação de informações contextuais, contribuindo para a discriminação entre ambientes associados ou não a determinados resultados. O núcleo basolateral do complexo amigdaloide participa do processamento do valor motivacional e emocional das pistas, enquanto o núcleo *accumbens* integra informações corticais, hipocampais e amigdalinas relevantes para a organização das respostas. A área tegmental ventral, por meio de suas projeções dopaminérgicas e de suas interações com populações glutamatérgicas e GABAérgicas, também participa da plasticidade dos circuitos relacionados à motivação e à aprendizagem associativa (Koob e Volkow, 2016; Hearing, 2019).

A extinção envolve mecanismos de plasticidade sináptica que incluem alterações na transmissão glutamatérgica e em vias intracelulares relacionadas à consolidação e à recuperação da memória. Receptores NMDA e AMPA/Kainato, proteínas cinases e

mecanismos de transcrição dependentes de atividade foram associados à aprendizagem de extinção em diferentes paradigmas (Quirk e Mueller, 2008; Gass e Chandler, 2013).

Entretanto, os mecanismos identificados na extinção do medo não devem ser automaticamente generalizados para respostas relacionadas às drogas.

O sistema GABAérgico também contribui para o controle da excitabilidade das redes neurais envolvidas na expressão e na redução das respostas condicionadas. Essa participação não pode ser resumida como um aumento generalizado da inibição cerebral durante a extinção. Os efeitos dependem da localização dos interneurônios, dos subtipos celulares recrutados e das projeções reguladas pela inibição local. Em regiões corticais, por exemplo, o aumento da inibição sobre determinados neurônios de projeção pode reduzir a atividade de vias envolvidas na limitação da resposta condicionada. Por isso, a relação entre transmissão GABAérgica e extinção deve ser descrita em termos de circuitos específicos, e não como um mecanismo uniformemente supressor.

A atividade dopaminérgica igualmente apresenta funções dependentes do circuito e da etapa da aprendizagem. A dopamina pode participar da saliência dos estímulos, da detecção de mudanças nas contingências e da atualização das expectativas relacionadas ao resultado. A ausência do efeito esperado durante as primeiras sessões de extinção pode gerar sinais de erro de previsão relevantes para a aquisição da nova aprendizagem. Contudo, a contribuição dopaminérgica varia conforme o paradigma e não deve ser interpretada exclusivamente como sinal de recompensa.

Nos modelos com drogas, a redução de uma resposta após o treinamento de extinção pode coexistir com adaptações moleculares e funcionais persistentes. A extinção modifica a expressão comportamental, mas não implica necessariamente que todas as alterações produzidas pela exposição à substância química tenham retornado às condições basais. Essa distinção é relevante porque diferentes componentes da adaptação neural podem apresentar trajetórias temporais distintas e responder de maneira desigual ao treinamento comportamental (Gass e Chandler, 2013; Hearing, 2019).

A extinção também não deve ser considerada equivalente ao tratamento clínico do transtorno por uso de substâncias químicas. Os procedimentos experimentais de exposição não reforçada permitem investigar mecanismos específicos de aprendizagem, mas apresentam limitações “translacionais”. Em seres humanos, as pistas associadas ao consumo são numerosas, variáveis e encontradas em diferentes contextos, enquanto o comportamento é influenciado por fatores sociais, emocionais, farmacológicos e cognitivos que não são integralmente reproduzidos nos modelos animais.

Em conjunto, a extinção comportamental constitui um processo de aprendizagem pelo qual a expressão de uma resposta condicionada diminui quando as contingências ambientais são modificadas. A resposta original pode voltar a ser expressa dependendo do contexto, do intervalo transcorrido e de novas experiências com o resultado. Sua investigação permite examinar como os organismos atualizam relações previamente aprendidas e como diferentes circuitos neurais regulam a persistência e a expressão das respostas associadas às drogas.

2.4 GEFIRINA E PLASTICIDADE INIBITÓRIA

A gefirina é uma proteína multifuncional essencial para a formação, a organização e a estabilização de grande parte das sinapses inibitórias no sistema nervoso central. Na densidade pós-sináptica inibitória, atua como proteína de ancoragem, contribuindo para o recrutamento e a estabilização de receptores de glicina (GlyR) e de determinados subtipos de receptores GABAA na membrana neuronial (Tyagarajan e Fritschy, 2014; Kasaragod e Schindelin, 2018). Sua função, entretanto, não se limita à de um suporte estrutural passivo. A organização da gefirina é dinâmica e regulada pela atividade neuronial, por modificações pós-traducionais e por interações com receptores, moléculas de adesão e proteínas associadas ao citoesqueleto.

Em um modelo experimental de desenvolvimento sináptico, Carricaburu et al. (2024) demonstraram que a gefirina pode favorecer a montagem e a localização sináptica de componentes pós-sinápticos GABAérgicos mesmo na ausência de liberação présináptica de GABA. Esse resultado reforça a participação ativa da gefirina na formação das especializações pós-sinápticas inibitórias, sem excluir a importância da atividade présináptica para o refinamento, a maturação e a estabilidade funcional dessas conexões.

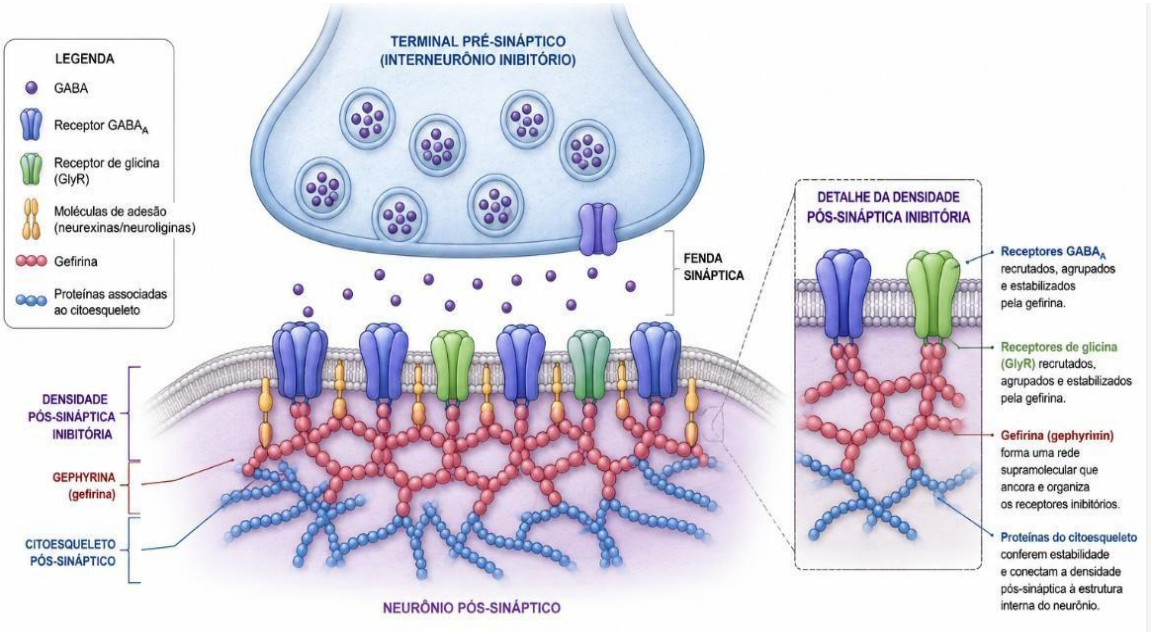


Figura 1. Representação esquemática da organização molecular de uma sinapse inibitória. A gefirina integra a densidade pós-sináptica e participa do recrutamento, do agrupamento e da estabilização de receptores GABAA e de glicina na membrana neuronial. Elaboração própria com base em Tyagarajan e Fritschy (2014), Battaglia et al. (2018) e Carricaburu et al. (2024).

Estruturalmente, a gefirina apresenta um domínio G na região N-terminal, um domínio central flexível, também denominado domínio C, e um domínio E na região C-terminal (Sola et al., 2004; Tretter et al., 2012; Kasaragod e Schindelin, 2018). O domínio G possui capacidade de trimerização, enquanto o domínio E participa da oligomerização e contém sítios relevantes para a ligação aos receptores inibitórios. O domínio central é menos estruturado e reúne sítios sujeitos à fosforilação e a outras modificações pós-traducionais, contribuindo para a regulação da estabilidade, da mobilidade e da organização sináptica da proteína.

Modelos clássicos propuseram que a trimerização do domínio G e a dimerização do domínio E possibilitariam a formação de uma rede hexagonal abaixo da membrana pós-sináptica. Embora esse modelo tenha sido importante para explicar a capacidade de agrupamento da gefirina, uma rede hexagonal regular não foi demonstrada diretamente como a organização universal da proteína in vivo. Evidências estruturais recentes indicam que domínios E dimerizados podem formar filamentos flexíveis, oferecendo uma explicação molecular adicional para a montagem e a adaptação da densidade pós-sináptica inibitória (Macha et al., 2025). Esses dados não eliminam completamente a possível contribuição dos domínios G para a ramificação ou para outras formas de organização supramolecular.

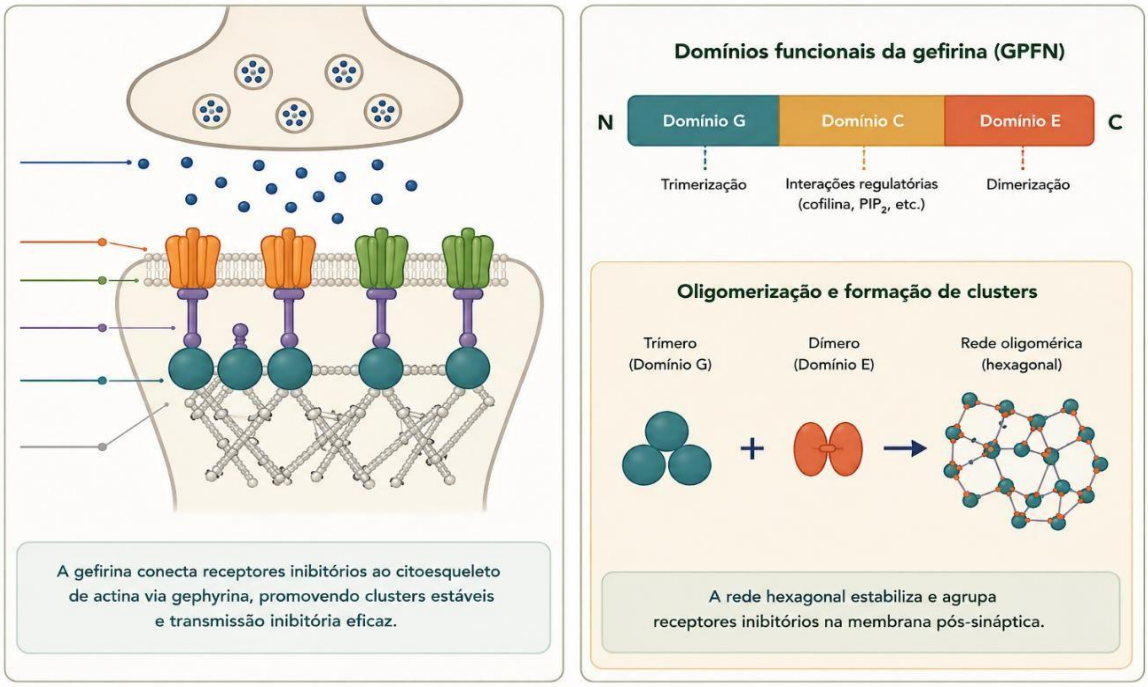


Figura 2. Organização estrutural da gefirina em seus domínios G, C e E. O domínio G apresenta capacidade de trimerização; o domínio E participa da oligomerização e contém sítios de ligação aos receptores inibitórios; e o domínio C concentra regiões regulatórias importantes. Estudos recentes propõem que a formação de filamentos flexíveis de gefirina constitui uma base molecular para sua organização nas densidades pós-sinápticas inibitórias. Elaboração própria com base em Kasaragod e Schindelin (2018) e Macha et al. (2025).

A organização supramolecular da gefirina favorece a formação de agrupamentos pós-sinápticos que funcionam como plataformas moleculares, aumentando a concentração e restringindo a mobilidade lateral dos receptores inibitórios em regiões específicas da membrana. Alterações no número, no tamanho, na distribuição e na estabilidade desses agrupamentos podem modificar a disponibilidade sináptica dos receptores e influenciar a transmissão inibitória e a excitabilidade neuronial (Tyagarajan e Fritschy, 2014; Groeneweg et al., 2018).

A presença de um agrupamento de gefirina, contudo, não equivale necessariamente à existência de uma sinapse inibitória funcional. Algumas sinapses GABAérgicas apresentam pouca ou nenhuma gefirina detectável, dependendo do tipo celular, da localização subcelular e da composição dos receptores. Do mesmo modo, alterações na imunorreatividade para gefirina não demonstram, isoladamente, mudanças na liberação de GABA, na atividade dos interneurônios ou na amplitude das correntes pós-sinápticas inibitórias. A identificação funcional dessas alterações exige medidas

complementares, como registros eletrofisiológicos e colocalização com marcadores pré e pós-sinápticos.

Além dos receptores GABAA, a gefirina exerce papel particularmente importante na estabilização dos receptores de glicina, sobretudo na medula espinhal, no tronco encefálico e em circuitos envolvidos no processamento sensorial e no controle motor (Lynch, 2004; Choii e Ko, 2015; Kasaragod e Schindelin, 2018). Em neurônios maduros, a ativação dos receptores de glicina geralmente aumenta a condutância ao cloreto e produz hiperpolarização ou inibição por desvio de corrente. O efeito final depende, entretanto, do gradiente eletroquímico do cloreto, da localização celular e do estágio de desenvolvimento neuronial (Zeilhofer et al., 2018).

A interação da gefirina com a subunidade β dos receptores de glicina é direta e apresenta afinidade elevada, sendo fundamental para a organização das sinapses glicinérgicas. Nos receptores GABAA, a interação é mais variável, depende da composição de subunidades e pode envolver outras proteínas reguladoras. Por essa razão, não é correto afirmar que todos os receptores GABAA sejam ancorados obrigatoriamente pela gefirina (Tretter et al., 2012; Kasaragod e Schindelin, 2018).

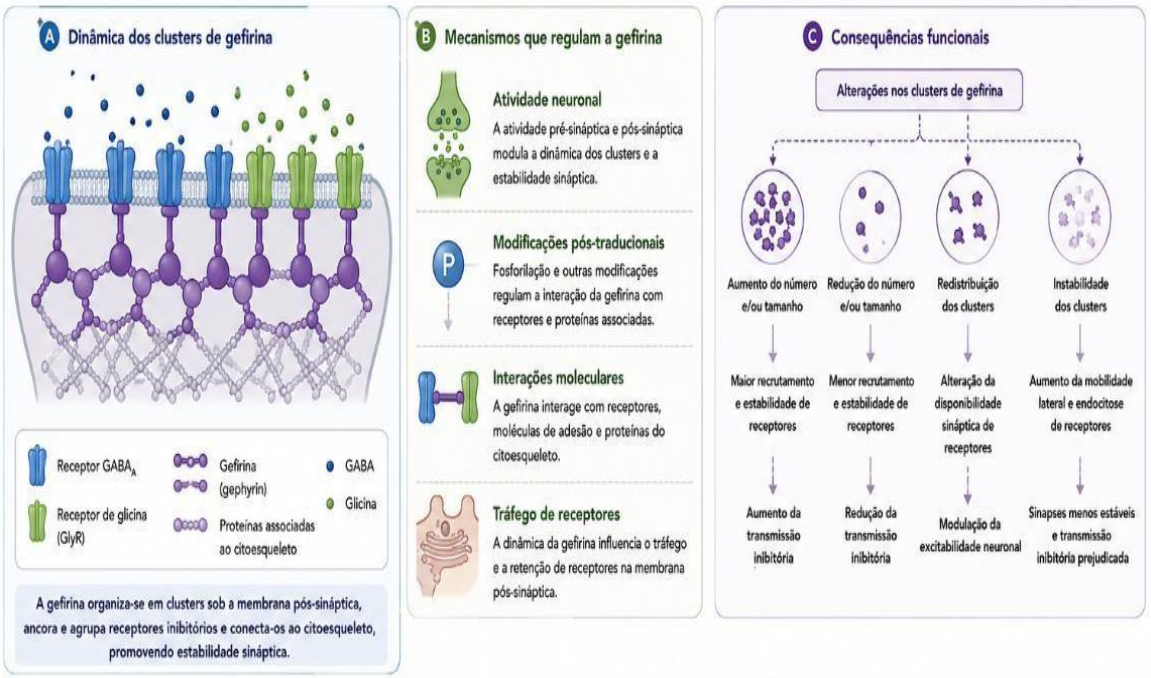


Figura 3. Representação esquemática da interação diferencial da gefirina com receptores inibitórios. A subunidade β do receptor de glicina (GlyR) interage diretamente e com elevada afinidade com o domínio E da gefirina. Nos receptores GABAA, a interação com a gefirina é dependente da composição de subunidades, envolvendo motivos específicos presentes em determinadas subunidades receptoras e

apresentando afinidades distintas. Fonte: elaboração própria com base em Tretter et al. (2012), Choii e Ko (2015) e Kasaragod e Schindelin (2018).

A gefirina integra uma rede molecular que inclui colibistina, neuroligin-2, neurexinas e outras proteínas associadas à organização das sinapses inibitórias. A colibistina contribui para o recrutamento e a estabilização da gefirina junto à membrana pós-sináptica por meio de interações com a própria gefirina e com fosfoinositídeos da membrana. A neuroligin-2, por sua vez, atua como molécula de adesão pós-sináptica e interage transinapticamente com neurexinas presentes no terminal pré-sináptico, contribuindo para o alinhamento e a maturação das especializações pré e pós-sinápticas.

A participação dessas moléculas varia de acordo com o tipo de sinapse e o contexto celular (Poulopoulos et al., 2009; Soykan et al., 2014; Tyagarajan e Fritschy, 2014).

2.5 Gefirina, morfina e plasticidade inibitória

No contexto da exposição aos opioides, a relação entre morfina e gefirina constitui uma hipótese biologicamente plausível, embora ainda pouco investigada diretamente. Considerando os efeitos dos receptores μ-opioides (MOR) sobre a organização funcional dos circuitos GABAérgicos e dopaminérgicos da área tegmental ventral (VTA), torna-se relevante examinar se a exposição à morfina é acompanhada por alterações em componentes pós-sinápticos inibitórios, entre os quais se destaca a gefirina (Johnson e North, 1992; Matsui et al., 2014).

Esse mecanismo não deve ser interpretado como consequência de um aumento uniforme da atividade dopaminérgica. A VTA apresenta ampla heterogeneidade celular e conectiva, e os efeitos dos opioides dependem da população neuronal, da origem das aferências, do alvo de projeção, da duração do tratamento e da história de exposição. Diferentes aferências GABAérgicas que convergem sobre neurônios dopaminérgicos apresentam sensibilidades distintas à ativação dos receptores μ-opioides, demonstrando que a ação dos opioides ocorre de maneira específica para cada circuito (Matsui et al., 2014). A exposição repetida também pode produzir adaptações persistentes na transmissão GABAérgica, glutamatérgica e dopaminérgica do sistema mesocorticolímbico, envolvendo regiões como o córtex pré-frontal medial (CPFm), o núcleo accumbens (NAc) e a VTA (Koob e Volkow, 2016; Hearing, 2019).

Uma possível ligação entre essas neuroadaptações e a gefirina envolve alterações na própria transmissão GABAérgica. A ativação dos receptores μ-opioides modifica a

atividade de aferências GABAérgicas na VTA e, após exposição repetida, pode produzir adaptações na liberação de GABA e nos mecanismos intracelulares associados a essas sinapses (Madhavan et al., 2010; Matsui et al., 2014). Mudanças persistentes na atividade inibitória podem, por sua vez, desencadear respostas homeostáticas pós-sinápticas, potencialmente modificando a disponibilidade, a estabilidade ou a distribuição da gefirina. Essa possibilidade deve ser compreendida como uma hipótese mecanística, uma vez que não demonstra uma ação direta da morfina sobre essa proteína.

Outro mecanismo potencial envolve a via ERK/MAPK. A gefirina é uma fosfoproteína cuja estabilidade e organização pós-sináptica são reguladas por modificações pós-traducionais. A ERK pode fosforilar a gefirina no resíduo Ser268, enquanto a GSK3β atua sobre o resíduo Ser270. Essas modificações participam do controle da organização da gefirina nas especializações pós-sinápticas e da plasticidade das sinapses GABAérgicas (Tyagarajan et al., 2011; Tyagarajan et al., 2013). Essa via torna-se particularmente relevante no contexto da exposição aos opioides porque a morfina pode modificar a atividade de ERK de maneira dependente da região cerebral, da duração da exposição e do regime de tratamento. Alterações de ERK foram descritas no NAc e em outras estruturas relacionadas à recompensa após tratamentos agudos e repetidos com morfina (Muller e Unterwald, 2004). Assim, a modulação dessa cascata representa uma possível via indireta pela qual a exposição à morfina poderia influenciar a organização pós-sináptica da gefirina.

A sinalização envolvendo Akt e GSK3β constitui outra possibilidade mecanística. A GSK3β participa diretamente da regulação da gefirina por meio da fosforilação da Ser270, influenciando sua organização nas especializações pós-sinápticas inibitórias. Alterações dessa via podem modificar a densidade dos agrupamentos de gefirina e estão associadas a mudanças funcionais na transmissão GABAérgica (Tyagarajan et al., 2011). A morfina, por sua vez, pode modificar a sinalização de Akt de maneira dependente do padrão de exposição. Muller e Unterwald (2004) demonstraram diferenças na fosforilação de Akt após tratamentos agudo e crônico com morfina, inclusive no NAc. Como Akt participa da regulação da atividade da GSK3β, alterações nesse eixo representam uma possibilidade biologicamente plausível de ligação entre a exposição repetida à morfina e a regulação molecular da gefirina. Entretanto, a sequência causal morfina–Akt/GSK3β–gefirina ainda não foi diretamente demonstrada nesses circuitos.

A proteólise dependente de Ca^{2+} também pode contribuir para a remodelação da gefirina. A calpaína-1, uma protease dependente de Ca^{2+}, participa da regulação da quantidade de gefirina disponível nas especializações pós-sinápticas. Além disso, o estado

de fosforilação da proteína pelas vias ERK e GSK3β influencia sua susceptibilidade à proteólise, estabelecendo uma interação entre atividade neuronal, sinalização intracelular e estabilidade do scaffold inibitório (Tyagarajan et al., 2011; Tyagarajan et al., 2013). Dessa maneira, alterações persistentes da atividade neuronal e das cascatas intracelulares decorrentes da exposição repetida à morfina poderiam modificar indiretamente o equilíbrio entre estabilização, redistribuição e degradação da gefirina. Contudo, uma redução da imunorreatividade não permite determinar isoladamente se ocorreu aumento da degradação proteica.

