

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF

LUCAS RANGEL DE OLIVEIRA

**O EFEITO DA MORFINA NO PROTOCOLO DE CONDICIONAMENTO CLÁSSICO
DE TRAÇO E SUA RESPOSTA LOCOMOTORA CONDICIONADA E
SENSIBILIZADA**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

2019

LUCAS RANGEL DE OLIVEIRA

**O EFEITO DA MORFINA NO PROTOCOLO DE CONDICIONAMENTO CLÁSSICO
DE TRAÇO E SUA RESPOSTA LOCOMOTORA CONDICIONADA E
SENSIBILIZADA**

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

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Marinete Pinheiro Carrera

CAMPOS DOS GOYTACAZES

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

O48 Oliveira, Lucas Rangel de.

O EFEITO DA MORFINA NO PROTOCOLO DE CONDICIONAMENTO CLÁSSICO DE TRAÇO E SUA RESPOSTA LOCOMOTORA CONDICIONADA E SENSIBILIZADA / Lucas Rangel de Oliveira. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

73 f. : il.

Bibliografia: 60 - 72.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2019.
Orientadora: Marinete Pinheiro Carrera.

1. Morfina. 2. Condicionamento de Traço. 3. Ambiente Novo. 4. Reconsolidação de Memória. 5. Dopamina. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 636

LUCAS RANGEL DE OLIVEIRA

**O EFEITO DA MORFINA NO PROTOCOLO DE CONDICIONAMENTO CLÁSSICO
DE TRAÇO E SUA RESPOSTA LOCOMOTORA CONDICIONADA E
SENSIBILIZADA**

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

Aprovada em 1 de abril de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Marinete Pinheiro Carrera
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF
(Orientadora)

Prof. Dr. Enrrico Bloise
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof^a. Dr^a. Flavia Regina Cruz Dias
Universidade Iguazu campus V - UNIG

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima dos Santos Sampaio
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha mãe, Eliane; ao meu pai, Aluisio; ao meu irmão, Victor Hugo; e à minha parceira de vida, Anna — minhas fundações —, pelo amor, apoio e incentivo nas horas difíceis de desânimo e cansaço.

À professora orientadora Marinete Pinheiro Carreira, pela oportunidade e pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho.

Aos professores da banca, pela disponibilidade e participação na análise desta dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Uenf e à Capes, pelo apoio ao desenvolvimento desta pesquisa.

A todos do laboratório e a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação acadêmica.

RESUMO

A dependência química é uma doença crônica, e a morfina, agonista opioide, é uma substância lícita que está entre as drogas de abuso mais utilizadas no mundo — realidades pouco observados por meio do protocolo de condicionamento de traço. A morfina tem efeitos extremamente viciantes, e, em roedores, isso é expresso em comportamentos, como no aumento da ativação locomotora, condicionamento e sensibilização, processos relacionados à gênese e à manutenção da dependência, de modo que a atenuação e/ou bloqueio dessas ocorrências são desejáveis para o tratamento. No presente estudo, administramos três doses de morfina (3,0, 5,0 e 10,0 mg/kg) após o teste comportamental em um ambiente novo. Os tratamentos foram feitos imediatamente (Experimento 1); após 15 minutos (Experimento 2), depois de uma exposição breve (5 minutos); ou imediatamente, após uma exposição longa de 30 minutos (Experimento 3). Os tratamentos foram aplicados em três dias sucessivos de indução. No segundo dia, a locomoção dos animais que receberam morfina no Experimento 1 foi maior em comparação com o grupo controle, o que não ocorreu nem na exposição longa, nem na exposição breve com administração após 15 minutos da saída da arena. Posteriormente, todos os grupos foram submetidos a cinco dias de protocolo de extinção comportamental. A atividade locomotora aumentada do Experimento 1, nas doses de morfina 5 e 10 mg/kg, foi mantida durante as cinco sessões de extinção. Após dois dias de retirada, todos os grupos receberam veículo e foram testados por 30 minutos em um teste final. Os grupos de dose 5 e 10 mg/kg do Experimento 1 continuaram a apresentar alta locomoção em relação ao veículo, mas esse comportamento foi restrito aos 10 minutos iniciais. No mais, não houve outras diferenças entre os grupos. Propõe-se que os efeitos da morfina na via de recompensa cerebral foram associados com a ativação de dopamina evocada pela exposição ao novo ambiente. O uso de drogas pode estar ligado a um ciclo de consolidação/reconsolidação que afeta e dificulta o tratamento.

Palavras-chave: Morfina. Ambiente Novo. Reconsolidação de Memória. Condicionamento de Traço. Extinção. Sensibilização. Locomoção. Dopamina.

