

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO - UENF

JAISE SILVA FERREIRA

**EFEITO DA NOVIDADE E DO CONTRACONDICIONAMENTO NO  
DESENVOLVIMENTO E NA EXPRESSÃO DE UMA RESPOSTA  
LOCOMOTORA CONDICIONADA E SENSIBILIZADA  
PRODUZIDA POR MORFINA EM RATOS**

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

MARÇO DE 2020

**JAISE SILVA FERREIRA**

**EFEITO DA NOVIDADE E DO CONTRACONDICIONAMENTO NO  
DESENVOLVIMENTO E NA EXPRESSÃO DE UMA RESPOSTA  
LOCOMOTORA CONDICIONADA E SENSIBILIZADA  
PRODUZIDA POR MORFINA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na área de Produção, Reprodução e Saúde Animal.

ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> D. Sc. Marinete Pinheiro Carrera

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

25 de março de 2020

**JAISE SILVA FERREIRA**

**EFEITO DA NOVIDADE E DO CONTRACONDICIONAMENTO NO  
DESENVOLVIMENTO E NA EXPRESSÃO DE UMA RESPOSTA  
LOCOMOTORA CONDICIONADA E SENSIBILIZADA  
PRODUZIDA POR MORFINA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na área de Produção, Reprodução e Saúde Animal.

Aprovado em 25 de março de 2020.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Breno Garone dos Santos (D. Sc. Ciência Animal – UENF)

---

Flávia Regina Cruz Dias (D. Sc. Ciência Animal – UENF)

---

Rosemary Bastos (D. Sc. Fisiologia – USP)

---

Marinete Pinheiro Carrera (D. Sc. Psicobiologia – USP)

**ORIENTADORA**

À minha mãe, Josila (*in memoriam*), por todo esforço feito para que todos os seus filhos conquistassem o ensino superior.

Ao meu marido Marcelo e às minhas filhas Alice e Bianca que são a base da minha vida.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me permitido chegar até aqui, sempre me amparando em todos os momentos de minha vida;

Agradeço ao meu marido, amigo e companheiro, Marcelo, por todo apoio e incentivo de sempre e pela compreensão, amor e carinho;

Agradeço às minhas filhas Alice e Bianca pelo apoio, incentivo, ajuda, amor, carinho e compreensão em todo esse tempo;

Agradeço à minha orientadora, professora Dr<sup>a</sup> Marinete Pinheiro Carrera, por todos os ensinamentos, pela importante orientação, pela dedicação e por fazer eu me apaixonar mais ainda pela pesquisa;

Agradeço imensamente aos meus colegas do laboratório, pela receptividade, pelo aprendizado, pela ajuda, pela solidariedade, pelo carinho com que me receberam. Serei eternamente grata a vocês!

Agradeço aos meus sogros, Ailton e Graça pelo carinho, dedicação e cuidado comigo e com a minha família;

Agradeço às minhas amigas, Sílvia Menezes e Inez Barcelos, por toda ajuda, apoio e amizade por todo esse tempo;

Agradeço aos professores da banca, pela disponibilidade e participação na avaliação deste trabalho;

Agradeço à Joana do biotério central da UENF, pela gentileza e disponibilidade em nos atender;

Agradeço à Jovana Ferraz Cerqueira Campos e à Conceição Custódio dos Santos, da coordenação da pós-graduação em ciência animal, por me atender sempre com disponibilidade e gentileza;

Agradeço à UENF e ao CCTA, por essa experiência fantástica em minha vida.

## RESUMO

A dependência química é uma doença crônica com possibilidade constante de recaídas e a morfina é um fármaco usado para tratamento de dor, com alto potencial para dependência, e aumenta a liberação de dopamina nas vias mesolímbicas e mesocorticais, regiões relacionadas à recompensa, prazer e compulsão. Estudos mostraram que o condicionamento, sensibilização comportamental e o ambiente novo estão envolvidos na dependência química. O condicionamento é um tipo de aprendizagem associativa resultante da interação de um estímulo com o ambiente. A sensibilização é caracterizada pelo aumento de uma determinada resposta comportamental quando se administra a mesma dose de uma droga, e a novidade atua como efeito de reforço no uso de drogas de abuso. O condicionamento Pavloviano de traço é um protocolo no qual o estímulo condicionado termina antes do início da apresentação do estímulo incondicionado, e útil em estudos da dependência química. O contracondicionamento é um método terapêutico que atua, substituindo resposta inicialmente produzida por uma resposta nova e oposta. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da novidade no desenvolvimento e na expressão do condicionamento e sensibilização produzidos pela morfina (experimento 1) e a utilização do contracondicionamento na atenuação dessa resposta (experimento 2). O experimento 1 é composto de 2 fases: na fase 1, um grupo dos ratos foi colocado na arena para sessão experimental de 5 minutos, recebendo veículo antes e após a sessão por 10 dias; a fase 2 foi dividida em 3 etapas: a primeira fase de indução, na qual todos os animais receberam veículo antes da sessão de 5 minutos, e em seguida, 4 grupos receberam veículo e 4 grupos receberam morfina 10mg/kg, por 5 dias; fase de condicionamento, na qual todos animais receberam veículo antes e após a sessão de 5 minutos, por 5 dias, e em seguida foram 2 dias de retirada; e finalizando, os animais receberam veículo antes da sessão para o teste final de 30 minutos. O experimento 2 constituiu de 3 fases: fase da indução, onde todos receberam veículo antes da sessão de 5 minutos e, em seguida, 4 grupos receberam veículo e 4 grupos receberam morfina 10 mg/kg, por 5 dias; fase de contracondicionamento, na qual todos receberam veículo antes da sessão de 5 minutos, e após 4 grupos receberam veículo e 4

grupos receberam apomorfina 0,05 mg/kg, sendo que uma parte dos animais recebeu o tratamento imediatamente após a sessão, e outra parte recebeu 15 minutos após a sessão, durante dias. Após 2 dias de retirada foi realizado teste de condicionamento por um dia, no qual os animais receberam veículo previamente à sessão de 30 minutos, mostrando que, nos grupos que se utilizou o protocolo de contracondicionamento imediatamente após a sessão, atenuou-se a resposta locomotora. Os resultados mostraram que a novidade inicialmente desperta comportamento exploratório do animal ocorrendo declínio com a habituação e que o ambiente novo funciona como reforço associado ao uso da morfina, intensificando a resposta locomotora condicionada e sensibilizada. O contracondicionamento pode ser uma importante ferramenta no protocolo de tratamento da dependência química.

**Palavras chave:** Dependência química, Condicionamento Pavloviano de Traço, Novidade, Contracondicionamento, Morfina.

## ABSTRACT

Addiction is a chronic disease with a constant possibility of relapse by patients and morphine is a drug used to treat pain, with high potential for dependence, and increases dopamine release in the mesolimbic and mesocortical pathways, regions related to reward pleasure and compulsion. Studies have shown that conditioning, behavioral sensitization, and the new environment are involved in chemical dependence. Conditioning is a type of associative learning resulting from the interaction of a stimulus with the environment. Sensitization is characterized by the increase in a particular behavioral response when administering the same dose of a drug, and novelty acts as a strengthening effect on the use of drugs of abuse. Pavlovian stroke conditioning is a protocol in which the conditioned stimulus ends before the beginning of the presentation of the unconditioned stimulus, and useful in chemical dependence studies. Counterconditioning is a therapeutic method that acts by replacing a response initially produced with a new and opposite response. This work aimed to evaluate the effect of novelty on the development and expression of conditioning and sensitization produced by morphine (experiment 1) and the use of counterconditioning in the attenuation of this response (experiment 2). Experiment 1 consisted of 2 phases, in phase 1 a group of rats was placed in the arena for an experimental session of 5 minutes, receiving vehicle before and after the session for 10 days; phase 2 was divided into 3 stages, the first induction phase, in which all animals received a vehicle before the 5-minute session, and after 4 groups they received a vehicle and 4 groups received morphine 10mg/kg for 5 days; conditioning phase, in which all animals received vehicle before and after the 5-minute session for 5 days, and then were 2 days of withdrawal, and finishing the animals received vehicle before the session for the final test of 30 minutes. Experiment 2 consisted of 3 phases: induction phase, where everyone received vehicle before the 5-minute session after 4 groups received a vehicle and 4 groups received morphine 10 mg/kg for 5 days; counterconditioning phase, in which all received vehicle before the 5-minute session, and after 4 groups received the vehicle and 4 groups received apomorphine 0.05 mg/kg, and part of the animals received treatment immediately after the session and another part received 15 minutes after the session for 5 days. After 2 days of withdrawal, a one-day conditioning test was performed, in which the animals received a vehicle

before the 30-minute session, showing that in the groups that used the counterconditioning protocol immediately after the session, the locomotor response was reduced. The results showed that the novelty initially arouses exploratory behavior of the animal occurring decline with habituation and that the new environment acts as a reinforcement associated with the use of morphine, intensifying the conditioned and sensitized locomotor response. Counterconditioning can be an important tool in the chemical dependence treatment protocol.

**Keywords:** chemical addiction, pavlovian trace conditioning, novelty, counterconditioning, morphine.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistemas Dopaminérgicos.....	32
Figura 2: Fórmula Estrutural da Morfina.....	35
Figura 3 Estrutura Química da Apomorfina.....	38
Figura 4 Ilustração da arena dividida em zonas.....	41
Figura 5 Experimento 1: Fase de Habituação.....	52
Figura 6 Experimento 1: Fase de Indução.....	54
Figura 7 Experimento 1: Fase de Condicionamento.....	55
Figura 8 Experimento 1: Teste Final.....	57
Figura 9 Experimento 2: Fase de Indução.....	59
Figura 10 Experimento 2: Contracondicionamento Dia 1.....	60
Figura 11 Experimento 2: Teste de Condicionamento.....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Linha do Tempo do Experimento 1.....	44
Tabela 2 Grupos do Experimento 1 .....	45
Tabela 3 Linha Temporal do Experimento 2.....	49
Tabela 4 Grupos do Experimento 2.....	49

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS GERAIS.....</b>	<b>15</b>
2.1 Objetivos Específicos.....	15
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
3.1 Condicionamento Pavloviano.....	16
3.2 Contracondicionamento.....	21
3.3 Sensibilização Comportamental.....	22
3.4 Novidade e Habituação.....	25
3.5 Consolidação e Reconsolidação da Memória.....	27
3.6 Sistema Dopaminérgico.....	31
3.7 Morfina.....	34
3.8 Apomorfina.....	38
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
4.1 Sujeitos.....	40
4.2 Ambiente Experimental.....	40
4.3 Quantificação Comportamental.....	41
4.4 Fármacos Utilizados.....	42
4.5 Experimento 1.....	42
4.5.1 Fase 1 – Conhecendo a arena.....	43
4.5.2 Fase 2 .....	43
4.6 Experimento 2.....	45
4.7 Estatística.....	50
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
5.1 Experimento 1.....	51
5.2 Experimento 2.....	58
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
6.1 Experimento 1.....	63
6.2 Experimento 2.....	70
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>

<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>76</b>
<b>9. ANEXO.....</b>	<b>86</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A dependência química é uma doença crônica, progressiva e com elevado potencial para recaída entre os indivíduos dependentes. (BASTOS, 2014; ZOU, 2017). Alterações em sistemas mediados por vários neurotransmissores, como dopamina e peptídeos opioides, estão relacionadas à vulnerabilidade da recaída na dependência química em humanos (UNODC, 2019). Dados atuais sobre os números de usuários de drogas como morfina, feito pelo UNODC (*United Nations Office on Drugs and Crime*), sugerem que o cenário mudou pouco nos últimos anos e que o consumo de opioides ainda é de grande prevalência, permeando em torno de 0,6% da população global, afetando pessoas de idades entre 15 e 64 anos. De 2013 a 2017, a taxa de mortalidade por overdose aumentou significativamente, representando cada vez mais uma ameaça à saúde do indivíduo dependente e da sociedade (UNODC, 2019).

As drogas psicoativas produzem neuroadaptações neurais, e atuam nas vias dopaminérgicas de recompensa e prazer no sistema nervoso central, alteram o sistema de motivação e produzem a sensação de prazer, podendo levar ao uso compulsivo da substância de abuso. A manutenção no uso das drogas ocorre em função de diversos motivos como a predisposição genética, perfil psicológico, contexto sociocultural e exposição ao fármaco. A dependência se instala quando as substâncias conseguem transformar, estímulo contextual contíguo em estímulo condicionado e de incentivo, responsáveis por motivar e manter comportamentos de dependência.

As pistas contextuais continuamente associadas ao uso de substância psicoativa ou de abuso adquirem propriedade de incentivo, reforçando a utilização das mesmas. Devido ao aumento da atividade da dopamina no sistema mesolímbico e mesocortical, uma futura exposição ao ambiente associado à droga pode ser suficiente para evocar uma resposta condicionada mesmo sem a administração da substância de abuso. Alguns estudos caracterizam a dependência química como uma doença que envolve aprendizagem e memória. Após consolidação desse aprendizado, através da memória, o ambiente influencia o indivíduo para a recaída (PAVLOV, 1927). O'Brien (1975), em

conjunto com Wikler (1973), alertaram sobre os efeitos do condicionamento no processo da dependência.

O condicionamento é um fator relevante na dependência química, considerado um tipo de aprendizagem associativa, na qual uma mudança comportamental é expressa pelo indivíduo como resultado de sua interação com o ambiente (SANCHIS e SPANALGEL, 2006). Drogas de abuso frequentemente induzem o condicionamento associadas aos ambientes. As drogas psicoativas estimulam as vias dos sistemas dopaminérgicos mesolímbico e mesocortical, e a presença do hipocampo nesse sistema é responsável pelo aprendizado e memória, favorecendo a dependência química. É fato que associações de droga x ambiente têm papel chave na dependência química e recaída.

Outro processo envolvido no uso repetido de drogas psicoativas é a sensibilização comportamental, que é um tipo de aprendizagem não associativa caracterizada por um modelo de neuroplasticidade, e os estímulos promovidos pelas substâncias psicoativas transformam estes estímulos simples em grandes incentivadores ao vício e à recaída, sendo intensificados em caso de pistas contextuais associadas com a droga, fatores importantes na manutenção da dependência química (ROBINSON e BERRIDGE, 1993; BENINGER e MILLER, 1998).

Todos os animais, inclusive o homem, reagem a eventos em seu ambiente, promovendo respostas de acordo com a natureza dos estímulos. Estudos consideram a habituação como a forma mais elementar de aprendizagem não associativa, produzindo diminuição na resposta causada pela repetição de um estímulo. Pesquisas sugerem que o ambiente novo exerce um efeito de reforço no uso de drogas de abuso, atuando como motivação pela busca da recompensa despertada pelo fator da novidade (TODOROV, 1991; SATO, 1995). Alguns estudos relataram que a resposta locomotora induzida pela cocaína em ambientes novos comparada a ambientes familiares foi bem maior, com alterações cerebrais duradouras (CAREY et al., 2008). A novidade reforça a resposta condicionada produzida por drogas psicoativas (XIGENG et al., 2003).

A morfina é um opiáceo utilizado para controlar dores severas e apresenta fortes efeitos nos sistemas de recompensa. A morfina se liga aos receptores  $\mu$  (mu) opioides que estão acoplados à proteína G, e reações subsequentes

ocorrem culminando com a inibição da liberação de alguns neurotransmissores, como o GABA, que com sua ação inibitória propicia um aumento da dopamina nas vias mesolímbicas e mesocorticais (CHEN et al., 2015; MORI et al., 2016).

Recentemente, em estudos realizados pelo nosso grupo do laboratório, verificou-se que a morfina produz resposta condicionada ao aumento da atividade locomotora em breves exposições no ambiente de teste, utilizando protocolo de condicionamento de traço (OLIVEIRA et al., 2019). Outros estudos recentes do nosso laboratório demonstraram a capacidade da apomorfina, na dose de 0,05 mg/Kg, de atenuar uma resposta locomotora condicionada e sensibilizada produzida previamente por morfina 10 mg/kg (LEITE JÚNIOR et al., 2019), como também Santos e colaboradores (2018) relataram que apomorfina em baixa dose (0,05 mg/kg) administrada imediatamente após a sessão experimental atenuou resposta locomotora dos animais, sugerindo redução da atividade de dopamina durante a consolidação da memória.

Adicionalmente, estudos do nosso laboratório demonstraram que o contracondicionamento é um método terapêutico, eficaz no tratamento de recaídas por drogas de abuso que utiliza, através de um novo processo de aprendizagem com nova associação, a substituição de uma resposta prévia por uma resposta nova e oposta. Nesse contexto, partimos da premissa que uma resposta condicionada induzida por morfina, a partir de breves testes em ambiente novo, utilizando o condicionamento de traço, poderia ser substituída por uma resposta hipolocomotora, utilizando o protocolo do contracondicionamento com apomorfina em baixa dose.

Nesse contexto, o presente estudo buscou avaliar a associação da novidade ambiental como reforçadora na aprendizagem associativa, como potencialmente importantes nos processos de comportamento condicionado promovido pelas drogas de abuso, como também, o protocolo de contracondicionamento como método de atenuar resposta locomotora condicionada pela morfina, utilizando a apomorfina 0,05 mg/kg.

## **2. OBJETIVOS GERAIS**

Verificar o efeito da novidade no desenvolvimento e na expressão do condicionamento e sensibilização e, também, o papel da inibição dopaminérgica na expressão do condicionamento produzido por morfina.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito do ambiente novo no desenvolvimento de uma resposta locomotora sensibilizada e na expressão de uma resposta locomotora condicionada produzida por morfina na dose de 10 mg/kg, utilizando-se um modelo de condicionamento Pavloviano de traço;
- Avaliar se a utilização de um protocolo de contracondicionamento com apomorfina 0,05 mg/kg atenuará uma resposta locomotora condicionada por morfina 10 mg/kg.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. CONDICIONAMENTO PAVLOVIANO

O condicionamento é descrito como um método de aprendizagem onde ocorre uma variação comportamental dos sujeitos pela influência de sua relação com o ambiente (BEAVER, 2001).

Pavlov, fisiologista russo, foi quem presumiu no ano de 1927, que o aprendizado se embasava no condicionamento. Seu experimento fundamentou-se pela observação de um cão diante de um estímulo neutro (EN), o som de uma sineta, que era associado à apresentação de comida, sendo a comida um estímulo incondicionado (EI). Pavlov tocava o sino, apresentava a comida e observava os efeitos como a sialorreia, sendo este um comportamento inato sob a condição da visão da comida, na qual chamou inicialmente de resposta incondicionada (RI). Após repetidas associações (sineta + comida) o animal passou a salivar apenas com o som da sineta. Pavlov percebeu ao longo do experimento, que outros estímulos poderiam promover esses efeitos como a luz, o odor, o barulho dos passos dele e o toque na pele. O estímulo que inicialmente era neutro, pois gerava uma resposta inespecífica, não produzia sialorreia e tornou-se um estímulo condicionado (EC); e a salivação, induzida pelo som da sineta, tornou-se uma resposta condicionada (RC) (PAVLOV, 1927; GANTT, 1927; MCKIN, 2013; CAREY et al., 2014).

O condicionamento pode ser classificado por duas linhas: condicionamento clássico ou pavloviano, e outra nomeada condicionamento operante ou instrumental. Tanto o condicionamento clássico quanto o operante são considerados processos de aprendizagem associativa e é sob essas condições que o animal pode aprender uma nova resposta (SANCHIS e SPANALGEL, 2006).

O condicionamento operante é um método de aprendizado que ocorre através de recompensas e punições para o comportamento. Assim, o sujeito age sobre o ambiente, de modo a gerar consequências (SANCHIS e SPANALGEL, 2006). Nesse condicionamento, há a necessidade de se ter a resposta para que possa liberar o EI (CAREY et al., 2014), com chances de aumento de recidivas de um determinado comportamento cujas consequências sejam aprazíveis, fato

comum de acontecer em casos de administração ativa de usuários de cocaína, intensificada pelas sensações prazerosas (BASTOS, 2014; SANTOS, 2015).

O condicionamento clássico é um método inconsciente e interessante para estudos de aprendizagem, memória e emoção em animais (BOUTON e MOODY, 2004). É um recurso utilizado para a aprendizagem que requer a obtenção e o acúmulo de conhecimentos com valores emocionais e relacionados com alterações comportamentais (NEES et al., 2015). Nesse condicionamento, emparelham-se dois estímulos com apelos diferentes, um incondicionado e outro condicionado, aplicados num prazo de tempo próximo e repetidas vezes, e como produto obtém-se uma resposta comportamental equivalente ao EI (CAREY et al., 2014). É uma forma de aprendizagem que associa a relação entre o estímulo ambiental neutro à resposta incondicionada. Nesse processo, uma resposta espontânea é associada aos estímulos considerados neutros de forma repetitiva. Ao ser apresentado sozinho, o estímulo neutro é capaz de produzir uma resposta semelhante à resposta espontânea (BASTOS, 2014; SANTOS, 2015). A rotina na administração crônica de medicamentos sugere o desenvolvimento de uma resposta condicionada, sendo que essa resposta pode atuar como reforçadoras na sensibilização induzida pelos medicamentos, o mesmo ocorrendo no caso de consumo de drogas de abuso (EIKELBOOM e STEWART, 1982).

O condicionamento pavloviano, ou clássico é classificado em condicionamento de traço e de atraso diferindo na relação temporal de apresentação dos estímulos incondicionados (EI) e estímulos condicionados (EC). Ambos promovem uma aprendizagem associativa, mas empregam substratos neurais diferentes. O condicionamento de atraso ocorre quando há uma sobreposição dos estímulos, no qual a apresentação do EI antecede a apresentação do EC e ambos os estímulos persistem juntos por um período, sendo finalizados no mesmo momento. Aplica-se o tratamento com a droga (EI) antes de o animal ser colocado na arena teste. Assim, o animal experimenta os efeitos da droga no ambiente teste (CAREY et al., 2014).