Também deve ser considerada a relação funcional entre a gefirina e os receptores GABA_A. A gefirina atua como importante proteína de ancoragem e organização de determinadas populações desses receptores nas especializações pós-sinápticas inibitórias. Modificações persistentes da atividade GABAérgica podem, portanto, favorecer um remodelamento coordenado entre receptores GABA_A, proteínas de ancoragem e componentes associados ao citoesqueleto pós-sináptico. Nesse cenário, alterações na imunorreatividade para gefirina poderiam representar uma resposta estrutural ou homeostática das especializações inibitórias às modificações da atividade dos circuitos produzidas pela exposição repetida à morfina.

A partir desses mecanismos, pode-se considerar que os efeitos da morfina sobre a gefirina sejam predominantemente indiretos e dependentes das neuroadaptações desencadeadas pela exposição à droga. A modulação da atividade GABAérgica, associada às alterações das vias ERK/MAPK e Akt/GSK3β e aos mecanismos dependentes de Ca^{2+} e calpaína, oferece possíveis rotas moleculares para mudanças na fosforilação, estabilidade e distribuição da gefirina. Além disso, quando a administração da morfina ocorre repetidamente em associação com um contexto específico, essas adaptações podem integrar processos de plasticidade relacionados à formação e manutenção das associações droga-contexto. Nesse sentido, diferenças entre condições de exposição associada e não associada ao contexto podem refletir não apenas os efeitos farmacológicos da morfina, mas também neuroadaptações decorrentes da experiência condicionada.

Apesar dessa plausibilidade, as evidências disponíveis não permitem afirmar que a morfina modifique necessariamente a oligomerização da gefirina ou seus agrupamentos pós-sinápticos no CPFm, NAc ou VTA. Tampouco é adequado apresentar alterações da gefirina como mecanismo estabelecido da sensibilização locomotora, da extinção ou da recuperação de respostas associadas aos opioides. A relação deve, portanto, permanecer como uma questão experimental: considerando que a exposição repetida à morfina produz

adaptações persistentes nos circuitos GABAérgicos e que a gefirina participa da organização pós-sináptica inibitória, torna-se pertinente investigar se a indução e a extinção da resposta locomotora condicionada são acompanhadas por alterações na distribuição, densidade e intensidade da imunorreatividade para gefirina.

Nesse contexto, a imuno-histoquímica cromogênica para gefirina permite avaliar aspectos da distribuição regional, densidade e intensidade dos perfis imunorreativos. Uma redução desses parâmetros pode ser compatível com menor disponibilidade da proteína ou com modificações em sua organização regional, enquanto um aumento pode refletir maior imunorreatividade, recrutamento molecular ou respostas compensatórias. Essas interpretações, entretanto, devem ser feitas com cautela, pois a marcação isolada não permite distinguir entre síntese, degradação, redistribuição subcelular ou modificações pós-traducionais da gefirina.

Além disso, os agrupamentos moleculares de gefirina apresentam dimensões submicrométricas e não podem ser individualizados com segurança pela microscopia de campo claro convencional. Consequentemente, depósitos ou perfis imunorreativos identificados pela reação com DAB não devem ser considerados automaticamente clusters sinápticos individuais. A demonstração de modificações específicas na organização de clusters ou na função GABAérgica exigiria abordagens complementares, incluindo microscopia confocal ou de super-resolução, colocalização com marcadores sinápticos e registros eletrofisiológicos (Specht et al., 2013).

Dessa forma, a análise da gefirina no CPFm, NAc e VTA oferece uma estratégia para investigar possíveis neuroadaptações das especializações pós-sinápticas inibitórias associadas à exposição repetida à morfina e à experiência condicionada. As alterações identificadas podem fornecer evidências de remodelamento da organização regional da imunorreatividade para gefirina, sem que isso implique, isoladamente, mudanças equivalentes no número de sinapses inibitórias ou na função GABAérgica. Essa interpretação preserva os limites metodológicos da imuno-histoquímica e, ao mesmo tempo, permite relacionar os resultados às adaptações moleculares e circuitais produzidas pela exposição repetida aos opioides.

3 HIPÓTESE

A associação entre a morfina e o contexto ambiental produzirá uma resposta locomotora condicionada e sensibilizada dependente do contexto, acompanhada de uma diminuição na complexidade dendrítica dos neurônios espinhosos médios do NAc e diminuição na imunorreatividade para gefirina no NAc, VTA e PFC. Adicionalmente, pressupõe-se que o procedimento de extinção atenuará a expressão comportamental dessa sensibilização sem reverter a retração dendrítica estrutural; contudo, impulsionará novas adaptações moleculares, caracterizadas pelo aumento na densidade de gefirina decorrente da consolidação de uma aprendizagem inibitória. Por fim, projeta-se que o desafio com morfina restabelecerá a sensibilização locomotora no grupo com histórico de associação droga-ambiente, o que será acompanhado pelo incremento na densidade de gefirina.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos da extinção de uma resposta condicionada e sensibilizada induzida por morfina sobre alterações comportamentais, complexidade dendrítica neuronal e organização da imunorreatividade para gefirina em ratos.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a sensibilização locomotora induzida pela morfina associada ao contexto experimental.
- Avaliar a extinção da resposta locomotora condicionada induzida pela morfina.
- Avaliar a recuperação da resposta locomotora após re-exposição à morfina.
- Avaliar a complexidade dendrítica e a densidade de espinhos dendríticos no núcleo *accumbens* por meio da técnica de Golgi-Cox.
- Avaliar a imunorreatividade para gefirina no córtex *pré-frontal*, núcleo *accumbens* e área tegmental ventral.

5 METODOLOGIA

5.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar albinos provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), pesando entre 200 e 300 g no início dos experimentos. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de plástico (25 × 18 × 17 cm), sob temperatura controlada de 22 ± 2 °C, ciclo claro/escuro de 12/12 h, com livre acesso à água e ração durante todo o período experimental.

Os experimentos foram realizados entre 8h e 12h. Com o objetivo de minimizar possíveis efeitos do estresse relacionado ao manejo, todos os animais foram submetidos ao procedimento de *handling* durante sete dias consecutivos antes do início dos experimentos, permanecendo em manipulação diária por aproximadamente cinco minutos.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos para experimentação animal adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UENF – Protocolo nº 461).

5.2 Fármacos

Foi utilizado sulfato de morfina (Dimorf®, Cristália, Brasil), administrado na dose de 10 mg/kg por via subcutânea (sc). A solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) foi utilizada como veículo (sc). O volume de administração foi padronizado em 1 ml/kg.

5.3 Ambiente experimental comportamental

Os experimentos comportamentais foram realizados em modelo de campo aberto utilizando quatro salas experimentais independentes, contendo iluminação vermelha, temperatura controlada (22 ± 2 °C) e ruído branco produzido por ventilador para padronização sonora ambiental.

Cada sala continha uma arena quadrada medindo 60 × 60 × 45 cm, com paredes e assoalho pintados na cor preta. Para registro da atividade locomotora foram utilizadas câmeras posicionadas aproximadamente 60 cm acima das arenas, acopladas a computadores contendo o *software EthoVision (Noldus*), responsável pela quantificação da distância percorrida (m).

5.4 Procedimentos comportamentais gerais

5.4.1 Fase de habituação

Durante a fase de habituação, os animais receberam solução salina fisiológica (NaCl 0,9%, sc) e foram imediatamente colocados na arena experimental por 30 minutos durante três dias consecutivos. A atividade locomotora foi registrada durante todo o período experimental.

O objetivo dessa fase foi reduzir respostas comportamentais relacionadas à novidade ambiental e permitir adaptação dos animais ao contexto experimental.

5.4.2 Fase de indução

Após a habituação, os animais foram submetidos à fase de indução farmacológica, na qual receberam veículo ou morfina associada ou não associada ao contexto experimental.

A diferença entre os grupos associado e não associado foi estabelecida pelo local no qual os animais experimentavam os efeitos farmacológicos da morfina.

- VEI: veículo imediatamente antes da arena e veículo 30 minutos após a sessão, durante a fase de indução.
- MOR-A: morfina (10 mg/kg, s.c.) imediatamente antes da arena e veículo 30 minutos após a sessão; os efeitos farmacológicos ocorreram associados ao contexto experimental.
- MOR-NA: veículo imediatamente antes da arena e morfina (10 mg/kg, s.c.) 30 minutos após a sessão, na caixa-viveiro; os efeitos farmacológicos não ocorreram associados ao contexto experimental.

5.4.3 Fase de extinção

Durante a fase de extinção, todos os animais receberam veículo imediatamente antes da exposição à arena experimental durante cinco minutos. Após a sessão locomotora, os animais retornaram à caixa-viveiro. Essa fase teve como objetivo promover a aprendizagem de extinção e reduzir a expressão da resposta locomotora condicionada e sensibilizada à morfina.

5.4.4Teste Final

No teste final, os animais foram subdivididos em grupos tratados com veículo ou morfina imediatamente antes da exposição à arena experimental. O objetivo dessa fase

foi avaliar possíveis respostas relacionadas à recuperação da sensibilização locomotora e à reativação da memória droga-contexto.

A tabela 1 apresenta a linha temporal do procedimento experimental geral.

Tabela 1: Linha temporal do procedimento experimental.

Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	Habituação			Indução					Extinção					Teste Final

5.5 Experimento 1 - Exposição aguda à morfina

O experimento agudo avaliou os efeitos de uma única administração de morfina sobre a atividade locomotora, a morfologia dendrítica do núcleo accumbens e a imunorreatividade para gefirina. Após três dias de habituação, os animais receberam veículo (VEI-1) ou morfina (MOR-1; 10 mg/kg, s.c.) imediatamente antes de uma sessão de cinco minutos na arena. A atividade locomotora foi registrada pelo sistema EthoVision. Após o teste, os animais foram destinados à coleta tecidual. Para cada análise histológica, foram utilizados oito animais por grupo (n = 8). A figura 4 apresenta a linha temporal desse experimento.

Dias	1	2	3	4	Eutanásia
	Fase de Habituação			Tratamento	Golgi-Cox Gefirina

Figura 4 - Linha temporal do experimento 1. Representação esquemática do protocolo experimental, composto por três dias de habituação (dias 1 a 3), seguidos pelo tratamento no dia 4. Após o procedimento experimental, os animais foram submetidos à eutanásia para coleta do tecido e posterior processamento pelas técnicas de Golgi-Cox e imuno-histoquímica para gefirina.

5.6 Experimento 2 - Desenvolvimento de uma resposta locomotora sensibilizada

O experimento de indução avaliou os efeitos da sensibilização locomotora sobre a morfologia dendrítica e a imunorreatividade para gefirina. Após três dias de habituação, os animais foram submetidos a cinco dias de indução e distribuídos nos grupos VEI-I, MOR-NA-I e MOR-A-I, conforme o pareamento entre tratamento e contexto descrito anteriormente. Ao término do quinto dia, foram realizados a coleta tecidual e os

procedimentos histológicos. Para cada análise histológica, foram utilizados oito animais por grupo (n = 7). A Figura 5 apresenta a linha do tempo e os grupos desse experimento.

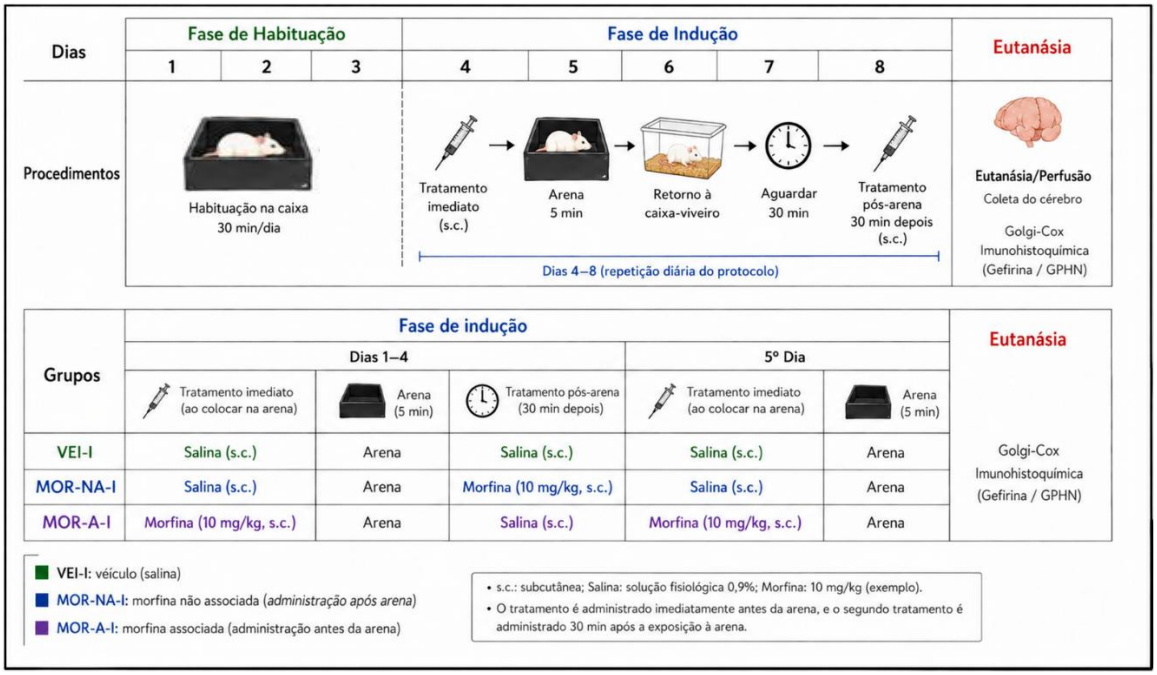


Figura 5 - Os animais foram inicialmente submetidos a três dias de habituação, seguidos por cinco dias de indução. Durante a fase de indução, os animais receberam salina ou morfina (10 mg/kg, s.c.) imediatamente antes da exposição à arena, de acordo com o grupo experimental. Após a avaliação comportamental na arena (5 min), os animais retornaram à caixa-viveiro e, 30 min depois, receberam salina ou morfina conforme o protocolo. O grupo VEI-I recebeu salina antes e após a arena; o grupo MOR-NA-I recebeu salina antes da arena e morfina 30 min após a exposição; e o grupo MOR-A-I recebeu morfina imediatamente antes da arena e salina 30 min depois. No quinto dia de indução, após a última exposição à arena, os animais foram destinados à perfusão e coleta do encéfalo para análise da plasticidade dendrítica por Golgi-Cox e avaliação imunohistoquímica de gefirina (GPHN). VEI-I: veículo; MOR-NA-I: morfina não associada ao contexto; MOR-A-I: morfina associada ao contexto; s.c.: via subcutânea.

5.7 Experimento 3 - Extinção da resposta locomotora condicionada e sensibilizada

O experimento de extinção avaliou a redução da resposta locomotora previamente sensibilizada e condicionada, bem como as alterações dendríticas e de imunorreatividade para gefirina após a aprendizagem de extinção. Após três dias de habituação e cinco dias de indução, os animais foram submetidos a cinco sessões de extinção, nas quais receberam veículo antes da arena, retornaram à caixa-viveiro e 30 min pós-arena. Para cada análise histológica, foram utilizados oito animais por grupo (n = 7). A figura 6 apresenta a linha do tempo e os grupos desse experimento.

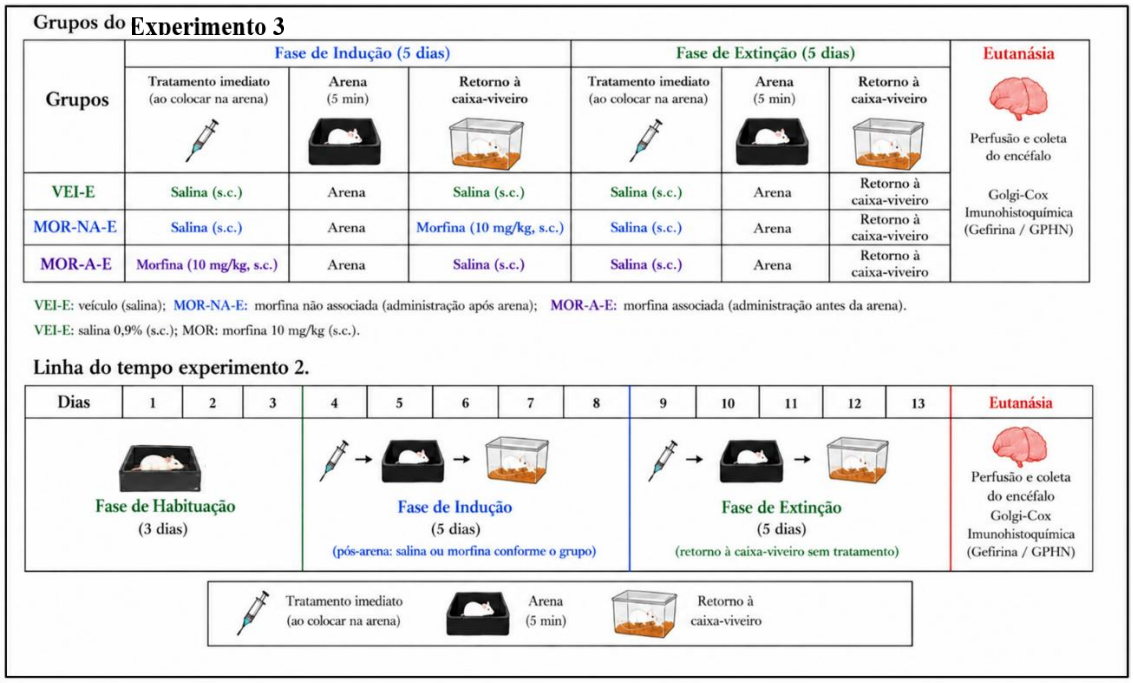


Figura 6. Delineamento experimental da fase de extinção da sensibilização locomotora induzida pela morfina. Os animais foram submetidos a três dias de habituação, seguidos por cinco dias de indução e cinco dias de extinção. Ao término da fase de extinção, os animais foram submetidos à perfusão e coleta do encéfalo para análise da plasticidade dendrítica por Golgi-Cox e avaliação imunohistoquímica de gefirina (GPHN). VEI: veículo; MOR-NA-E: morfina não associada ao contexto; MOR-A-E: morfina associada ao contexto; s.c.: via subcutânea.

5.8 Experimento 4 Efeito do desafio com morfina sobre a resposta locomotora sensibilizada previamente extinta e sobre a expressão da gefirina

O experimento de teste final avaliou a expressão da sensibilização após a aprendizagem de extinção e as alterações na imunorreatividade para gefirina. Após habituação, indução e extinção, os animais foram subdivididos metade dos animais de cada grupo recebeu morfina e a outra metade recebeu veículo, originando os grupos VEI/VEI, VEI/MOR, MOR-NA/VEI, MOR-NA/MOR, MOR-A/VEI e MOR-A/MOR. Para a análise histológica, foram utilizados oito animais por grupo (n = 7). A figura 7 apresenta a linha do tempo e os grupos desse experimento.

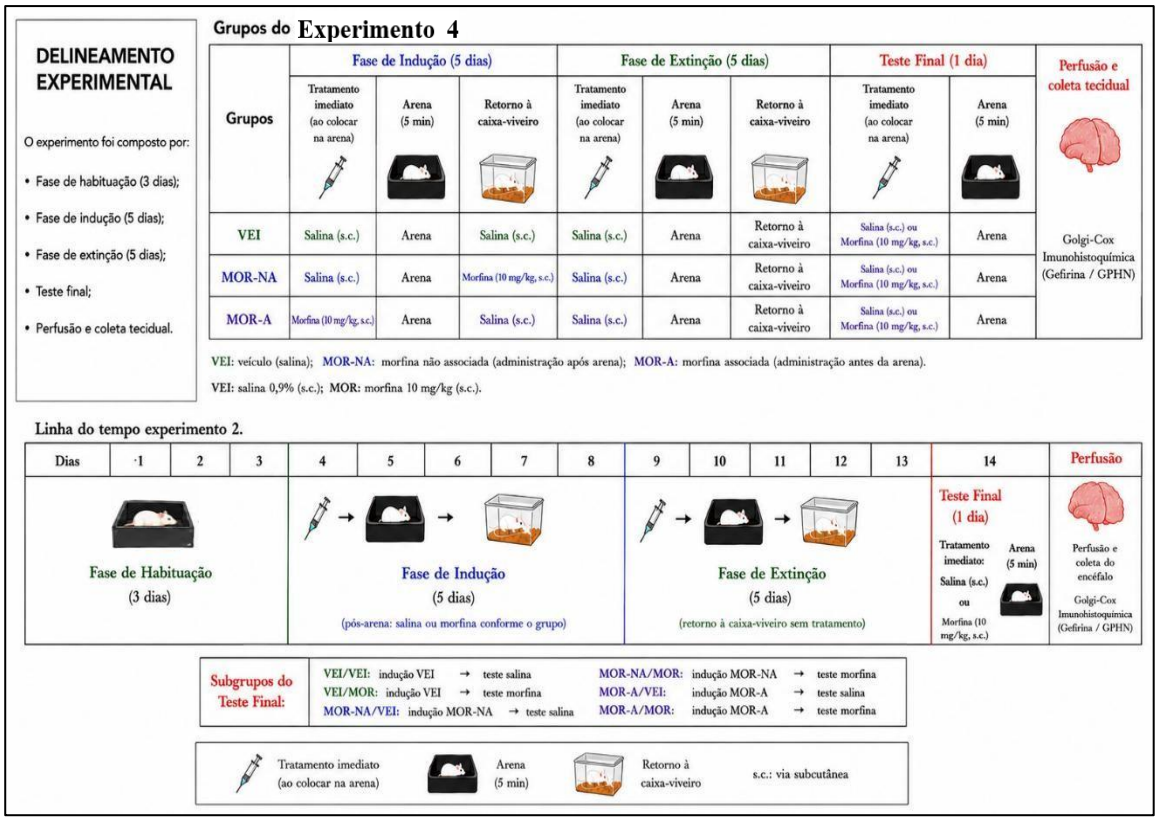


Figura 7. Delineamento experimental do Teste Final e Recuperação da Resposta Condicionada. Após três dias de habituação, os animais foram submetidos a cinco dias de indução e cinco dias de extinção. No teste final, cada grupo foi subdividido de acordo com o tratamento administrado imediatamente antes da arena, originando seis subgrupos: VEI/VEI, VEI/MOR, MOR-NA/VEI, MOR-NA/MOR, MOR-A/VEI e MOR-A/MOR. Após o teste, os animais foram submetidos à perfusão e coleta do encéfalo para análise da plasticidade dendrítica por Golgi-Cox e avaliação imunohistoquímica de gefirina (GPHN). VEI: veículo (salina 0,9%); MOR: morfina (10 mg/kg); MOR-NA: morfina não associada ao contexto; MOR-A: morfina associada ao contexto; s.c.: via subcutânea.

5.9 Perfusão e coleta tecidual

Ao término dos protocolos experimentais, os animais foram profundamente anestesiados com uretana a 20% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA; 1,5 g/kg, i.p.). Posteriormente, os animais destinados à análise imuno-histoquímica para gefirina foram submetidos à perfusão transcardíaca utilizando inicialmente 100 mL de solução salina fisiológica gelada (4-10 °C), seguida por 200 mL de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,4), também gelado.

Após a perfusão, os encéfalos foram removidos e pós-fixados em paraformaldeído 4% por aproximadamente 24 horas (overnight) a 4 °C. Em seguida, os tecidos foram lavados em tampão fosfato de Sorenson 0,4 M (PBS), com três trocas sucessivas de 20 minutos cada, para remoção de resíduos do fixador. Posteriormente, os encéfalos foram

submetidos à crioproteção em solução de sacarose 20% até completo afundamento do tecido.

Os animais destinados à técnica de Golgi-Cox não foram perfundidos. Após anestesia profunda, os encéfalos foram removidos cuidadosamente e imediatamente imersos na solução de Golgi-Cox para impregnação neuronal.

5.10 Técnica de Golgi-Cox

Para investigação das alterações relacionadas à plasticidade dendrítica neuronal, foi utilizada a técnica histológica de Golgi-Cox, amplamente reconhecida como uma das metodologias mais confiáveis para visualização da arborização dendrítica e da morfologia de espinhos dendríticos (Kang et al., 2017). Essa técnica permite impregnação completa e aleatória de neurônios individuais, apresentando baixa interferência de estruturas de fundo e possibilitando análise detalhada da árvore dendrítica em sua totalidade (Kolb e McClimans, 1986; Spiga et al., 2011).

O procedimento experimental foi realizado com base no protocolo descrito por Zhong et al. (2019), com adaptações metodológicas previamente descritas na literatura (Risher et al., 2014).

Após remoção dos encéfalos, os tecidos foram imediatamente imersos em solução de Golgi-Cox composta por dicromato de potássio 5%, cloreto de mercúrio 5% e cromato de potássio 5%, ajustada para pH 6,5. Os encéfalos permaneceram inicialmente por 48 horas na solução e posteriormente foram transferidos para solução fresca de Golgi-Cox, onde permaneceram por 14 dias no escuro, visando redução da coloração de fundo e impregnação homogênea dos neurônios.

Após o período de impregnação, os tecidos foram submetidos à crioproteção em sacarose 30% em PBS por 2 a 3 dias. Em seguida, os encéfalos foram seccionados em cortes coronais de 100 μm utilizando criostato. Para evitar fissuras teciduais durante o corte, os encéfalos e lâminas foram mantidos em temperaturas aproximadas de −3 °C e −13 °C, respectivamente.

Os cortes foram montados em lâminas previamente gelatinizadas e submetidos ao protocolo de desenvolvimento descrito por Kolb e McClimans (1986). As secções foram incubadas em hidróxido de amônia por 30 minutos, seguidas de incubação em tiossulfato de sódio 5% por 10 minutos. Posteriormente, os cortes foram desidratados em séries crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e montados com DPX Mountant for Histology (Sigma-Aldrich®).

As análises morfológicas foram realizadas no núcleo *accumbens*, região relacionada à recompensa, à memória associativa e ao controle comportamental.

5.11 Imuno-histoquímica para gefirina (GPHN)

Para investigação da expressão e distribuição da proteína gefirina (GPHN), componente fundamental da densidade pós-sináptica de sinapses inibitórias, foi utilizada a técnica de imunohistoquímica em campo claro utilizando 3,3′-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno (Fritschy et al., 2008; Tyagarajan e Fritschy, 2014).

Após perfusão e pós-fixação, os encéfalos foram crioprotegidos em sacarose 30% em PBS até completo afundamento do tecido. Posteriormente, os tecidos foram seccionados em cortes coronais seriados de 30–40 μm utilizando criostato.

As secções foram inicialmente lavadas em PBS e incubadas em solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 0,3% para bloqueio da atividade endógena da peroxidase. Em seguida, os cortes foram incubados em solução bloqueadora contendo soro normal e Triton X-100 para redução de ligações inespecíficas e permeabilização tecidual.

Posteriormente, as secções foram incubadas com anticorpo primário anti-gefirina (GPHN) diluído em solução tampão por período overnight sob refrigeração e agitação leve. Após lavagens sucessivas em PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado, seguidos pela aplicação do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC).

A revelação da imunorreatividade foi realizada utilizando solução de DAB, resultando em precipitado marrom insolúvel nos locais de expressão da gefirina. Após o desenvolvimento cromogênico, os cortes foram contracorados com hematoxilina, desidratados em séries crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e montados com DPX.

A análise da imunorreatividade para gefirina foi realizada em campo claro utilizando imagens obtidas em microscopia óptica. As imagens foram processadas no software Fiji/ImageJ utilizando o plugin Colour Deconvolution para separação cromática do DAB e hematoxilina.

A densidade da marcação imunorreativa para gefirina foi quantificada em regiões de interesse (ROI) padronizadas, calculando-se a razão entre o número de perfis imunorreativos detectados e a área da ROI. Cada animal contribuiu com uma única medida por região cerebral analisada, evitando pseudorrepetição e garantindo independência estatística dos dados.

5.12 Análise estatística

Antes dos testes de hipótese, a normalidade das distribuições e a homogeneidade das variâncias foram avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. No experimento agudo, a distância total percorrida, o comprimento dendrítico total, a densidade de espinhos e a densidade regional de marcação para gefirina foram comparados entre VEI-1 e MOR-1 por testes t para amostras independentes. A análise de Sholl foi avaliada por ANOVA de medidas repetidas de dois fatores, considerando a distância radial como fator intrassujeitos e o grupo de tratamento como fator entressujeitos. Nas fases de indução e extinção, os perfis diários de atividade locomotora foram avaliados por ANOVAs de medidas repetidas de dois fatores, com os dias experimentais como fator intrassujeitos e o grupo como fator entressujeitos. As medidas obtidas em um único momento, incluindo comprimento dendrítico total, densidade de espinhos e densidade regional de marcação para gefirina, foram analisadas por ANOVAs de uma via. A complexidade das ramificações dendríticas obtida pela análise de Sholl foi avaliada por ANOVA de medidas repetidas de dois fatores (distância radial × grupo). No teste final, a atividade locomotora e a densidade regional de marcação para gefirina nos seis grupos foram analisadas por ANOVAs de uma via. Quando foram detectados efeitos principais ou interações significativas, realizaram-se comparações pareadas com correção de Bonferroni. O nível de significância foi estabelecido a priori em $p < 0,05$. Os dados são apresentados como média ± erro-padrão da média (EPM).

6 RESULTADOS

6.1 Exposição aguda à morfina

A figura 8 apresenta a atividade locomotora após a administração aguda de morfina e veículo. O teste t para amostras independentes mostrou que a administração aguda de morfina reduziu significativamente a distância percorrida em comparação ao veículo [$t(30) = 5,10$; $p < 0,01$].

A figura 9 apresenta o efeito da injeção aguda de morfina sobre a complexidade dendrítica. O teste t para amostra independente mostrou que não houve diferenças entre VEI-1 e MOR-1 na densidade de espinhos (Fig. 9A) [$t(78) = 0,63$; $p > 0,05$] e no comprimento dendrítico total (Fig. 9B) [$t(78) = 0,05$; $p > 0,05$]. Na análise de Sholl (Fig. 9C), a ANOVA de medidas repetidas mostrou que houve efeito da distância radial [$F(14,1092) = 34,20$; $p < 0,01$], sem efeito de grupo [$F(1,78) = 2,53$; $p > 0,05$] e sem interação grupo × distância radial [$F(14,1092) = 0,50$; $p > 0,05$]. As figuras 9D, 9E e 9F

apresentam as fotomicrografias ilustrativas da densidade dendrítica, comprimento dendrítico e análise de Sholl dos grupos experimentais, respectivamente.

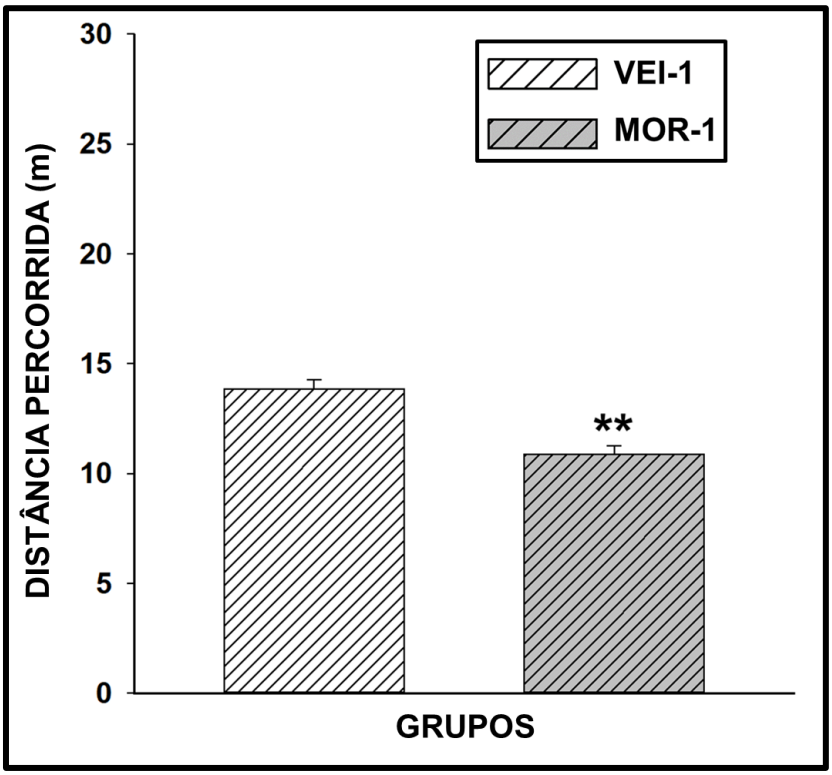


Figura 8. Efeito da administração aguda de morfina ou veículo sobre a atividade locomotora. O teste *t* para amostras independentes demonstrou que o grupo VEI-1 apresentou maior atividade locomotora que o grupo MOR-1. ** $p < 0,01$.

A figura 10 apresenta o efeito da administração aguda de morfina na densidade da proteína gefirina. O teste t para amostras independentes mostrou que a densidade de marcação para gefirina foi maior em MOR-1 do que em VEI-1 no NAc (Fig. 10A) [$t(14) = 6,42$; $p < 0,01$] e na VTA (Fig. 10B) [$t(14) = 5,70$; $p < 0,01$], mas não diferiu no CPFm (Fig. 10C) [$t(14) = 1,63$; $p > 0,05$].

Assim, uma única exposição à morfina produziu depressão locomotora inicial e foi acompanhada por um rápido aumento da densidade de gefirina especificamente em regiões subcorticais do circuito de recompensa, NAc e VTA, sugerindo aumento da sinalização sináptica inibitória, sem evidências de remodelamento estrutural detectável dos dendritos ou espinhos dendríticos no NAc.

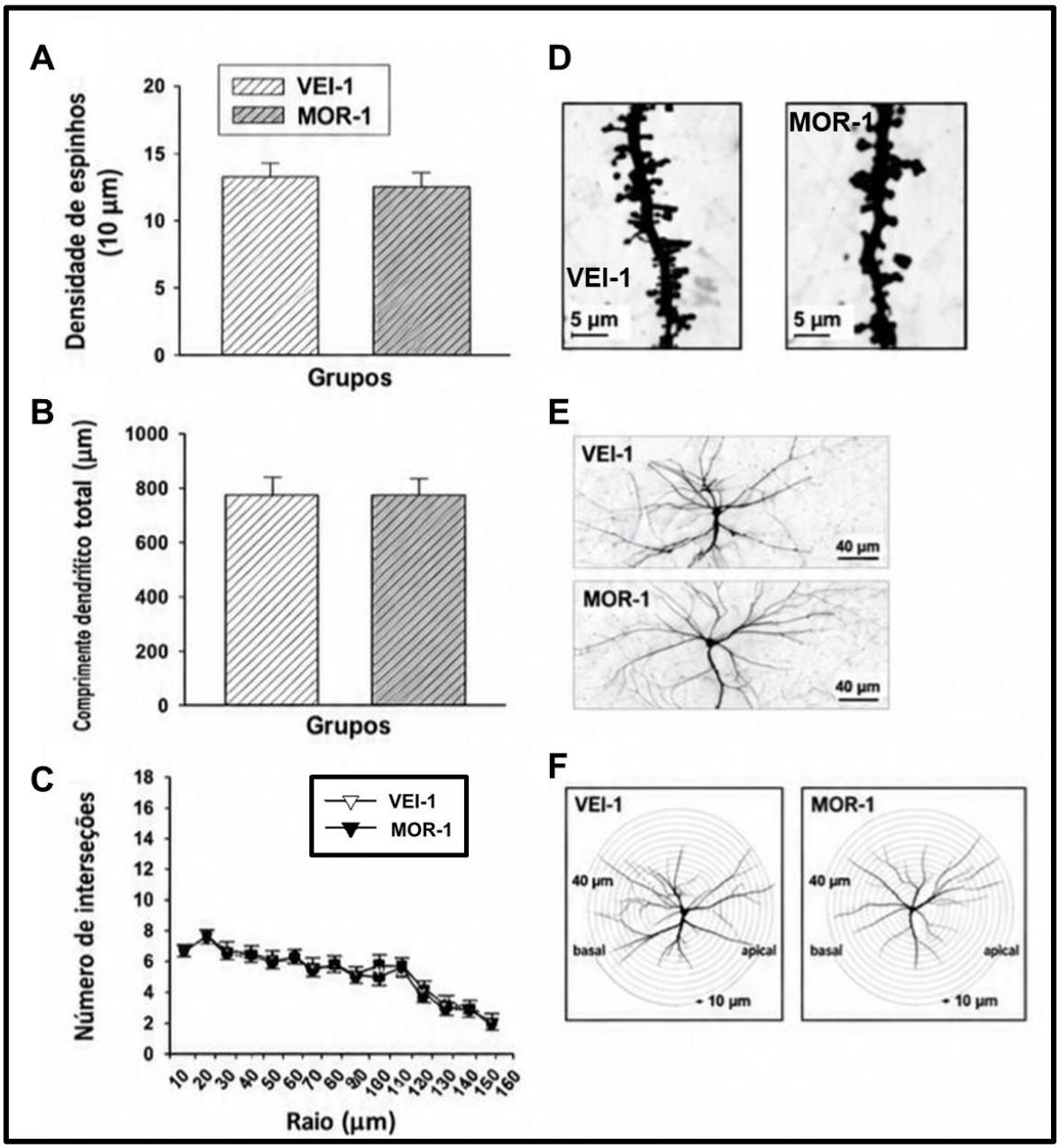


Figura 9. Complexidade dendrítica no núcleo accumbens (NAc) após administração aguda de morfina ou veículo. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos VEI-1 e MOR-1 na densidade de espinhos dendríticos **(A)**, no comprimento dendrítico total **(B)** e na análise de Sholl **(C)**. **D–F:** Fotomicrografias e reconstruções representativas dos neurônios analisados para a complexidade dendrítica no NAc nos grupos VEI-1 e MOR-1. Barras de escala conforme indicado na figura.

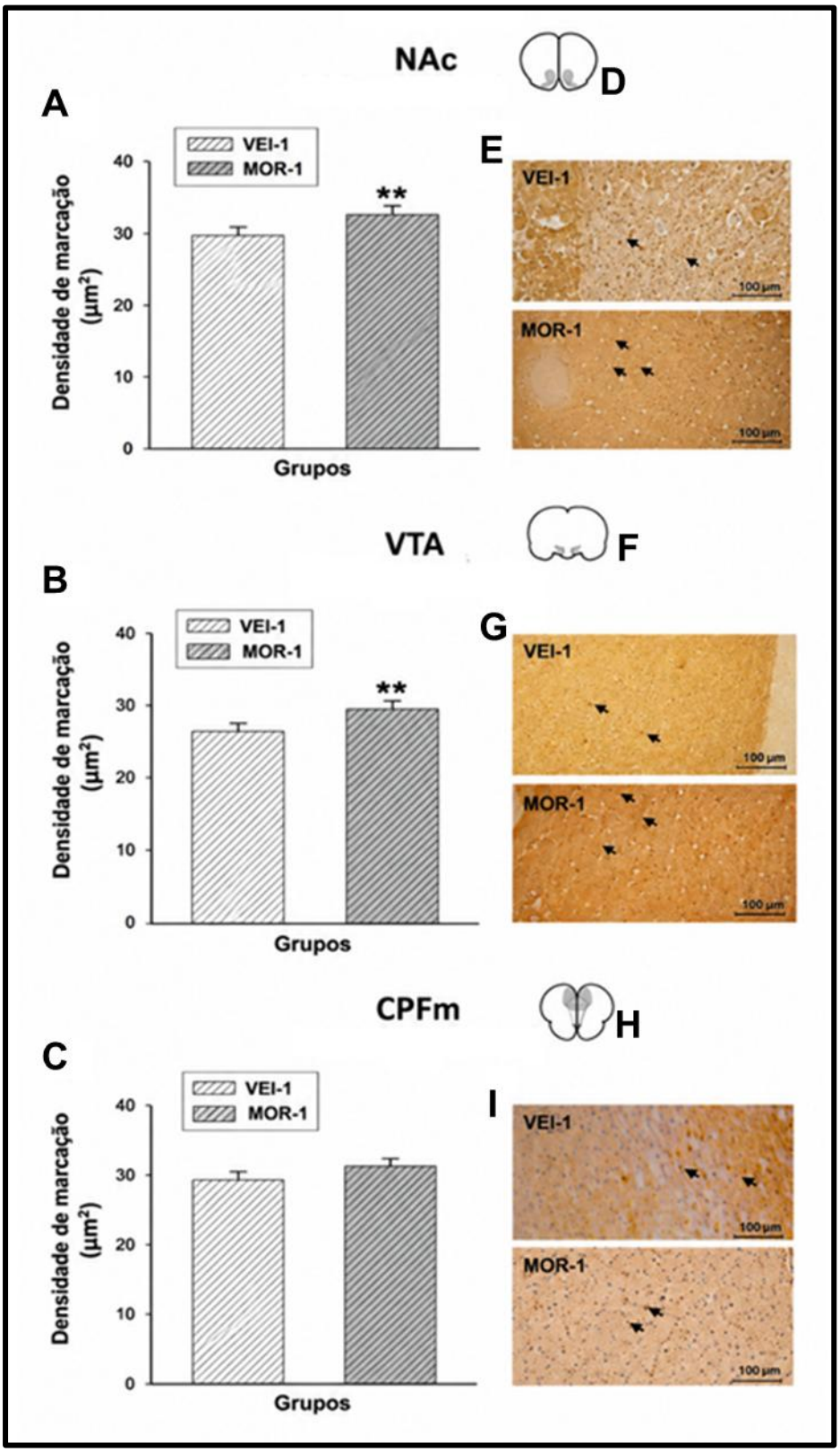


Figura 10. Densidade de marcação para gefirina após administração aguda de morfina ou veículo no NAc (A), VTA (B) e CPFm (C). ** $p < 0,01$ (teste t para amostras independentes). **E**, G e I: Fotomicrografias representativas das secções utilizadas para a quantificação da marcação de gefirina no NAc, VTA e CPFm, respectivamente. D, F e H: Representação esquemática do corte coronal encefálico indicando as regiões NAc, VTA e CPFm, respectivamente. Setas indicam marcação da gefirina. Barras de escala = 100 µm.

6.2 Indução da sensibilização locomotora dependente do contexto e alterações na plasticidade sináptica

Figura 11 apresenta a atividade locomotora ao longo de cinco dias consecutivos, durante sessões de 5 minutos na arena, nos grupos VEI-I, MOR-A-I e MOR-NA-I. A ANOVA de medidas repetidas de dois fatores revelou interação significativa grupo × dias [$F(8, 156) = 112{,}84$; $p < 0{,}01$] e efeito principal significativo de grupo [$F(2, 39) = 59{,}10$; $p < 0{,}01$], mas não houve efeito principal significativo de dia [$F(4, 156) = 1{,}52$; $p > 0{,}05$]. As comparações pareadas com ajuste de Bonferroni mostraram que, no dia 1, o grupo MOR-A-I apresentou menor atividade locomotora que os grupos MOR-NA-I e VEI-I ($p < 0{,}01$). No dia 2, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0{,}05$). Entretanto, do dia 3 ao dia 5, o grupo MOR-A-I apresentou maior atividade locomotora que os grupos MOR-NA-I e VEI-I ($p < 0{,}01$ para ambas as comparações). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos VEI-I e MOR-NA-I em nenhum dia da fase de indução ($p > 0{,}05$). As comparações pareadas com ajuste de Bonferroni também revelaram aumento progressivo da atividade locomotora ao longo dos dias no grupo MOR-A-I, enquanto a atividade locomotora diminuiu nos grupos VEI-I e MOR-NA-I, particularmente nas comparações dos dias 1–2 com os dias 5–6 ($p < 0{,}01$). Os achados indicam o desenvolvimento de sensibilização comportamental no grupo MOR-A-I.

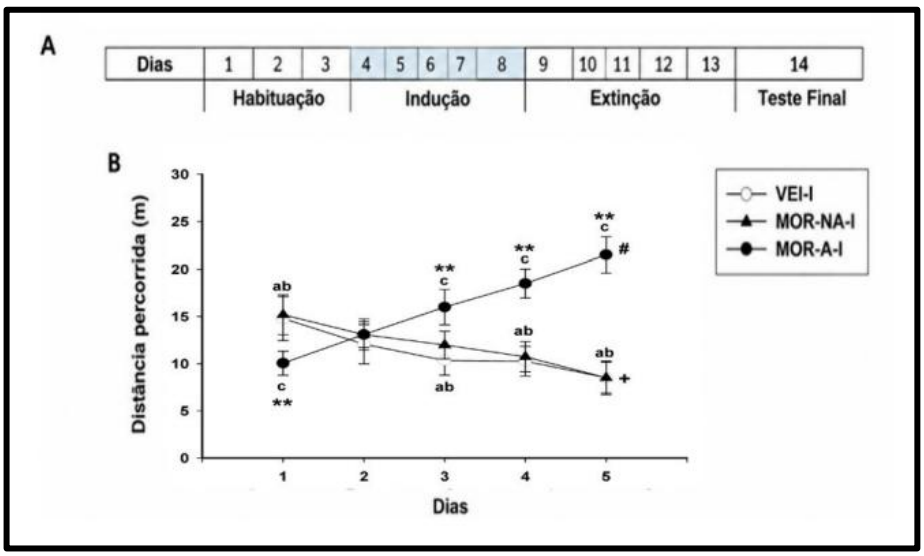


Figura 11. Desenvolvimento da sensibilização locomotora durante a fase de indução. (A) Linha do tempo marcando em azul a fase de indução. (B) Atividade locomotora. Letras a, b e c indicam respectivamente os grupos VEI-I, MOR-NA-I e MOR-A-I. Letras sozinhas indicam diferenças dos outros grupo. ** $p < 0{,}01$. + indica diminuição da locomoção ao longo dos dias para o mesmo grupo experimental. # indica aumento da locomoção ao longo dos dias para o mesmo grupo experimental (ANOVA por medidas repetidas seguidas do teste de Bonferroni).

A figura 12 apresenta a complexidade dendrítica no núcleo accumbens (NAc) após a fase de indução da sensibilização comportamental à morfina. A análise morfológica revelou efeito significativo de grupo sobre a densidade de espinhos [$F(2,312) = 3,64$; $p < 0,02$] e sobre o comprimento dendrítico total [$F(2,102) = 15,0$; $p < 0,01$]. A densidade de espinhos foi maior em VEI-I do que em MOR-A-I, enquanto MOR-NA-I não diferiu dos demais grupos. O comprimento dendrítico foi maior em VEI-I do que nos dois grupos tratados com morfina e maior em MOR-NA-I do que em MOR-A-I. Na análise de Sholl, foram detectados interação grupo × distância radial [$F(28,1428) = 10,80$; $p < 0,01$] e efeitos principais de distância radial [$F(14,1428) = 80,42$; $p < 0,01$] e grupo [$F(2,102) = 83,33$; $p < 0,01$], com menor complexidade no grupo MOR-A-I.