No condicionamento de traço há uma diferença do momento da apresentação dos estímulos. Pavlov apontou que neste tipo de condicionamento, o EC é apresentado e finalizado e posteriormente EI é exibido. O intervalo entre as duas apresentações deve ser breve a ponto de formar uma associação (KRYUKOV, 2012; CAREY et al., 2014; SANTOS et al., 2017). Ocorre a

implantação de intervalo de tempo ou, também, denominado de intervalo de traços entre a exposição do EC e a apresentação do EI (COONOR e GOULD, 2016). Pavlov revelou que neste modelo de condicionamento há um traço discreto transitório do EC que persiste no sistema nervoso central, podendo se associar ao EI (KRYUKOV, 2012; CAREY et al., 2014; SANTOS et al., 2017). Pavlov (1927) argumentou que a aprendizagem associativa no condicionamento de traço decorre de um resquício de estímulo no sistema nervoso, que sobrevive num tempo adequado e que não desaparece com o fim do estímulo físico (PAVLOV, 1927, apud KRYUKOV, 2012).

A variação de tempo de apresentação dos estímulos modifica a força da associação do EC e EI, ocorrendo uma diminuição da resposta condicionada (RC) à medida que o intervalo temporal aumenta (PAVLOV, 1927). Apesar de utilizarem mecanismos associativos diferentes para aprendizagem, o condicionamento de traço e o condicionamento de atraso geram respostas comportamentais semelhantes (COONOR e GOULD, 2016). No condicionamento clássico de atraso ocorre a constatação do efeito da droga no ambiente teste, na associação direta do EI com o EC. Entretanto, no condicionamento clássico de traço, a avaliação da ação da droga associada ao ambiente não são experimentadas de maneira imediata e, sim, em testes ou exposições subsequentes (OLIVEIRA et al., 2019).

Alguns trabalhos de nosso laboratório demonstraram que com a aplicação do fármaco apomorfina, que é um agonista dopaminérgico, imediatamente após o término da sessão experimental, ocorreu o desenvolvimento de uma resposta locomotora condicionada e sensibilizada (BASTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2015).

Pesquisas no nosso laboratório com apomorfina, utilizando o condicionamento clássico de traço, demonstraram que os efeitos observados asseguram a consolidação dos processos através da memória. Experimentou-se a apomorfina nas doses de 0,05mg/Kg, que apresenta uma ação inibitória na locomoção (ação autoreceptora), e na dose de 2,0mg/Kg, que aumenta a atividade locomotora do animal (ação pós-sináptica). Ambos os tratamentos foram aplicados imediatamente após o animal passar pela sessão de teste num ambiente novo. Os resultados demonstraram uma hipoatividade locomotora da apomorfina de 0,05mg/kg e a hiperatividade para apomorfina de 2,0mg/Kg.

Nesse experimento separou-se um grupo para receber o tratamento após 15 minutos de saída do ambiente-teste. Os animais desse grupo não manifestaram alteração na atividade locomotora, apresentando um comportamento locomotor similar ao grupo que recebeu apenas solução salina. Vale ressaltar que esses resultados se aplicaram para os testes no qual o ambiente representava uma novidade. Quando o ambiente é previamente habituado aos ratos, subsequentemente, os tratamentos após o teste na arena não são capazes de gerar uma resposta condicionada (DAMIANOPOULOS e CAREY, 1992; BASTOS et al., 2014; LEITE JUNIOR et al., 2018; SANTOS et al., 2018).

É aceitável que o condicionamento de atraso com estímulos pontuais condicionados promova suas ações através de mecanismos cerebelares, qualificados como área de aprendizagem reflexiva, ao passo que o mecanismo envolvido com o condicionamento de traço seja através do córtex pré-frontal e hipocampo, regiões envolvidas com comportamentos voluntários (CAREY et al., 2014; SANTOS, 2015).

Na dependência química há a associação dos efeitos da droga de abuso (EI) com o ambiente (EN), e com a repetição dessa associação, o ambiente será capaz de produzir os efeitos da droga mesmo sem sua presença (BASTOS, 2014). Robinson e Berridge (1993) afirmaram que as lembranças das pistas contextuais associadas ao uso de drogas de abuso são gatilhos para a modulação do condicionamento comportamental.

É comprovado que o uso repetido de drogas psicoativas provoca sensibilização com compulsão associada aos estímulos ambientais e ao aumento dos efeitos das drogas (CAREY et al., 2014). Incentivos contextuais condicionados são capazes de atuar como uma alavanca no indivíduo e estimular o desejo pelo consumo da droga mesmo após longos períodos sem consumo.

Bevins e Bardo (1999) relataram que no experimento, no qual ratos e camundongos experimentaram repetidamente dois ambientes neutros diferentes, pareados, com momentos de uso de drogas e sem uso de drogas, na fase pós-condicionamento, na qual o animal poderia escolher o local que poderia ficar. O favoritismo ficou para o local da caixa que anteriormente foi associada ao uso de drogas de abuso como cocaína, morfina, anfetamina, entre outros. Além disso, Ehrman e colaboradores (1992) relataram que, em estudos, os

históricos de incentivos associados ao uso de drogas de abuso estimulam respostas subjetivas e fisiológicas, o mesmo não ocorrendo com o grupo controle, no qual não recebia nenhuma droga.

Os efeitos promovidos pelas drogas psicoativas têm a participação nas vias dopaminérgicas relacionadas com o circuito de recompensa, que quando ativado por agonistas diretos, como a apomorfina, e por agonistas indiretos, como metilfenidato, e associado aos estímulos do ambiente, torna o estímulo ambiental neutro em condicionado, despertando o consumo e a busca pela droga (CAREY et al., 2014).

A ativação da resposta locomotora condicionada às pistas contextuais induzidas por drogas com ação dopaminérgica, é objeto de estudo de vários pesquisadores com o objetivo de esclarecer a modificação comportamental desenvolvido pelo uso condicionado de drogas (ANAGNOSTARAS e ROBINSON, 1996; CAREY e GUI, 1998; OLIVEIRA et al., 2019).

Kalivas e O'Brien (2008) dissertaram que os circuitos cerebrais sofrem alterações pela interação intensa com as drogas de abusos utilizadas associadas às pistas ambientais. A adaptação neuronal pode ser transitória ou duradoura, sendo que na condição duradoura há característica do vício. O organismo se reorganiza para executar as tarefas diante do aprendizado estabelecido pelo condicionamento desenvolvido.

Estudos sobre os papéis desenvolvidos pelos neurotransmissores, como atores importantes no desenvolvimento da memória e execução dos comportamentos adquiridos, estão bem evoluídos. Até certo ponto, essas pesquisas advêm da interação dos estudos sobre formas de aprendizado que são estimuladas de forma natural, com os estudos sobre a dependência de drogas, esta última considerada como doença crônica. Através dessas pesquisas postulou-se que o processo da dependência química abrange o neurotransmissor dopamina. Na presença dos estímulos relevantes, a dopamina é liberada nas vias mesolímbica e mesocortical, vias fundamentais para o desenvolvimento e manutenção dos processos de condicionamento e sensibilização, fundamentais na dependência química (BERRIGDE, 2007; KALIVAS e O'BRIEN, 2008).

### 3.2. CONTRACONDICIONAMENTO

Conceitua-se contracondicionamento uma forma de tratamento que se baseia nos princípios do condicionamento clássico, na qual busca a substituição de respostas negativas desencadeadas por algum estímulo, por respostas positivas (BAEYENS et al., 1992). Trata-se do condicionamento de uma resposta contrária ao estímulo inicialmente recebido, produzindo uma nova associação e posteriormente um novo processo de aprendizagem (BASTOS, 2014).

Newall e colaboradores (2017) demonstraram em seus estudos que o contracondicionamento e a extinção são dois métodos comportamentais que podem contribuir no tratamento do medo aprendido. Setenta e duas crianças participaram desse experimento, com idade entre 7 a 12 anos. Aos participantes foi apresentado imagens de dois animais não familiarizados na tela do computador, etapa que correspondeu à fase de indução do medo. Um desses animais foi associado a uma foto de uma pessoa assustada, enquanto ao outro animal nada foi associado. Para a fase seguinte os participantes foram separados em três grupos, sendo que: o primeiro grupo passou pelo teste de contracondicionamento, no qual o animal fora emparelhado com uma pessoa com um sorriso no rosto; o segundo grupo passou pelo teste da extinção, no qual o animal fora apresentado sem rosto assustado; e o terceiro grupo era o grupo controle, que não recebeu nenhum teste que reduzisse o medo. Neste teste o contracondicionamento mostrou-se mais eficaz em reduzir o medo do que o processo da extinção. O contracondicionamento emparelhou o estímulo condicionado temido com um resultado positivo. Após repetidos emparelhamentos positivos, houve um declínio no medo, substituído por uma resposta positiva. O tratamento pelo contracondicionamento mostrou-se mais eficaz que o tratamento pela extinção, porque pode aumentar e aprofundar a extinção pela apresentação da resposta positiva.

Um estímulo condicionado emparelhado inicialmente com um estímulo incondicionado, ao ser associado a um estímulo incondicionado com efeito oposto ao anterior, efeito aversivo, responde de maneira oposta, com reversão da resposta condicionada inicial (JEFFS e DUKA, 2019).

Matos e colaboradores (2011) apuraram, através de suas pesquisas, que o método do contracondicionamento foi capaz de impedir a expressão da

resposta locomotora condicionada pela apomorfina 2,0 mg/kg. Inicialmente, nessa pesquisa, os animais receberam apomorfina 2,0 mg/kg por cinco dias consecutivos, configurando a fase da indução. Posteriormente, os animais passaram por um teste de condicionamento e sensibilização. Os valores de locomoção observados demonstraram que a apomorfina 2,0 mg/kg estimulou a atividade locomotora e também produziu condicionamento e sensibilização locomotora. Na fase seguinte, fase reversa ou teste de contracondicionamento, administrou-se em alguns animais apomorfina na dose de 0,05 mg/kg, pois em doses baixas a apomorfina induz a diminuição da atividade locomotora (BRAGA et al., 2009<sup>a</sup>, 2009b; CARRERA et al., 2013; BASTOS et al., 2014). Os resultados expressaram a diminuição da atividade locomotora pela apomorfina na dosagem de 0,05 mg/kg, contudo não alterou a locomoção sensibilizada pela apomorfina no grupo que recebeu a dose de 2,0 mg/kg. O uso do método do contracondicionamento é oportuno para tratamento de desejos incontroláveis, como no tratamento pelo uso de substâncias de abuso.

### **3.3. SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL**

Um aspecto marcante na utilização de drogas psicoativas utilizadas de forma repetida é a exacerbação das respostas excitantes. Esse fato é uma consequência da sensibilização comportamental oriunda de razões diferentes e, dentre elas, a adaptação neuronal com mudanças na sensibilidade dos neurotransmissores e, também, no sistema de aprendizagem, despertada pelo condicionamento clássico de Pavlov (ROBINSON e BERRIDGE, 1993; BRAGA et al., 2009<sup>a</sup>; CAREY et al., 2014; SANTOS et al., 2015; OLIVEIRA, 2019).

A exposição às drogas de abuso acarreta alterações no sistema neural promovendo sensibilização comportamental ou tolerância reversa (ROBINSON e BERRIDGE, 1993; VANDERSCHUREN, 2001). A sensibilização comportamental é caracterizada pelo aumento de uma determinada resposta comportamental quando se administra a mesma dose de uma droga repetidamente. Em roedores, o desenvolvimento de sensibilização é observado com o aumento da locomoção e comportamentos rotacional e estereotipado (BASTOS, 2014; SANTOS, 2015). A sensibilização pode ser duradoura, induzida pela repetida exposição às drogas psicoativas, como por exemplo, cocaína e

anfetamina (VANDERSCHUREN, 2001). A sensibilização torna-se um gatilho para o uso abusivo, desencadeando uma busca compulsiva pela droga, na procura pelo prazer promovido por ela. Gradualmente, o sistema dopaminérgico é sensibilizado (ROBINSON e BERRIDGE, 1993).

A sensibilização é um processo de aprendizagem não associativo, entretanto é potencializada quando ocorre em conjunto com o processo de condicionamento (STEWART e BADIANI, 1993; MCKIN, 2013). Na condição de desenvolver a sensibilização comportamental apenas no ambiente que recebe a droga, concluiu-se que essa sensibilização é específica do contexto (ANAGNOSTARAS e ROBINSON, 1996).

Além disso, a sensibilização demonstra ser uma reprodução da tolerância, contudo, a resposta produzida não é uma resposta contrária à ação da droga, e sim uma resposta condicionada e semelhante à droga (MCKIN, 2013). Alguns autores afirmaram que a sensibilização em ratos a droga pode promover reações por até mais de 1 ano, e que pode acontecer um aumento da sensibilização com o passar do tempo (ROBINSON e BERRIDGE, 1993).

Robinson e Berridge (1993, 2008) postularam que os efeitos que estimulam o consumo da droga e suas dicas contextuais apresentadas de maneira repetitiva tornam-se mais intensas em decorrência do aumento da atividade da dopamina no sistema mesolímbico e de adaptações neuronais no sistema cerebral, responsáveis pela adequação aos efeitos motivacionais. Com o passar do tempo, a droga adquire um grande valor, tornando-se um reforçador positivo.

Volkow e colaboradores (2007, 2011) demonstraram que drogas de abuso excitam o sistema mesolímbico, e, por conseguinte, a liberação de dopamina, que apresenta uma expressão significativa no processo da dependência química. Dentro desse grupo de substâncias, a anfetamina, cocaína, morfina, heroína e álcool despertam uma elevação de concentração de dopamina no núcleo *accumbens*, aumentando o impacto no estímulo associado às drogas de abuso e intermediando os incentivos de reforço agudo à droga (MCKIN, 2013).

As drogas psicoativas e as drogas de abuso alteram a neurotransmissão dopaminérgica. O comportamento do animal após exposição de forma repetida às drogas psicoativas, ou até mesmo o estresse, é alterado com manifestação da elevação das respostas comportamentais e neuroquímicas. Presume-se que

no período da exposição contínua, ocorra uma estimulação constante da dopamina no VTA, onde suscita uma série de reações moleculares e alteração na neuroplasticidade que culmina com a liberação aumentada de dopamina. (BOLEIAU et al., 2007).

No trabalho desenvolvido por Viganò e colaboradores (2003), testou-se a sensibilização comportamental do agonista opioide, morfina, em roedores, para avaliação da resposta comportamental por exposição ininterrupta. A resposta foi o aumento da atividade locomotora apresentada pelos roedores caracterizando uma sensibilização comportamental, o que difere da tolerância, na qual a resposta seria a diminuição do efeito excitatório da morfina (VANDERSCHUREN et al., 1997).

Os resultados da sensibilização comportamental estimulada pela ação da apomorfina demonstraram respostas com aumento da locomoção condicionadas, mas num contexto específico (BLOISE et al., 2007; BRAGA et al., 2009<sup>a</sup>, 2009<sup>b</sup>; MATOS et al., 2011; DIAS et al., 2010; BASTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2017). Os efeitos condicionados não se apresentam apenas pelo acúmulo da droga ou pelo comprometimento do seu metabolismo, mas contemplam também alterações moleculares (SANGUEDO et al., 2014, apud OLIVEIRA, 2019).

O grupo de pesquisa de nosso laboratório desenvolveu experimentos que avaliaram a sensibilização comportamental e condicionamento de animais produzidos pela apomorfina na dose 2,0mg/Kg, administrada de forma repetida. Observou-se uma mudança no comportamento dos animais com aumento da atividade locomotora. Fato este explicado pela característica da apomorfina, que na dose de 2,0mg/Kg atua preferencialmente nos receptores dopaminérgicos D1 e D2 pós-sinápticos (CAREY et al., 2008; BRAGA et al., 2009<sup>ab</sup>; MATOS et al., 2011; CARRERA et al., 2011, 2012, 2013; BASTOS et al., 2013).

O uso abusivo com administração repetida de opiáceos, associado às pistas contextuais, desperta a sensibilização comportamental nas administrações subseqüentes, e sendo dessa maneira, a sensibilização desenvolvida não é atribuída exclusivamente à ação farmacológica direta do opiáceo, mas também aos aprendizados associados (MARTTINGLY et al., 1997). Estabelecida a sensibilização comportamental, as neuroadaptações surgem e, para efeito de tratamento de recaídas, se faz necessário interromper

a associação das pistas contextuais e o uso de drogas (VEZINA e LEYTON, 2009). Childress e colaboradores (2008) postularam que durante a abstinência, usuários relatam que ao visitar o local onde normalmente administravam a droga, era despertado o desejo pelo consumo da droga.

### **3.4. NOVIDADE E HABITUAÇÃO**

O processo de habituação ocorre após a exposição a repetidos estímulos que gradualmente tornam-se insignificantes e deixam de ser novidade. A técnica de habituação é utilizada em protocolos de experimentos que buscam avaliar processos de aprendizagem e memória (SANTOS, 2019).

O ambiente novo desperta um comportamento de motivação pela busca da recompensa pela novidade (XIGENG et al., 2003). Um fator importante para a habituação é o número de vezes de exposição do animal. O ambiente novo promove um maior estímulo na atividade locomotora do grupo controle, o que dificulta inicialmente a avaliação com o grupo tratamento. Após o ambiente tornar-se familiar, ocorre um declínio na locomoção do animal (CAREY et al., 2014).

Bardo e Bevins (2000) destacam que através do modelo experimental da Preferência Condicionada por Lugar (PCL), baseado no condicionamento aprendido, há como medir os efeitos reforçadores positivos e os reforçadores negativos. Considera-se positivo quando o animal tem uma preferência por um determinado lugar, no qual comumente está associado a algum estímulo de recompensa e, negativo quando há um comportamento aversivo ao local associado a alguma substância. Relataram também que pesquisas que apresentaram uma variedade grande de estímulos, como por exemplo, comida, água, fluidos, doces, entre outros, tiveram a preferência dos animais. Essa preferência aconteceu pela novidade que representou esses estímulos e alteraram o estado motivacional do animal. Esse relato comunga com trabalhos de outros pesquisadores que afirmaram, após outras pesquisas, que estímulos novos apresentam propriedades de recompensa (PIERCE et al., 1995; BARDO, et. al., 1996).

Roedores expostos para análises de comportamento demonstraram inicialmente uma capacidade exploratória pelo novo ambiente, com motivação

para desbravar esse ambiente e, posteriormente, depois de repetidas apresentações, houve perda do estímulo pela novidade (CERBONE e SADILE, 1994).

O ambiente novo ou familiar exerce um papel relevante para os estímulos produzidos pela cocaína em teste de ambientes. Alguns estudos demonstraram que os incentivos de locomoção induzidos pela cocaína em ambientes novos comparados a ambientes familiares são bem maiores. Além disso, ao aplicar a mesma dose de cocaína ou outra substância psicoativa e expor os animais a ambientes novos e altamente familiares, o estímulo do ambiente novo despertou maior atividade de locomoção. A associação de ambiente novo e tratamento com drogas psicoativas expõe o cérebro a alterações duradouras (CAREY et al., 2008).

Experimento com ratos, no qual o animal teve oportunidades de contatos repetidos com objetos em dois ambientes diferentes demonstraram um incremento do favoritismo pelo ambiente emparelhado com a novidade. A novidade gera o estímulo nas vias mesolímbica e mesocortical, circuito da recompensa e prazer que, associado ao ambiente, justifica a preferência e produz aumento na resposta condicionada (BEVINS, 2002). O mesmo comportamento não ocorre caso ocorra habituação aos objetos que antes eram “novos”. O interesse pela novidade não é despertado (DAI et al., 1995).

Dai e colaboradores (1995) postularam que numa primeira exposição de um animal em teste de campo aberto, a colocação de um objeto na Zona Central (ZC) não interfere nas suas entradas e permanência nessa área do local de teste. Caso o animal seja exposto ao campo de teste por mais tempo, tornando-o mais familiar, a presença de um objeto na ZC, aumenta a visita do animal nessa área. Essa é uma forma de se medir positivamente a habituação do animal ao campo de teste. E esse tipo de estudo é importante para as pesquisas em neurotoxicidade de drogas, através dele permite-se avaliar ao mesmo tempo efeitos do tratamento na atividade motora, na atenção a um objeto e memória.

Drogas psicoativas como anfetamina e cocaína, em ambiente de livre escolha, despertam um efeito de recompensa manifestado através da atividade locomotora relativa à novidade. A morfina, testada em grupos de ratos jovens e

adultos, em campo aberto emparelhado, com ambientação prévia e na exposição de uma novidade, demonstrou também o efeito condicionado da droga com a busca acentuada pela novidade (XIGENG et al., 2003).

### **3.5. CONSOLIDAÇÃO E RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA**

A memória é um processo relacionado com várias funções como executiva e aprendizado. Gera no indivíduo a capacidade de adquirir, armazenar e evocar informações das mais simples, como o local que guardamos algo, ou até as mais complexas, como memorizar números de senhas de locais variados (MOURÃO JUNIOR e FARIA, 2015). A capacidade de armazenar diversas informações e experiências vividas é uma técnica que ocorre de maneira evolutiva e que permite que ao longo da vida se possa buscar esses dados, lembranças e recuperá-las (BASTOS, 2014). A memória é construída por uma coleção de grupos de memória com rubricas moleculares, celulares e sistêmicas (NADER, 2003). É um processo de etapas com aquisição, consolidação e recuperação (SZAPIRO, 2002; IZQUIERDO, 2011). Concede aos indivíduos vantagens adaptativas quando os tornam capazes de comparar experiências vividas anteriormente com situações atuais, podendo, portanto, avaliar o comportamento mais adequado a ser expresso (SANTOS, 2019).

Cada indivíduo apresenta sua capacidade mnemônica, com condições de conquistar, preservar e recuperar as informações. Trata-se de um processo na qual as experiências transformam-se em aprendizado, ficando arquivado ou não, de forma permanente na memória (NADER et al., 2003; DE MELLO BASTOS, 2014). As regiões do hipocampo e amígdala com suas conexões com o hipotálamo e o tálamo controlam grande parte do arquivamento e da recuperação das memórias (OLIVEIRA, 2019). A concentração de substâncias neurotransmissoras como a dopamina, serotonina e noradrenalina influenciam a aquisição da memória, com função principal de favorecer o processo de formação dessa memória. Sendo assim, em situações de instabilidade em suas concentrações, pode haver uma alteração na forma como a memória será consolidada, podendo inclusive inibir a sua formação (SANTOS, 2019).