A figura 13 apresenta o efeito da indução de uma resposta locomotora sensibilizada por morfina na densidade da proteína gefirina. As ANOVAs de um fator revelaram diferenças significativas na densidade da proteína gefirina (μm^2) entre os grupos em todas as regiões avaliadas. No NAc (Fig. 13A) [$F(2, 20) = 13,20$; $p < 0,01$], o grupo VEI-I apresentou densidade da proteína gefirina significativamente maior que os grupos MOR-A-I e MOR-NA-I (ambos $p < 0,01$), sem diferença significativa entre os dois grupos tratados com morfina ($p > 0,05$). Na VTA (Fig. 13B) [$F(2, 20) = 6,85$; $p < 0,01$], o grupo VEI-I apresentou densidade de gefirina significativamente maior que o grupo MOR-A-I ($p < 0,05$), enquanto não foram observadas diferenças significativas entre VEI-I e MOR-NA-I ($p > 0,05$) nem entre MOR-A-I e MOR-NA-I ($p > 0,05$). De modo semelhante, no CPFm (Fig. 13C) [$F(2, 20) = 5,80$; $p < 0,05$], a densidade de gefirina foi significativamente maior no grupo VEI-I que no grupo MOR-A-I ($p < 0,05$), sem diferenças significativas entre VEI-I e MOR-NA-I ($p > 0,05$) nem entre MOR-A-I e MOR-NA-I ($p > 0,05$). Fotomicrografias representativas das secções utilizadas para a contagem dos perfis imunorreativos para gefirina no NAc, VTA e CPFm são apresentadas nas Figuras 13D, 13E e 13F, respectivamente.

A administração repetida de morfina durante cinco dias induz sensibilização comportamental dependente do contexto, acompanhada por retração da arborização dendrítica e perda de espinhos dendríticos no NAc, ambas exacerbadas pelo pareamento com o contexto, juntamente com uma redução generalizada de marcadores sinápticos inibitórios mediados pela gefirina ao longo do circuito mesocorticolímbico (NAc, VTA e CPF), refletindo um estado de neuroplasticidade desadaptada e desinibição da rede neural.

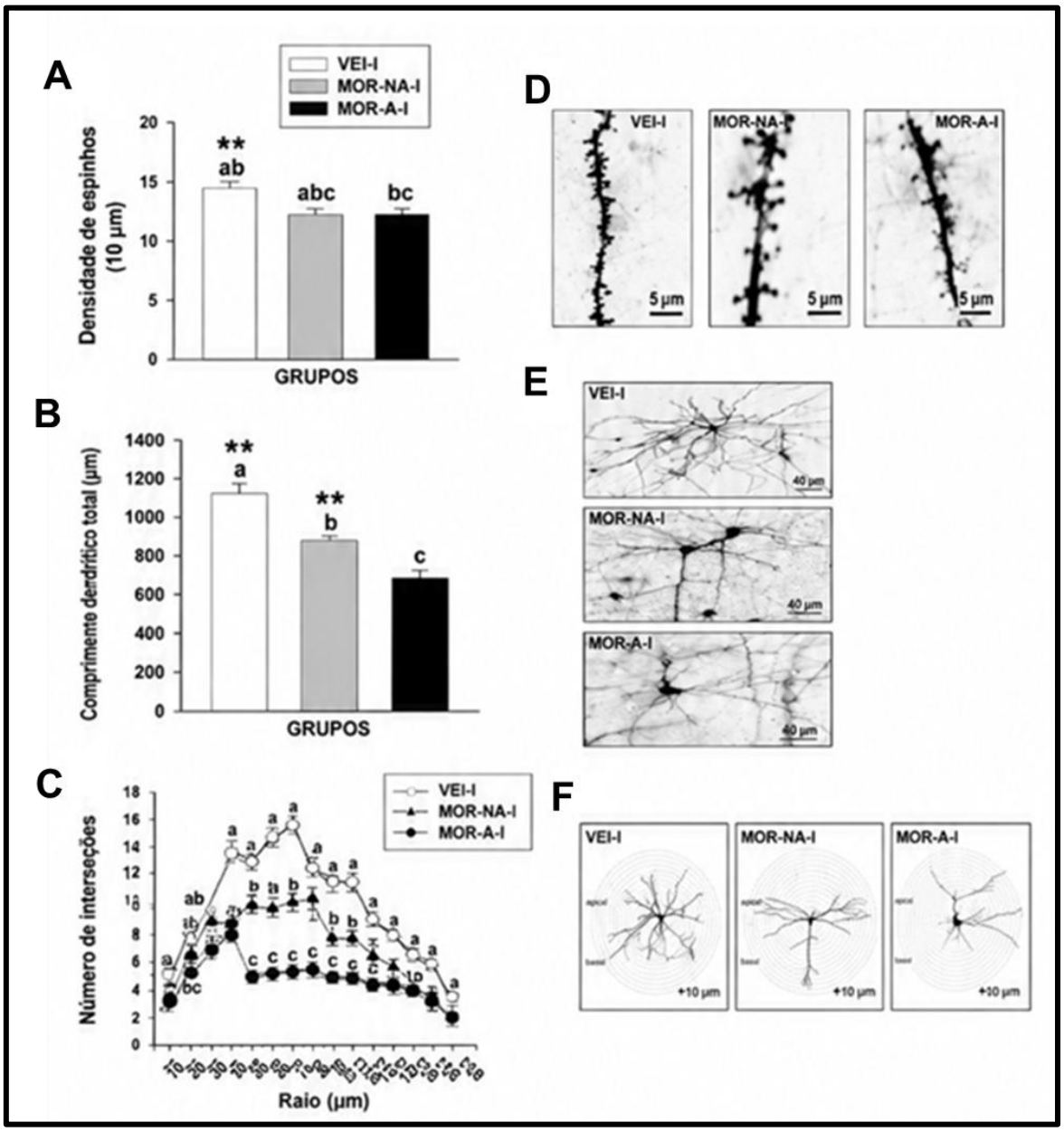


Figura 12. Complexidade dendrítica no núcleo accumbens (NAc) após a fase de indução da sensibilização comportamental à morfina. (A) Densidade de espinhos dendríticos (10 µm) e (B) comprimento dendrítico. Letras a, b e c indicam respectivamente os grupos VEI-I, MOR-NA-I e MOR-A-I. Letras sozinhas indicam diferenças dos outros grupo. ** $p < 0,01$ (ANOVA de um fator seguida do teste de Bonferroni). (C) número de intersecções por raio. Letras a, b e c indicam respectivamente os grupos VEI-I, MOR-NA-I e MOR-A-I. Letras sozinhas indicam diferenças dos outros grupo. ** $p < 0,01$ (ANOVA de medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni). D–F: Fotomicrografias e reconstruções representativas dos neurônios analisados para a complexidade dendrítica no NAc. Barras de escala conforme indicado na figura.

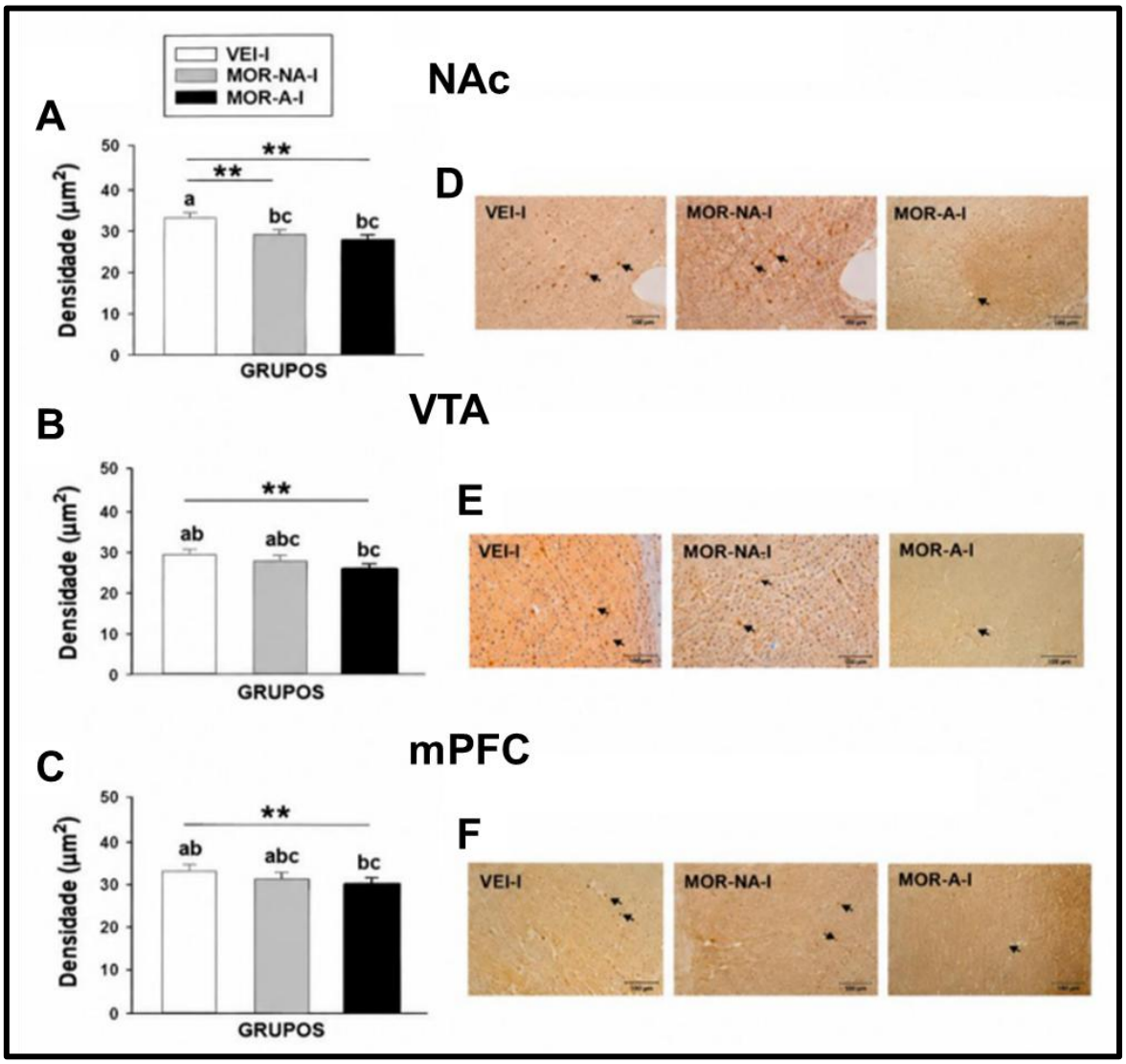


Figura 13. Densidade de marcação para gefirina no NAc (**A**), VTA (**B**) e CPFm (**C**) após o desenvolvimento da sensibilização locomotora. Letras a, b e c indicam respectivamente os grupos VEI-I, MOR-NA-I e MOR-A-I. Letras sozinhas indicam diferenças dos outros grupo. Letras pareadas indicam que os grupos não são diferentes estatisticamente. ** $p < 0,01$ (ANOVA de um fator seguida do teste de Bonferroni). **D**, **E** e **F**: Fotomicrografias representativas das secções utilizadas para a quantificação da marcação de gefirina no NAc, VTA e CPFm, respectivamente. Setas indicam marcação da gefirina. Barras de escala = 100 µm.

6.3 A extinção da sensibilização à morfina dependente do contexto suprime a hiperlocomoção condicionada e aumenta a expressão subcortical de gefirina, apesar da persistência da atrofia dendrítica no NAc.

A figura 14 apresenta a atividade locomotora durante a fase de extinção. Durante a fase de indução (Fig. 14B, painel esquerdo), a ANOVA de medidas repetidas de dois

fatores revelou interação significativa grupo × dia [F (8, 156) = 83,0; p < 0,01], além de efeitos principais de grupo [F (2, 39) = 72,80; p < 0,01] e dia [F (4, 156) = 4,53; p < 0,01]. As comparações post hoc de Bonferroni mostraram que os animais MOR-A-E apresentaram hipolocomoção aguda no dia 1 (p < 0,01 em comparação com VEI-E e MOR-NA-E), seguida de atividade equivalente entre todos os grupos no dia 2 (p > 0,05). A partir do dia 3, o grupo MOR-A-E manteve atividade locomotora significativamente maior que os demais grupos (p < 0,01), que não diferiram entre si (p > 0,05). Ao longo da fase de indução, a atividade locomotora do grupo MOR-A-E aumentou progressivamente, enquanto a dos grupos VEI-E e MOR-NA-E diminuiu (dias 1–2 em comparação com os dias 5–6, p < 0,01), confirmando o estabelecimento de sensibilização comportamental dependente do contexto.

Durante a fase de extinção (Fig. 14B, painel direito), a ANOVA de medidas repetidas de dois fatores revelou interação significativa grupo × dia [F (8, 156) = 34,20; p < 0,01], além de efeitos principais de grupo [F (2, 39) = 42,30; p < 0,01] e dia [F (4, 156) = 47,50; p < 0,01]. As comparações post hoc de Bonferroni demonstraram que, nos dias 1 e 2, o grupo MOR-A-E manteve atividade locomotora significativamente maior que os grupos MOR-NA-E e VEI-E (p < 0,01), confirmando a expressão de uma resposta locomotora condicionada. Entretanto, do dia 3 ao dia 5, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (p > 0,05). Além disso, o grupo MOR-A-E apresentou redução progressiva da atividade locomotora ao longo dos dias de extinção, particularmente na comparação dos dias 1–2 com os dias 4–5 (p < 0,01), enquanto os grupos VEI-E e MOR-NA-E não apresentaram mudanças significativas (p > 0,05). Em conjunto, esses resultados demonstram expressão robusta de uma resposta condicionada nos animais pareados ao contexto durante o início da extinção, seguida de sua redução com o avanço do treinamento de extinção.

A figura 15 apresenta o efeito da extinção da sensibilização locomotora na complexidade dendrítica no NAc. Quanto à densidade de espinhos (Fig. 15A), a ANOVA de um fator [F (2, 102) = 10,80; p < 0,01], seguida de testes post hoc de Bonferroni, revelou que a densidade de espinhos foi significativamente maior nos grupos VEI-E e MOR-NA-E que no grupo MOR-A-E (p < 0,01), sem diferença significativa entre VEI-E e MOR-NA-E (p > 0,05). Para o comprimento dendrítico total (Fig. 15B), a ANOVA de um fator revelou efeito significativo [F (2, 102) = 20,93; p < 0,01], com o grupo VEI-E apresentando comprimento dendrítico significativamente maior que os dois grupos tratados com morfina (p < 0,01), os quais não diferiram significativamente entre si (p >

0,05). Por fim, a análise de Sholl (Fig. 15C) revelou interação significativa grupo × raio [F (28, 1428) = 10,20; p < 0,01]. Nos raios de 10 a 150 µm, o grupo VEI-E apresentou mais interseções por raio que o grupo MOR-A-E (p < 0,01). Além disso, o grupo MOR-NA-E manteve maior arborização que o grupo MOR-A-E entre 20 e 140 µm (p < 0,01), enquanto o grupo VEI-E apresentou maior complexidade dendrítica que o grupo MOR-NA-E nos raios de 40–60 µm e 130–150 µm (p < 0,01). Fotomicrografias representativas das secções teciduais analisadas para a complexidade dendrítica no NAc são apresentadas nas Figuras 15D, 15E e 15F.

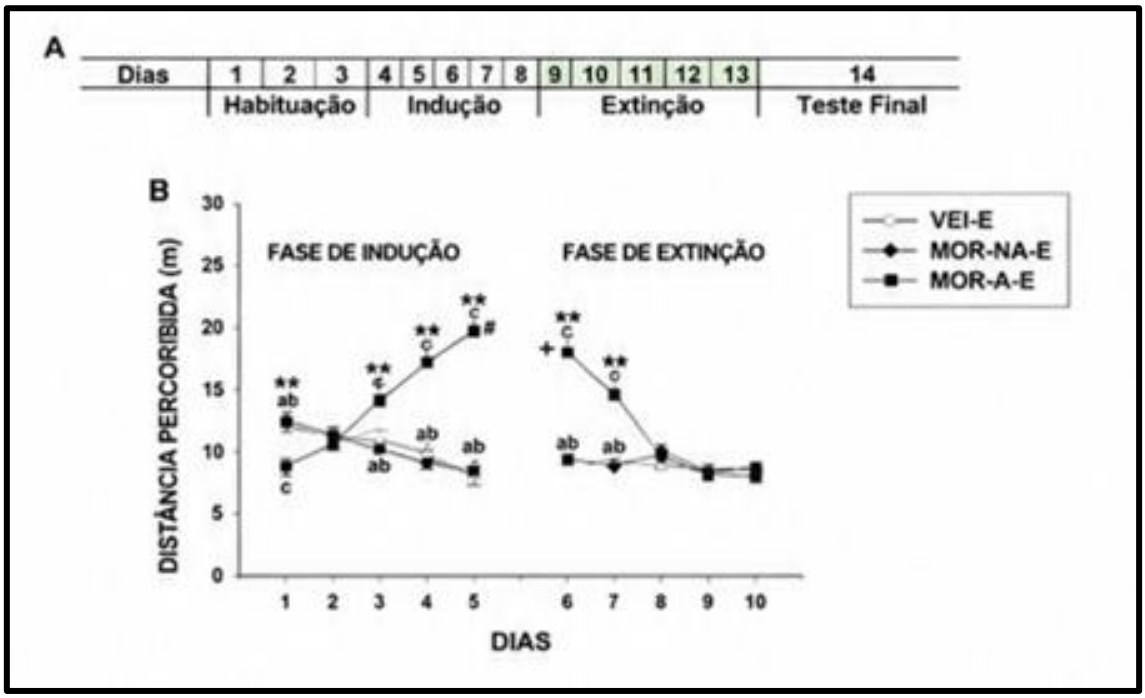


Figura 14. Indução e extinção da sensibilização locomotora à morfina. (A) Delineamento experimental, (A) Linha do tempo marcando em verde a fase de extinção. (B) Atividade locomotora (m) expressos como média ± EPM. Letras a, b e c indicam respectivamente os grupos VEI-E, MOR-NA-E e MOR-A-E. Letras sozinhas indicam diferenças dos outros grupo. Letras pareadas indicam que não existem diferenças estatísticas entre os grupos. ** p < 0,01. + indica diminuição da locomoção ao longo dos dias para o mesmo grupo experimental. # indica aumento da locomoção ao longo dos dias para o mesmo grupo experimental (ANOVA por medidas repetidas seguidas do teste de Bonferroni).

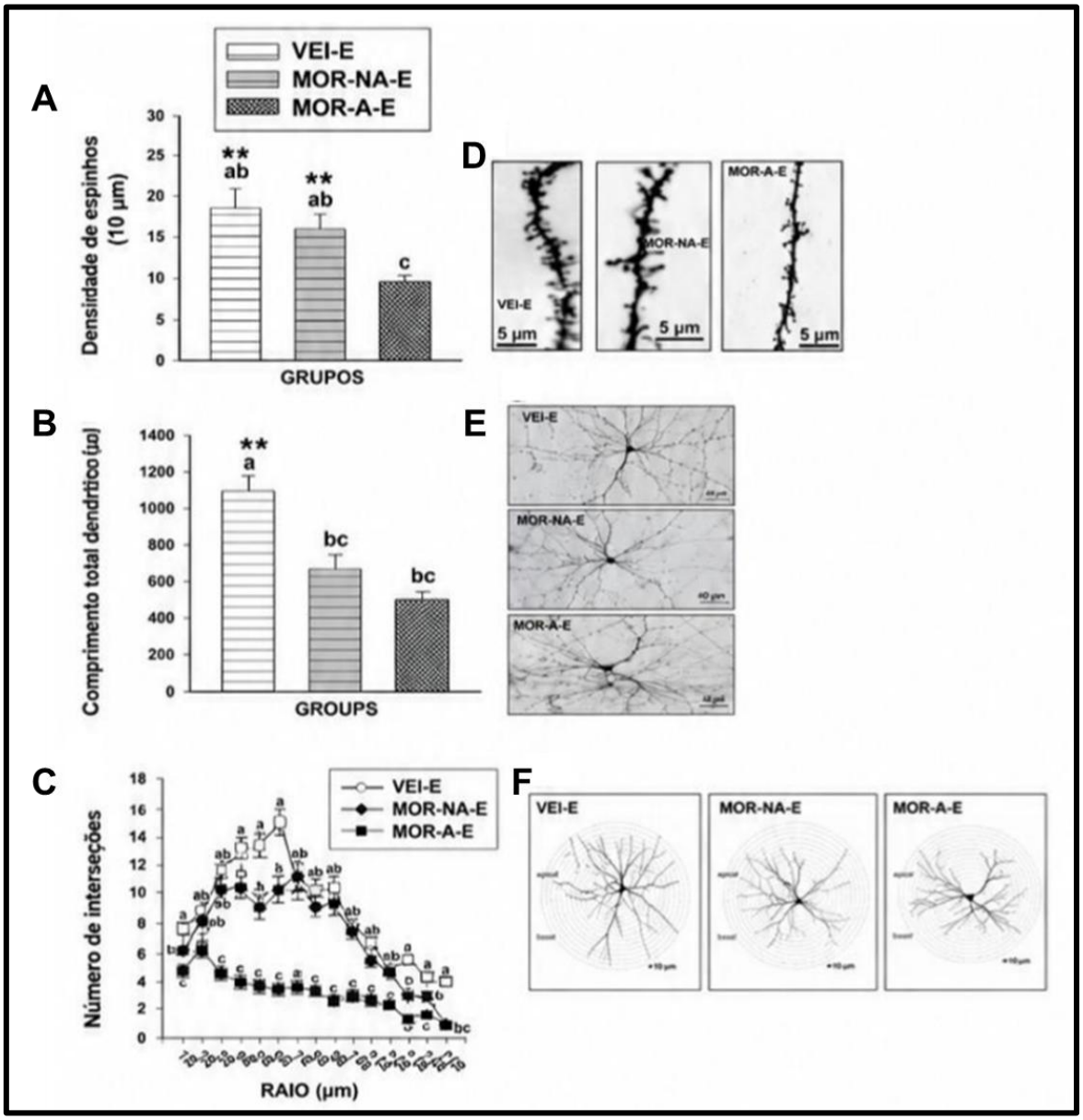


Figura 15. Complexidade dendrítica no NAc após a fase de extinção. (A) densidade de espinhos dendríticos (10 µm) e (B) comprimento dendrítico. Letras a, b e c indicam respectivamente os grupos VEI-E, MOR-NA-E e MOR-A-E. Letras sozinhas indicam diferenças dos outros grupo. Letras pareadas significa que não existe diferença entre os grupos. ** $p < 0,01$ (ANOVA de um fator seguida do teste de Bonferroni). (C) número de intersecções por raio. Letras a, b e c indicam respectivamente os grupos VEI-I, MOR-NA-I e MOR-A-I. Letras sozinhas indicam diferenças dos outros grupo. Letras sozinhas indicam diferenças dos outros grupos. Letras pareadas significa que não existe diferença entre os grupos. ** $p < 0,01$ (ANOVA de medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni). D–F: Fotomicrografias e reconstruções representativas dos neurônios analisados para a complexidade dendrítica no NAc. Barras de escala conforme indicado na figura.

A figura 16 apresenta os efeitos da extinção de uma resposta locomotora sensibilizada na densidade da proteína gefirina. A ANOVA de um fator revelou diferenças significativas na densidade da proteína gefirina (μm²) no NAc [$F(2, 20) = 8,0$; $p < 0,01$] (Fig. 16A). As comparações pareadas com ajuste de Bonferroni mostraram que o grupo MOR-A-E apresentou densidade de gefirina significativamente maior que o grupo VEI-E ($p < 0,01$), enquanto não foram observadas diferenças significativas entre MOR-A-E e MOR-NA-E ($p > 0,05$) nem entre VEI-E e MOR-NA-E ($p > 0,05$).

Na VTA (Fig. 16B), a ANOVA de um fator também revelou efeito significativo de grupo [$F(2, 20) = 10,53$; $p < 0,01$]. A densidade de gefirina foi significativamente maior nos grupos MOR-A-E ($p < 0,01$) e MOR-NA-E ($p < 0,05$) que no grupo VEI-E. Não houve diferença entre os grupos tratados com morfina ($p > 0,05$). No CPFm (Fig. 16C), não foram observadas diferenças significativas na densidade de gefirina entre os grupos [$F(2, 20) = 1,74$; $p > 0,05$]. Fotomicrografias representativas das secções utilizadas para a contagem dos perfis imunorreativos para gefirina no NAc, VTA e CPFm são apresentadas nas Figuras 16D, 16E e 16F, respectivamente.

O protocolo de extinção de cinco dias suprimiu com sucesso a hiperlocomoção condicionada ao contexto induzida pela morfina, indicando a aquisição da aprendizagem de extinção. Entretanto, a recuperação comportamental foi acompanhada por déficits estruturais persistentes, incluindo redução do comprimento dendrítico e da complexidade das ramificações nos neurônios do NAc, sugerindo que a extinção da resposta comportamental ocorreu apesar da permanência de alterações estruturais no circuito mesocorticolímbico de recompensa. Em conjunto, esses achados indicam que o treinamento de extinção esteve associado a um aumento seletivo da densidade da proteína gefirina em regiões subcorticais de recompensa, particularmente no NAc e na VTA, com efeitos mais pronunciados nos animais pareados ao contexto, enquanto a densidade de gefirina no CPFm permaneceu inalterada.

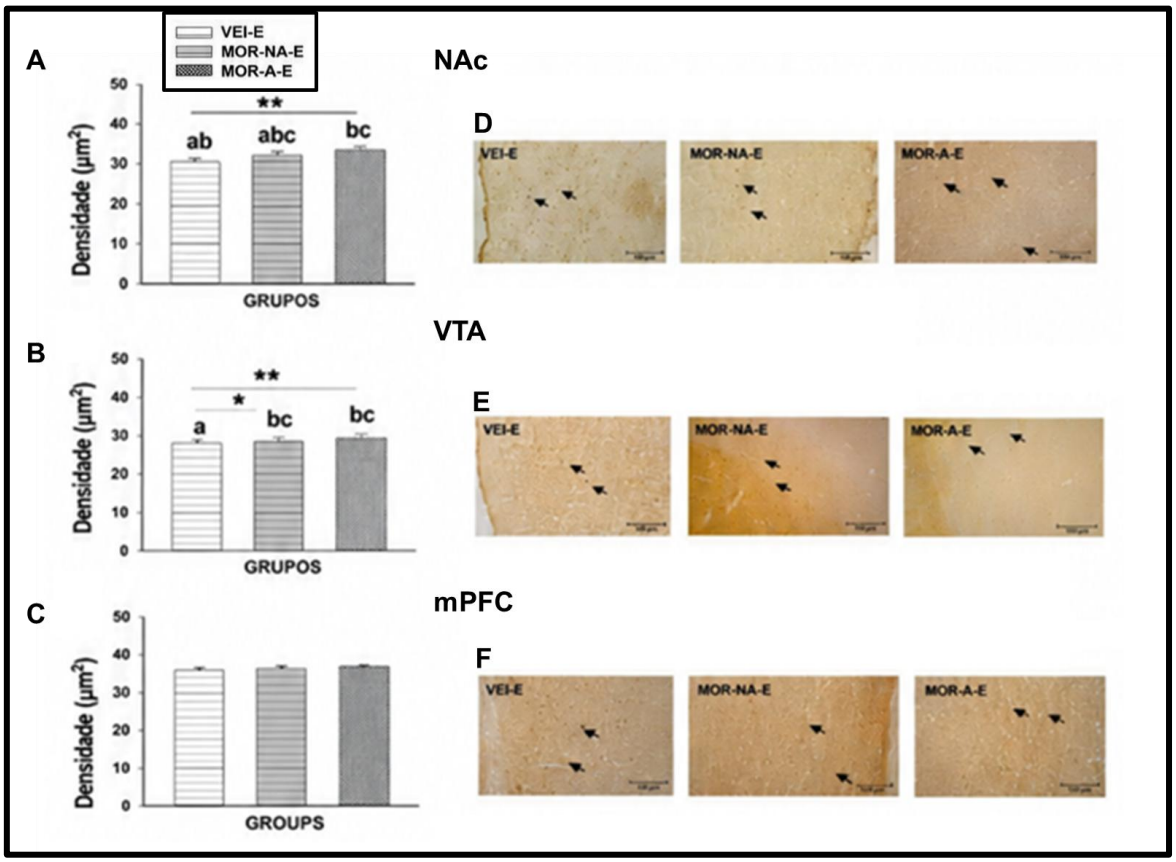


Figura 16. Marcação imunorreativa para gefirina após a fase de extinção. Densidade de marcação para gefirina no NAc (**A**), VTA (**B**) e CPFm (**C**) após o desenvolvimento da sensibilização locomotora. Letras a, b e c indicam respectivamente os grupos VEI-E, MOR-NA-E e MOR-A-E. Letras sozinhas indicam diferenças dos outros grupo. Letras pareadas indicam que os grupos não são diferentes estatisticamente. ** $p < 0,01$ (ANOVA de um fator seguida do teste de Bonferroni). **D**, **E** e **F**: Fotomicrografias representativas das secções utilizadas para a quantificação da marcação de gefirina no NAc, VTA e CPFm, respectivamente. Setas indicam marcação da gefirina. Barras de escala = 100 µm.

6.4 Efeito de um desafio com morfina sobre a resposta locomotora sensibilizada previamente extinta e a expressão regional de gefirina

A figura 17 apresenta a atividade locomotora após o desafio com morfina e a administração de veículo nos grupos que foram submetidos ao processo de extinção. Na fase de indução (Fig. 17C, painel esquerdo), a ANOVA de medidas repetidas de dois fatores revelou interação significativa grupo × dia [$F (20, 144) = 64,0$; $p < 0,01$], além de efeitos principais de grupo [$F (5, 36) = 8,60$; $p < 0,01$] e dia [$F (4, 144) = 4,30$; $p < 0,01$]. As comparações post hoc de Bonferroni mostraram que, no dia 1, os grupos com morfina pareada ao contexto (MOR-A/MOR e MOR-A/VEI) apresentaram menor atividade

locomotora que os demais grupos ($p < 0,01$). Embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre os grupos no dia 2 ($p > 0,05$), os grupos com morfina pareada apresentaram atividade locomotora significativamente maior que os demais do dia 3 até o final da fase de indução ($p < 0,01$). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos veículo (VEI/VEI e VEI/MOR) e os grupos com morfina não pareada (MOR-NA/VEI e MOR-NA/MOR) ($p > 0,05$). Além disso, os grupos com morfina pareada apresentaram aumento progressivo da atividade locomotora ao longo da fase de indução, particularmente na comparação dos dias 1–2 com os dias 5–6 ($p < 0,01$).

Durante a fase de extinção (Fig. 17C, painel central), a ANOVA de medidas repetidas de dois fatores revelou interação significativa grupo × dia [$F (20, 144) = 14,61$; $p < 0,01$], além de efeitos principais significativos de grupo [$F (5, 36) = 30,0$; $p < 0,01$] e dia [$F (4, 144) = 55,0$; $p < 0,01$]. As comparações post hoc com ajuste de Bonferroni mostraram que, nos dias 1 e 2, os grupos com morfina pareada ao contexto (MOR-A/MOR e MOR-A/VEI) apresentaram atividade locomotora significativamente maior que os demais grupos ($p < 0,01$). Entretanto, do dia 3 ao dia 5, não foram observadas diferenças significativas na atividade locomotora entre os grupos ($p > 0,05$).

No teste de desafio com morfina (Fig. 17C, painel direito, e Fig. 17D), a ANOVA de um fator revelou efeito significativo de grupo [$F (5, 41) = 12,10$; $p < 0,01$]. As comparações post hoc com ajuste de Bonferroni mostraram que o grupo MOR-A/MOR apresentou atividade locomotora significativamente maior que todos os demais grupos ($p < 0,01$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos restantes ($p > 0,05$).

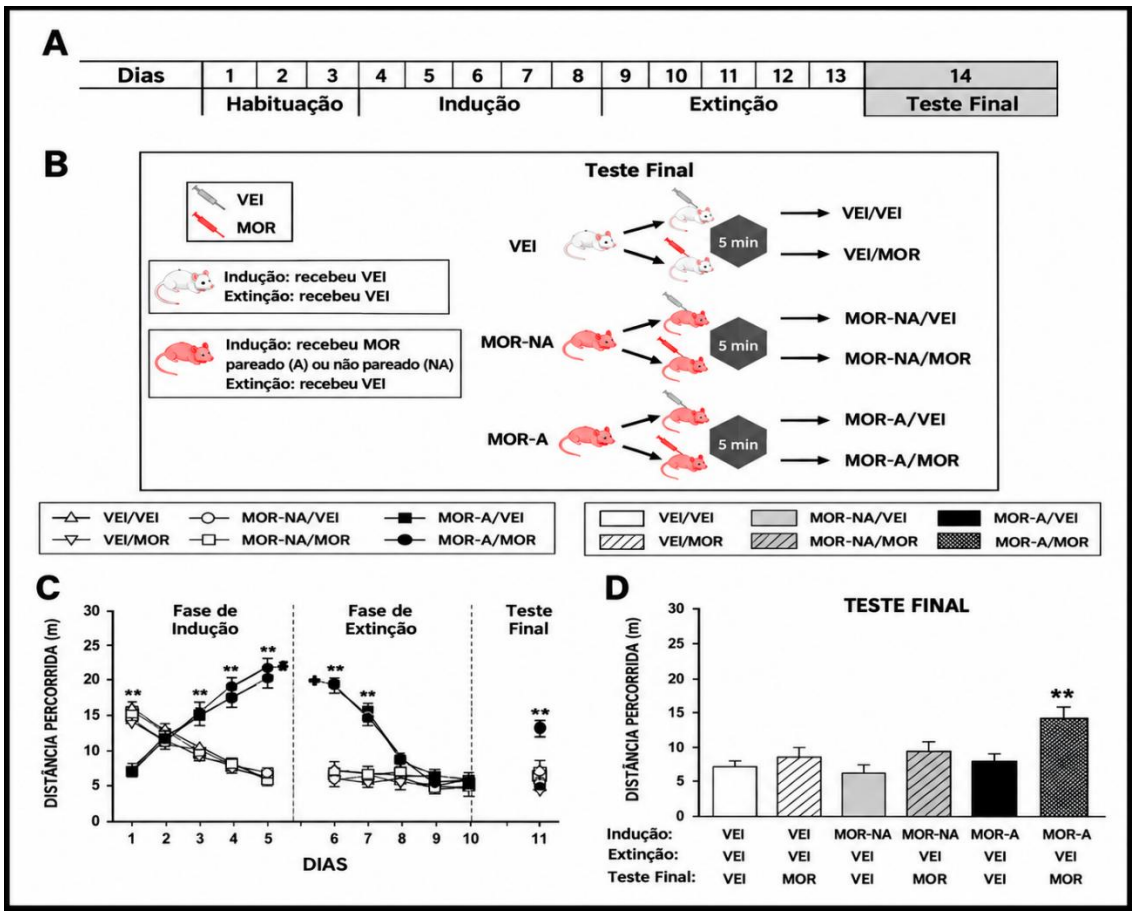


Figura 17. Atividade locomotora durante as fases de indução, extinção e teste final. (C) Distância percorrida pelos grupos VEI/VEI, VEI/MOR, MOR-NA/VEI, MOR-NA/MOR, MOR-A/VEI e MOR-A/MOR ao longo das fases de indução e extinção e no teste final. (D) Distância percorrida durante o teste final. Após a extinção, o desafio com morfina promoveu recuperação da resposta locomotora sensibilizada especificamente no grupo MOR-A/MOR, que apresentou atividade locomotora significativamente maior que todos os demais grupos ($p < 0,01$). Não foram observadas diferenças significativas entre os demais grupos ($p > 0,05$). Os dados são expressos como média ± EPM. **$p < 0,01$.

A figura 18 apresenta o efeito do desafio com morfina e da administração de veículo na densidade da proteína gefirina nos grupos submetidos ao processo de extinção. A avaliação da densidade da proteína gefirina no circuito mesocorticolímbico revelou diferenças significativas entre os grupos no NAc [$F (5, 41) = 56,70$; $p < 0,01$] (Fig. 4E), na VTA [$F (5, 41) = 42,30$; $p < 0,01$] (Fig. 4F) e no CPFm [$F (5, 41) = 46,91$; $p < 0,01$] (Fig. 4G). Nas três regiões cerebrais, foi observado um padrão consistente: os controles VEI/VEI apresentaram a menor densidade de perfis imunorreativos para gefirina, diferindo significativamente da maioria dos grupos experimentais ($p < 0,05$), exceto do grupo MOR-NA/VEI na VTA e no CPFm ($p > 0,05$). Em contraste, os animais que

receberam o desafio com morfina no contexto previamente pareado à droga (MOR-A/MOR) apresentaram a maior densidade de gefirina, significativamente superior à dos grupos VEI/VEI, VEI/MOR, MOR-NA/VEI e MOR-NA/MOR ($p < 0,01$), mas comparável à do grupo MOR-A/VEI ($p > 0,05$). Além disso, os grupos MOR-A/VEI e MOR-NA/MOR apresentaram consistentemente maior densidade de gefirina que os grupos VEI/VEI, VEI/MOR e MOR-NA/VEI ($p < 0,01$), sem diferença significativa entre si ($p > 0,05$). Não foram detectadas diferenças entre VEI/MOR e MOR-NA/VEI em nenhuma das três regiões ($p > 0,05$). Fotomicrografias representativas das secções utilizadas para a contagem dos perfis imunorreativos para gefirina no NAc, VTA e CPFm são apresentadas nas Figuras 4H, 4I e 4J, respectivamente.

Em síntese, o desafio com morfina restabeleceu seletivamente a hiperlocomoção sensibilizada nos animais pareados ao contexto após a extinção. Esse restabelecimento comportamental foi acompanhado por aumento da densidade de gefirina em todo o circuito, abrangendo NAc, VTA e CPFm, sugerindo que a reexposição à morfina em um contexto associado à droga está relacionada ao aumento da organização pós-sináptica inibitória em todo o sistema mesocorticolímbico.

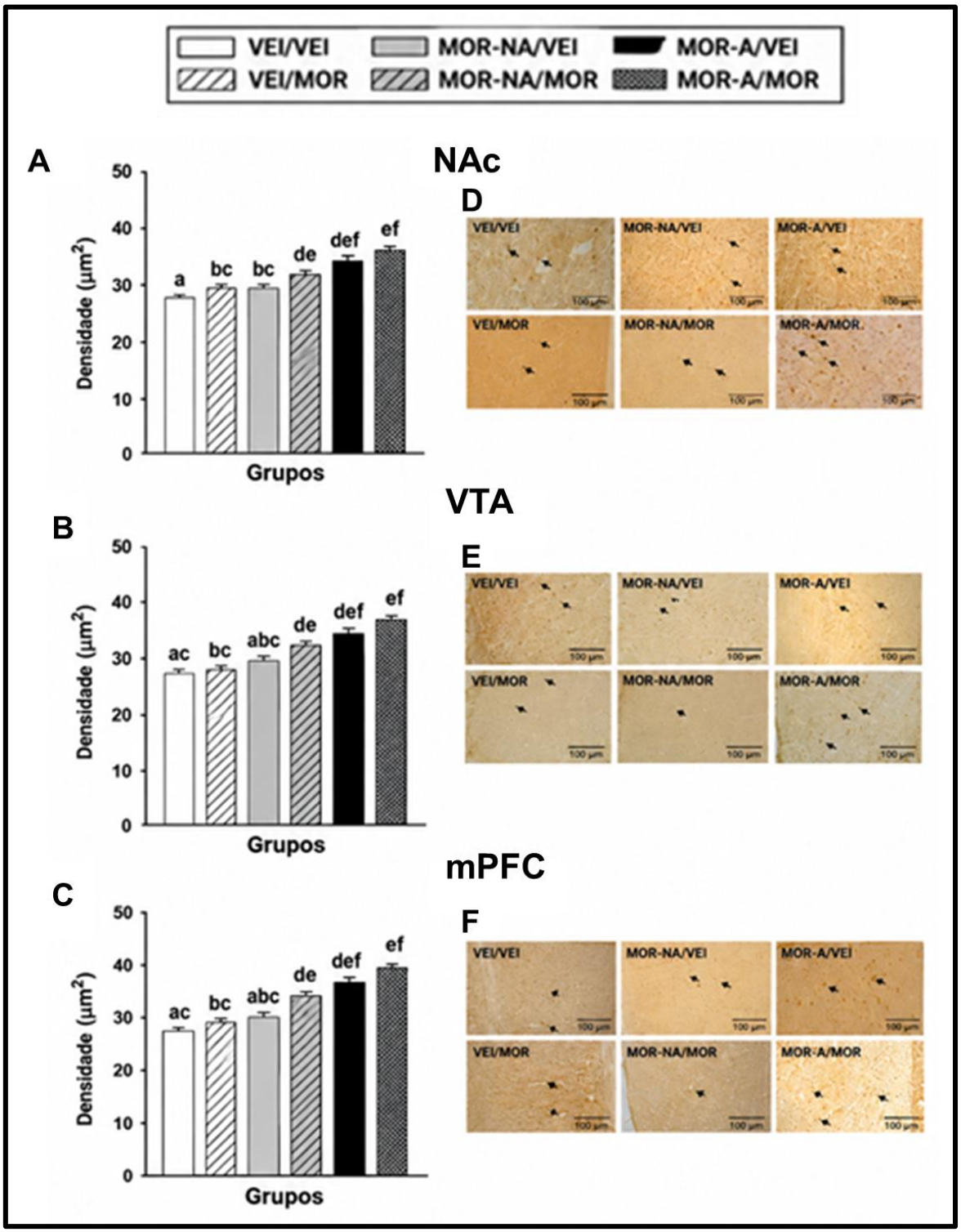


Figura 18. Densidade de marcação para gefirina no NAc (**A**), VTA (**B**) e CPFm (**C**) após o teste final. Letras a, b, c, d, e, e f indicam respectivamente os grupos VEI/VEI, VEI/MOR, MOR-NA/VEI, MOR-NA/MOR, MOR-A/VEI e MOR-A/MOR. Letras sozinhas indicam diferenças dos outros grupo. Letras pareadas indicam que os grupos não são diferentes estatisticamente. ** $p < 0,01$ (ANOVA de um fator seguida do teste de Bonferroni). **D**, **E** e **F**: Fotomicrografias representativas das secções utilizadas para a quantificação da marcação de gefirina no NAc, VTA e CPFm, respectivamente. Setas indicam marcação da gefirina. Barras de escala = 100 µm.

6.5 Avaliação longitudinal revela trajetórias divergentes de remodelamento dendrítico no NAc entre animais tratados com veículo e animais sensibilizados à morfina.

Figura 19 apresenta a complexidade dendrítica dos neurônios do NAc. Para a densidade total de espinhos (Fig. 19B), a ANOVA de dois fatores revelou interação significativa grupo × fase [$F(2, 220) = 9,60$; $p < 0,01$] e efeito principal significativo de grupo [$F(1, 220) = 24,63$; $p < 0,01$], mas não houve efeito principal significativo da fase de tratamento [$F(2, 220) = 0,22$; $p > 0,05$]. As comparações post hoc com ajuste de Bonferroni mostraram que o grupo VEI-E apresentou densidade de espinhos significativamente maior que os grupos VEI-I ($p < 0,05$) e VEI-1 ($p < 0,01$). Não foi observada diferença significativa entre VEI-I e VEI-1 ($p > 0,05$). O grupo MOR-A-E apresentou densidade de espinhos significativamente menor que o grupo MOR-1 ($p < 0,01$). Não foram observadas diferenças significativas entre MOR-A-I e MOR-A-E ($p > 0,05$) nem entre MOR-A-I e MOR-1 ($p > 0,05$).

Para o comprimento dendrítico total (Fig. 19C), a ANOVA de dois fatores revelou interação significativa grupo × fase de tratamento [$F(2, 220) = 15,0$; $p < 0,01$] e efeito principal significativo de grupo [$F(1, 220) = 56,13$; $p < 0,01$], mas não houve efeito principal significativo da fase de tratamento [$F(2, 220) = 2,11$; $p > 0,05$]. As comparações post hoc com ajuste de Bonferroni mostraram aumento do comprimento dendrítico ao longo das fases de tratamento no grupo VEI. Especificamente, o grupo VEI-1 apresentou comprimento dendrítico significativamente menor que os grupos VEI-I e VEI-E ($p < 0,01$), enquanto não foi observada diferença significativa entre VEI-I e VEI-E ($p > 0,05$). Nos grupos tratados com morfina, os resultados mostraram redução progressiva do comprimento dendrítico ao longo das fases de tratamento. Especificamente, o grupo MOR-1 apresentou comprimento dendrítico significativamente maior que o grupo MOR-A-E ($p < 0,01$). Não foram observadas diferenças significativas entre MOR-1 e MOR-A-I ($p > 0,05$) nem entre MOR-A-I e MOR-A-E ($p > 0,05$).