O processo da memória inicia-se com a fase do aprendizado, também chamado de codificação ou fase da aquisição, que representa o momento em

que as informações são recebidas (estímulo) e armazenadas no sistema de memória de curto prazo, seguida da fase da estabilização, momento no qual as informações são consolidadas e, para que se mantenham, devem ser armazenadas como memória de longa duração (DUDAI, 2004). No momento em que uma memória está sendo consolidada, a mesma se torna lábil e propícia a interferências farmacológicas e comportamentais. Existe um intervalo entre o momento da aquisição da memória e seu armazenamento chamado de janela da consolidação (SANTOS, 2019). Posteriormente, ocorre a fase do arquivamento das informações e, por fim, a fase da recuperação na qual a evocação pode ser consciente ou não, e por mecanismos específicos, o conhecimento ou aprendizado podem ser recuperados. É um sistema dinâmico (NADER, 2015).

Alguns tratamentos como administração de injeções sistêmicas podem interromper a formação da memória de longo prazo, mesmo aplicados dias depois. Alguns desses tratamentos usam substâncias que bloqueiam a tradução do RNAm em proteínas, portanto a consolidação da memória é um processo que tem a participação na síntese proteica nos neurônios (NADER et al., 2000). Um experimento feito por Schafe e LeDoux (2000) avaliou a presença do processo de consolidação de memória no medo auditivo, utilizando a substância anisomicina (um inibidor de síntese de proteínas), infundida na amígdala lateral e basal (LBA), e logo após o aprendizado, a memória de curto prazo manteve-se inalterada, mas a memória de longo prazo ficou comprometida. Porém, quando a infusão foi aplicada após 6 horas de aprendizado, a memória de longo prazo permaneceu intacta.

A consolidação da memória é influenciada pelo intervalo de tempo entre a aquisição e a consolidação da informação ou aprendizado, momento que ainda se apresentam sensíveis e possíveis de serem alterados. Alguns tratamentos para amnésia associam alguns reforçadores que contribuem na formação de uma nova memória, porém, atinge-se o resultado se a introdução desses reforçadores acontecer logo após o aprendizado (NADER, 2015).

A sinapse é o local onde a informação é transmitida de uma célula para outra, e o processo de aprendizagem promove alterações na eficácia dessa transmissão (NADER, 2015). A consolidação é a estabilização progressiva da memória pós-adquirida, e ocorrem em dois processos: a consolidação sináptica,

que acontece imediatamente após a sessão de aprendizado; e a consolidação do sistema, com um prazo um pouco maior para consolidar, dependente inicialmente do hipocampo e, após organização, desfaz essa dependência (DUDAI, 2004). No processo da aprendizagem e da consolidação da memória recente, sistemas cerebrais são ativados através da amígdala lateral e basal e suas ligações com outras regiões cerebrais, em conjunto com estímulo noradrenérgico, onde haverá a regulação do processo da consolidação da memória. Esse sistema modulador regula também outros recursos mnemônicos, como a aquisição, recuperação e extinção da memória. O aprendizado e a memória são induzidos a partir de experiência e por sua vez definem a expressão comportamental. As memórias podem ser aprimoradas com tratamento efetuado durante a janela da consolidação, possibilitando avaliação do desempenho pelos efeitos das drogas na memória (ROZENDAAL e MCGAUGH, 2011).

A consolidação da memória era considerada um processo de conversão que poderia durar de minutos a horas, no qual uma memória instável passaria a ser estável, imune à degradação nos dias que se seguiam ou até mesmo em anos (STICKGOLD e WALKER, 2005). Essa teoria foi revisada e chegou-se na hipótese de que uma memória consolidada pode ser reavivada para um estado transitório, sensível, podendo ser alterado (NADER, 2003). Esse processo é chamado de reconsolidação da memória (STICKGOLD e WALKER, 2005).

A reconsolidação da memória ocorre após a evocação da memória consolidada, que durante essa recuperação torna-se sensível e pode ser mantida, fortalecida ou alterada (TRONSON e TAYLOR, 2007). É a reativação de memórias mais antigas e profundas. (DEBIEC et al., 2002), desestabilizando-as e tornando-as vulneráveis às interferências (NADER e EINARSSON, 2010). Proporciona uma alteração adaptativa, um retorno plástico da memória, criando uma oportunidade para atuar terapêuticamente, numa circunstância de *stress* pós-traumático, como também no vício das drogas de abuso. A reconsolidação utiliza mecanismos diferentes, porém similares, que não estão envolvidos com a consolidação (LEE, 2009) e são mais vulneráveis à ruptura (DUDAI, 2004). Ao contrário da extinção, a reconsolidação proporciona um efeito amnésico persistente, com interferência no traço original da memória, não permitindo que ocorra a recuperação espontânea (SANTOS, 2019).

Comportamentos persistentes na busca e consumo de drogas de abuso insinua que o processo de aprendizagem e posterior consolidação na memória são fatores que favorecem a recaída. O uso de drogas repetidas vezes inspira circuitos neurais para fortalecer o aprendizado e a formação da memória. A redução da associação da memória com o uso da droga é um meio de quebrar o ciclo da reincidência do consumo da droga. O comportamento recorrente para o consumo de drogas também está pareado com pistas contextuais, que fortalecem a consolidação da memória. A cada uso, memórias são reativadas e reconsolidadas. A administração de agentes amnésicos próximo ao tempo de evocação da memória pode interromper este ciclo e contribuir no comportamento do sujeito na dependência química (SORG, 2012). A memória consolidada é evocada, e necessita de uma nova síntese de proteína para ser reconsolidada (NADER et al., 2000).

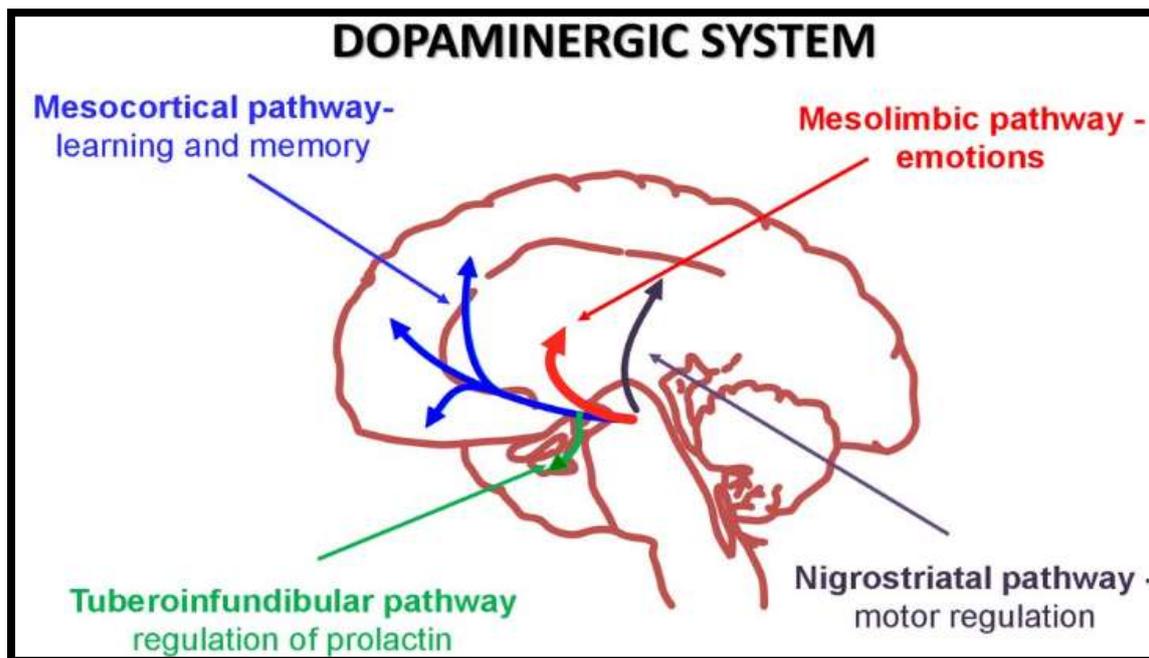
Em nosso laboratório foram desenvolvidos trabalhos utilizando apomorfina, uma droga psicomotora, agonista dopaminérgico D1 e D2, em um modelo experimental de toxicodependência. Como resultado, observou-se que a apomorfina na dose de 2,0mg/Kg gerou uma resposta locomotora condicionada, bem como sensibilizada, reforçando a associação droga-ambiente (BLOISE et al., 2007; BRAGA et al., 2009ab; DE MATOS et al., 2010; DIAS et al., 2010; CARRERA et al., 2011, 2012, 2103). Esta mesma droga, apomorfina, em doses baixas (0,05mg/Kg) é seletiva para autorreceptores D2, reduzindo a atividade dopaminérgica. Estudos complementares foram feitos para avaliar a atuação desta droga em doses baixas, em comportamentos condicionados e sensibilizados. Os resultados mostraram que a apomorfina na dose de 0,05mg/Kg, no processo da reconsolidação da memória, atenuou a sensibilização e o condicionamento (BRAGA et al., 2009<sup>a</sup>).

### **3.6. SISTEMA DOPAMINÉRGICO**

A dopamina é uma catecolamina endógena, um neurotransmissor de grande importância no aprendizado, cognição, emoção, motivação, afeto, memória, controle motor, como também coopera com a modulação cardíaca, preservação da atividade renal e motilidade gastrointestinal (MATSUMOTO, 2005;

SALAMONE et al., 2005; GOODMAN e GILMAN, 2006). No entanto, a sua função mais pesquisada é a sua participação nos processos de “recompensa” (SALAMONE et al., 2005). Produzida na substância nigra, região central do cérebro, a partir da tirosina, aminoácido que pode ser sintetizado no fígado a partir de outro aminoácido, fenilalanina e também ser adquirido pela alimentação. No citoplasma dos axônios terminais, a tirosina é convertida em Dihidroxifenilalanina (DOPA) com a participação da enzima tirosina hidroxilase. A DOPA é convertida em dopamina com a presença da enzima DOPA descarboxilase, e encaminhada para as vesículas sinápticas secretórias, para, enfim, após um potencial de ação, liberar a dopamina na fenda sináptica e em alguns casos no espaço extracelular (MCKIN, 2013).

Existem quatro vias no sistema dopaminérgico (Figura 1). A primeira via chama-se sistema tuberoinfundibular, via na qual a dopamina atua como neurohormônio. Nesta via as células do hipotálamo liberam dopamina diretamente no sistema portal hipofisário, com a função de inibir a liberação de prolactina. Nas outras três vias, a dopamina atua como neurotransmissor. No sistema nigrostriatal as células do corpo do neurônio se encontram na substância nigra, na região do mesencéfalo, e os seus axônios são projetados para duas regiões do estriado, núcleo caudado e putâmen. Nesta via, o papel da dopamina é regular o movimento motor e a degeneração celular (BENINGER, 1983; MCKIN, 2013; KATSUNG, 2017). A deficiência de dopamina neste sistema é uma das características neuropatológicas da doença de Parkinson (POEWE, 2017).



**Figura 1:** Sistemas dopaminérgicos. Fonte: Stahl SM. Essential Psychopharmacology of antipsychotics and mood stabilizers; 1 st ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2002.

Os outros dois sistemas são chamados mesocortical e mesolímbico, vias nas quais os corpos celulares residem na Área Tegmentar Ventral (VTA) e seus axônios se prolongam ao córtex pré-frontal e ao núcleo *accumbens* e partes do sistema límbico, respectivamente. Na via mesocortical, a dopamina está relacionada à compulsão e perda de controle no consumo de drogas de abuso, e a via mesolímbica está ligada ao sistema de recompensa e memória (SAAL et al., 2003; NESTLER, 2004; SALAMONE et al., 2005; OLSON e NESTLER, 2007; VOLKOW et al., 2011, MCKIN, 2013; KATSUNG, 2017).

O grupo de receptores dopaminérgicos inicialmente foi classificado como D1 e D2 e foram considerados farmacologicamente, bioquimicamente e fisiologicamente diferentes. A classificação foi ampliada para D1, D2, D3, D4, D5 (MISSALE et al., 1998; CAVALLOTTI et al., 2004), sendo distribuídos principalmente no sistema límbico, compreendendo hipocampo e amígdala e, também, nos núcleos *accumbens* e putâmen, e tubérculo olfatório (WOOTEN, 1997; NESTLER et al., 2001; MCKIN, 2013; KATSUNG, 2017).

Os receptores são divididos em grupos pela afinidade de perfis, sendo que os receptores D1 e D5 compõem o grupo *D1-like* e os receptores D2, D3 e D4 compõem o grupo *D2-like*. Os receptores D2 são distribuídos na substância

nigra, VTA e hipocampo, e sua ativação inibe a produção de AMPc e, além disso, também desempenham o papel de autorreceptores (MISSALE et al., 1988; BERKE e HYMAN, 2000; NESTLER et al., 2001; MCKIN, 2013; KATSUNG, 2017).

Os receptores D1, contrariamente ao receptor D2, ativam o sistema do AMPc, pois estimula a ação da adenilato ciclase, tem participação importante na memória e no vício de drogas em intervenções nas patologias neurológicas. Encontra-se principalmente no núcleo *accumbens*, putâmen e na amígdala, ao contrário do receptor D2, que se encontra nessa região em pouca quantidade. Os receptores D3 são em menor quantidade, encontrados exclusivamente no núcleo *accumbens*, região relacionada às funções emocionais, comportamentais, cognitivas, mecanismos de recompensa, e também no transtorno de uso de substâncias, e igualmente pouco distribuídos estão os receptores D5, com expressão no hipocampo, tubérculo olfatório e hipotálamo. Os receptores D4 estão em maior quantidade do que os receptores D3, concentrando-se mais nas áreas corticais e límbicas (NESTLER et al., 2001; CAVALLOTTI et al., 2004; MCKIN, 2013; KATSUNG, 2017).

O VTA situa-se no centro do mesencéfalo, perto da substância nigra, e tem uma participação muito importante no circuito da recompensa, tanto por ação natural como drogas reforçadoras. A conexão entre o VTA e o núcleo *accumbens*, também chamada sistema mesolímbico de dopamina, desempenha um papel importante na função de reforço e busca de recompensa, associada ao prazer e toxicodependência (HEINZ et al., 2004; ADINOFF, 2004; YOUNG et al., 2011; NASCIMENTO e SAKATA, 2011; MCKIN, 2013; SOLEIMANI, 2018).

O sistema límbico é formado por várias estruturas que integram vários processos. O hipocampo é uma grande estrutura límbica com participação no aprendizado e na memória, podendo associar, em partes, um local com uma droga, altamente conectado com a amígdala, outra região do sistema límbico, que está associada às emoções negativas e formação da memória emocional. Interligada com outras substâncias límbicas e regiões cerebrais, recebe informações sensoriais do córtex, como por exemplo, nível de estresse (BERKE e HYMAN, 2000; MCKIN, 2013; KATZUNG, 2017).

Os efeitos motivacionais despertados pelas drogas tornam-se fortes e sensibilizados com repetidas exposições, acarretando o aumento da atividade

da dopamina no sistema mesolímbico e neuroadaptações nos circuitos cerebrais (ROBINSON e BERRIDGE, 2008). Pela neuroadaptação, o organismo oferece uma resposta homeostática pelo estímulo excessivo. Contudo, outra resposta, plasticidade sináptica, pode ser oferecida na qual permite a associação da droga com o estímulo traduzindo em um aprendizado comportamental específico (BERKE e HYMAN, 2000). Essas alterações são importantes para que as regiões cerebrais se adaptem ao sistema de recompensa (KOOB e LE MOAL'S, 2008).

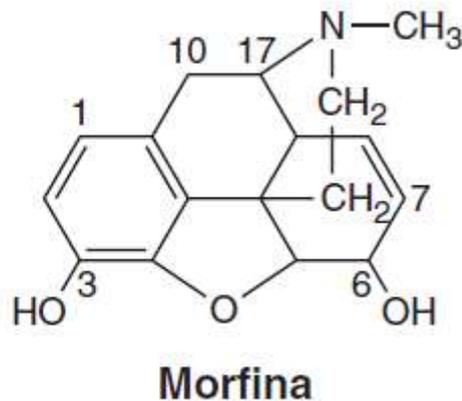
A dopamina apresenta um papel importante nos efeitos recompensadores nas drogas de abuso (VOLKOW et al., 2011). As drogas de abuso ativam a dopamina no sistema límbico, que quando liberada no núcleo *accumbens* aumenta o efeito de estímulo associado às drogas e medeiam os efeitos de reforço agudo das drogas. A droga de abuso desperta sensações agradáveis e prazerosas, e estes, como efeitos de reforço, estimulam a busca e o uso da droga. Substâncias como anfetamina, cocaína, morfina, heroína, e álcool provocam o aumento da dopamina (VOLKOW et al., 2007).

A potência de efeito sobre o aumento da dopamina varia com a classe da droga. O papel da dopamina na recompensa em drogas de abuso não aparece com o efeito hedônico de prazer, mas aparece com incentivo de reforço e facilitando a associação da recompensa com o aprendizado através da modulação das regiões cortical e subcortical. Diferentes neuroadaptações ocorrem nos receptores D1 e D2 com uso de drogas repetidas, sendo que há aumento na sinalização do receptor D1 e uma diminuição do sinal do receptor D2 (VOLKOW et al., 2012).

### **3.7. MORFINA**

Morfina (Figura 2) é um alcaloide isolado do ópio (*Papaver somniferum*), e recebeu esse nome em honra a Morfeu, deus grego dos sonhos, e corresponde a 10% do peso do ópio. Seu isolamento foi descrito por Friedrich Sertüner em 1803, liberada para distribuição para uso médico em 1817, e teve seu uso disponibilizado sem restrição até o início do século XX. Apresenta uma ação muito eficaz para tratamento de dores intensas. Com a criação da agulha

hipodérmica (1899), o uso da morfina difundiu-se até culminar no consumo indiscriminado da droga (MCKIN, 2013; KATSUNG, 2017).



**Figura 2:** Fórmula estrutural da morfina (7,8-dihydro-4,5-epoxy-17- methylmorphinan-3,6-diol). Fonte: KATSUNG, 2017.

A morfina é uma base com pKa 8, sendo assim, não é absorvida rapidamente pelo sistema digestivo justificado pela ionização no pH ácido que suas moléculas sofrerão. Apresenta baixa lipossolubilidade e por via oral a absorção é lenta, propiciando a manutenção de níveis constantes da droga na corrente sanguínea, com extenso metabolismo no sistema digestivo, e significativo efeito de primeira passagem no fígado, portanto, seus efeitos parenterais são melhores. Após absorção, a maioria dos opioides concentra-se nos pulmões, fígado e baço e uma grande porcentagem se ligará às proteínas plasmáticas. A maioria dos opioides atravessa lentamente a barreira hematoencefálica, em razão da baixa solubilidade lipídica. Já no cérebro, os opioides ficam concentrados nos gânglios da base, amígdala e no periaqueductal cinza (PGA), região intimamente associada com a sensação de dor (CORBETT et al., 2009; MCKIN, 2013; KATSUNG, 2017).

Após absorvido, 90% são transformados em vários metabólitos que serão excretados posteriormente, na urina e nas fezes, enquanto 10% são excretados inalterados na urina. A meia vida da morfina é de duas horas, e 90% serão eliminados no prazo de 24 horas após sua administração. A aplicação subcutânea de morfina é considerada uma administração parenteral efetiva. Na sua metabolização conjuga-se com o ácido glicurônico e forma metabólitos ativos e inativos, sendo os dois principais metabólitos 6-glicuronato de morfina

(M6G) e o 3-glicuronato de morfina (M3G). O M6G mostrou uma potente ação antinocepciona, com efeitos menos tóxicos do que a morfina, enquanto o M3G não manifesta afinidade com os receptores  $\mu$  ( $\mu$ ), mas Harris e colaboradores (1999) postulam que este metabólito atua antagonizando os efeitos depressores analgésicos e respiratórios da morfina (STUART-HARRIS et al., 2000; TRESOT et al., 2008; MCKIN, 2013; TOMAZZI, 2014; KATSUNG, 2017).

Os receptores opioides são chamados de  $\mu$  ( $\mu$ ), MOR, kappa ( $\kappa$ ), KOR, delta ( $\delta$ ), DOR, e mais recentemente opioide receptor-*like* ORL-1, NOP. Receptores opioides no sistema nervoso central respondem a alguns peptídeos, denominados de peptídeos opioides endógenos, cujas propriedades farmacológicas são bem parecidas com a dos opioides. São descritas em três famílias: as endorfinas, encefalinas e dinorfinas (KIEFFER e RUFF, 2002; TRESOT et al., 2008; CORBETT et al., 2009; MCKIN, 2013; TOMAZZI, 2014; KATSUNG, 2017; KIBALY et al., 2019).

Os receptores opioides acoplam-se à proteína G, na qual seus efeitos celulares encontram-se principalmente através das proteínas Gi/Go. Diferentes respostas mediadas por cada tipo de receptor é decorrente das diferentes distribuições anatômicas de cada receptor (CORBETT et al., 2009). O receptor DOR atua na analgesia bem como, também, em processos cognitivos e na dependência física, localizado no sistema límbico, incluindo hipocampo e amígdala, como também no córtex, hipotálamo, núcleo *accumbens* e algumas regiões da medula. O receptor KOR age na termorregulação, secreção neuroendócrina, nocicepção e controle da diurese, encontrado no núcleo *accumbens*, VTA, hipotálamo e regiões específicas do tálamo. Ao receptor MOR compete o controle do ciclo respiratório, fluxo intestinal e nocicepção, sendo encontrado em todo sistema límbico, incluindo hipocampo e amígdala, tálamo e VTA (MARTINS, 2012; MCKIN, 2013; TOMAZI, 2014; KIBALY et al., 2019).

Os receptores MOR, sob estímulo de opioides, promovem a inibição da adenilatociclase, diminuindo a concentração intracelular do AMPc, fechando os canais de cálcio dependentes que estão nas terminações pré-sinápticas e restringindo a liberação de neurotransmissores, como glutamato, GABA, glicina, norepinefrina, acetilcolina e dopamina. Ocorre uma hiperpolarização na membrana desse neurônio, dificultando a transmissão do estímulo doloroso (MARTINS, 2012; KIBALY et al., 2019).