Quanto ao número de interseções em função da distância radial (Fig. 19D), a ANOVA de medidas repetidas (análise de Sholl) revelou efeito principal significativo da distância radial [$F(14, 2996) = 105,57$; $p < 0,001$] e interação altamente significativa distância radial × grupo [$F(70, 2996) = 13,92$; $p < 0,001$], indicando perfis espaciais distintos de arborização dendrítica entre os grupos. Os grupos tratados com veículo apresentaram expansão progressiva das ramificações dendríticas nos raios intermediários e distais. O

grupo basal (VEI-1) apresentou perfil de arborização relativamente achatado, com pico em raios intermediários (por exemplo, raio 10: 6,30 ± 0,55 interseções). Após a exposição repetida, VEI-I e VEI-E desenvolveram arborizações dendríticas altamente complexas, com picos pronunciados no número de interseções em raios intermediários (VEI-I, raio 7: 15,34 ± 0,64 interseções; VEI-E, raio 6: 14,51 ± 0,61 interseções) e manutenção de valores elevados até os raios distais (por exemplo, VEI-I, raio 10: 10,89 ± 0,59 interseções). Em contraste, a exposição aguda à morfina (MOR-1) produziu perfil de arborização comparável ao do grupo veículo basal, com pico no raio 2 (7,68 ± 0,37 interseções). A exposição repetida à morfina, entretanto, reduziu acentuadamente a complexidade dendrítica. O grupo MOR-A-I apresentou redução pronunciada dos valores máximos de interseção (raio 4: 7,00 ± 0,55 interseções), seguida de queda acentuada nos raios intermediários (raio 5: 3,80 ± 0,57 interseções). Essa redução da complexidade dendrítica foi ainda mais pronunciada após a extinção no grupo MOR-A-E, que apresentou pico próximo ao soma no raio 2 (6,34 ± 0,39 interseções), seguido de rápida diminuição nas demais distâncias radiais (raio 4: 4,03 ± 0,55; raio 10: 3,06 ± 0,59 interseções).

Em conjunto, esses achados estruturais revelam uma divergência acentuada na neuroplasticidade do NAc entre a adaptação fisiológica e o remodelamento induzido pela morfina. Nos animais tratados com veículo e sem exposição prévia à droga, a exposição repetida ao aparato comportamental promoveu remodelamento estrutural adaptativo e dependente da experiência, caracterizado pelo aumento da densidade de espinhos, alongamento dendrítico e maior complexidade da arborização nos campos dendríticos intermediários e distais. Em contraste, a exposição repetida à morfina atenuou acentuadamente essas formas de plasticidade estrutural, resultando em reduções persistentes do comprimento dendrítico e da complexidade da arborização. Essas alterações duradouras na arquitetura dendrítica receptiva dos neurônios do NAc podem contribuir para a disfunção persistente do circuito mesocorticolímbico associada à exposição aos opioides e para o aumento da vulnerabilidade à recaída.

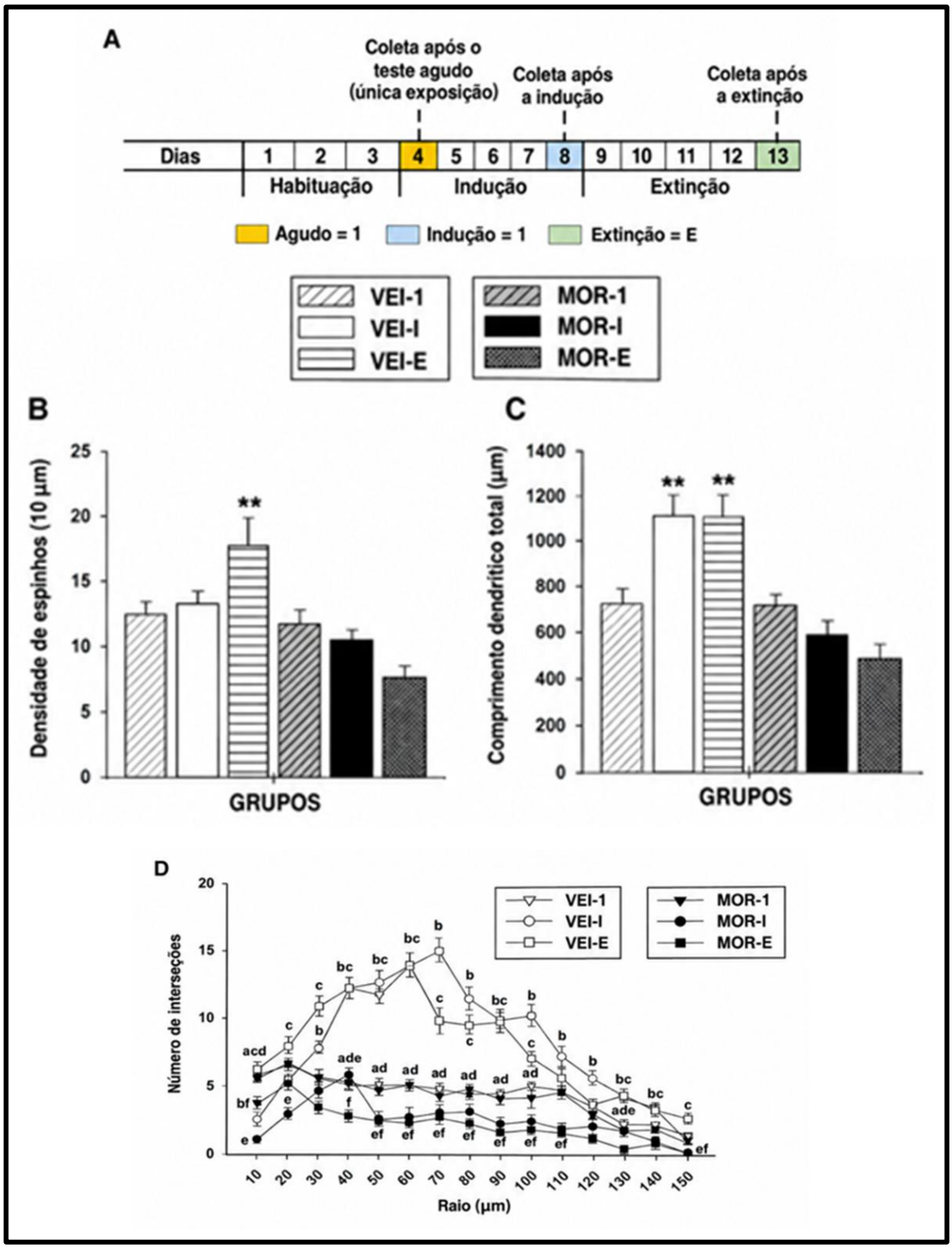


Figura 19. Evolução temporal da morfologia dendrítica de neurônios espinhosos médios no NAc ao longo das fases experimentais. **A**: Cronograma experimental especificando os momentos de coleta de amostras: **B**: Densidade total de espinhos por µm. Ratos tratados com veículo apresentaram um aumento na densidade de espinhos após a extinção (VEH-E vs. VEH-1 [$p < 0,01$] e VEH-I [$p < 0,05$]), enquanto a exposição à morfina pareada ao contexto induziu uma perda progressiva de espinhos dendríticos, atingindo níveis significativamente mais baixos após a extinção (MOR-P-E vs. MOR-1, $p < 0,01$). **C**: Comprimento dendrítico total (µm). Grupos tratados com veículo mostraram uma expansão do comprimento dendrítico

total ao longo das fases (VEH-1 < VEH-I e VEH-E, $p < 0,01$), enquanto a exposição repetida à morfina levou a uma retração dendrítica progressiva (MOR-1 > MOR-P-E, $p < 0,01$). **D**: Análise de Sholl mostrando que os grupos tratados com veículo apresentaram expansão da arborização da fase aguda para as fases posteriores (30–100 μm, $p < 0,01$). Por outro lado, o tratamento com morfina associada ao contexto produziu uma simplificação dendrítica progressiva, com os animais na fase aguda (MOR-1) exibindo maior complexidade de arborização do que nas condições de sensibilização (MOR-P-I) e extinção (MOR-P-E) ao longo de vários raios ($p < 0,01$). Os dados são apresentados como média + E.P.M. Letras minúsculas acima das barras/pontos indicam comparações *post-hoc* entre grupos ($p < 0,05$). Asteriscos (**$p < 0,01$) indicam diferenças estatisticamente significativas entre as fases experimentais em relação aos controles basais/agudos.

7 DISCUSSÃO

7.1 Exposição aguda à morfina

No experimento agudo, os animais tratados com morfina apresentaram redução significativa da distância percorrida em comparação aos animais do grupo veículo. Portanto, nas condições experimentais empregadas, uma única administração subcutânea de morfina, na dose de 10 mg/kg, produziu um efeito locomotor depressor durante os cinco minutos iniciais de exposição à arena. Paralelamente, não foram detectadas alterações significativas no comprimento dendrítico total, no número de dendritos, no número de interseções, na densidade de espinhos ou na complexidade da arborização dos neurônios espinhosos médios do núcleo *accumbens* (NAc). Em contraste, houve aumento da densidade de marcação imunorreativa para gefirina no NAc e na área tegmental ventral (VTA), enquanto o córtex *pré-frontal* medial (CPFm) não apresentou diferença estatisticamente significativa.

A redução da atividade locomotora observada após a administração aguda de morfina é compatível com a natureza temporalmente bifásica dos efeitos motores desse opioide em ratos. Babbini e Davis (1972) demonstraram que a resposta locomotora à morfina depende da dose e do intervalo transcorrido desde a administração, podendo ocorrer uma fase inicial de depressão motora seguida por recuperação e, em determinados protocolos, por ativação locomotora tardia. Portanto, a direção da resposta depende diretamente da janela temporal utilizada para o registro comportamental.

No presente experimento, a atividade locomotora foi registrada imediatamente após a administração da morfina e durante um período breve de cinco minutos. Essa característica metodológica favorece a detecção dos efeitos iniciais da droga, antes da manifestação de uma eventual fase estimulante tardia. Dessa forma, a menor distância

percorrida pelo grupo MOR-1 deve ser interpretada como expressão do efeito locomotor depressor inicial da morfina, e não como ausência de ação farmacológica sobre os circuitos cerebrais relacionados à motivação e ao movimento.

Evidências mais recentes sustentam essa interpretação. Paul, Gueven e Dietis (2021) demonstraram que a administração subcutânea aguda de morfina produz supressão locomotora em ratos, enquanto a administração repetida modifica progressivamente essa resposta. Dependendo da dose e da duração do tratamento, pode ocorrer redução do efeito depressor inicial, desenvolvimento de tolerância motora ou aparecimento de maior ativação locomotora. Assim, a resposta produzida pela primeira exposição não deve ser equiparada à sensibilização comportamental, que pressupõe aumento progressivo da resposta após administrações repetidas.

A interpretação também deve considerar a influência do contexto experimental. Coelho et al. (2025), utilizando ratos Wistar, morfina na dose de 10 mg/kg por via subcutânea e sessões locomotoras de cinco minutos, demonstraram que os efeitos agudos e repetidos da droga são modulados pelo grau de novidade ou familiaridade do ambiente. Nesse estudo, a morfina administrada em ambiente novo produziu padrões de ativação da via ERK diferentes daqueles observados quando a droga foi administrada em ambiente previamente familiar, particularmente em regiões associadas à recompensa, como a VTA. Esses resultados mostram que a resposta aguda não depende exclusivamente da dose, mas também da experiência prévia do animal com o contexto no qual a droga é administrada.

A redução locomotora não significa que o circuito mesocorticolímbico tenha sido inativado. A morfina atua principalmente como agonista dos receptores μ-opioides, produzindo efeitos distintos conforme a região, o tipo celular e a origem das aferências. Na VTA, a ativação desses receptores pode reduzir a transmissão GABAérgica dirigida aos neurônios dopaminérgicos, modificando o equilíbrio entre inibição e excitação e favorecendo alterações na sinalização dopaminérgica para o NAc. Contudo, essa organização é mais complexa do que um modelo baseado exclusivamente na inibição de interneurônios GABAérgicos locais (Fields e Margolis, 2015; Matsui et al., 2014).

Matsui et al. (2014) demonstraram que aferências GABAérgicas provenientes do núcleo tegmental rostromedial, do NAc e de interneurônios locais apresentam sensibilidades diferentes à ativação de receptores opioides. A inibição produzida pela morfina foi mais pronunciada em determinadas aferências do que em outras. Consequentemente, os efeitos agudos da droga resultam da modulação de circuitos GABAérgicos heterogêneos, e não de uma ação uniforme sobre toda a VTA. Doyle e

Mazei-Robison (2021) também destacaram que exposições agudas e crônicas a opioides produzem adaptações distintas na atividade, na transmissão sináptica e na organização molecular dos neurônios dopaminérgicos da VTA.

Nesse contexto, a menor atividade locomotora observada no grupo MOR-1 pode refletir a integração de diferentes efeitos agudos da morfina, incluindo depressão motora inicial, analgesia, alterações exploratórias e modulação dos circuitos motivacionais. A distância percorrida no campo aberto não permite separar isoladamente esses componentes. Por essa razão, o resultado deve ser descrito objetivamente como redução da atividade locomotora no período avaliado, evitando classificá-lo de maneira ampla como sedação ou comprometimento motor, pois essas interpretações exigiriam testes complementares de coordenação, força muscular, imobilidade e estado de alerta (Babbini e Davis, 1972; Paul, Gueven e Dietis, 2021).

Apesar da alteração comportamental, a exposição aguda à morfina não modificou os parâmetros morfológicos dos neurônios espinhosos médios do NAc. Não foram observadas diferenças no comprimento dendrítico total, no número de dendritos, no número de interseções, na densidade de espinhos ou na análise de Sholl. Esses resultados indicam que, uma única administração não foi suficiente para produzir remodelamento dendrítico detectável pela técnica de Golgi-Cox.

A ausência de diferença morfológica não deve ser interpretada como ausência completa de plasticidade neural. Alterações na liberação de neurotransmissores, na atividade de receptores, na fosforilação de proteínas, na expressão de genes imediatos e na eficácia sináptica podem ocorrer rapidamente, antes do estabelecimento de mudanças estruturais estáveis. A técnica de Golgi-Cox permite avaliar a morfologia neuronial em um determinado momento, mas não mede diretamente eventos moleculares ou eletrofisiológicos que podem anteceder o remodelamento dendrítico (Risher et al., 2014; Thompson, Oscar-Berman e Kaplan, 2021).

A literatura sobre alterações dendríticas induzidas por opioides concentra-se predominantemente em protocolos repetidos ou prolongados. Thompson, Oscar-Berman e Kaplan (2021) mostraram que os efeitos dos opioides sobre os neurônios espinhosos médios do NAc variam de acordo com a substância, o padrão de administração, a duração da exposição, a sub-região analisada e o subtipo neuronal. Em geral, alterações mais consistentes na ramificação dendrítica e nos espinhos são identificadas após exposições repetidas, autoadministração ou períodos de abstinência.

Geoffroy et al. (2019), por exemplo, identificaram remodelamento dos espinhos dendríticos na divisão *shell* do NAc após tratamento repetido com morfina. Os autores observaram aumento da proporção de espinhos finos e redução de espinhos demonstrando que a morfina pode alterar não apenas a densidade total, mas também a composição morfológica dos espinhos. Esses resultados não são diretamente comparáveis ao experimento agudo, mas ajudam a demonstrar que as modificações estruturais dependem da repetição da exposição e da consolidação das neuroadaptações.

Lefevre et al. (2023) reforçaram essa dependência do padrão de exposição ao demonstrarem que administrações contínuas e interrompidas de morfina produzem adaptações distintas na excitabilidade e na plasticidade sináptica dos neurônios espinhosos médios D1 e D2 da divisão *shell* do NAc. Portanto, não existe uma resposta estrutural única à morfina. A direção e a magnitude das alterações dependem da continuidade do tratamento, da ocorrência de abstinência, do subtipo celular e do tempo transcorrido após a exposição.

Nesse sentido, a ausência de alterações dendríticas no experimento agudo constitui um resultado relevante. Ela estabelece uma condição de referência para os experimentos de exposição repetida, permitindo distinguir os efeitos iniciais da droga das alterações progressivamente desenvolvidas durante a indução da sensibilização. Caso modificações dendríticas sejam observadas após tratamentos repetidos, sua ocorrência poderá ser relacionada com maior segurança à repetição da exposição e às neuroadaptações associadas, e não ao efeito imediato de uma única dose.

Em contraste com a estabilidade dos parâmetros dendríticos, a administração aguda de morfina aumentou a densidade de marcação imunorreativa para gefirina no NAc e na VTA. Esse resultado sugere que componentes moleculares relacionados à organização das pós-sinapses inibitórias podem responder precocemente à exposição à droga, antes que mudanças na arquitetura dendrítica sejam detectáveis (Pizzarelli et al., 2020; Carricaburu et al., 2024).

A gefirina é uma proteína de ancoragem pós-sináptica envolvida no agrupamento e na estabilização de receptores $GABA_A$ em grande parte das sinapses inibitórias do sistema nervoso central. Sua organização não é estática, sendo regulada por fosforilação, palmitoilação, interações com proteínas adaptadoras, atividade neuronial e mecanismos de transporte e estabilização de receptores. Dessa maneira, modificações na densidade, no tamanho ou na distribuição dos *clusters* de gefirina podem acompanhar processos de plasticidade inibitória (Pizzarelli et al., 2020).

Evidências recentes também demonstram que a gefirina participa ativamente da montagem dos componentes pós-sinápticos GABAérgicos. Carricaburu et al. (2024) mostraram que a gefirina promove a organização e a localização sináptica de componentes pós-sinápticos inibitórios e que parte desse processo pode ocorrer mesmo na ausência de liberação pré-sináptica de GABA. Esse achado é especialmente relevante para a interpretação do presente estudo, pois demonstra que alterações na marcação para gefirina não podem ser traduzidas automaticamente como aumento da liberação de GABA ou da força da transmissão inibitória.

Na VTA, o aumento da imunorreatividade para gefirina pode representar uma resposta pós-sináptica precoce às alterações produzidas pela morfina nas aferências GABAérgicas. Entretanto, a VTA contém neurônios dopaminérgicos, GABAérgicos e glutamatérgicos, além de aferências provenientes de diversas regiões. Como não foi realizada colocalização com marcadores específicos de tipo celular, não é possível determinar se o aumento ocorreu predominantemente em neurônios dopaminérgicos, interneurônios GABAérgicos ou outras populações. O resultado demonstra uma alteração regional da marcação, mas não identifica sua localização celular nem sua consequência funcional (Matsui et al., 2014; Doyle e Mazei-Robison, 2021).

No NAc, o aumento da marcação para gefirina pode estar associado à rápida reorganização dos componentes pós-sinápticos inibitórios em resposta às alterações na atividade do circuito mesolímbico. Os neurônios espinhosos médios recebem modulação dopaminérgica da VTA e aferências glutamatérgicas do córtex pré-frontal, hipocampo, complexo amigdaloide e núcleos da linha média e intralaminares do tálamo, incluindo o núcleo paraventricular, além de estabelecerem conexões inibitórias locais. Uma alteração aguda nesse equilíbrio pode recrutar mecanismos de reorganização molecular mesmo sem produzir, no mesmo intervalo temporal, mudanças detectáveis na arborização dendrítica (Russo et al., 2010; Koob e Volkow, 2016).

A ausência de diferença significativa no CPFm reforça o caráter regionalmente seletivo das alterações. Esse resultado não significa que o CPFm tenha permanecido funcionalmente inalterado, mas somente que não foi detectada diferença na densidade de marcação para gefirina. Modificações na atividade neuronial, na localização subcelular de receptores, na fosforilação de proteínas ou na liberação de neurotransmissores podem ocorrer sem alteração mensurável na densidade regional do marcador. Além disso, as regiões cerebrais podem apresentar diferentes velocidades de resposta à exposição aguda (Pizzarelli et al., 2020).

A interpretação da imunorreatividade para gefirina deve ser realizada com cautela. A imunoistoquímica em campo claro com DAB permite avaliar a presença e a distribuição regional do antígeno, mas não mede diretamente a função sináptica. Portanto, o aumento da densidade de marcação não constitui, isoladamente, evidência de aumento da transmissão GABAérgica, maior atividade inibitória, maior quantidade de receptores $GABA_A$ funcionais ou formação de novas sinapses (Pizzarelli et al., 2020; Carricaburu et al., 2024).

Para determinar a natureza funcional dessa alteração, seriam necessárias análises complementares, como colocalização da gefirina com marcadores pré-sinápticos GABAérgicos, incluindo VGAT ou GAD65/67; avaliação de subunidades dos receptores $GABA_A$; microscopia confocal ou de super-resolução; identificação dos tipos celulares envolvidos; e registros eletrofisiológicos de correntes pós-sinápticas inibitórias. Portanto, a formulação mais rigorosa é que a morfina aumentou regionalmente a imunorreatividade para gefirina, resultado compatível com reorganização precoce de componentes póssinápticos inibitórios (Pizzarelli et al., 2020; Carricaburu et al., 2024).

Também deve ser reconhecido que ainda são escassos os estudos que avaliaram diretamente os efeitos de uma única administração sistêmica de morfina sobre a gefirina no NAc, na VTA e no CPFm. Os trabalhos disponíveis demonstram a ação dos opioides sobre circuitos GABAérgicos e o papel da gefirina na organização das pós-sinapses inibitórias, mas não estabelecem diretamente que a morfina aguda aumenta a função

GABAérgica por meio da gefirina nessas regiões (Matsui et al., 2014; Doyle e Mazei-Robison, 2021; Pizzarelli et al., 2020).

Em conjunto, os resultados revelam uma dissociação temporal entre os efeitos comportamentais, moleculares e estruturais da morfina. Uma única administração produziu redução da atividade locomotora durante os cinco minutos iniciais do teste e aumento regional da imunorreatividade para gefirina no NAc e na VTA, sem promover alterações detectáveis na morfologia dendrítica dos neurônios espinhosos médios do NAc. O CPFm, por sua vez, não apresentou diferença significativa na marcação para gefirina.

Esse padrão sugere que os efeitos motores iniciais e a reorganização molecular de componentes pós-sinápticos inibitórios podem anteceder o desenvolvimento de alterações dendríticas persistentes. O experimento agudo estabelece, portanto, uma referência essencial para interpretar as fases posteriores, permitindo distinguir o efeito farmacológico inicial da morfina das neuroadaptações associadas à exposição repetida, à

sensibilização locomotora e à aprendizagem droga–contexto (Babbini e Davis, 1972; Thompson, Oscar-Berman e Kaplan, 2021; Pizzarelli et al., 2020).

7.2 Indução da sensibilização locomotora

Durante a fase de indução, o grupo que recebeu morfina associada ao contexto experimental (MOR-A) apresentou aumento progressivo da distância percorrida em comparação aos grupos veículo (VEI) e morfina não associada ao contexto (MOR-NA), enquanto VEI e MOR-NA não diferiram significativamente. Assim, nas condições deste experimento, a sensibilização locomotora foi detectada no grupo MOR-A, e o contraste com MOR-NA indica que o pareamento entre a administração de morfina e o ambiente de teste modulou a expressão comportamental observada. Os resultados estatísticos completos permanecem apresentados exclusivamente na seção Resultados.

Esse resultado é compatível com a concepção de que a sensibilização comportamental não corresponde apenas ao efeito farmacológico acumulado da droga, mas envolve aprendizagem associativa e integração entre os efeitos da substância e as pistas ambientais presentes durante sua administração. Contextos previamente pareados à morfina podem adquirir propriedades condicionadas e influenciar a magnitude da resposta locomotora em exposições posteriores. Crespo et al. (2022), por exemplo, demonstrou que os efeitos comportamentais condicionados pela morfina dependem da associação entre droga e contexto e envolvem sinalização de ERK no núcleo accumbens. De modo complementar, Coelho et al. (2025) mostraram que a familiaridade ou a novidade do ambiente modifica a sensibilização locomotora induzida por morfina, reforçando que as características contextuais constituem variáveis relevantes na expressão desse fenômeno.