O receptor MOR é responsável pela maioria dos efeitos da morfina, através do aumento na atividade mesolímbica, principalmente no VTA e núcleo *accumbens*. No VTA, com um opioide atuando como agonista, ocorre a inibição da liberação do GABA pelos interneurônios que, por sua vez, estimulam os neurônios dopaminérgicos que projetados até o núcleo *accumbens* aumentam a liberação de dopamina, correlacionando positivamente o opioide ao seu efeito reforçador e potencial de abuso (NESTLER, 2004; VOLKOW et al., 2011; MARTINS et al., 2012; MORI et al., 2016)

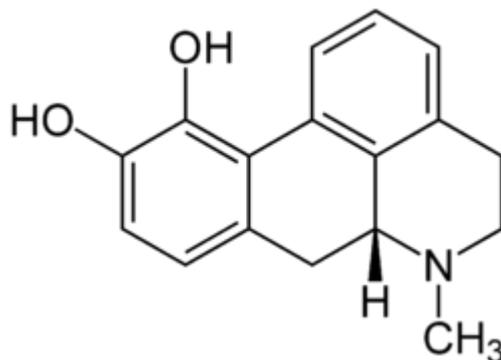
Comportamentos decorrentes de uso abusivo de drogas são altamente dependentes da ativação de neurônios dopaminérgicos no VTA. Ocorre inicialmente a inibição dos neurônios GABAérgicos, logo após os neurônios glutamatérgicos ativam o VTA e, por fim, ocorre a excitação dos neurônios dopaminérgicos. Além disso, foi estudado que a inibição da liberação do glutamato pré-sináptico, em neurônios dopaminérgicos no VTA, inibem a atividade neuronal da morfina, demonstrando que para ocorrer sua ação prazerosa os neurônios glutamatérgicos não devem estar inibidos. (CHEN, 2015). O prazer é gerado pela presença da dopamina no núcleo *accumbens* (KOSTEN e GEORGE, 2002; DI CHIARA et al., 2004).

O transtorno por uso de substâncias engloba ações cognitivas e emocionais reguladas pelo córtex, supervalorizando os reforçadores de drogas (GOLDSTEIN e VOLKOW, 2002). O estímulo da dopamina com a administração de drogas psicoativas anula a inibição da amígdala pelo córtex pré-frontal medial, com possibilidades de ocorrer a desinibição das respostas afetivas (KIBALY et al., 2019).

A morfina é uma substância com efeitos pró-dopamina, que induz o aumento da atividade locomotora, conforme estudado pelo nosso grupo de pesquisa, no qual demonstrou que a morfina administrada imediatamente após um período de cinco minutos na arena, em doses de 5,0 e 10,0 mg/Kg potencializou a locomoção na arena. Nesse mesmo estudo, observou-se que mesmo após cinco sessões utilizando protocolo de extinção, a atividade locomotora aumentada manteve-se (OLIVEIRA, 2019).

### 3.8. APOMORFINA

A apomorfina (Figura 3) é uma substância alcaloide, semissintética, derivada não-narcótica da morfina que atua como um potente agonista dopaminérgico (LEWITT, 2004). Foi produzida pela primeira vez em 1869 através do tratamento ácido da morfina e apresenta uma estrutura química semelhante à dopamina (PICADA, 2003). Sua estrutura altamente lipofílica permite que atravesse as membranas com muita rapidez, com início de ação imediato (BOYLE e ONDO, 2015). Seu alto metabolismo hepático de primeira passagem impede a eficácia pela via oral e, ao invés disso, a injeção subcutânea é a via usual, com pico plasmático de 40-60 minutos, com início de ação entre 7-10 minutos. Esse metabolismo pode ser através de várias enzimas incluindo N-desmetilação, sulfatação, glucuronidação e catecol-O-metiltransferase, ou por oxidação não enzimática, e com esse metabolismo diverso há também a diversificação de atuação clínica (PICADA, 2003; LEWITT, 2004; JENNER e KATZENSCHLAGER, 2016).



**Figura 3:** Estrutura química da apomorfina.

[https://it.wikipedia.org/wiki/Apomorfina#/media/File:Apomorphine\\_Structural\\_Formulae.png](https://it.wikipedia.org/wiki/Apomorfina#/media/File:Apomorphine_Structural_Formulae.png)

A apomorfina exerce uma potente atividade dopaminérgica, atuando como um agonista direto e de amplo espectro, ativando os receptores dopaminérgicos de forma não seletiva como, também, apresenta atividade nos receptores de serotonina e alfa-adrenérgicos (JENNER e KATZENSCHLAGER, 2016). Como agonista, D1/D2 atua tanto na ativação bem como na inibição da atividade da dopamina, dependendo da concentração que se apresenta. Esses potentes efeitos no circuito dopaminérgico, mesmo opostos, são justificados pela

disposição e sensibilidade dos receptores D1/D2. Os receptores D1 são preponderantemente pós-sinápticos, e os receptores D2 são posicionados tanto pré como pós-sináptico (CARRERA et al., 2013). A apomorfina demonstrou uma atuação como agonista total nos receptores D2, e nos receptores D1, uma ação como agonista parcial. Entretanto, mesmo os receptores D2 com seus sítios de ligação dispostos tanto como pré e pós-sináptico, os sítios pré-sinápticos são mais sensíveis, em torno de 6 a 10 vezes, à apomorfina do que os sítios D2 pós-sinápticos (MATTINGLY et al., 1997). Os receptores D2, também intitulados como autorreceptores, quando estimulados atuam inibindo os neurônios dopaminérgicos (CARRERA et al., 2013).

Doses baixas de apomorfina (0,05 mg/kg) estimulam os autorreceptores e promove uma ação antidopaminérgica. Tratamentos com baixas doses de apomorfina induz uma efetiva hipoatividade locomotora, pela atuação nos receptores D2 pré-sinápticos. Trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que a apomorfina em baixas doses diminui a resposta locomotora exacerbada em caso de administração de apomorfina em altas doses como também atenua a resposta locomotora induzida pelo incentivo do ambiente novo (BRAGA et al., 2009a, 2009b; CARRERA et al., 2013; BASTOS et al., 2014, SANTOS, 2015).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Sujeitos

Foram utilizados 84 ratos machos, albinos, *Wistar*, provenientes do Biotério Central da UENF, Campos dos Goytacazes, RJ. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de plástico (25 X 18X 17 cm) tendo acesso livre à água e à ração padronizada de laboratório até o final do experimento. As gaiolas ficaram em uma sala do setor de Farmacologia do Laboratório de Morfologia e Patologia (LMPA), com temperatura controlada ( $22 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ ) e com ciclo de luz, claro/escuro, de 12 em 12 horas (luz das 7h às 19h). O experimento foi conduzido na fase clara, no horário entre 7h e 13h. Os animais foram pesados e manipulados individualmente por cincominutos diários durante sete (7) dias (“*handling*”) antes do início do procedimento experimental, para que os mesmos se habituassem ao contato e manipulação do pesquisador. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob o número 395.

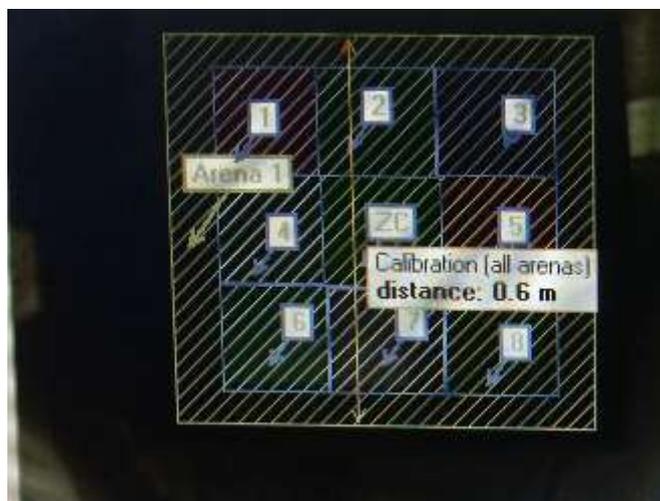
### 4.2 Ambiente Experimental

O presente projeto de pesquisa foi desenvolvido em quatro salas experimentais (3 X 2 metros) contendo iluminação vermelha, para que evitasse a aversão à luz branca e para realçar o objeto branco e o fundo preto da arena (NASELLO et al., 1998). Além disso, temperatura controlada ( $22 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ) e o som de um ventilador ligado em cada sala como ruído de fundo, para que não houvesse interferência de ruídos externos. Ligava-se o ventilador antes da colocação do animal no ambiente de teste e, desligava após a remoção do animal da arena. Cada sala conteve uma arena quadrada medindo 60 X 60 X 45cm, com assoalho e paredes pintados na cor preta. Câmeras (*Panasonic*® - *Panasonic Corporation, Kadoma- Osaka, Japão*; *Ikegami*® - *Ikegami Tsushinki Co.,Ltda., Ota-Tóquio, Japão*) foram posicionadas 60 cm acima da arena experimental. As câmeras foram acopladas a um computador PC compatível, contendo um sistema de análise de imagens *EthoVision*® (Noldus, Holanda).

Todo o experimento foi conduzido automaticamente, sem a presença do experimentador no ambiente de teste.

### 4.3 Quantificação comportamental

Registrou-se a locomoção em distância percorrida (m). Para isso, foi utilizado um sistema de análise de imagens *EthoVision*® (Noldus, Holanda). Foi quantificado a locomoção total que corresponde à locomoção na área total da arena e a locomoção na zona central da arena, que é considerada uma medida de emocionalidade (ARCHER, 1973; DENENBERG, 1969; ILIADI, 2009). Para se quantificar a locomoção na zona central, a arena foi dividida em nove zonas de 20x20cm. As zonas foram denominadas de zona 1 e zona 8 e a zona central foi nomeada de ZC (Figura 4). A divisão das arenas foi feita no próprio sistema *Ethovision*® (Noldus), quando foi feita a configuração, ou seja, na aba “*Arena setting*” foram primeiramente configuradas e denominadas as zonas, e posteriormente a arena como um todo, delimitando a área de onde foram captados os movimentos dos animais. A divisão da arena em zonas possibilitou a quantificação de entradas dos animais na zona central (CAREY e GUI, 1998).



**Figura 4:** Ilustração da arena dividida em 9 zonas, sendo a do meio denominada Zona Central (ZC). Fonte: Produzido pelo autor, 2019.

### 4.4 Fármacos utilizados

Foi utilizada a morfina na concentração de 10 mg/ml, na forma de sulfato (Dimorf® Laboratório Cristália, Brasil). A dose a ser utilizada foi de 10,0 mg/kg

(LEITE JUNIOR et al., 2019), a administração pela via subcutânea (SC) na região da nuca e o volume de administração foi de 1ml/kg.

Foi utilizada também a apomorfina-HCl hemihidratada (Laboratório Sigma, ST. Louis, Mo, USA), na dose de 0,05 mg/kg, dissolvida em solução salina na proporção de 0,05 mg de apomorfina/ml. O volume de administração foi de 1 ml/kg, sendo a administração por via subcutânea.

A solução salina (NaCl 0,9%) foi utilizada como veículo no volume de 1 ml/kg e administrada por SC. As soluções foram preparadas antes de cada experimento.

**4.5 EXPERIMENTO 1:** Efeitos condicionados do contexto novo com a administração de morfina após término da sessão experimental.

Esse experimento teve como objetivo avaliar o efeito do ambiente novo no desenvolvimento de uma resposta locomotora sensibilizada e na resposta locomotora condicionada produzida por morfina na dose de 10 mg/Kg, utilizando-se um modelo de condicionamento Pavloviano de traço.

Esse experimento foi realizado em duas fases.

#### **4.5.1 Fase 1 – Habituação na arena**

Essa fase foi realizada com o objetivo de habituar os animais à arena experimental. Consistiu em administrar veículo (VEI) antes de o animal ser colocado na arena. Em seguida iniciava a sessão experimental na arena, que durava cinco minutos, e imediatamente após a retirada do animal da arena, era administrado mais uma vez veículo. Esse procedimento foi realizado de forma igual com todos os animais (n=14) e executado por 10 dias consecutivos.

#### **4.5.2 Fase 2**

Essa parte do experimento foi dividida em três fases: fase da indução, fase do condicionamento e o teste final.

### **a) Fase da Indução (1 – 5 dias)**

Essa foi a fase da administração dos tratamentos farmacológicos. Foi utilizado o protocolo pavloviano de condicionamento de traço, no qual há uma diferença do momento da apresentação dos estímulos. Pavlov postulou que neste tipo de condicionamento, o EC é apresentado e finalizado e, posteriormente, o EI é exibido. O intervalo entre as duas apresentações deve ser breve a ponto de formar uma associação (KRYUKOV, 2012; CAREY et al., 2014; SANTOS et al., 2017). Ocorre a implantação de intervalo de tempo, ou também denominado de intervalo de traço, entre a exposição do EC e a apresentação do EI (COONOR e GOULD, 2016), e há um traço discreto transitório do EC que persiste no sistema nervoso central, podendo persistir até a apresentação do EI para manter a associação dos dois estímulos (KRYUKOV, 2012; CAREY et al., 2014; SANTOS et al., 2017). Fizeram parte dessa fase os animais que participaram da fase 1 do experimento, ou seja, os animais que foram habituados na arena (n=14) e animais “*naïves*”, ou seja, animais que não foram habituados na arena (n=14). Os animais habituados (HAB) e os animais não habituados (NÃO-HAB) foram divididos nos seguintes grupos:

- NÃO-HAB VEI (n=7): Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos para o registro da atividade locomotora. Imediatamente após o término da sessão experimental foram administrados com veículo.
- NÃO-HAB MOR (n=7): Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos para o registro da atividade locomotora. Imediatamente após o término da sessão experimental foram administrados com morfina 10 mg/kg.
- HAB VEI (n=7): Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos para o registro da atividade locomotora. Imediatamente após o término da sessão experimental foram administrados com veículo.
- HAB MOR (n=7): Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos para o registro da atividade locomotora.

Imediatamente após o término da sessão experimental foram administrados com morfina 10 mg/kg.

**b) Fase do condicionamento (1 – 5 dias)**

Um dia após o final da fase de indução, todos os grupos receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos, durante cinco dias consecutivos. Este teste foi designado para avaliar a expressão de uma resposta locomotora condicionada produzida por morfina.

**c) Período de retirada (2 dias)**

Não houve testes comportamentais e nem administração de tratamentos farmacológicos. Os animais permaneceram em suas caixas-viveiros.

**d) Teste final (1 dia)**

Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por 30 minutos onde a atividade locomotora foi registrada.

A tabela 1 apresenta a linha temporal do experimento 1.

**Tabela 1:** Linha do tempo do experiment 1.

	FASE 1										FASE 2												
DIAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
	Habituação										Indução					Condicionamento					Retirada		Teste Final

A tabela 2 apresenta os grupos do experimento 1.

**Tabela 2:** Grupos do experimento 1.

Grupos	FASE 1		FASE 2				
	Habituação		Indução		Condicionamento		Teste Final
	Pré-arena	Pós-arena	Pré-arena	Pós-arena	Pré-arena	Pós-arena	Pré-arena
HAB-VEI (n=7)	VEI	VEI	VEI	VEI	VEI	VEI	VEI
HAB-MOR (n=7)	VEI	VEI	VEI	MOR	VEI	VEI	VEI
NÃO-HAB VEI (n=7)	---	---	VEI	VEI	VEI	VEI	VEI
NÃO-HAB MOR (n=7)	---	---	VEI	MOR	VEI	VEI	VEI

HAB= Habitado; NÃO-HAB= Não habituado; VEI= Veículo; MOR= Morfina 10 mg/kg.

**4.6 EXPERIMENTO 2:** Efeito do protocolo de contracondicionamento utilizando-se doses baixas de apomorfina na fase da reconsolidação da memória.

Esse experimento teve como objetivo avaliar se a utilização de um protocolo de contracondicionamento com apomorfina 0,05 mg/Kg atenuaria uma resposta locomotora condicionada por morfina 10 mg/Kg.

O experimento consistiu nas seguintes etapas:

#### **a) Fase de indução (1 – 5 dias)**

Essa foi a fase da administração do tratamento farmacológico com a morfina. Utilizou-se o protocolo pavloviano de traço, que ocorre quando a exposição ao estímulo condicionado (EC) precede e termina antes do início do estímulo incondicionado (EI), com intervalo breve entre o EC e o EI. (PAVLOV, 1927). Pavlov (1927) argumentou que a aprendizagem associativa no condicionamento de traço decorre de um resquício de estímulo no sistema nervoso, que sobrevive num tempo adequado e que não desaparece com o fim do estímulo físico.

Os animais foram divididos aleatoriamente em oito grupos, sendo n=7. No primeiro dia de teste, todos receberam injeções com VEI e, em seguida, foram colocados individualmente em um local novo (arena) por cinco minutos. Completado os cinco minutos de teste, quatro grupos receberam injeções VEI e aos outros quatro grupos foram dadas injeções de MOR (10mg/kg) imediatamente após a retirada da arena teste. Por intermédio do tratamento,

após o término da sessão experimental com morfina, avaliou-se o comportamento do animal através da sua atividade locomotora como resposta condicionada. Esse experimento foi repetido por mais quatro dias, para um total de cinco sessões. Os oito grupos experimentais foram os seguintes:

- VEI/VEI-I (n=7): Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos para o registro da atividade locomotora. Imediatamente após o término da sessão experimental foram administrados com veículo.
- VEI/APO-I (n=7): Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos para o registro da atividade locomotora. Imediatamente após o término da sessão experimental foram administrados com veículo.
- VEI/VEI-D (n=7): Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos para o registro da atividade locomotora. Imediatamente após o término da sessão experimental foram administrados com veículo.
- VEI/APO-D (n=7): Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos para o registro da atividade locomotora. Imediatamente após o término da sessão experimental foram administrados com veículo.
- MOR/VEI-I (n=7): Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos para o registro da atividade locomotora. Imediatamente após o término da sessão experimental foram administrados com morfina (10mg/kg).
- MOR/APO-I (n=7): Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos para o registro da atividade locomotora. Imediatamente após o término da sessão experimental foram administrados com morfina (10mg/kg).
- MOR/VEI-D (n=7): Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos para o registro da atividade locomotora. Imediatamente após o término da sessão experimental foram administrados com morfina (10mg/kg).

- MOR/APO-D (n=7): Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos para o registro da atividade locomotora. Imediatamente após o término da sessão experimental foram administrados com morfina (10mg/kg).

#### **b) Protocolo de contracondicionamento (1-5 dias)**

Essa foi a fase da administração do tratamento farmacológico com a apomorfina, para o teste de contracondicionamento, sendo este uma forma de tratamento que se baseia nos princípios do condicionamento clássico, na qual busca a substituição de respostas negativas desencadeadas por algum estímulo, por respostas positivas. Portanto é o condicionamento de uma resposta contrária ao estímulo inicialmente recebido (DE MELLO BASTOS, 2014).

Nessa fase do experimento, grupos VEI e MOR foram pareados. Esta fase testou se a apomorfina conseguiria produzir uma resposta condicionada contrária à resposta induzida pela morfina, promovendo uma nova aprendizagem, bem como, também, se o tempo para a administração da apomorfina alteraria esse resultado. Esse experimento foi repetido por mais quatro dias, para um total de cinco sessões. Os oito grupos experimentais foram os seguintes:

- VEI/VEI-I (n=7): Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos para o registro da atividade locomotora. Imediatamente após o término da sessão experimental foram administrados com veículo.
- VEI/APO-I (n=7): Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos para o registro da atividade locomotora. Imediatamente após o término da sessão experimental foram administrados com apomorfina (0,05 mg/kg).
- VEI/VEI-D (n=7): Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos para o registro da atividade locomotora. Passados 15 minutos após o término da sessão experimental foram administrados com veículo.

- VEI/APO-D (n=7): Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos para o registro da atividade locomotora. Passados 15 minutos após o término da sessão experimental foram administrados com apomorfina (0,05 mg/kg).
- MOR/VEI-I (n=7): Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos para o registro da atividade locomotora. Imediatamente após o término da sessão experimental foram administrados com veículo.
- MOR/APO-I (n=7): Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos para o registro da atividade locomotora. Imediatamente após o término da sessão experimental foram administrados com apomorfina (0,05 mg/kg).
- MOR/VEI-D (n=7): Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos para o registro da atividade locomotora. Passados 15 minutos após o término da sessão experimental foram administrados com veículo.
- MOR/APO-D (n=7): Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena por cinco minutos para o registro da atividade locomotora. Passados 15 minutos após o término da sessão experimental foram administrados com apomorfina (0,05 mg/kg).

### **c) Retirada (2 dias)**

Terminada a fase farmacológica, todos os animais foram submetidos a um período de retirada de drogas de dois dias, durante o qual os animais permaneceram em suas caixas-viveiro, sem receber tratamento farmacológico ou manipulação comportamental. Esta fase permitiu a dissipação dos efeitos dos tratamentos farmacológicos.

### **d) Teste de condicionamento (1 dia)**

Os animais receberam veículo e imediatamente após foram colocados na arena por 30 minutos, onde a atividade locomotora foi registrada para determinar o impacto do contracondicionamento sobre a resposta condicionada da morfina, medindo a locomoção do animal nesse período.

A tabela 3 apresenta a linha temporal do experimento 2:

**Tabela 3:** Linha temporal do experimento 2.

<b>DIAS</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	<b>Indução</b>					<b>Contracondicionamento</b>					<b>Retirada</b>	<b>Teste de Condicionamento</b>	

A tabela 4 apresenta os grupos do experimento 2

**Tabela 4:** Grupos do experimento 2.

<b>GRUPOS</b>	<b>FASES</b>				
	<b>Indução</b>		<b>Contracondicionamento</b>		<b>Teste final</b>
	<b>Pré-arena</b>	<b>Pós-arena</b>	<b>Pré-arena</b>	<b>Pós-arena</b>	<b>Pré-arena</b>
VEI/VEI-I (n=7)	VEI	VEI	VEI	VEI	VEI
VEI/APO-I (n=7)	VEI	VEI	VEI	APO	VEI
VEI/VEI-D (n=7)	VEI	VEI	VEI	VEI	VEI
VEI/APO-D (n=7)	VEI	VEI	VEI	APO	VEI
MOR/VEI-I (n=7)	VEI	MOR	VEI	VEI	VEI
MOR/APO-I (n=7)	VEI	MOR	VEI	APO	VEI
MOR/VEI-D (n=7)	VEI	MOR	VEI	VEI	VEI
MOR/APO-D (n=7)	VEI	MOR	VEI	APO	VEI

VEI= Veículo; MOR= Morfina 10mg/kg; APO= apomorfina 0,05mg/kg; I= tratamento administrado imediatamente após retirada da arena no teste de contracondicionamento; D= tratamento administrado após 15 minutos da retirada da arena no teste de contracondicionamento.

#### 4.7 Estatística

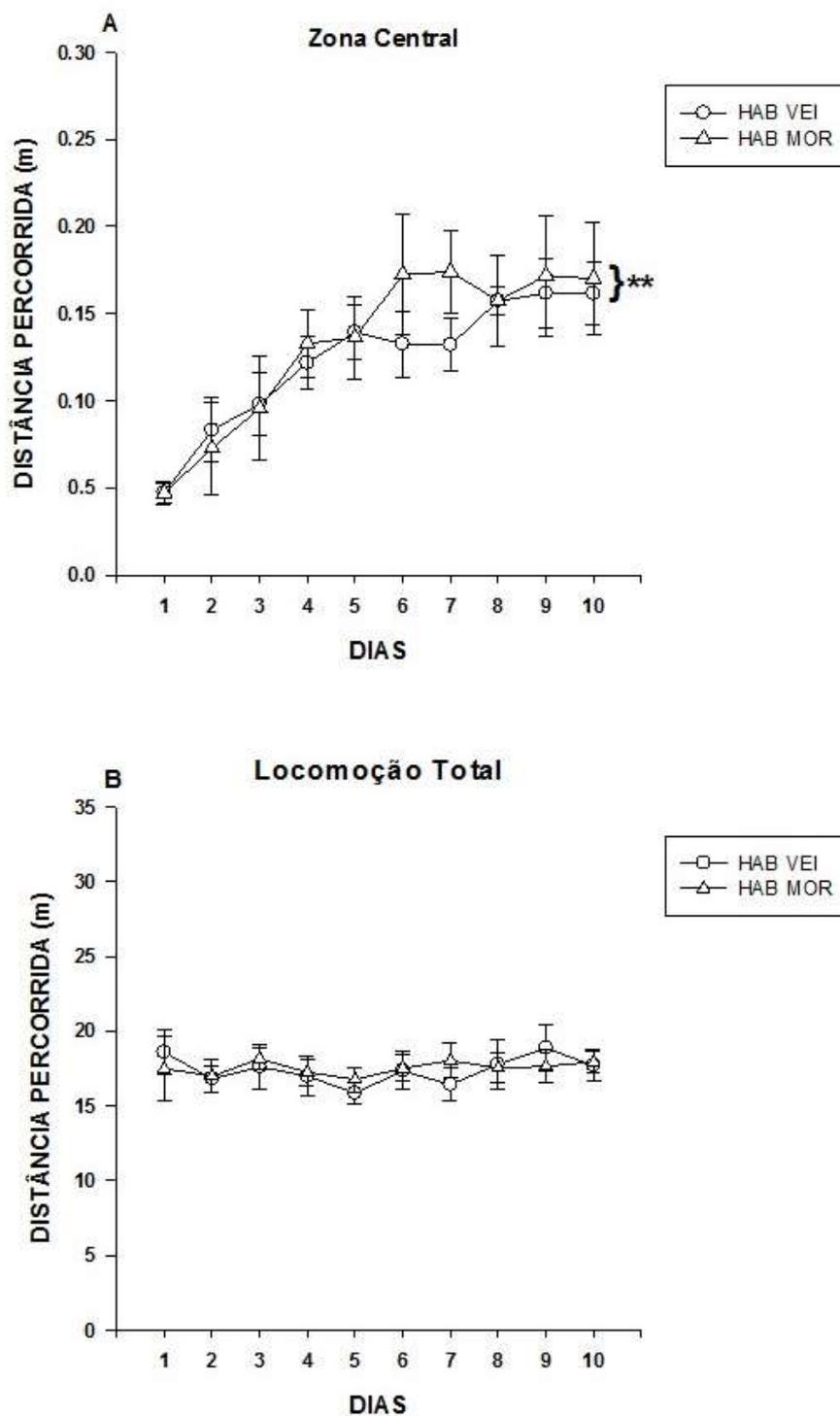
Os resultados da fase de indução foram analisados utilizando-se a Análise de Variância (ANOVA) de dois fatores, para determinar o efeito de tratamento, o efeito do dia, bem como as interações entre as variáveis. Quando foi registrado um efeito significativo da interação de tratamentos de grupo versus dias de indução, os dados foram avaliados por ANOVA de um fator, seguido do teste *post-hoc* de *Tukey*, considerando  $p < 0,05$  como critério de significância estatística. Os dados comportamentais obtidos a partir do primeiro dia de condicionamento de 30 minutos, do teste final de 30 minutos e os seus primeiros cinco minutos foram analisados por ANOVA de um fator. Apresentando possíveis diferenças significativas entre os grupos observados através da ANOVA (efeitos do grupo  $p < 0,05$ ) foram analisados utilizando o teste de *Tukey*.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EXPERIMENTO 1: Efeitos condicionados do contexto novo com a administração de morfina após término da sessão experimental.

A Figura 5 apresenta os resultados da atividade locomotora na arena total e na zona central da fase 1 (fase de habituação). Para a locomoção na zona central (Fig. 5 A), a ANOVA de dois fatores mostrou que houve somente efeito dos dias de tratamento [ $F(9, 108) = 9,20; p < 0,01$ ]. Não houve efeito dos grupos [ $F(1, 12) = 0,30; p > 0,05$ ] e nem interação grupos X dias [ $F(9, 108) = 0,43; p > 0,05$ ]. O teste de *Tukey* mostrou que houve aumento da locomoção na zona central para os dois grupos HAB, sendo que nos dias 8, 9 e 10 a locomoção na zona central foi maior do que o primeiro dia ( $p < 0,05$ ). Para a locomoção total na arena (Fig. 5B), a ANOVA de dois fatores mostrou que não houve efeito dos grupos [ $F(1, 12) = 0,01; p > 0,05$ ], não houve efeito dos dias de tratamento [ $F(9, 108) = 0,80; p > 0,05$ ] e nem interação grupos X dias [ $F(9, 108) = 0,35; p > 0,05$ ]. Esses resultados corroboram os resultados de Cerbone e Sadile (1994), evidenciando que depois de repetidas apresentações de um ambiente novo a roedores, há uma perda do estímulo pela novidade com o passar dos dias.

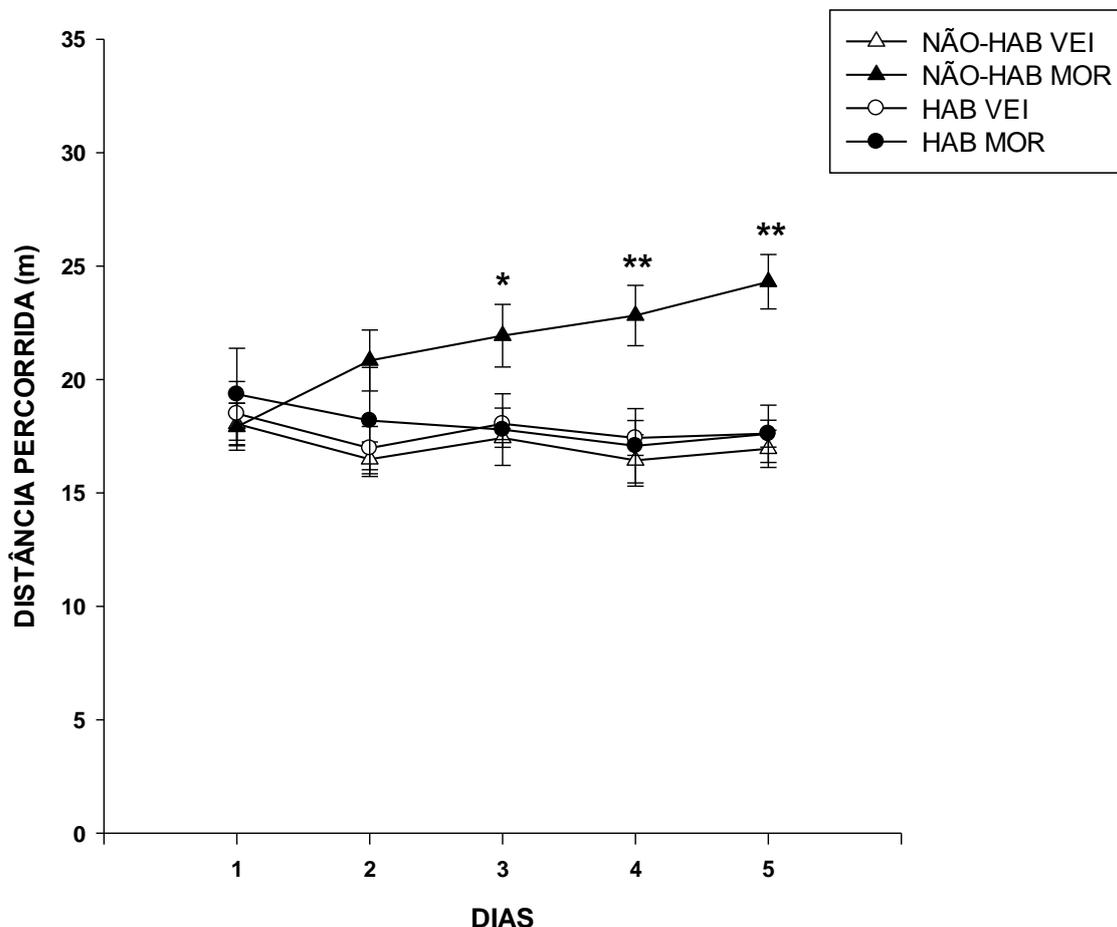
## EXPERIMENTO 1: FASE DE HABITUAÇÃO



**Figura 5:** Média e Erro Padrão da Média (E.P.M.) dos resultados da locomoção na Zona Central (A) e da locomoção total (B) durante os 10 dias da fase 1 (fase de habituação). \*\* indica maior locomoção no mesmo dia experimental. \*\* Indica maior locomoção do que nos demais dias ( $p < 0,05$ ; ANOVA de dois fatores, seguida pelo Teste de Tukey).

Na Figura 6 observa-se a apresentação dos dados da distância percorrida pelos animais na fase do tratamento farmacológico da fase 2. A ANOVA de dois fatores por medidas repetidas mostrou que houve interação grupos X dias [F (12, 96) = 4,40; p <0,01] como também efeito dos grupos [F (3, 24) = 3,45; p <0,05], entretanto não houve efeito dos dias de tratamento [F (4, 96) = 1,0; p > 0,05]. A análise da interação grupo X dia, a ANOVA de um fator seguido de teste de *Tukey* indicou que no dia 1 [F (3, 24) = 0,21; p > 0,05] e no dia 2 [F (3, 24) = 1,72; p > 0,5] não ocorreu diferença entre os grupos. No dia 3 [F (3, 24) = 3,51; p <0,05], os resultados demonstraram que o grupo que não foi apresentado previamente ao ambiente teste e que também recebeu veículo antes do teste na arena e morfina imediatamente após a retirada do ambiente teste (NÃO-HAB MOR) apresentou dados de locomoção mais altos que todos os grupos, como também no dia 4 [F (3, 24) = 5,51; p <0,01] e dia 5 [F (3, 24) = 12,0; p <0,01].

## EXPERIMENTO 1: FASE DE INDUÇÃO

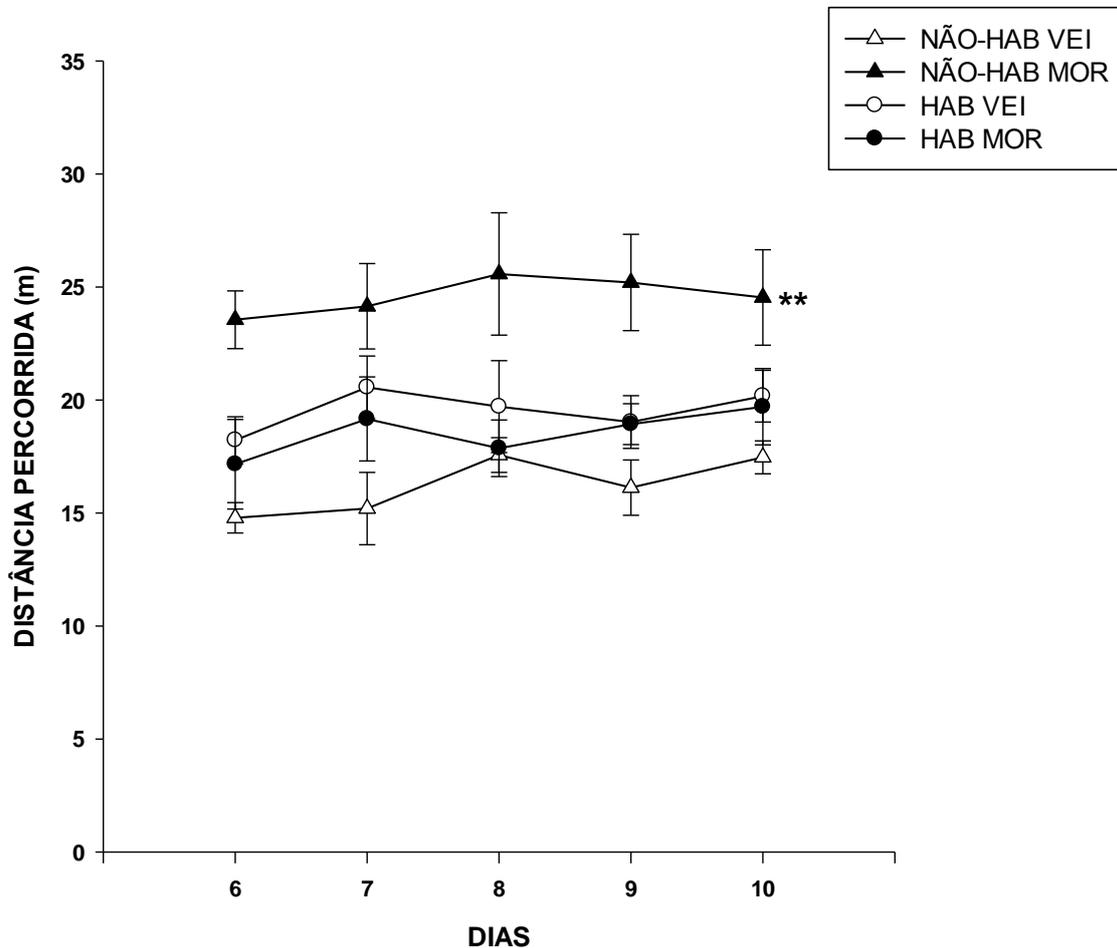


**Figura 6:** Média e Erro Padrão da Média (E.P.M.) da locomoção ao longo dos cinco dias da fase de indução. \* indica maior locomoção no mesmo dia experimental. \*\* Indica maior locomoção para o grupo NÃO-HAB MOR quando comparado ao 1º e 2º dia experimental ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo Teste de Tukey).

A Figura 7 apresenta os resultados da distância percorrida pelos animais na arena total na fase de condicionamento. Nesta fase do experimento, todos os animais receberam veículo antes da sessão experimental para avaliar se a morfina associada ao estímulo do ambiente produziria uma resposta condicionada. Para essa análise, a ANOVA de dois fatores mostrou efeito dos grupos [ $F(3, 24) = 7,81$ ;  $p < 0,01$ ] como também efeito de dias de tratamento [ $F(4, 96) = 2,53$ ;  $p < 0,05$ ], entretanto, não houve interação grupo X dia [ $F(12, 96) = 0,60$ ;  $p > 0,05$ ]. Para comparações de grupos individuais, a ANOVA de um fator

[ $F(3, 136) = 27,0$ ;  $p < 0,01$ ] seguida pelo teste de *Tukey* mostrou que o grupo NÃO-HAB MOR apresentou locomoção maior do que todos os outros grupos ( $p < 0,01$ ).

### EXPERIMENTO 1: FASE DE CONDICIONAMENTO



**Figura 7:** Média e Erro Padrão da Média (E.P.M.) dos resultados da locomoção durante o teste de condicionamento ao longo de cinco dias. \*\* indica maior locomoção para o grupo NÃO-HAB MOR quando comparado aos demais grupos ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo Teste de *Tukey*).

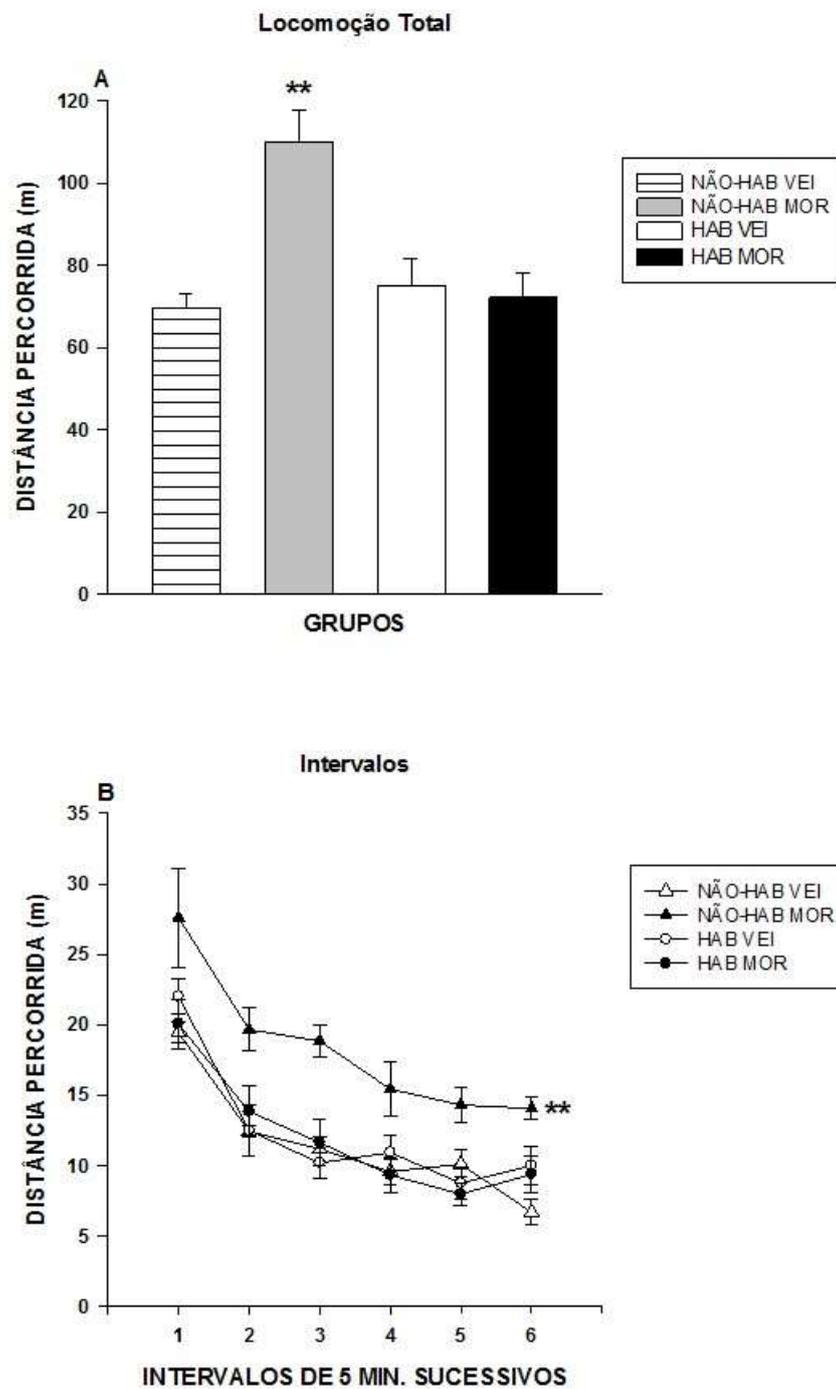
A Figura 8A apresenta os resultados da locomoção total na fase do teste final durante 30 minutos. A ANOVA de um fator mostrou que houve efeito dos grupos [ $F(3, 24) = 9,52$ ;  $p < 0,01$ ]. Através do teste de *Tukey* observou-se que o grupo NÃO-HAB MOR apresentou maior locomoção do que todos os outros grupos ( $p < 0,01$ ). Para a locomoção por intervalos de cinco minutos (Fig. 8B), a ANOVA de dois fatores mostrou que houve efeito dos grupos [ $F(3, 24) = 9,52$ ;  $p < 0,01$ ], efeito de intervalos [ $F(5, 120) = 67,81$ ;  $p < 0,01$ ], porém indicou que não

houve interação grupo X intervalo [ $F(15, 120) = 1,10; p > 0,05$ ]. Na comparação de grupos individuais a ANOVA de um fator [ $F(3, 164) = 13,32; p < 0,01$ ] acompanhado pelo teste de *Tukey* observou-se que o grupo NÃO-HAB MOR teve maior atividade locomotora do que todos os outros grupos ( $p < 0,01$ ). Os resultados também indicaram que ao longo dos intervalos, todos os grupos experimentais apresentaram um decréscimo na locomoção ( $p > 0,05$ ).

**Figura 8:** Média e Erro Padrão da Média (E.P.M.) dos resultados da locomoção durante os 30 minutos (A) e a locomoção nos sucessivos intervalos de 5 minutos (B) ao longo do teste final. \*\* indica maior locomoção para o grupo NÃO-HAB MOR quando comparado aos demais grupos ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo Teste de Tukey).

**Figura 8:** Média e Erro Padrão da Média (E.P.M.) dos resultados da locomoção durante os 30 minutos (A) e a locomoção nos sucessivos intervalos de 5 minutos (B) ao longo do teste final. \*\* indica maior locomoção para o grupo NÃO-HAB MOR quando comparado aos demais grupos ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo Teste de Tukey).