A ausência de diferença significativa entre VEI e MOR-NA é particularmente informativa. Embora os animais do grupo MOR-NA tenham recebido morfina, a droga não foi administrada no mesmo contexto em que a atividade locomotora foi avaliada. Esse resultado não demonstra que a exposição não associada seja biologicamente inerte; indica, especificamente, que ela não produziu, no contexto e no momento avaliados, a mesma expressão locomotora observada quando a morfina foi pareada ao ambiente experimental. Portanto, o conjunto dos dados sustenta uma modulação contextual da sensibilização, sem permitir atribuir toda a resposta a um mecanismo exclusivamente associativo.

No NAc, a análise dos neurônios espinhosos médios revelou redução do comprimento dendrítico total, do número total de dendritos, do número de interseções e

da densidade de espinhos dendríticos nos grupos expostos repetidamente à morfina, com alterações mais pronunciadas no grupo MOR-A. Quando as médias do grupo MOR-NA se situaram entre VEI e MOR-A, esse padrão deve ser descrito como intermediário em termos quantitativos. Entretanto, valores intermediários, *per se*, não comprovam efeito parcial da exposição não associada nem dependência gradual do contexto.

Os resultados morfológicos indicam que a exposição repetida à morfina foi acompanhada por remodelamento da arborização e dos espinhos dendríticos dos neurônios analisados no NAc. Essa interpretação é coerente com evidências de que opioides induzem plasticidade estrutural em circuitos de recompensa, embora a direção e a magnitude dessas alterações variem conforme a substância, a dose, o regime de administração, o intervalo até a análise, a sub-região cerebral, o compartimento dendrítico e o tipo neuronial investigado. A revisão de Thompson, Oscar-Berman e Kaplan (2021) mostrou que a exposição a opioides pode modificar a morfologia neuronial em regiões relacionadas à recompensa e ao controle executivo, mas também evidenciou considerável heterogeneidade entre os estudos. Por isso, a redução observada no presente experimento deve ser interpretada como uma forma específica de remodelamento associada ao protocolo utilizado, e não como resposta universal à morfina.

No estriado ventral, a organização morfológica dos neurônios espinhosos médios é sensível ao padrão de exposição a opioides e à história de abstinência. Geoffroy et al. (2019) observaram alterações duradouras na densidade e na morfologia de espinhos dendríticos no NAc após exposição à morfina e abstinência prolongada. Lefevre et al. (2023) demonstraram que a morfina produz remodelamento de espinhos dependente do subtipo de neurônio espinhoso médio, destacando que populações que expressam receptores dopaminérgicos D1 ou D2 podem responder de modo distinto. Em conjunto, esses estudos sustentam a existência de plasticidade estrutural induzida por opioides, mas recomendam cautela ao comparar diretamente resultados obtidos em diferentes subregiões, tipos celulares e momentos experimentais.

A redução da densidade de espinhos dendríticos observada no presente estudo pode refletir reorganização dos sítios potenciais de contato sináptico excitatório, pois grande parte das sinapses glutamatérgicas dos neurônios espinhosos médios ocorre sobre espinhos dendríticos. Todavia, a técnica de Golgi-Cox fornece uma medida morfológica e não permite determinar, isoladamente, a identidade molecular, a origem dos terminais pré-sinápticos ou a eficácia funcional das sinapses. Assim, não se pode concluir apenas a partir da diminuição do número de espinhos que tenha ocorrido redução global da

neurotransmissão glutamatérgica. Alterações na forma e na estabilidade dos espinhos, na composição de receptores e na força das conexões remanescentes podem ocorrer sem correspondência linear com a densidade total (Russo et al., 2010; Thompson, Oscar-Berman e Kaplan, 2021).

Também não é possível estabelecer, com base no delineamento empregado, que o remodelamento dendrítico causou a sensibilização locomotora. Os dois fenômenos foram observados após o mesmo regime de exposição e podem representar componentes paralelos ou interdependentes da neuroplasticidade induzida pela morfina. A associação mais intensa entre as alterações estruturais e o grupo MOR-A é consistente com a participação de processos dependentes do contexto, mas a demonstração de causalidade exigiria manipulações específicas capazes de impedir ou reverter o remodelamento neuronial e verificar diretamente o efeito sobre o comportamento.

Carricaburu et al. (2024) demonstraram que a gefirina participa da montagem autônoma e da localização sináptica de componentes pós-sinápticos GABAérgicos, inclusive em condições sem liberação pré-sináptica de GABA. Esse estudo fundamenta o papel da gefirina na organização da arquitetura pós-sináptica inibitória, mas não demonstrou uma ação direta de receptores μ-opioides sobre essa proteína.

Toddes et al. (2021), por sua vez, mostraram que a redução do número de cópias do gene do receptor μ-opioide (Oprm1) modifica a microcircuitaria do NAc, com alterações na transmissão inibitória de neurônios espinhosos médios D2, na expressão de RNAm de gefirina e na densidade de *puncta* sinápticos inibitórios, além de influenciar comportamentos sociais recíprocos. Esse estudo fornece evidências de que alterações na sinalização μ-opioide podem afetar componentes inibitórios e relacionados à gefirina no NAc, mas não avaliou a administração repetida de morfina nem neurônios dopaminérgicos da VTA; portanto, não constitui demonstração direta dos efeitos do protocolo empregado nesta tese.

No NAc, a modificação dos *clusters* de gefirina pode estar relacionada à reorganização dos mecanismos inibitórios locais que regulam a excitabilidade dos neurônios espinhosos médios. Na VTA, a interpretação exige atenção à heterogeneidade celular e sináptica da região. Receptores μ-opioides estão presentes em diferentes elementos do circuito mesolímbico, e a morfina pode desinibir neurônios dopaminérgicos ao reduzir a transmissão GABAérgica proveniente de aferências e interneurônios. Matsui et al. (2014) demonstraram que receptores μ-opioides controlam entradas GABAérgicas distintas sobre neurônios dopaminérgicos da VTA. Consequentemente, uma alteração na

densidade de gefirina nessa região não permite inferir, sem identificação celular e funcional, se houve aumento ou redução líquida da inibição sobre neurônios dopaminérgicos.

Os mecanismos pelos quais a morfina pode modificar a gefirina ainda não estão estabelecidos diretamente. Como hipótese, a ativação de receptores μ-opioides pode alterar a atividade neuronal e o balanço entre aferências GABAérgicas, glutamatérgicas e dopaminérgicas, recrutando vias intracelulares capazes de modular a fosforilação, a palmitoilação, o tráfego e a estabilidade da gefirina na membrana pós-sináptica. Mudanças de atividade também podem induzir respostas homeostáticas na organização de receptores GABAA e de seus complexos de ancoragem. Assim, as diferenças observadas podem resultar de redistribuição subcelular, alteração da estabilidade dos agrupamentos ou resposta compensatória do circuito, sem que os dados atuais permitam distinguir entre esses mecanismos (Tyagarajan e Fritschy, 2014; Pizzarelli et al., 2020; Carricaburu et al., 2024).

No CPFm, as alterações na imunorreatividade para gefirina são compatíveis com o recrutamento de uma rede mais ampla envolvida no controle executivo e na modulação do comportamento motivado. O CPFm participa da regulação do comportamento dirigido a objetivos e do controle sobre circuitos de recompensa. Doyle e Mazei-Robison (2021) destacaram que as adaptações induzidas por opioides na VTA variam conforme o tipo celular, o componente sináptico e o tempo de exposição. Ainda assim, a atribuição de funções específicas às alterações de gefirina observadas nas regiões analisadas permanece uma hipótese a ser testada diretamente (Hearing, 2019; Koob e Volkow, 2016).

Os resultados da fase de indução mostram que o pareamento entre morfina e contexto foi associado a uma trajetória locomotora distinta e à expressão de sensibilização no grupo MOR-A, resultado compatível com evidências de que as pistas contextuais modulam os efeitos comportamentais produzidos pela morfina (Crespo et al., 2022; Coelho et al., 2025). Paralelamente, a exposição repetida à morfina foi acompanhada por redução dos parâmetros de complexidade dendrítica e da densidade de espinhos dos neurônios espinhosos médios do NAc. Esses resultados são consistentes com estudos que demonstram remodelamento estrutural no NAc após exposição repetida a opioides, embora a direção e a magnitude dessas alterações dependam do regime de administração, do período de abstinência e do subtipo neuronial analisado (Geoffroy et al., 2019; Thompson, Oscar-Berman e Kaplan, 2021; Lefevre et al., 2023). Também foram observadas alterações regionais na densidade de *clusters* imunorreativos para gefirina,

proteína envolvida na organização e estabilização de componentes pós-sinápticos GABAérgicos (Pizzarelli et al., 2020; Carricaburu et al., 2024). O conjunto das alterações foi mais pronunciado no grupo MOR-A, sendo compatível com uma possível contribuição da associação droga–contexto para as neuroadaptações observadas. Contudo, os dados são correlacionais e morfológicos: não demonstram que as alterações dendríticas tenham causado a sensibilização nem que as modificações na imunorreatividade para gefirina correspondam diretamente ao aumento ou à diminuição da neurotransmissão GABAérgica.

7.3 Extinção da sensibilização locomotora

Após a fase de indução, os animais foram submetidos a cinco sessões consecutivas de extinção, nas quais receberam veículo antes da exposição ao aparato. Ao longo dessas sessões, observou-se redução progressiva da atividade locomotora, acompanhada pela diminuição das diferenças entre os grupos. O grupo MOR-A-E apresentou maior atividade locomotora nas sessões iniciais, mas essa diferença foi atenuada com a repetição das exposições ao contexto na ausência de morfina. Esse padrão indica diminuição da expressão comportamental previamente estabelecida pelo pareamento entre a droga e o ambiente.

A redução da resposta locomotora durante a extinção não deve ser interpretada como apagamento da aprendizagem original. A literatura sobre aprendizagem associativa demonstra que a extinção corresponde predominantemente à aquisição de uma nova relação, na qual o contexto deixa de predizer a ocorrência do estímulo anteriormente associado, enquanto a memória original pode permanecer preservada e voltar a ser expressa em determinadas condições (Bouton, 2002, 2004, 2019; Bouton et al., 2021). Assim, a diminuição da atividade locomotora observada ao longo das sessões é compatível com a formação progressiva de uma memória de extinção, e não necessariamente com a reversão completa das associações droga–contexto estabelecidas durante a indução.

A expressão da aprendizagem de extinção depende do contexto e das condições em que a resposta é posteriormente avaliada. Mudanças contextuais, passagem do tempo ou reapresentação do estímulo não condicionado podem favorecer o reaparecimento de respostas anteriormente extintas, fenômenos descritos, respectivamente, como renovação, recuperação espontânea e restabelecimento (Bouton, 2002, 2004, 2019; Vervliet, Craske e Hermans, 2013; Trask, Thrailkill e Bouton, 2017). Embora parte dessa literatura tenha

sido desenvolvida em modelos de condicionamento aversivo, os princípios de aprendizagem de extinção e controle contextual também são relevantes para a compreensão das respostas associadas às drogas.

Nos modelos relacionados ao uso de drogas, a diminuição da resposta durante a extinção também não demonstra necessariamente a reversão completa das neuroadaptações produzidas pela exposição anterior. A aprendizagem original pode permanecer disponível e ser recuperada posteriormente pela reapresentação da droga, por estímulos associados ou por mudanças nas condições contextuais (Gass e Chandler, 2013;

Hearing, 2019). Portanto, a atenuação das diferenças locomotoras entre os grupos durante as cinco sessões indica redução da expressão da sensibilização no contexto de extinção, mas não permite concluir que a sensibilização ou a memória associativa original tenham sido definitivamente eliminadas.

A persistência de alterações morfológicas após a extinção reforça essa distinção entre redução da resposta comportamental e reversão das neuroadaptações. Mesmo após as sessões sem morfina, foram observadas diferenças na densidade de espinhos dendríticos, no comprimento dendrítico total e na complexidade das arborizações dos neurônios espinhosos médios do núcleo *accumbens*. Essas diferenças foram mais pronunciadas no grupo MOR-A-E, sugerindo que o histórico de pareamento entre morfina e contexto permaneceu associado a um padrão específico de organização dendrítica.

A exposição repetida à morfina pode produzir remodelamento dos espinhos dendríticos de neurônios do núcleo accumbens, embora a direção e a magnitude dessas alterações dependam do regime de administração, do período de retirada, da sub-região analisada e da população neuronial considerada (Geoffroy et al., 2019; Thompson, Oscar-Berman e Kaplan, 2021). Geoffroy et al. (2019) demonstraram alterações na morfologia dos espinhos dendríticos do núcleo accumbens após tratamento repetido com morfina. Entretanto, como a avaliação foi realizada um dia após o término do tratamento crônico, esse estudo fundamenta a ocorrência de remodelamento induzido pela morfina, mas não demonstra diretamente a persistência dessas alterações após um protocolo de extinção.

Thompson, Oscar-Berman e Kaplan (2021), em uma revisão sobre a plasticidade dos neurônios espinhosos médios do núcleo *accumbens*, destacaram que os opioides podem produzir alterações estruturais e funcionais dependentes do tipo de substância, do padrão de exposição, do período de abstinência e do subtipo neuronial. Lefevre et al. (2023) também mostraram que exposições contínuas e interrompidas à morfina produzem adaptações distintas em neurônios que expressam receptores dopaminérgicos D1 ou D2

na divisão *shell* do núcleo *accumbens*. Embora Lefevre et al. (2023) não tenham investigado diretamente a extinção da sensibilização locomotora, seus resultados demonstram que o padrão temporal de exposição à morfina influencia a natureza das adaptações celulares no núcleo *accumbens*.

Dessa forma, as alterações morfológicas observadas após a extinção podem representar neuroadaptações relacionadas ao histórico de exposição à morfina e às associações estabelecidas durante a indução. Entretanto, os resultados de Golgi-Cox são transversais e morfológicos e não permitem determinar quando essas alterações surgiram, se foram modificadas durante a extinção ou se participaram causalmente da redução ou da posterior recuperação da resposta locomotora. Também não permitem identificar diretamente os subtipos de neurônios espinhosos médios envolvidos.

A densidade de marcação imunorreativa para gefirina também foi modificada após a extinção. No NAc, MOR-A-E apresentou maior densidade que VEI-E; na VTA, MOR-A-E e MOR-NA-E apresentaram valores superiores a VEI-E; e, no CPFm, não foram detectadas diferenças significativas. Em comparação com a fase de indução, esse padrão mostra que a extinção foi acompanhada por reorganização regional da imunorreatividade para gefirina, particularmente nos animais com histórico de exposição à morfina. Esse resultado não equivale, contudo, a uma medida direta da intensidade da transmissão inibitória.

A gefirina atua como uma proteína de ancoragem essencial para a estabilização e a organização de receptores GABA_A em especializações pós-sinápticas inibitórias (Tyagarajan e Fritschy, 2014; Kasaragod e Schindelin, 2018; Pizzarelli et al., 2020). Modificações na quantidade, na distribuição ou na organização de seus *clusters* podem refletir remodelamento de estruturas pós-sinápticas GABAérgicas, mas não permitem, isoladamente, concluir que houve aumento ou diminuição da liberação de GABA ou da corrente inibitória. Carricaburu et al. (2024) demonstraram que a gefirina participa da organização e da localização sináptica de componentes pós-sinápticos GABAérgicos mesmo na ausência de liberação pré-sináptica de GABA. Portanto, esse estudo fundamenta a organização pós-sináptica dependente de gefirina, mas não demonstra uma ação direta da morfina ou de receptores μ-opioides sobre essa proteína.

Os resultados indicam que a extinção reduziu progressivamente a expressão locomotora associada ao histórico de pareamento entre morfina e contexto, enquanto diferenças morfológicas e moleculares permaneceram detectáveis. Essa dissociação é compatível com a interpretação de que a extinção corresponde a uma nova aprendizagem,

capaz de inibir a expressão comportamental anterior sem necessariamente eliminar a memória original ou reverter completamente as neuroadaptações produzidas pela exposição à droga (Bouton, 2002, 2004, 2019; Gass e Chandler, 2013; Hearing, 2019).

Entretanto, os resultados permanecem correlacionais. Não é possível afirmar que as alterações dendríticas ou as diferenças na densidade de *clusters* de gefirina tenham causado a redução da atividade locomotora durante a extinção. Da mesma forma, os resultados não demonstram que essas alterações tenham determinado o comportamento observado posteriormente no teste final. Eles mostram que a atenuação comportamental durante a extinção coexistiu com modificações estruturais e pós-sinápticas no núcleo *accumbens*, fornecendo uma base para a interpretação dos resultados apresentados na etapa de Teste Final e Recuperação da Resposta Condicionada.

7.4 Teste final e expressão da resposta sensibilizada

Após a indução da sensibilização locomotora e as sessões de extinção, os animais foram submetidos ao teste final no mesmo ambiente experimental. Nessa etapa, a combinação entre o histórico de tratamento VEI, morfina não associada ao contexto (MOR-NA) ou morfina associada ao contexto (MOR-A) e a administração de veículo ou morfina no dia do teste permitiu avaliar a persistência das neuroadaptações produzidas pela exposição prévia à droga.

No teste final, o grupo MOR-A/MOR apresentou a maior atividade locomotora entre os grupos experimentais. Esse resultado indica que os animais previamente expostos à morfina no mesmo contexto demonstraram uma resposta locomotora acentuada quando receberam novamente a droga naquele ambiente. O efeito observado é compatível com a expressão da sensibilização locomotora dependente do histórico associativo entre droga e contexto (Crespo et al., 2022; Coelho et al., 2025).

A interpretação desse resultado, entretanto, deve diferenciar resposta condicionada, sensibilização e efeito farmacológico agudo. Uma recuperação puramente condicionada seria demonstrada pelo aumento da atividade locomotora do grupo MOR-A/VEI, isto é, dos animais previamente condicionados que retornaram ao contexto sem receber morfina no teste final. Como o aumento mais evidente ocorreu no grupo MOR-A/MOR, o resultado sustenta principalmente a expressão da sensibilização provocada pelo desafio farmacológico no contexto previamente associado à droga. Portanto, a expressão “recuperação da resposta condicionada” deve ser empregada com cautela e

depender da comparação estatística entre MOR-A/VEI e os grupos-controle tratados com veículo (Steketee e Kalivas, 2011; Crespo et al., 2022).

A ausência de aumento significativo no grupo MOR-A/VEI, caso confirmada pelo teste final, indicaria que a simples reexposição ao contexto não foi suficiente para produzir recuperação locomotora condicionada detectável. Nesse caso, os resultados demonstrariam que a resposta permaneceu parcialmente suprimida após a extinção na ausência da droga, mas pôde ser novamente expressa quando a morfina foi administrada.

A extinção é geralmente compreendida como um processo de nova aprendizagem, no qual a associação entre o contexto e a ausência do efeito da droga passa a competir com a memória previamente estabelecida entre contexto e morfina. Ela reduz a expressão comportamental condicionada, mas não necessariamente elimina a associação original. Por isso, respostas previamente extintas podem reaparecer após a reapresentação da droga, mudanças contextuais ou passagem do tempo. Esse princípio é amplamente reconhecido nos modelos contemporâneos de extinção e recaída comportamental (Bouton, 2002, 2004, 2019; Bouton et al., 2021).

No presente experimento, a maior atividade locomotora do grupo MOR-A/MOR sugere que a aprendizagem estabelecida durante a indução permaneceu biologicamente relevante apesar da redução comportamental observada durante a extinção. O desafio com morfina pode ter reativado neuroadaptações relacionadas à sensibilização e facilitado a recuperação da resposta no contexto previamente pareado à droga. Contudo, o delineamento não permite determinar se o efeito decorreu da recuperação da associação condicionada original, da expressão de sensibilização farmacológica persistente ou da interação entre esses dois processos.

O grupo MOR-NA/MOR apresentou resposta inferior à do grupo MOR-A/MOR. Essa diferença é relevante porque ambos receberam morfina no teste final, mas apenas o grupo MOR-A havia experimentado anteriormente os efeitos da droga no ambiente de avaliação. O padrão sugere que a exposição farmacológica repetida, isoladamente, não explica toda a magnitude da resposta final e que a associação droga–contexto contribuiu para potencializar sua expressão.

Os animais VEI/MOR fornecem uma referência importante para o efeito locomotor da morfina no teste final sem histórico prévio de exposição repetida. Se MOR-A/MOR apresentou atividade significativamente maior que VEI/MOR, esse contraste sustenta a presença de sensibilização, pois demonstra que o histórico de administrações pareadas aumentou a resposta em relação ao efeito observado em animais previamente

tratados com veículo. A comparação entre MOR-A/MOR e MOR-NA/MOR, por sua vez, permite avaliar a contribuição do pareamento droga–contexto para a sensibilização.

Em conjunto, a interpretação do teste final depende de três contrastes fundamentais:

MOR-A/VEI *versus* VEI/VEI: avalia a expressão locomotora produzida pelo contexto na ausência de morfina;

MOR-A/MOR *versus* VEI/MOR: avalia a sensibilização decorrente do histórico de exposição repetida;

MOR-A/MOR *versus* MOR-NA/MOR: avalia a contribuição do pareamento entre morfina e contexto.

Dessa maneira, o aumento observado no grupo MOR-A/MOR é compatível com a persistência de neuroadaptações comportamentais após a extinção e com a influência do contexto sobre a expressão da sensibilização. Não obstante, sem aumento significativo no grupo MOR-A/VEI, não é possível afirmar que tenha ocorrido recuperação autônoma da resposta locomotora condicionada apenas pela reexposição ao ambiente.

7.4.1 Imunorreatividade para gefirina após o teste final

A análise imuno-histoquímica revelou diferenças na densidade de marcação para gefirina no NAc, na VTA e no CPFm após o teste final. O grupo VEI/VEI apresentou, em geral, os menores valores. MOR-A/MOR apresentou os valores mais elevados e não diferiu de MOR-A/VEI, enquanto MOR-A/VEI e MOR-NA/MOR também mostraram aumentos em comparação aos grupos-controle, de acordo com as comparações regionais. Esse padrão demonstra que o desafio farmacológico, o histórico de pareamento e a aprendizagem de extinção foram acompanhados por reorganização regional da marcação para gefirina. O aumento observado em MOR-NA/MOR é particularmente relevante porque não foi reproduzido durante as fases de indução e extinção, indicando que a nova exposição à morfina modificou a resposta desse grupo.

A maior densidade de *clusters* de gefirina no grupo MOR-A/MOR indica que o histórico de associação entre morfina e contexto, seguido por extinção e novo desafio farmacológico, foi acompanhado por reorganização da estrutura molecular pós-sináptica inibitória. Como a gefirina participa da ancoragem e estabilização de receptores GABAA na membrana pós-sináptica, modificações em seus *clusters* podem representar alterações na organização das sinapses inibitórias. Entretanto, esse resultado não demonstra diretamente aumento da liberação de GABA, maior corrente inibitória ou aumento do

número de sinapses funcionalmente ativas (Pizzarelli et al., 2020; Carricaburu et al., 2024).