## EXPERIMENTO 1: TESTE FINAL

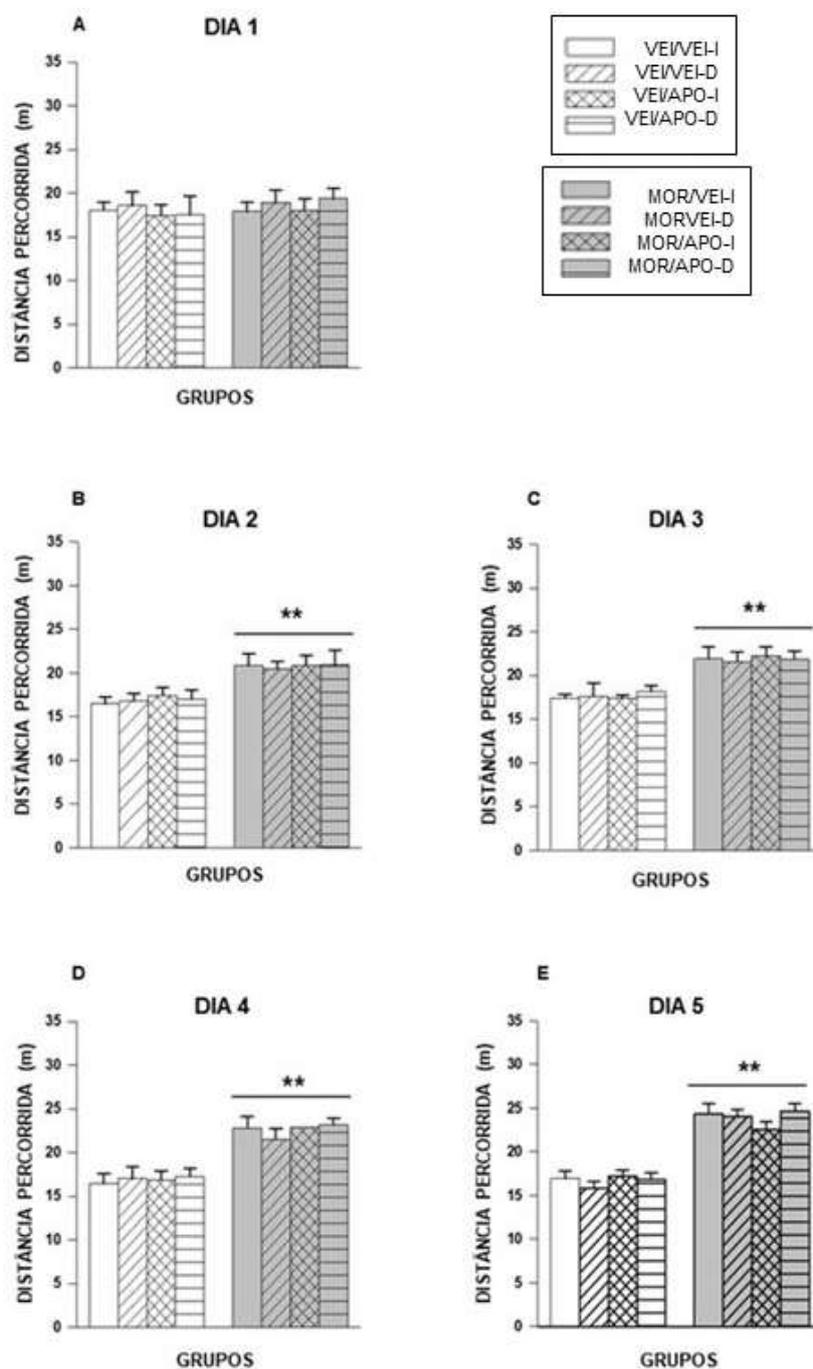


**Figura 8:** Média e Erro Padrão da Média (E.P.M.) dos resultados da locomoção durante os 30 minutos (A) e a locomoção nos sucessivos intervalos de 5 minutos (B) ao longo do teste final. \*\* indica maior locomoção para o grupo NÃO-HAB MOR quando comparado aos demais grupos ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo Teste de Tukey).

**5.2 EXPERIMENTO 2:** Efeito do protocolo de contracondicionamento utilizando-se doses baixas de apomorfina na fase da reconsolidação da memória.

Na Figura 9 observa-se a apresentação dos dados da distância percorrida pelos animais na fase do tratamento farmacológico com morfina (fase de indução). A ANOVA de dois fatores por medidas repetidas mostrou que houve interação grupo X dia [ $F(28, 192) = 3,71$ ;  $p < 0,01$ ], efeito dos grupos [ $F(7, 48) = 6,75$ ;  $p < 0,01$ ] assim como efeito dos dias de tratamento [ $F(4, 192) = 10,33$ ;  $p < 0,01$ ]. Na análise da interação grupo X dia, a ANOVA de um fator seguida pelo teste de *Tukey* mostrou (Fig. 9A) que não houve diferenças entre os grupos no dia 1 [ $F(7, 48) = 0,24$ ;  $p > 0,05$ ], porém nos dias 2 [ $F(7, 48) = 3,45$ ;  $p < 0,01$ ], 3 [ $F(7, 48) = 5,23$ ;  $p < 0,01$ ], 4 [ $F(7, 48) = 8,20$ ;  $p < 0,01$ ] e 5 [ $F(7, 48) = 20,22$ ;  $p < 0,01$ ], os grupos MOR apresentaram maior atividade locomotora que os grupos VEI, conforme pode ser observado nas figuras 9B, 9C, 9D e 9E, respectivamente.

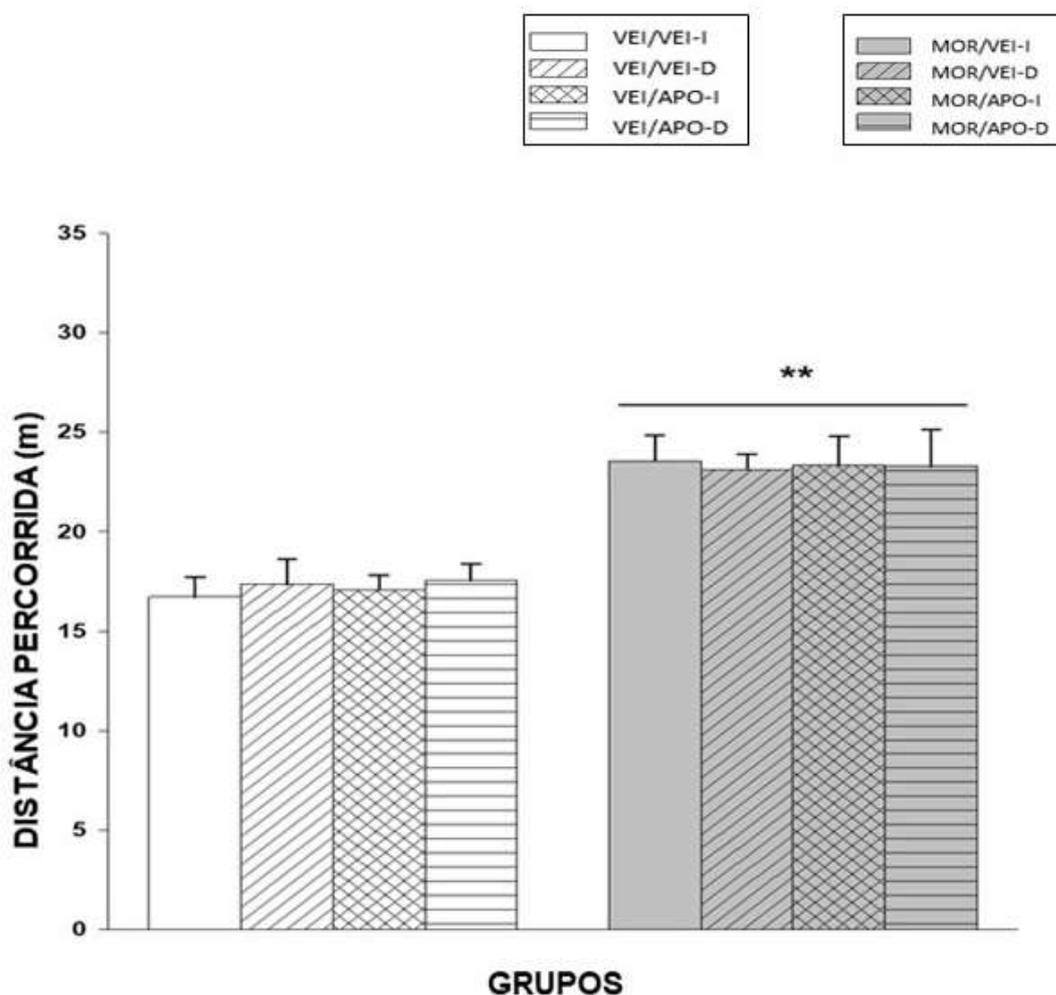
## FASE DE INDUÇÃO



**Figura 9:** Média e Erro Padrão da Média (E.P.M.) da locomoção ao longo dos 5 dias da fase de indução. \*\* indica nível maior locomoção no mesmo dia experimental ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo Teste de Tukey).

A Figura 10 retrata a atividade locomotora no primeiro dia da fase de contracondicionamento com o tratamento farmacológico com a apomorfina. A ANOVA de um fator mostrou que houve efeito dos grupos [F (7, 48) = 7,50;  $p < 0,01$ ]. Através do teste de *Tukey* observou-se que todos os grupos MOR apresentaram dados de locomoção mais altos que os grupos VEI ( $p < 0,05$ ), e também que não houve diferença entre os grupos MOR ( $p > 0,05$ ).

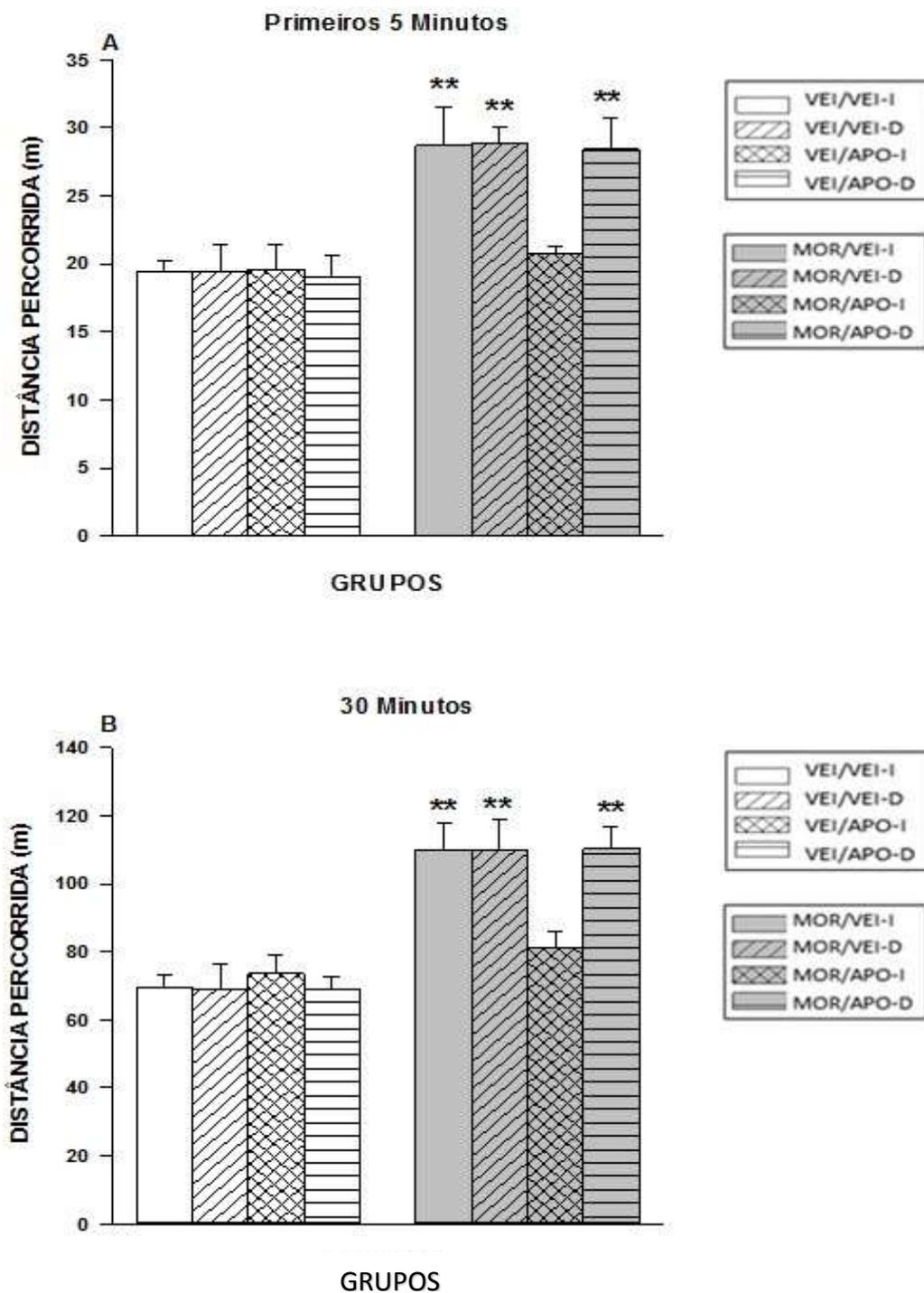
### CONTRACONDICIONAMENTO DIA 1



**Figura 10:** Média e Erro Padrão da Média (E.P.M.) dos resultados da locomoção total no primeiro dia do protocolo de contracondicionamento. Administrações imediatamente (I) após retirada do ambiente teste e administrações feitas após (D) 15 minutos após a saída da arena teste. \*\* indica nível de locomoção maior no mesmo dia experimental. ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo Teste de Tukey).

A Figura 11A apresenta os resultados da atividade locomotora nos primeiros cinco minutos do teste de condicionamento. A ANOVA de um fator mostrou que houve efeito dos grupos [ $F(7,48) = 6,70$ ;  $p < 0,01$ ]. Através do teste de *Tukey* observou-se que três grupos MOR apresentaram dados de locomoção mais altos que todos os grupos VEI ( $p < 0,05$ ), maiores que o grupo MOR / APO-I ( $p < 0,05$ ) e que não houve diferença entre os grupos VEI e MOR/APO-I ( $p > 0,05$ ). A Figura 11B apresenta os resultados da locomoção total na fase do teste final durante 30 minutos. A ANOVA de um fator mostrou que houve efeito dos grupos [ $F(7, 48) = 10,20$ ;  $p < 0,01$ ], ademais, o teste de *Tukey* indicou que os três grupos MOR apresentaram dados de locomoção mais altos que os grupos VEI e MOR/APO-I ( $p < 0,05$ ). Entre os grupos VEI e MOR/APO-I ( $p > 0,05$ ) não foi exibido nenhuma diferença.

## EXPERIMENTO 2: TESTE DE CONDICIONAMENTO



**Figura 11:** Média e Erro Padrão da Média (E.P.M.) da locomoção total nos primeiros cinco minutos (A) e da locomoção total nos 30 minutos (B) de teste de condicionamento. \*\* indica nível de locomoção maior no mesmo dia experimental. ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo Teste de Tukey).

## 6 DISCUSSÃO

**6.1 EXPERIMENTO 1:** Efeitos condicionados do contexto novo com a administração de morfina após término da sessão experimental.

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a importância do ambiente novo na indução de uma resposta condicionada produzida por morfina na dose de 10 mg/kg, administrada imediatamente após breve sessão experimental, e também a influência da familiarização com o ambiente no comportamento locomotor dos animais através da medida da atividade na zona central. Foi possível observar através dos resultados, que a familiarização com o contexto ambiental na fase 1 aumentou a atividade dos animais na zona central sem alteração da atividade locomotora total, indicando diminuição de ansiedade pelo ambiente novo.

Diferentemente no que se refere à locomoção, não houve mudança na locomoção total em ambos os grupos ao longo dos 10 dias de sessões experimentais, e os animais mantiveram locomoção sem variações. O ambiente perdeu as características de novidade (CERBONE e SADILE, 1994). É uma manifestação característica de animais roedores no processo da habituação, a diminuição do interesse pela exploração de um ambiente novo, após exposições repetidas e continuadas (LEUSSIS e BOLIVAR, 2006). Os resultados mostraram-se em níveis constantes de locomoção total ao longo de toda a fase 1 (experimento 1- fase 1(Figura 4B)), mesmo assim, não se pode afirmar que houve habituação. Entretanto, essa estabilidade de resultados fornece parâmetros para a identificação de resposta condicionada.

A atividade na zona central com repetidos testes na arena, também é uma medida comportamental, de caráter positivo para habituação (DAI et al., 1995), pois avalia o caráter de ansiedade do animal, considerando também o comportamento exploratório, através da atividade locomotora (GOES et al., 2013). Liebsch e colaboradores (1998) postularam que o nível aumentado da atividade locomotora do animal na zona central em arena, indica uma queda da ansiedade considerada uma forma avaliativa da emocionalidade do rato. Carey e colaboradores (2008) relataram que roedores passaram mais vezes pela zona

central quando introduzido um objeto novo nesta área, em ambiente na qual já conheciam previamente, o mesmo não aconteceria se o ambiente também fosse uma novidade (DAI et al., 1995). Vale ressaltar que houve estreita correspondência entre as respostas dos dois grupos (experimento 1 – fase 1 (Figura 4A)), com efeitos comportamentais equiparados com significativa resposta até o sexto dia de teste, demonstrando um declínio na atividade locomotora mas ainda com resposta na locomoção maior do que no início do experimento. Experiências emocionalmente estimulantes de aprendizado inspiram um processo de consolidação (MCGAUGH e ROOZENDAAL, 2009). Dentro dessa perspectiva, o nível de ansiedade pela exposição inicial ao ambiente novo aumentado, demonstra ser um indicador de uma forte resposta emocional. A excitação emocional ativa processos neurobiológicos que modulam a consolidação de memórias de experiências recentes, que podem ser evocadas (GASBARRI e TOMAZ, 2012).

Leite Júnior e colaboradores (2019) apuraram que tratamentos repetitivos despertam uma atividade locomotora expressa nos primeiros cinco minutos de teste. Em cinco minutos, portanto, os dados obtidos de locomoção na zona central estão adequadamente inseridos ao processo de início da consolidação após a exposição inicial à arena, ao ambiente novo. Diante desta observação, percebe-se que a atividade dopaminérgica promovida pela novidade associa-se com a atividade dopaminérgica relacionada com a morfina administrada imediatamente após o teste de arena, e isto ocorre durante o período de consolidação da memória.

Na fase 2 do experimento, os resultados demonstraram que a morfina administrada após a sessão experimental na arena, influenciou o comportamento do grupo (NÃO-HAB MOR) sem exposição prévia ao ambiente de teste, com aumento da locomoção ao longo dos dias de administração, sendo que este padrão de resposta não foi observado nos demais grupos. Vale ressaltar que no primeiro dia de tratamento com morfina, após sessão experimental, os animais receberam veículo antes de serem colocados na arena. Considerando isso, o primeiro dia foi um dia sem tratamento farmacológico para todos os grupos e o protocolo utilizado, o de condicionamento pavloviano de traço, no qual a resposta farmacológica não é experimentada no ambiente teste, ou seja, o comportamento foi medido sem estado medicamentoso.

Em recente trabalho (OLIVEIRA et al., 2019), foi possível demonstrar que a morfina administrada após o término da sessão experimental produziu potentes efeitos condicionados, o qual corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho. Vale ressaltar que as exposições ao ambiente teste foram repetidas, porém breves (5 minutos), impossibilitando a ocorrência de habituação entre as sessões experimentais, mantendo o valor da novidade. A exposição a um novo ambiente em cinco minutos evoca a liberação de dopamina que ativaré sistemas cerebrais responsáveis pelo aprendizado e memória, como o hipocampo e seus efeitos persistem brevemente após remoção do novo ambiente (MENEZES et al., 2015).

Foi possível observar os efeitos condicionados revelados no segundo dia de tratamento (experimento 1, fase de indução (figura 5)) com morfina imediatamente após retirada da arena, resposta condicionada que se mostra mais acentuada na terceira sessão experimental com o grupo que não recebeu exposição prévia ao ambiente de teste (NÃO-HAB MOR), sustentando o nível de condicionamento após a sessão experimental, indicando para o animal que o ambiente é sempre novo, corroborando com Oliveira e colaboradores (2019) que afirmaram que a hiperlocomoção provocada pela morfina ocorre dentro de cinco minutos.

A morfina não atua diretamente nos receptores dopaminérgicos, mas seus fortes efeitos liberam dopamina (CHEN et al., 2015; DI CHIARA e IMPERATO, 1988; LIU et al., 2018; MORI et al., 2016). A morfina liga-se ao receptor MOR, responsável pela maioria dos efeitos da morfina, através do aumento da atividade mesolímbica principalmente no VTA e núcleo *accumbens*. No VTA a morfina atua como agonista, ocorre a inibição da liberação do GABA pelos interneurônios, que por sua vez, estimulam os neurônios dopaminérgicos que projetados até o núcleo *accumbens*, aumentam a liberação de dopamina, modulando o reforço positivo correlacionando ao seu efeito potencial de abuso (NESTLER, 2004; VOLKOW et al., 2011; MARTINS et al., 2012; MORI et al., 2016).

Ocorre um aumento na resposta condicionada com tratamentos repetidos com morfina após a sessão experimental na arena, indicando um fortalecimento progressivo do condicionamento pelos efeitos de tratamento que ocorrem durante a consolidação. O tratamento com morfina administrada após a sessão

experimental atua como reforço positivo (ROBINSON E BERRIGDE, 1993), alterando o comportamento locomotor do animal, aumentando a sua atividade locomotora acima da induzida apenas pelo novo ambiente. A cada exposição ao ambiente, há a evocação dos efeitos da droga, gerando esse ciclo de consolidação/reconsolidação da memória (TRONSON E TAYLOR, 2013)

Não houve diferenças entre os demais grupos, nem mesmo no grupo que também recebeu morfina e que na fase 1 foi apresentado à arena (HAB MOR). Tratamentos administrados imediatamente após uma breve exposição no ambiente teste, porém, previamente explorados, não produzem condicionamento (BASTOS et al., 2014; LEITE JÚNIOR et al., 2019), indicando a necessidade de um estímulo novo para associação do ambiente com tratamento administrado após a sessão experimental. Estudos anteriores revelaram que a cocaína produz efeitos estimulantes agudos em ambientes experimentais que representem novidade, resultados não demonstrados em contextos ambientais nos quais os sujeitos estivessem previamente habituados (CAREY et al., 2005; CAREY e DAMIANOPOULOS, 2008).

As divergências referentes à locomoção entre o grupo NÃO-HAB MOR e os demais grupos experimentais, aumentaram de forma significativa ao longo dos subsequentes dias de testes, indicando efeito condicionado pela morfina somente no grupo NÃO-HAB MOR. A associação consolidada referente ao ambiente aumentou quanto ao seu valor de incentivo e, conseqüentemente, a subsequente resposta comportamental foi potencializada. A ausência de resposta condicionada no tratamento com morfina, após a sessão experimental no grupo exposto previamente (HAB MOR) no ambiente experimental, justifica-se pela sua participação na fase 1 desse experimento, na qual os sujeitos foram submetidos a 10 sessões consecutivas na arena teste, por cinco minutos. Tratamentos administrados imediatamente após passagem no ambiente teste, não promovem condicionamento, porque esse ambiente deixa de ser novo e passa a ser familiarizado. A memória da habituação foi consolidada, perdeu-se o estímulo da novidade. A experiência ambiental já foi consolidada. (BASTOS, et al., 2014; LEITE JÚNIOR et al., 2018). Não houve correspondência entre as respostas comportamentais ao tratamento após sessão experimental com morfina entre os grupos que já conheciam previamente a arena teste (HAB) e os grupos que só conheceram o ambiente teste na fase 2 (NÃO-HAB), com exceção

no primeiro dia da fase de indução (experimento 1, fase de indução (Figura 5)), mesmo após cinco dias de tratamento farmacológico.

A dopamina é ativada por processos motivados pela novidade, com participação de suma importância nos processos de consolidação e reconsolidação de memórias (OLIVEIRA et al., 2019). Essa ativação aumenta a liberação de neurônios dopaminérgicos no VTA e no hipocampo (MENEZES et al., 2015), estruturas cerebrais relacionadas aos mecanismos de recompensa e motivação (LEGAULT e WISE, 2001). Santos (2019) sugere que as associações das pistas contextuais com o tratamento farmacológico após a sessão experimental, consolidam-se por ativação dopaminérgica, o ambiente não perde seu caráter de novidade, e a droga exerce seu papel reforçador positivo.

Outro dado importante observado nos resultados, é que o efeito estimulante do condicionamento, que foi induzido na primeira fase com o grupo NÃO-HAB MOR, permaneceu na segunda fase (experimento 1 – fase de condicionamento (Figura 6)). Deve-se ressaltar que nessa fase os animais receberam apenas veículo tanto antes como após a sessão experimental, para avaliar a resposta condicionada exclusivamente na presença dos estímulos condicionados, sem a presença do tratamento farmacológico, sem as pistas de estímulos da droga. Testes de condicionamento com tratamento antes da sessão experimental diverge do teste dito “pós-teste”, pois a droga é administrada antes do animal ser colocado no ambiente de teste, e avalia-se o comportamento do animal sob o efeito da droga na arena. O teste com condicionamento após a sessão experimental não é conduzido sob o efeito da droga, sendo assim, não há diferenças de sinais associados à presença ou ausência das pistas das drogas. O fato de não necessariamente existir uma correlação entre as pistas das drogas e os testes, pode ser que facilite o condicionamento rápido observado com o condicionamento administrado após a sessão experimental. Os tratamentos aplicados logo após o término da sessão experimental alteram o comportamento do animal durante a janela da consolidação, na qual a memória pode ser modulada (OLIVEIRA et al., 2019).

Santos e colaboradores (2018) apuraram em testes com apomorfina com grupos pareados e não pareados, incluindo tratamentos antes e após a sessão experimental, que os efeitos comportamentais nos grupos após o teste experimental espelhavam os grupos que recebiam tratamento antes da sessão

teste. Os efeitos da apomorfina foram observados no segundo dia da sessão experimental e em ambos os grupos. Trabalhos anteriores (BASTOS, 2014; SANTOS et al., 2015; 2017) demonstraram que a apomorfina quando aplicada imediatamente após sessão experimental de cinco minutos no ambiente novo, sugeriu uma mudança no comportamento do animal. Verificaram que houve uma alteração na atividade da dopamina, cujos efeitos são mantidos, durante a consolidação de teste de aprendizado, promovida pela apomorfina, mudando o valor do incentivo da associação, preconizando que associações estímulo-resposta pareados com alta descarga dopaminérgica estimulem a consolidação dessas associações.

Pôde-se observar no teste final o efeito condicionado produzido pela morfina no grupo, que foi exposto à arena pela primeira vez na fase 2 e que recebeu o tratamento farmacológico através da resposta locomotora condicionada (experimento 1 – teste final (Figura 7A)), restrita à fase inicial da inserção do animal no ambiente de teste e posterior declínio na atividade locomotora. Neste teste, todos os animais foram administrados com salina e colocados imediatamente na arena por 30 minutos. Os resultados mostraram que o grupo que não esteve exposto previamente ao ambiente teste apresentou maior locomoção do que os demais grupos. Tal fato sugere que o tratamento com morfina administrado associado a um ambiente novo possibilita uma resposta condicionada. Nos outros grupos não houve divergências na atividade locomotora, e ao longo dos intervalos do teste (experimento 1 – teste final (Figura 7B)), houve uma diminuição progressiva na locomoção em todos os grupos experimentais. Esses resultados são consistentes com os efeitos esperados em um condicionamento (CAREY et al., 2014). No teste final de 30 minutos também é relevante o impacto da exposição ao ambiente experimental nos testes de cinco minutos anteriores, demonstrando um possível efeito de habituação nos demais grupos experimentais.

A metodologia aplicada neste estudo baseou-se em exposições curtas (cinco minutos) dos sujeitos, individualmente, em ambiente teste novo, com o objetivo de avaliar a possibilidade de ocorrer processos de consolidação imediatamente após a sessão experimental, conforme Menezes e colaboradores (2015) já haviam experimentado.

Experimentos com breves tempos de exposição utilizando a locomoção como medida de comportamento de efeito de condicionamento são interessantemente aplicados porque testes longos associados com avaliação locomotora em arena, para pesquisa com drogas (CAREY et al., 2008) apresenta como complicador o fato de ocorrer a habituação entre as sessões e como consequência, a diminuição da locomoção do grupo controle.

O presente estudo concluiu que experimentos com breves sessões de teste para estudos de condicionamento com drogas psicoativas são pertinentes porque podem evitar algumas intercorrências. Defende, por fim, que breve exposição a um novo ambiente com tratamentos farmacológicos, após a sessão experimental, pode contribuir como um protocolo útil para estudos do processo de condicionamento induzido por drogas.

## **6.2 EXPERIMENTO 2:** Efeito do protocolo de contracondicionamento utilizando-se doses baixas de apomorfina na fase da reconsolidação da memória.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do método do contracondicionamento no bloqueio/atenuação da resposta condicionada pela morfina 10 mg/kg com breves exposições.

Já fora demonstrado anteriormente por Oliveira e colaboradores (2019), em breves exposições de cinco minutos e diferentes doses de morfina (3, 5 e 10 mg/kg), o aumento na atividade locomotora dos animais em três dias de teste de indução, e o grupo que recebera 10 mg/kg apresentou maior atividade locomotora no último dia do teste do que os demais grupos. Na pesquisa atual foi relevante observar que no primeiro dia de experimento, ou seja, no primeiro dia em que os animais foram inseridos na arena, o comportamento locomotor dos animais foi parecido (experimento 2- fase de indução (Figura 8A)). Porém, após o primeiro tratamento aplicado imediatamente após o teste no ambiente experimental ocorreu uma mudança (experimento 2- fase de indução (Figura 8B)): grupos que receberam morfina como tratamento apresentaram atividade locomotora maior que os grupos que receberam tratamento com solução salina. A resposta condicionada aumentou com os tratamentos repetitivos (experimento 2- fase de indução (Figuras 8C, D e E)) indicando que os tratamentos administrados imediatamente após a sessão experimental foram consolidados (IZQUIERDO, 2011). Izquierdo (2011) relatou que a associação da novidade do ambiente com a informação farmacológica na memória ocorre no intervalo de cinco a dez minutos após a retirada do ambiente teste, intervalo de importância para a consolidação da memória.

Deve-se destacar que a eficácia dos tratamentos administrados após a sessão experimental é devido ao efeito de condicionamento de traço, portanto, a associação com o ambiente novo também mantém a resposta locomotora. A apresentação inicial ao ambiente novo estimula intensa resposta exploratória e emocional do animal, uma vez que a novidade desperta a motivação e a busca pela recompensa da novidade (XIGENG et al., 2003), iniciando assim, o processo de consolidação em ambos os grupos experimentais. Para os grupos veículos, as pistas contextuais são consolidadas e, nas sessões subsequentes, ocorre a diminuição do seu caráter de novidade e inovador, e como resposta há

o declínio da atividade, o ambiente teste tornou-se familiar (SANTOS et al., 2018). Em outro estudo foi demonstrado que a cocaína provocara efeitos excitatórios em ambientes novos, no entanto, o mesmo não ocorreu em ambientes previamente apresentados aos animais (CAREY et al., 2005; CAREY e DAMIANOPOULOS, 2008).

A morfina se liga aos receptores  $\mu$  (mu) ativando o sistema dopaminérgico mesolímbico de recompensa com origem no VTA, também bloqueiam a ação inibitória de liberação de dopamina nos interneurônios GABAérgicos, desinibindo os neurônios dopaminérgicos que se projetam no núcleo *accumbens*, sistema que intervém nas propriedades gratificantes das drogas de abuso (HYMAN e MALENKA, 2001; LIU et al., 2014; TOMAZI, 2014). Drogas de abuso, como a morfina, aumentam a concentração de dopamina no núcleo *accumbens*, alterando o comportamento do animal, e regulam o aprendizado e a recompensa (VOLKOW et al., 2002; NESTLER, 2004; VOLKOW et al., 2011). O sistema mesolímbico inclui o núcleo *accumbens*, amígdala e hipocampo, e apresenta relevante participação na recompensa no uso de drogas, com memórias relacionadas ao uso de drogas e respostas condicionadas também ligadas ao uso de drogas (VOLKOW et al., 2002).

O efeito do tratamento com morfina integrou-se à memória consolidada, assim sendo, nas exposições subsequentes, a sessão experimental desperta os efeitos excitatórios da morfina fortalecendo a consolidação/reconsolidação. O repetido emparelhamento de morfina e consolidação/reconsolidação favorece, indiscutivelmente, a continuidade da resposta condicionada. Esse processo foi observado e relatado por Oliveira e colaboradores (2019) anteriormente, os quais apuraram que as sugestões de estímulo de respostas condicionadas pelo uso de drogas seguidas do consumo dessas drogas é o maior fator de reforço para a duração da dependência química e a resistência ao tratamento. (ROBINSON e BERRIDGE, 1993; HYMAN e MALENKA, 2001; SIMON e SETLOW, 2006).

O contracondicionamento é um método eficaz e com resultados positivos na eliminação de respostas condicionadas que causam incômodo ou exposição desagradável de um sujeito (BASTOS, 2014). Baseado nesse conceito utilizou-se a referida metodologia para avaliação da manutenção da resposta condicionada pela morfina. O tratamento farmacológico utilizado foi a apomorfina

0,05 mg/kg após sessão experimental breve (cinco minutos) também durante cinco dias, sendo que em alguns grupos a administração foi realizada imediatamente à saída do sujeito da arena e outros grupos receberam 15 minutos após a saída do animal do ambiente teste.

No primeiro dia do teste de contracondicionamento (experimento 2- contracondicionamento dia 1 (Figura 9) é relevante abordar que os animais dos grupos tratados com morfina na fase de indução mostraram comportamento semelhante com o último dia da fase de indução, apresentando locomoção maior que os grupos que foram tratados com veículo. O tratamento com a apomorfina só ocorreu após a saída do animal da arena, ou seja, para avaliação comportamental desse dia 1, os animais ainda não tinham recebido o tratamento com apomorfina. Apomorfina, agonista dopaminérgico D1/D2, em doses baixas, preferencialmente, estimula os autorreceptores D2 reduzindo o nível da atividade da dopamina durante a consolidação da memória. O valor de incentivo dos estímulos ambientais incorporados na memória é atenuado junto à resposta comportamental (DI CHIARA et al., 1977; MISSALE et al., 1998; CAREY et al., 2004, 2008; SANTOS, et al., 2018).

No último dia do experimento (experimento 2- teste de condicionamento (Figuras 10 A e B)), os animais que foram tratados imediatamente após a saída da arena com morfina na fase de indução, e com apomorfina também imediatamente após a sessão experimental, no protocolo de contracondicionamento, diminuíram a resposta locomotora condicionada pela morfina, no teste de contracondicionamento. Fato não observado nos outros grupos que receberam morfina imediatamente após a saída do ambiente teste na fase de indução, e que receberam veículo imediatamente ou 15 minutos após a saída da arena ou apomorfina 15 minutos após a saída do ambiente teste, no protocolo de contracondicionamento, entretanto, mantiveram a resposta condicionada no mesmo nível do início dessa fase. O contracondicionamento é um procedimento importante na alteração da aprendizagem no contexto de respostas condicionadas, e promissor para o tratamento de desejos incontroláveis, como os relacionados ao uso de drogas (DE MATTOS et al., 2011).

O emparelhamento repetido da administração da morfina com a consolidação/reconsolidação da memória justifica a manutenção da resposta

condicionada pelo grupo que recebeu morfina após a sessão experimental, na fase de indução, e apomorfina no protocolo de contracondicionamento, sendo que sua administração ocorreu após 15 minutos da saída dos animais da arena, o que afasta a possibilidade de um efeito inibitório inespecífico da apomorfina. Os resultados corroboram com os encontrados por Santos e colaboradores (2017 e 2018), que utilizaram um protocolo de condicionamento de traço com apomorfina 0,05 mg/kg e apomorfina 2,0 mg/kg, administradas imediatamente após a exposição ao ambiente teste, e foi observada resposta condicionada e em contraponto. De Mattos e colaboradores (2011), no seu experimento, administrou apomorfina 0,05 mg/kg e, 20 minutos após essa administração, o animal era colocado na arena, não sendo observado resposta condicionada.

Sob a perspectiva de que a dopamina é o neurotransmissor relacionado ao incentivo do sistema de recompensa e da motivação (PECIÑA et al., 2003; VOLKOW et al., 2012; COOPER et al., 2017), poderia ser pressuposto que a integração da inibição da atividade dopaminérgica na reconsolidação da memória induzida pela apomorfina poderia ser relacionada à diminuição do efeito motivacional e da evocação das propriedades dessa associação. Nesta etapa, essas perspectivas se sustentam por observação empírica.

Cabe a observação de que a eficácia da atuação inibitória na atividade dopaminérgica promovida pelo tratamento após sessão experimental, com a apomorfina (BRAGA ET AL., 2009a; CARRERA et al., 2011; SANTOS, et al., 2018) não atesta que a dopamina atue mediando a resposta condicionada provocada pela morfina. O efeito do tratamento após sessão experimental com apomorfina meramente revela que um tratamento inibidor de dopamina pode exercer um efeito contrário, uma ação estimulante condicionada, independentemente de qual circuito de neurotransmissores atue na resposta estimulante condicionada.

O tratamento de transtorno por uso de substâncias, pelo método da extinção, é considerado frágil porque sofre influência do humor do sujeito. Childress e colaboradores (1994) postularam que estados de humor negativos podem se associar com pistas externas e promover a recaída. E estudos em modelos animais apuraram que as respostas condicionadas extintas sofrem recuperação espontânea (PAVLOV, 1928), e sendo consideradas inclusive, como um fator limitante de grande importância na garantia da eficácia do

processo de extinção como um método de tratamento para a dependência química (SANTOS, 2019).

Os resultados obtidos nesses experimentos inspiram a sua continuação, pela qual se apuraria o condicionamento induzido pela morfina, aplicando o protocolo de contracondicionamento, analisando se a supressão da resposta condicionada pelo tratamento com apomorfina após sessão experimental imediato preveniria o recondicionamento. No experimento testaria se após a eliminação do condicionamento estabelecido pela morfina pelo tratamento com apomorfina após teste de arena, seria possível a recuperação da resposta condicionada à morfina pelo protocolo após teste no ambiente experimental com morfina. Se o processo de consolidação/reconsolidação requisitar a ativação do estado produzido pela resposta condicionada à morfina, ao que tudo indica as pistas originais não seriam eficazes para iniciar um processo de consolidação/reconsolidação e, como consequência, o protocolo de tratamento com morfina após sessão experimental não geraria o recondicionamento da morfina.

Este caminho é interessante para avaliar se as dicas de condicionamento foram ineficazes para o recondicionamento após a sessão no ambiente teste, entretanto, pode ser pressuposto que as pistas readquiram suas propriedades como estímulos condicionados caso o tratamento com a morfina antecedesse a sessão experimental e, assim, os seus efeitos ocorreriam na presença das pistas contextuais como um protocolo de condicionamento pavloviano de drogas convencional.

Através dos resultados obtidos concluiu-se que a morfina administrada após sessão experimental breve de cinco minutos em ambiente novo, produz resposta condicionada associada à consolidação/reconsolidação da memória. O protocolo de contracondicionamento é um método eficaz para substituição de respostas negativas por respostas positivas, aplicado imediatamente em curtas exposições no ambiente condicionado, produzindo uma nova aprendizagem associada também com a consolidação/reconsolidação da memória, e o protocolo de condicionamento de traço com um papel relevante para o desenvolvimento e manutenção dos efeitos condicionados de drogas com propriedades abusivas.

## 7. CONCLUSÃO

- A novidade do ambiente desperta comportamento exploratório do animal indicando queda da ansiedade à medida que o ambiente se torna mais familiar, tornando as visitas, na zona central, mais frequentes;
- Avaliação da atividade locomotora é uma medida de caráter comportamental positivo para habituação;
- A morfina induz resposta locomotora condicionada e sensibilizada com breves exposições de cinco minutos em ambiente novo com administrações da droga após a sessão experimental, sugerindo que o consumo de drogas em um novo contexto pode conduzir ao desenvolvimento de efeitos condicionados significantes;
- O condicionamento de traço pode ser um protocolo útil para analisar novas formas de estudo da dependência química;
- A familiarização como ambiente é um fator que inibe a resposta condicionada pela morfina. A experiência ambiental já está consolidada.
- O protocolo de contracondicionamento foi eficaz porque atenuou a resposta locomotora induzida pela morfina utilizando apomorfina 0,05 mg/kg, constituindo um método adequado na inibição da expressão da resposta condicionada, associando uma nova aprendizagem;

## 8. REFERÊNCIAS

ADINOFF, B. Neurobiologic process in drug reward and addiction. **Havard Review of Psychiatry**, v.12, p. 305-320, 2004.

ANAGNOSTARAS, S.G., ROBINSON, T.E. Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: modulation by associative learning. **Behavioral Neurociences**, v. 110, p. 397-414, 1996.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anita. Behav**, v. 21, p. 205-235, 1973.

BAEYENS, F., EELEN, P., VAN DEN BERGH, O.; CROMBEZ, G. The content of learning in human evaluative conditioning. Acquired valence is sensitive to reevaluation. **Learning and Motivation**, v. 23, p. 200-224, 1992.

BARDO, M.T., BEVINS, R.A. Conditioned place preference: what does it add to our understanding of preclinical reward. **Psychopharmacology**, v. 153, p. 31-43, 1999.

BARDO, M.T., DONOHEW, R.L., HARRINGTON, N.G. Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. **Behav Brain Res**, p. 23-43, 1996.

BASTOS, J.M., et al., Drug memory substitution during re-consolidation: a single inhibitory autoreceptor apomorphine treatment given during psychostimulant memory re-consolidation replaces psychostimulant conditioning with conditioned inhibition and reverses psychostimulant sensitization. **Behavioural Brain Research**, v. 260, p. 139–47, 2014.

BEAVER, B.V. Comportamento canino de origem sensorial e nervosa. In: BEAVER, B.V. (ed.) **Comportamento canino: um guia para veterinários**. 1ª ed. São Paulo. Editora Roca Ltda. 2001, p.55-132.

BENINGER, R.J. The Role of Dopamine in Locomotor Activity and Learning. **Brain Research Reviews**, v. 6, p. 173-196, 1983.

BENINGER, R.J., MILLER, R. Dopamine D1-like receptors and reward-related incentive learning. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 22, p. 335-45, 1998.

BERKE, J.D., HYMAN, S.E. Addiction, Dopamine, and the Molecular Mechanisms of Memory. **Neuron**, v. 25, p. 515–532, 2000.

BEVINS, R.A., BARDO, M.T. Conditioned increase in place preference by access to novel objects: antagonism by MK-801. **Behav Brain Res**, p. 53-60, 1999.

BLOISE, E., CAREY, R.J., CARRERA, M.P. Behavioral sensitization produced by a single administration of apomorphine: implications for the role of Pavlovian

conditioning in the mediation of context-specific sensitization. **Pharmacol Biochemical Behavior**, 2007.

BOILEAU, I., et al. Conditioned dopamine release in humans: A positron emission tomography [11C] raclopride study with amphetamine. **Journal of Neuroscience**, v. 27, 2007.

BOUTON, M.E. Context and behavioral process in extinction. **Learning Memory**, v. 1, p. 485-494, 2004.

BOYLE, A., ONDO, W. Role of Apomorphine in the Treatment of Parkinson's Disease. **CNS Drugs**, 2015.

BRAGA, P.Q., et al. Low dose apomorphine induces context specific sensitization of hypolocomotion without conditioning: support for a new state dependent retrieval hypothesis of drug conditioning and sensitization. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 93, 2009a.

BRAGA, P.Q., et al. Low dose apomorphine induces context specific sensitization of hypolocomotion without conditioning: support for a new state dependent retrieval hypothesis of drug conditioning and sensitization. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 93, 2009b.

CAREY, R.J., CARRERA, M.P., DAMIANOPOULOS, E.N. A new proposal for drug conditioning with implications for drug addiction: The Pavlovian two-step from delay to trace conditioning. **Behavioural Brain Research**, v. 275, p. 150–156, 2014.