A direção do resultado observado no teste final também deve ser discutida em relação às fases anteriores. Uma elevação da densidade de *clusters* após o desafio não contradiz necessariamente reduções observadas durante a indução ou alterações persistentes após a extinção. A organização da gefirina é dinâmica e pode variar em função do tempo transcorrido desde a administração, da reexposição ao contexto e da nova ativação dos receptores μ-opioides. Assim, o teste final pode representar uma etapa de reorganização ou recrutamento pós-sináptico diferente daquela observada durante a aquisição da sensibilização (Pizzarelli et al., 2020).

No NAc, o aumento da densidade de clusters de gefirina pode refletir reorganização dos mecanismos inibitórios que regulam a excitabilidade dos neurônios espinhosos médios. Essa região integra aferências glutamatérgicas provenientes do córtex pré-frontal, hipocampo e complexo amigdaloide com sinais dopaminérgicos originados na VTA. Por isso, alterações na organização pós-sináptica inibitória do NAc podem participar da adaptação do circuito diante da reapresentação da droga e das pistas contextuais associadas (Russo et al., 2010; Koob e Volkow, 2016).

Na VTA, a interpretação é particularmente complexa porque a morfina pode aumentar a atividade de neurônios dopaminérgicos por meio da inibição de elementos GABAérgicos, produzindo desinibição dopaminérgica. Matsui et al. (2014) demonstraram que receptores μ-opioides regulam diferentes entradas GABAérgicas sobre neurônios dopaminérgicos da VTA. Desse modo, o aumento da densidade de gefirina nessa região não permite determinar se houve fortalecimento da inibição sobre neurônios dopaminérgicos, reorganização das sinapses sobre neurônios GABAérgicos ou resposta compensatória à ativação repetida do circuito.

No CPFm, as alterações de gefirina podem estar relacionadas à reorganização de circuitos envolvidos no controle executivo, na regulação do comportamento motivado e na influência das informações contextuais sobre a resposta à droga. O CPFm mantém conexões recíprocas com o NAc e outras estruturas do circuito de recompensa. Entretanto, assim como nas demais regiões, a imunoistoquímica isoladamente não permite determinar quais tipos neuroniais apresentaram alteração nem estabelecer sua consequência funcional (Hearing, 2019; Koob e Volkow, 2016).

Carricaburu et al. (2024) demonstraram que a gefirina organiza e direciona componentes pós-sinápticos GABAérgicos para os sítios sinápticos, inclusive na ausência

de liberação pré-sináptica de GABA. Esse dado sustenta a interpretação da gefirina como componente da arquitetura pós-sináptica inibitória, mas não demonstra que a ativação de receptores μ-opioides ou a exposição à morfina produza diretamente reorganização dependente de gefirina. Portanto, a relação entre o desafio com morfina e as alterações observadas no presente experimento deve permanecer como uma interpretação baseada nos dados desta tese, e não como resultado demonstrado por aquele estudo.

Em síntese, os resultados do teste final mostram que a extinção reduziu a expressão da resposta locomotora, mas não impediu que a administração de morfina produzisse uma resposta acentuada nos animais previamente condicionados. O aumento observado no grupo MOR-A/MOR sustenta a persistência da sensibilização e a contribuição do contexto previamente associado à droga. Entretanto, caso MOR-A/VEI não tenha diferido dos controles, o resultado não deve ser apresentado como recuperação puramente condicionada, mas como expressão da sensibilização após o desafio farmacológico no contexto previamente pareado (Steketee e Kalivas, 2011; Crespo et al., 2022; Coelho et al., 2025).

Paralelamente, as alterações na densidade de *clusters* imunorreativos para gefirina no NAc, na VTA e no CPFm indicam reorganização molecular regional após a combinação entre histórico de condicionamento, extinção e desafio com morfina. Esses achados ampliam a compreensão das neuroadaptações relacionadas à exposição repetida a opioides, mas permanecem de natureza morfológica e correlacional. Portanto, não permitem inferir diretamente aumento ou redução da neurotransmissão GABAérgica nem demonstrar que as modificações de gefirina foram responsáveis pela recuperação da resposta locomotora (Pizzarelli et al., 2020; Carricaburu et al., 2024).

8 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que os efeitos comportamentais, morfológicos e imunoistoquímicos da morfina variaram conforme o regime de exposição, o pareamento com o contexto experimental e a fase avaliada. No experimento agudo, uma única administração de morfina reduziu a distância percorrida durante os cinco minutos de avaliação, sem produzir alterações detectáveis nos parâmetros dendríticos dos neurônios espinhosos médios do núcleo *accumbens*. Em contraste, foram observadas alterações regionalmente seletivas na densidade de perfis imunorreativos para gefirina, com aumento no núcleo *accumbens* e na área tegmental ventral, mas não no córtex *pré-frontal* medial.

Durante a indução, o grupo que recebeu morfina associada ao ambiente experimental (MOR-A) apresentou aumento progressivo da atividade locomotora em comparação aos grupos veículo (VEI) e morfina não associada ao contexto (MOR-NA), caracterizando sensibilização locomotora modulada pelo pareamento entre droga e contexto. A exposição repetida à morfina também foi acompanhada por alterações morfológicas nos neurônios analisados no núcleo *accumbens*, incluindo redução do comprimento dendrítico, do número de dendritos, do número de interseções, da complexidade da arborização e da densidade de espinhos, com padrão mais pronunciado no grupo MOR-A.

A redução progressiva da atividade locomotora durante as sessões sem morfina demonstra que o procedimento promoveu aprendizagem de extinção e diminuiu a expressão da resposta previamente estabelecida. A complexidade dendrítica do grupo MOR-A permaneceu reduzida, sem evidência de recuperação parcial. Paralelamente, a imunorreatividade para gefirina foi modificada pela extinção, especialmente no NAc e na VTA dos grupos com histórico de exposição à morfina. Esses achados mostram que a redução comportamental não foi acompanhada por reversão uniforme das alterações neurais detectadas.

No teste final, o grupo MOR-A/MOR apresentou a resposta locomotora mais acentuada. Esse resultado sustenta a persistência da sensibilização e demonstra que o histórico de administração da morfina no ambiente experimental influenciou a resposta produzida pelo novo desafio farmacológico. Na ausência de aumento significativo no grupo MOR-A/VEI em comparação aos controles tratados com veículo; contudo, não se pode afirmar que tenha ocorrido recuperação autônoma da resposta locomotora condicionada exclusivamente pela reexposição ao contexto. O achado deve ser interpretado, de maneira mais precisa, como expressão da sensibilização após o desafio com morfina no ambiente previamente pareado à droga.

As diferenças regionais na densidade de marcação imunorreativa para gefirina mostram que a exposição à morfina, o pareamento contextual, a aprendizagem de extinção e o desafio farmacológico foram acompanhados por modificações na organização molecular pós-sináptica inibitória. No teste final, destacaram-se os aumentos observados nos grupos MOR-A/MOR, MOR-A/VEI e MOR-NA/MOR, conforme as comparações regionais. Entretanto, a imunorreatividade para gefirina não constitui medida funcional direta da neurotransmissão GABAérgica e não permite concluir que houve aumento ou

redução da liberação de GABA, da corrente inibitória ou do número de sinapses funcionalmente ativas.

O estudo demonstra que o pareamento entre morfina e contexto modula a sensibilização locomotora e está associado a alterações dendríticas no núcleo *accumbens* e a modificações regionais na imunorreatividade para gefirina. A extinção reduziu a expressão comportamental, mas não promoveu reversão uniforme das alterações neurais avaliadas, enquanto o desafio final com morfina revelou a persistência da sensibilização nos animais com histórico de pareamento. Esses dados evidenciam que as respostas comportamentais e as medidas morfológicas e moleculares podem apresentar cursos temporais distintos. Como as análises são morfológicas e correlacionais, não é possível estabelecer relação causal entre o remodelamento dendrítico, as alterações de gefirina e a atividade locomotora. Estudos futuros com identificação de tipos celulares, colocalização sináptica e avaliações eletrofisiológicas serão necessários para determinar as consequências funcionais dessas modificações.

9 REFERÊNCIAS

BABBINI, M.; DAVIS, W. M. Time-dose relationships for locomotor activity effects of morphine after acute or repeated treatment. British Journal of Pharmacology, v. 46, n. 2, p. 213–224, 1972. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1972.tb06866.x.

BATTAGLIA, S. et al. Activity-dependent inhibitory synapse scaling is determined by gephyrin phosphorylation and subsequent regulation of GABA-A receptor diffusion. eNeuro, v. 5, n. 1, art. ENEURO.0203-17.2017, 2018. DOI: 10.1523/ENEURO.0203-17.2017.

BOUTON, M. E. Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. Biological Psychiatry, New York, v. 52, n. 10, p. 976–986, 2002.

BOUTON, M. E. Context and behavioral processes in extinction. Learning & Memory, New York, v. 11, n. 5, p. 485–494, 2004.

BOUTON, M. E. Extinction of instrumental (operant) learning: interference, varieties of context, and mechanisms of contextual control. Psychopharmacology, Berlin, v. 236, n. 1, p. 7–19, 2019.

BOUTON, M. E.; MAREN, S.; MCNALLY, G. P. Behavioral and neurobiological mechanisms of Pavlovian and instrumental extinction learning. Physiological Reviews, v. 101, n. 2, p. 611–681, 2021.

BROWNE, C. J. et al. Cocaine and morphine induce shared and divergent transcriptional regulation in nucleus accumbens D1 and D2 medium spiny neurons. Molecular Psychiatry, v. 30, n. 9, p. 4247–4257, 2025. DOI: 10.1038/s41380-025-03004-1.

CARRICABURU, E. et al. Gephyrin promotes autonomous assembly and synaptic localization of GABAergic postsynaptic components without presynaptic GABA release. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 121, n. 26, art. e2315100121, 2024. DOI: 10.1073/pnas.2315100121.

CHOII, G.; KO, J. Gephyrin: a central GABAergic synapse organizer. Experimental & Molecular Medicine, Seoul, v. 47, p. e158, 2015.

COELHO, G. C. et al. Opioid-environment interaction: contrasting effects of morphine administered in a novel versus familiar environment on acute and repeated morphine-induced behavioral effects and on acute morphine ERK activation in reward-associated brain areas. Behavioural Brain Research, v. 476, art. 115221, 2025. DOI: 10.1016/j.bbr.2024.115221.

CRESPO, L. G. S. C. et al. 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. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v. 214, art. 173356, 2022. DOI: 10.1016/j.pbb.2022.173356.

DARCQ, E.; KIEFFER, B. L. Opioid receptors: drivers to addiction? Nature Reviews Neuroscience, v. 19, n. 8, p. 499–514, 2018. DOI: 10.1038/s41583-018-0028-x.

DELAGE, C. et al. Behavioral sensitization to psychostimulants and opioids: what is known in rodents and what still needs to be explored in humans? Progress in NeuroPsychopharmacology & Biological Psychiatry, v. 127, art. 110824, 2023. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2023.110824.

DELAMATER, A. R. Experimental extinction in Pavlovian conditioning: behavioural and neuroscience perspectives. Quarterly Journal of Experimental Psychology, London, v. 57B, n. 2, p. 97–132, 2004.

DOYLE, M. A.; MAZEI-ROBISON, M. S. Opioid-induced molecular and cellular plasticity of ventral tegmental area dopamine neurons. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, v. 11, n. 2, art. a039362, 2021. DOI: 10.1101/cshperspect.a039362.

EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Drug addiction: updating actions to habits to compulsions. Annual Review of Psychology, Palo Alto, v. 67, p. 23–50, 2016.

FIELDS, H. L.; MARGOLIS, E. B. Understanding opioid reward. Trends in Neurosciences, Amsterdam, v. 38, n. 4, p. 217–225, 2015.

FRITSCHY, J. M.; HARVEY, R. J.; SCHWARZ, G. Gephyrin: where do we stand, where do we go? Trends in Neurosciences, v. 31, n. 5, p. 257–264, 2008. DOI: 10.1016/j.tins.2008.02.006.

GASS, J. T.; CHANDLER, L. J. The plasticity of extinction: contribution of the prefrontal cortex in treating addiction through inhibitory learning. Frontiers in Psychiatry, v. 4, art. 46, 2013. DOI: 10.3389/fpsyt.2013.00046.

GEOFFROY, H. et al. Morphine-induced dendritic spine remodeling in rat nucleus accumbens is corticosterone dependent. International Journal of Neuropsychopharmacology, v. 22, n. 6, p. 394–401, 2019. DOI: 10.1093/ijnp/pyz014.

GIBB, R.; KOLB, B. A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. Journal of Neuroscience Methods, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 1–4, 1998.

GOMES-RIBEIRO, J. et al. Mapping functional traces of opioid memories in the rat brain. Brain Communications, v. 6, n. 5, art. fcae281, 2024. DOI: 10.1093/braincomms/fcae281.

GROENEWEG, F. L. et al. Gephyrin: a key regulatory protein of inhibitory synapses and beyond. Histochemistry and Cell Biology, v. 150, n. 5, p. 489–508, 2018. DOI: 10.1007/s00418-018-1725-2.

GUEGAN, T. et al. Morphine-induced locomotor sensitization produces structural plasticity in the mesocorticolimbic system dependent on CB1-R activity. Addiction Biology, v. 21, n. 6, p. 1113–1126, 2016. DOI: 10.1111/adb.12281.

HEARING, M. Prefrontal-accumbens opioid plasticity: implications for relapse and dependence. Pharmacological Research, v. 139, p. 158–165, 2019. DOI: 10.1016/j.phrs.2018.11.012.

HEINSBROEK, J. A. et al. A common limiter circuit for opioid choice and relapse identified in a rodent addiction model. Nature Communications, v. 12, art. 4788, 2021.

HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C.; NESTLER, E. J. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. Annual Review of Neuroscience, Palo Alto, v. 29, p. 565–598, 2006.

HÁMOR, P. U. et al. Morphine-context associative memory and locomotor sensitization in mice are modulated by sex and context in a dose-dependent manner. bioRxiv, preprint 2023.11.03.565492, 2023. DOI: 10.1101/2023.11.03.565492.

IMPERIO, C. G.; LEVIN, F. R.; MARTINEZ, D. The neurocircuitry of substance use disorder, treatment, and change: a resource for clinical psychiatrists. American Journal of Psychiatry, v. 181, p. 958–972, 2024.

JOHNSON, S. W.; NORTH, R. A. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. The Journal of Neuroscience, v. 12, n. 2, p. 483–488, 1992.

KANG, H. W. et al. Comprehensive review of Golgi staining methods for nervous tissue. Applied Microscopy, v. 47, n. 2, p. 63–69, 2017. DOI: 10.9729/AM.2017.47.2.63.

KASARAGOD, V. B.; SCHINDELIN, H. Structure-function relationships of gephyrin. Frontiers in Molecular Neuroscience, Lausanne, v. 11, p. 1–15, 2018.

KOEHL, A. et al. Structure of the mu-opioid receptor-Gi protein complex. Nature, v. 558, n. 7711, p. 547–552, 2018. DOI: 10.1038/s41586-018-0219-7.

KOLB, B.; MCCLIMANS, J. C. Golgi staining techniques for dendritic analysis. Behavioural Brain Research, Amsterdam, v. 20, p. 37–44, 1986.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. The Lancet Psychiatry, London, v. 3, n. 8, p. 760–773, 2016.

LATTAL, K. M.; LATTAL, K. A. Facets of Pavlovian and operant extinction. Behavioural Processes, Amsterdam, v. 90, n. 1, p. 1–8, 2012.

LEFEVRE, E. M. et al. Differential patterns of synaptic plasticity in the nucleus accumbens caused by continuous and interrupted morphine exposure. The Journal of Neuroscience, v. 43, n. 2, p. 308–318, 2023. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0595-22.2022.

LYNCH, J. W. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. Physiological Reviews, Bethesda, v. 84, n. 4, p. 1051–1095, 2004.

LÜSCHER, C.; MALENKA, R. C. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction. Neuron, Cambridge, v. 69, n. 4, p. 650–663, 2011.

MACHA, A. et al. Gephyrin filaments represent the molecular basis of inhibitory postsynaptic densities. Nature Communications, v. 16, art. 8293, 2025. DOI: 10.1038/s41467-025-63748-w.

MADHAVAN, A.; BONCI, A.; WHISTLER, J. L. Opioid-induced GABA potentiation after chronic morphine attenuates the rewarding effects of opioids in the ventral tegmental area. The Journal of Neuroscience, v. 30, n. 42, p. 14029–14035, 2010. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3366-10.2010.

MATSUI, A. et al. Separate GABA afferents to dopamine neurons mediate acute action of opioids, development of tolerance, and expression of withdrawal. Neuron, v. 82, n. 6, p. 1346–1356, 2014.

MULLER, D. L.; UNTERWALD, E. M. In vivo regulation of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) and protein kinase B (Akt) phosphorylation by acute and chronic morphine. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 310, n. 2, p. 774–782, 2004.

PAUL, A. K.; GUEVEN, N.; DIETIS, N. Profiling the effects of repetitive morphine administration on motor behavior in rats. Molecules, v. 26, n. 14, art. 4355, 2021. DOI: 10.3390/molecules26144355.

PETERS, J.; KALIVAS, P. W.; QUIRK, G. J. Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. Learning & Memory, v. 16, n. 5, p. 279–288, 2009.

PETERS, J.; LALUMIERE, R. T.; KALIVAS, P. W. Infralimbic prefrontal cortex is responsible for inhibiting cocaine seeking in extinguished rats. Journal of Neuroscience, v. 28, n. 23, p. 6046–6053, 2008.

PIZZARELLI, R. et al. Tuning GABAergic inhibition: gephyrin molecular organization and functions. Neuroscience, v. 439, p. 125–136, 2020. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2019.07.036.

POULOPOULOS, A. et al. Neuroligin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. Neuron, v. 63, n. 5, p. 628–642, 2009. DOI: 10.1016/j.neuron.2009.08.023.

QUIRK, G. J.; MUELLER, D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. Neuropsychopharmacology, London, v. 33, n. 1, p. 56–72, 2008.

RISHER, W. C. et al. Rapid Golgi analysis method for efficient and unbiased classification of dendritic spines. PLOS ONE, v. 9, n. 9, art. e107591, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0107591.

ROBINSON, T. E.; KOLB, B. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. Neuropharmacology, Oxford, v. 47, p. 33–46, 2004.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. Review: the incentive sensitization theory of addiction. Philosophical Transactions of the Royal Society B, London, v. 363, n. 1507, p. 3137–3146, 2008.

RUSSO, S. J. et al. The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. Trends in Neurosciences, Amsterdam, v. 33, n. 6, p. 267–276, 2010.

SOLA, M. et al. Structural basis of gephyrin organization. The EMBO Journal, Oxford, v. 23, n. 12, p. 2510–2519, 2004.

SOYKAN, T. et al. A conformational switch in collybistin determines the differentiation of inhibitory postsynapses. The EMBO Journal, v. 33, n. 18, p. 2113–2133, 2014. DOI: 10.15252/embj.201488143.

SPECHT, C. G. et al. Quantitative nanoscopy of inhibitory synapses: counting gephyrin molecules and receptor binding sites. Neuron, v. 79, n. 2, p. 308–321, 2013. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.05.013.

SPIGA, S. et al. Morphological plasticity induced by drugs of abuse. European Neuropsychopharmacology, Amsterdam, v. 21, n. 6, p. 457–467, 2011.

STEKETEE, J. D.; KALIVAS, P. W. Drug wanting: behavioral sensitization and relapse. Pharmacological Reviews, Bethesda, v. 63, n. 2, p. 348–365, 2011.

SWINGLER, M. et al. Molecular and cellular basis of mu-opioid receptor signaling: mechanisms underlying tolerance and dependence development. Frontiers in Neuroscience, v. 19, art. 1597922, 2025. DOI: 10.3389/fnins.2025.1597922.

THOMPSON, B. L.; OSCAR-BERMAN, M.; KAPLAN, G. B. Opioid-induced structural and functional plasticity of medium-spiny neurons in the nucleus accumbens. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v. 120, p. 417–430, 2021. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2020.10.015.

TODDES, C. et al. Mu-opioid receptor (Oprm1) copy number influences nucleus accumbens microcircuitry and reciprocal social behaviors. The Journal of Neuroscience, v. 41, n. 38, p. 7965–7977, 2021. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2440-20.2021.

TRASK, S.; THRAILKILL, E. A.; BOUTON, M. E. Occasion setting, inhibition, and the contextual control of extinction in Pavlovian and instrumental (operant) learning. Behavioural Processes, v. 137, p. 64–72, 2017. DOI: 10.1016/j.beproc.2016.10.003.

TRETTER, V. et al. Gephyrin, the enigmatic organizer at GABAergic synapses. Frontiers in Cellular Neuroscience, v. 6, art. 23, 2012.

TYAGARAJAN, S. K. et al. Regulation of GABAergic synapse formation and plasticity by GSK3β-dependent phosphorylation of gephyrin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 108, n. 1, p. 379–384, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1011824108.

TYAGARAJAN, S. K. et al. Extracellular signal-regulated kinase and glycogen synthase kinase 3β regulate gephyrin postsynaptic aggregation and GABAergic synaptic function in a calpain-dependent mechanism. Journal of Biological Chemistry, v. 288, n. 14, p. 9634–9647, 2013. DOI: 10.1074/jbc.M112.442616.

TYAGARAJAN, S. K.; FRITSCHY, J. M. Gephyrin: a master regulator of neuronal function? Nature Reviews Neuroscience, London, v. 15, n. 3, p. 141–156, 2014.

VALJENT, E. et al. Mechanisms of locomotor sensitization to drugs of abuse in a two-injection protocol. Neuropsychopharmacology, v. 35, n. 2, p. 401–415, 2010. DOI: 10.1038/npp.2009.143.

VANDERSCHUREN, L. J. M. J.; KALIVAS, P. W. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization. Psychopharmacology, Berlin, v. 151, n. 2–3, p. 99–120, 2000.

VERVLIET, B.; CRASKE, M. G.; HERMANS, D. Fear extinction and relapse: state of the art. Annual Review of Clinical Psychology, v. 9, p. 215–248, 2013.

VOLKOW, N. D.; MICHAELIDES, M.; BALER, R. The neuroscience of drug reward and addiction. Physiological Reviews, Bethesda, v. 99, n. 4, p. 2115–2140, 2019.

WILLIAMS, J. T. et al. Regulation of mu-opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. Pharmacological Reviews, v. 65, n. 1, p. 223–254, 2013. DOI: 10.1124/pr.112.005942.

ZAQOUT, S.; KAINDL, A. M. Golgi-Cox staining step by step. Frontiers in Neuroanatomy, v. 10, art. 38, 2016. DOI: 10.3389/fnana.2016.00038.

ZEILHOFER, H. U. et al. Glycine receptors and glycine transporters: targets for novel analgesics? Cellular and Molecular Life Sciences, v. 75, n. 3, p. 447–465, 2018. DOI: 10.1007/s00018-017-2622-x.

ZHONG, F. et al. Step by step Golgi-Cox staining for cryosection. Frontiers in Neuroanatomy, v. 13, art. 62, 2019. DOI: 10.3389/fnana.2019.00062.

ZHUANG, Y. et al. Molecular recognition of morphine and fentanyl by the human muopioid receptor. Cell, v. 185, n. 23, p. 4361–4375.e19, 2022. DOI: 10.1016/j.cell.2022.09.041.