CAREY, R.J., DAMIANOPOULOS, E.N., SHANAHAN, A.B. Cocaine conditioned behavior: a cocaine memory trace or an anti-habituation effect. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 90, 2008.

CAREY, R.J., DEPALMA, G., DAMIANOPOULOS, E. Acute and chronic cocaine behavioral effects in novel versus familiar environments: open-field familiarity differentiates cocaine locomotor stimulant effects from cocaine emotional behavioral effects. **Behav. Brain Res**, v. 158, p. 321-330, 2005.

CAREY, R.J., GUI, J. Cocaine conditioning and cocaine sensitization: what is the relationship? **Behavioral Brain Research**, v. 92, p. 67-76, 1998.

CARRERA, M.P., et al. Reversal of apomorphine locomotor sensitization by a single post-conditioning trial treatment with a low autoreceptor dose apomorphine: A memory re-consolidation approach. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, p. 29-34, 2011.

CARRERA, M.P., et al. Most-trial apomorphine at an autoreceptor dose level can eliminate apomorphine conditioning and sensitization: Support for the critical role of dopamine in re-consolidation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 236, p. 244-250, 2012.

CARRERA, M.P., et al. Post-trial apomorphine at an autoreceptor dose level can eliminate apomorphine conditioning and sensitization: Support for the critical role of dopamine in re-consolidation. **Behav Brain Res**, 2013.

CAVALLOTTI, C., et al. Dopaminergic Receptors in Rat Dura Mater: Pharmacological Characteristics. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.31, p. 190-194, 2004.

CERBONE, A., SADILE, A.G. Behavioral habituation to spatial novelty: interference and noninterference studies. **Neurosciences Biobehavior Reviews**, v. 18, p. 497-518, 1994.

CHEN, M., et al. Morphine disinhibits glutamatergic input to VTA dopamine neurons and promotes dopamine neuron excitation. **ELife**, 2015.

CHILDRESS, A. R., et al. Prelude to passion: Limbic activation by “unseen” drug and sexual cues. **PloS One**, p. 3998–4003, 2008.

CONNOR, D.A., GOULD, T.J. The role of working memory and declarative memory in trace conditioning. **Neurobiol Learn Mem**, v.134, p. 193-209, 2016.

COOPER, S., ROBISON, A.J., MAZEI-ROBISON, M.S. Reward Circuitry in Addiction. **Neurotherapeutics**, v. 14, p. 687–697, 2017.

CORBETT, A. D. et al. 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. **British Journal of Pharmacology**, p.153-162, 2009.

DAI, H., KROST, M., CAREY, R.J. A new methodological approach to the study of habituation: the use of positive and negative behavioral indices of habituation. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 62, p. 169-174, 1995.

DAMIANOPOULOS, E.N., CAREY, R.J. Pavlovian conditioning of CNS drug effects: a critical review and new experimental design. **Neuroscience**, v. 83, p. 65-77, 1992.

DEBIEC, J. LEDOUX, J.E., NADER, K, Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. **Neuron**, v. 36, 2002.

DENENBERG, V.H. Open-field behavior in the rat: what does it mean? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 159, p. 852-859, 1969.

DI CHIARA, G., et al. Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. **Neuropharmacology**, v.47, p. 227-241, 2004.

DI CHIARA, G., IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, 1988.

DI CHIARA, G., PORCEDDU, M.L., FRATTA, W., GESSA, G.L. Postsynaptic receptors are not essential for dopaminergic feedback regulation. **Nature**. V. 267; p. 270–2, 1977.

DIAS, F.R., CAREY, R.J., CARRERA, M.P. Apomorphine-induced context specific behavioural sensitization is prevented by the D1 antagonist SCH-23390 but potentiated and uncoupled from contextual cues by the D2 antagonist sulpride. **Psychopharmacology**, v. 209, p. 137-157, 2010.

DUDAI, Y. Reconsolidation: the advantage of being refocused. **Current Opinion in Neurobiology**, v.16, p. 174-178, 2004.

EHRMAN, R.N., et al. Conditioned responses to cocaine-related stimuli in cocaine abuse patients. **Psychopharmacology**, v.107, p.523-529, 1992.

EIKELBOOM, R., STEWART, J. Conditioning of Drug-Induced Physiological Responses. **Psychological Review**, v. 89, p. 507-528, 1982.

GANTT, W.H. Inot onily. **The British Medical Journal**, p. 1070-1073, 1927.

GASBARRI, A., TOMAZ, C. Memória e processos motivacionais / emocionais. **Front Behav Neurosci**, v. 6, 2012.

GOES, T.C., et al. Comportamento de ratos Wistar no Paradigma da Exploração Livre. **SCIENTIA PLENA**, v. 9, 2013.

GOLDSTEIN, R.Z., VOLKOW, N.D. Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. **Am J Psychiatry**, 2002.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, 11 ed, 2006.

HEINZ, M.D., et al. Correlation Between Dopamine D2 Receptors in the Ventral Striatum and Central Processing of Alcohol Cues and Craving. **Am J Psychiatry**, 2004.

HYMAN, S.E., MALENKA, R.C. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. **Nature reviews-neuroscience**, v. 2, 2001.

ILIADI, K.G. The genetic basis of emotional behavior: Has the time come for a Drosophila model? **Journal of Neurogenetics**, v. 23, p. 136-146, 2009.

IZQUIERDO, I. Memória. **Artmed** Porto Alegre, 2011.

JEFFS, S., DUKA, T. Single-response appetitive Pavlovian to instrumental transfer is suppressed by aversive counter-conditioning. **Quarterly Journal of Experimental Psychology**, p. 1-13, 2019.

JENNER, P., KATZENSCHLAGER. R. Apomorphine – pharmacological properties and clinical trials in Parkinson’s disease. **Parkinsonism Relat Disord.** 2016.

KALIVAS, P.W., O’BRIEN, C. Drug Addiction as a Pathology of Staged Neuroplasticity. **Neuropsychopharmacology REVIEWS**, v. 33, p. 166–180, 2008.

KATZUNG, B.A., TREVOR, A.J. **Farmacologia Básica e Clínica.** Mc Graw Hill: São Paulo, 13 ed., 2017.

KIBALY, C., et al. Non- nociceptive roles of opioids in the CNS: opioids’ effects on neurogenesis, learning, memory and affect. **Nature Reviews-Neuroscience**, 2019.

KIEFFER, B.L., RUFF, C.G. Exploring the opioid system by gene knockout. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 285–306, 2002.

KOOB, G.F., LE MOAL, M. Addiction and the brain antireward system. **Annu Rev Psychol.**, v. 59, p. 29-53, 2008.

KOSTEN, T.R., GEORGE, T.P. The Neurobiology of Opioid Dependence: Implications for Treatment. **Research reviews — the neurobiology of opioid dependence**, 2002.

KRYUKOV, V.I. Towards a unified model of pavlovian conditioning: short review of trace conditioning models. **Cogn Neurodyn**, p. 377-398, 2012.

LEE, J.L.C. Reconsolidation: maintaining memory relevance. Trends in **Neurosciences**, v. 32, p. 413-420, 2009.

LEGAULT, M., WISE, R.A. Novelty-evoked elevations of nucleus accumbens dopamine: dependence on impulse flow from the ventral subiculum and glutamatergic neurotransmission in the ventral tegmental area. **Eur J Neurosci**, v. 13, p. 819-828, 2001.

LEITE JUNIOR, J.B., et al. Reversal of morphine conditioned behavior by an anti-dopaminergic post-trial drug treatment during re-consolidation. **Behavioral Brain Research**, p. 1-12, 2019.

LEUSSIS, M.P, BOLIVAR, V.J. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. **Neurosci Biobehav Ver**, v.30, 2006.

LEWITT, Peter A. Subcutaneously administered apomorphine: pharmacokinetics and metabolism. **AAN Enterprises**, 2004.

LIEBSCH, G., et al. Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 94, p. 301–310, 1998.

MANCHIKANTI, L., et al. Controlled substance abuse and illicit drug use in chronic pain patients: An evolution of multiple variables. **Pain Phsycaia**, v. 9, p. 75-79, 2006.

MARTINS, R.T., et al. Receptores opioides até o 81pomorfi atual. **Ver. Dor.**, v. 13, p. 75-79, 2012.

MATOS, L.W., CAREY, R.J., CARRERA, M.P. Apomorphine conditioning and sensitization: the paired/unpaired treatment order as a new major determinant of drug conditioned and sensitization effects. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 96, 2011.

MATSUMOTO, K., et al. Effects in vitro and in vivo by apomorphine in the rat corpus cavernosum. **British Journal of Pharmacology**, v.146, p. 259–267, 2005.

MATTINGLY, B.A., KOCH, C., OSBORNE, F.H., GOTSICK, J.E. Stimulus and response factors affecting the development of behavioral sensitization to apomorphine. **Psychopharmacology**, v. 130, 1997.

MCGAUGH, J.L., ROOZENDAAL, B. Drug enhancement of memory consolidation: historical perspective and neurobiological implications. **Psychopharmacology**, v. 202, 2009.

MCKIN, W.A. Antipsychotic drugs. In: MCKIN, W.A. (ed.) **Drugs and Behavior: an introduction to behavioral pharmacology**. 4 ed. Editora Prentice HALL, 2013.

MENEZES, J., et al. Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on D1-subtype dopaminereceptors in hippocampus. **National Academy of Sciences**, v. 112, 2015.

MISSALE, H.G., et al. Dopamine Receptors: from structure to function. **Physiological Reviews**, v.78, p. 189-225, 1998.

MORI, T., et al. Differential activation of dopaminergic systems in rat brain basal ganglia by morphine and methamphetamine. **Neuroscience**, v. 322, p. 164–170, 2016.

MOURÃO JÚNIOR, C. A., FARIA, N. C. Memória. **Psicol. Reflex. Crit.** V. 28, 2015.

NADER, K., et al. Multiple trace theory of human memory: computational, neuroimaging, and neuropsychological results. **Hippocampus**, v.10, p. 121-130, 2000.

NADER, K. Memory traces unbound. **Trends in Neurosciences**, v. 26, p. 65-72, 2003.

NADER, K., EINARSSON, E.O. Memory reconsolidation: an update. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 2010.

NADER, K. Reconsolidation and the Dynamic Nature of Memory. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 2015.

NASCIMENTO, D.C.H, SAKATA, R.K. Dependência de opioide em pacientes com dor crônica. **Revista Dor.**, 2011.

NASELLO, A.G., et al. Sudden Darkness Induces a High Activity-Low Anxiety State in Male and Female Rats. **Physiology & Behavior**, v. 63, p. 451–454, 1998.

NESS, F., HEINRICH, A., FLOR, H. A mechanism-oriented approach to psychopathology: The role of Pavlovian conditioning. **International Journal of Psychophysiology**, v. 98, n. 2, p. 351-364, 2015.

NESTLER, E.J. Molecular Basis of Long-Term Plasticity Underlying Addiction. **Nature reviews-Neuroscience**, v. 2, 2001.

NESTLER, E.J. Molecular mechanisms of drug addiction. **Neuropharmacology**, v. 47, p. 24–32, 2004.

NEWALL, C., et al. The relative effectiveness of extinction and counter-conditioning in diminishing children's fear. **Behav Res Ther.**, v. 95, p. 42-49, 2017.

O'BRIEN, C.P. Experimental analysis of conditioning factors in human narcotic addiction. **Pharmacology reviews**, v. 27, p. 533-543, 1975.

OLIVEIRA, L.R., et al. Morphine administered post-trial can induce potent conditioned morphine effects. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.179, p.134-141, 2019.

OLSON, V.G., NESTLER, E.J. Topographical Organization of GABAergic Neurons Within the Ventral Tegmental Area of the Rat. **SYNAPSE**, v.61, p. 87–95, 2007.

PAVLOV, I.P. **Conditioned reflex**. London: Oxford University Press; 1927.

PECINA, S., et al. Hyperdopaminergic Mutant Mice Have Higher “Wanting” But Not “Liking” for Sweet Rewards. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 9395–9402, 2003.

PICADA, J. N. Efeitos da 82pomorfina e de um produto derivado de sua autooxidação em diferentes modelos biológicos. **Tese** (Doutora em Ciências). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2003

PIERCE, R.C., KALIVAS, P.W. Amphetamine produces sensitized increases in locomotion and extracellular dopamine preferentially in the nucleus accumbens

shell of rats administered repeated cocaine. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 275, p. 1019-1029, 1996.

POEWE, W., et al. Parkinson disease. **Nature Reviews**, v. 3, 2017.

QUIRK, G.J. The Role of Ventromedial Prefrontal Cortex in the Recovery of Extinguished Fear. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 6225–6231, 2000.

ROBINSON, T., BERRIDGE, K.C. The neural basis of drug craving: an incentive salience theory of addiction. **Brain Research Reviews**, v.8, n.3, p. 247-291, 1993.

ROBINSON, T. E., & BERRIDGE, K. C. The incentive sensitization theory of addiction: Some current issues. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 363, p. 3137–3146, 2008.

ROOZENDAAL, B., MCGAUGH, J.L. Modulação de memória. **Behav. Neurosci**, v. 125, p. 797–824, 2011.

SAAL, D., et al., Drugs of Abuse and Stress Trigger a Common Synaptic Adaptation in Dopamine Neurons. **Neuron**, v. 37, p. 577–582, 2003.

SALAMONE, J.D., et al. Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, p. 34–41, 2005.

SANCHIS-SEGURA, C. SPAGNEL, R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. **Addiction Biology**, v. 11, p. 2-38, 2006.

SANTOS, B.G. A influência de parâmetros temporais na relação entre o condicionamento de atraso na expressão de uma resposta condicionada e sensibilizada e na ativação da proteína ERK em estruturas relacionadas com a dependência de drogas. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, 2019.

SANTOS, B.G., CAREY, R.J., CARRERA, M.P. Post-trial induction of conditioned apomorphine stimulant and inhibitory response effects: Evidence for potent trace conditioning of drug effects. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 129, p. 79–86, 2015.

SANTOS, B.G., CAREY, R.J., CARRERA, M.P. The acquisition, extinction and spontaneous recovery of Pavlovian drug conditioning induced by post-trial dopaminergic stimulation/inhibition. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 156, p. 24–29, 2017.

SANTOS, B.G., CAREY, R.J., CARRERA, M.P. Repeated pre-trial and post-trial low and high dose apomorphine treatments induce comparable

inhibitory/excitatory sensitization and conditioned drug effects. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 175, p. 108–115, 2018.

SATO, T. Habituação e sensibilização comportamental. **Tese** (Mestrado em Psicologia) – Universidade de São Paulo, 1995.

SCHAFE, G.E., LEDOUX, J.E. Memory Consolidation of Auditory Pavlovian Fear Conditioning Requires Protein Synthesis and Protein Kinase A in the Amygdala. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, 2000.

SIMON, N.W., SETLOW, B. Post-training amphetamine administration enhances memory consolidation in appetitive Pavlovian conditioning: Implications for drug addiction. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 86, p. 305–310, 2006.

SORG, B.A., Reconsolidation of drug memories. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 36, p.1400–1417, 2012.

STEWART, J., BADIANI, A. Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. **Behavioral Pharmacology**, v. 4, p. 289-312, 1993.

STICKGOLD, ROBERT E WALKER, MATTHEW, P. Memory consolidation and reconsolidation: what is the role of sleep? **Trends in Neurosciences**, v. 28, p. 408-415, 2005.

STUART-HARRIS, R., et al. The pharmacokinetics of morphine and morphine glucuronide metabolites after subcutaneous bolus injection and subcutaneous infusion of morphine. **Blackwell Science Ltd Br J Clin Pharmacol**, v. 49, p. 207-214, 2000.

SZAPIRO, G., et al. Molecular mechanisms of memory retrieval. **Neurochem. Res**, v.27, p.1491–1498, 2002.

TODOROV, J.C. Progressos nos estudos das bases neurais da aprendizagem. **Psic.: Teor. E Pesq.**, 1991.

TOMAZI, L. Arcaína reverte a preferência condicionada por lugar induzida por morfina em camundongos. **Tese** (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul, 2014.

TRESCOT, M.D., et al. Opioid Pharmacology. **Pain Physician: Opioid Special**, v. 11, p. 133-153, 2008.

TRONSON, N.C.E, TAYLOR, J.R. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, 2007.

UNDOC, **World Drug Report**, 2019.

VANDERSHUREN, L., et al. A single exposure to morphine induces long-lasting behavioral and neurochemical sensitization in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 1533-1538, 2001.

VANDERSHUREN, L.J., et al. Morphine-induced long-term sensitization to the locomotor effects of morphine and amphetamine depends on the temporal pattern of the pretreatment regimen. **Psychopharmacology**, v. 131, p. 115-122, 1997.

VEZINA, P., LEYTON, M. Conditioned cues and the expression of stimulant sensitization in animals and humans. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 160–168, 2009.

VIGANO, D., et al. I-Opioid receptor signaling in morphine sensitization. **Neuroscience**, v. 117, p. 921–929, 2003.

VOLKOW, N.D., et al. Role of Dopamine, the Frontal Cortex and Memory Circuits in Drug Addiction: Insight from Imaging Studies. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 78, p. 610–624, 2002.

VOLKOW, N. D., et al. Dopamine in drug abuse and addiction: Results of imaging studies and treatment implications. **Archives of Neurology**, v. 64, p. 1575–1579, 2007.

VOLKOW, N.D., et al. Addiction: Beyond dopamine reward circuitry. **PNAS**, v. 108, 2011.

VOLKOW, N.D., et al. Addiction Circuitry in the Human Brain. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, v. 52, p. 321–36, 2012.

WILKER, A. Dynamics of drugs dependence. Implications of a conditioning theory for research treatment. **Arch Gen Psychiatry**, v. 28, p. 611-616, 1973.

WOOTEN, G.F. Functional Anatomical and Behavioral Consequences of Dopamine Receptor Stimulation. **Annals New York Academy of Sciences**, 1997.

XIGENG, Z., et al. Susceptibility to morphine place conditioning: relationship with stress-induced locomotion and novelty-seeking behavior in juvenile and adult rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 929–935, 2003.

ZOU, Z., et al. Definition of substance and non-substance addiction. **Adv Exp Med Biol**, p. 21-41, 2017.

## ANEXO

O presente trabalho foi submetido e aceito para publicação na Revista *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, com o título “*Morphine Administred Post-Trial Induces Potent Morphine Conditioned Effects If the Context is Novel but Not If the Context is Familiar*”, conforme a cópia do email abaixo.

### Rights and Access form Completed form for your article [PBB\_172978]



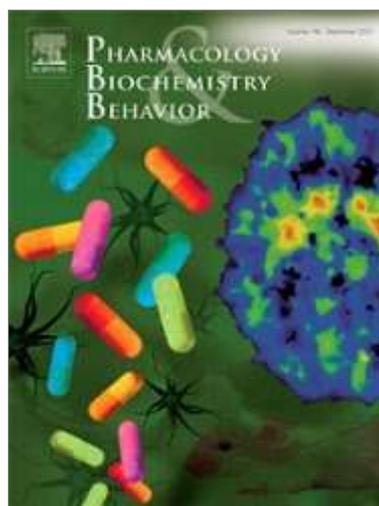
**Elsevier - Author**  
**Forms <Article\_Status@elsevier.com>**

25 de jun. de 2020  
12:56

Dear Dr Ferreira,

Thank you for publishing your article in *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. Dr. Carrera completed the Rights and Access Form for your article *Morphine administered post-trial induces potent morphine conditioned effects if the context is novel but not if the context is familiar* on June 25, 2020.

The Order Summary is attached to this email. A copy of the Order Summary is also sent to all co-authors for whom we have contact details.



If you have any questions, please do not hesitate to contact us. To help us assist you, please quote our article reference PBB\_172978 in all correspondence.

Now that your article has been accepted, you will want to maximize the impact of your work. Elsevier facilitates and encourages authors to share their article responsibly. To learn about the many ways in which you can share your article whilst respecting copyright, visit: [www.elsevier.com/sharing-articles](http://www.elsevier.com/sharing-articles).

Kind regards,  
Elsevier Researcher Support



## Seven strategies for you to create a brand and promote your research

Learn how to give your research the visibility it deserves with these seven strategies.

> [Access module now](#)

### Have questions or need assistance?

Please do not reply to this automated message.

For further assistance, please visit our [Elsevier Support Center](#) where you search for solutions on a range of topics and find answers to frequently asked questions.

You can also talk to our researcher support team by phone 24 hours a day from Monday-Friday and 24/7 by live chat and email.

© 2018 Elsevier Ltd | Privacy Policy <http://www.elsevier.com/privacypolicy>

Elsevier Limited, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GB, United Kingdom, Registration No. 1982084. This e-mail has been sent to you from Elsevier Ltd. To ensure delivery to your inbox (not bulk or junk folders), please add [article\\_status@elsevier.com](mailto:article_status@elsevier.com) to your address book or safe senders list.

## Direitos e acesso

### A morfina administrada após o ensaio induz potentes efeitos condicionados à morfina se o contexto for novo, mas não se o contexto for familiar

autor correspondente

Dra. Marinete Pinheiro Carrera

Endereço de e-mail

marinete@uenf.br

Diário

Farmacologia, Bioquímica e Comportamento

Número do artigo

172978

Nossa referência

PBB\_172978

PII

S0091-3057 (19) 30649-5

DOI

[10.1016 / j.pbb.2020.172978](https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172978)

## Confirmação de pedido

Obrigado por preencher o formulário de Direitos e Acesso.

**Número do pedido**

OACSRPBB1729780

**Data do pedido**

25 de junho de 2020

---

**Financiadores de pesquisa**

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do  
Estado do Rio de Janeiro  
Números de bolsa: E-26 / 200.895 / 2017

---

**Opção de Publicação**

Inscrição

**Acordo de Publicação**

- Sou um autor, assinando em nome de todos os co-autores do manuscrito

Posso postar o manuscrito aceito em meu repositório institucional e torná-lo público após um período de embargo. Para garantir a sustentabilidade da pesquisa revisada por pares em publicações de periódicos, não posso compartilhar o artigo final publicamente, por exemplo, no ResearchGate ou Academia.edu.

Mais detalhes sobre a [Política de Compartilhamento da Elsevier aqui](#) .

Com base nas informações fornecidas, o período de embargo / data de término é de 12 meses