ABSTRACT

Addiction is a chronic disease, and morphine, the opioid agonist, is a licit substance that is among the most commonly used drugs of abuse in the world - realities rarely observed through the Trace conditioning protocol. Morphine has extremely addictive effects, and in rodents this is expressed in behaviors such as increased locomotor activation, conditioning and sensitization, processes related to genesis and maintenance of dependence, so that the attenuation and/or blocking of these occurrences are desirable for treatment. In the present study, we administered three doses of morphine (3.0, 5.0 and 10.0 mg/kg) after the behavioral test in a new environment. The treatments were done immediately (Experiment 1); after 15 minutes (Experiment 2), after a brief exposure (5 minutes); or immediately after a 30-minute long exposure (Experiment 3). The treatments were applied on three consecutive days of induction. On the second day, the locomotion of animals receiving morphine in Experiment 1 was higher compared to the control group, which occurred neither in long exposure nor in brief exposure with administration after 15 minutes of exit from the arena. Subsequently, all groups were submitted to five days of behavioral extinction protocol. The increased locomotor activity of Experiment 1 at doses of morphine 5 and 10 mg/kg was maintained during the five extinction sessions. After two days of withdrawal, all groups received vehicle and were tested for 30 minutes in a final test. The dose groups 5 and 10 mg/kg of Experiment 1 continued to show high locomotion relative to the vehicle, but this behavior was restricted to the initial 10 minutes. In addition, there were no other differences between the groups. It has been proposed that the effects of morphine on the brain reward pathway were associated with the activation of dopamine evoked by exposure to the new environment. Drug use may be linked to a consolidation/reconsolidation cycle that affects and impairs treatment.

Keywords: Morphine. New environment. Reconsolidation of memory. Trace Conditioning. Extinction. Sensitization. Locomotion. Dopamine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Protocolos de Condicionamento de atraso e traço.....	18
Figura 2 - Médias e Erro padrão da média para distância percorrida (m) durante os 3 dias sucessivos da fase de indução * p <0,05 versus grupo veículo (ANOVA de uma via em cada dia seguido pelo teste de múltiplas faixas de Duncan). § p <0,05 morfina 10 mg/kg versus grupo morfina 3 mg/kg (ANOVA de um fator seguido pelo teste de Duncan). # p <0,01 primeiro dia de indução versus o terceiro dia de indução para cada grupo morfina (teste t para amostras dependentes).....	40
Figura 3 - Média e erro padrão da média para distância percorrida (m) durante os 5 dias sucessivos da fase de extinção para grupos de imediatos. *** p <0,05 versus todos os grupos. ** p <0,05 versus 3,0 mg/kg de morfina e grupo veículo, * p <0,05 versus grupo veículo (ANOVA de um fator seguido pelo teste de Duncan).....	42
Figura 4 - Médias e erro padrão da média para distância percorrida (m) durante os 30 minutos do teste final. * p <0,05 versus grupo veículo (ANOVA de um fator seguido pelo teste de Duncan).....	43
Figura 5 - Médias e Erro padrão da média para distância percorrida (m) durante os 3 dias da fase de indução do Experimento 2, com 15 minutos de atraso..	44
Figura 6 - Média e erro padrão da média para distância percorrida (m) durante os 5 dias sucessivos da fase de extinção para o Experimento 2, com 15 minutos de atraso..	45
Figura 7 - Médias e erro padrão da média para distância percorrida (m) durante os 30 minutos do teste final para o Experimento 2, com 15 minutos de atraso..	46
Figura 8 - Médias e Erro padrão da média para distância percorrida (m) durante os 3 dias sucessivos. da fase de indução para o Experimento 3, com 30 minutos de duração, # p <0,05 primeiro dia de indução versus o terceiro dia de indução para cada grupo de morfina (teste t)..	47
Figura 9 - Média e erro padrão da média para distância percorrida (m) durante os 5 dias sucessivos da fase de extinção do Experimento 3, com 30 minutos de duração.	48
Figura 10 - Médias e erro padrão da média para distância percorrida (m) durante os 30 minutos do teste final do Experimento 3 com 30 minutos, # p <0,01 primeiro intervalo X último intervalo (ANOVA de um fator em cada intervalo seguido pelo teste de Duncan).....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linha do tempo.	32
Tabela 2 - Procedimento Experimental – Experimentos 1 e 2.	33
Tabela 3 - Grupos do Experimento 1.	34
Tabela 4 - Grupos do Experimento 2.	36
Tabela 5 - Procedimento Experimental – Experimento 3.	37
Tabela 6 - Grupos do Experimento 3.	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	14
2.1	GERAIS	14
2.1	ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	DEPENDÊNCIA QUÍMICA	15
3.2	CONDICIONAMENTO CLÁSSICO	16
3.3	SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL	19
3.4	MEMÓRIA	21
3.5	EXTINÇÃO	22
3.6	A VIA DOPAMINÉRGICA	24
3.7	OPIOIDES	26
3.8	MORFINA	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	SUJEITOS	29
4.2	FÁRMACO	31
4.3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	31
4.3.1	Fase de indução (1º-3º dia)	31
4.3.2	Fase de Extinção (4º-8º dia)	31
4.3.3	Fase de Retirada (9º-10º dia)	32
4.3.4	Teste Final (11º dia)	32
4.4	EXPERIMENTO 1: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA IMEDIATAMENTE APÓS O TÉRMINO DA SESSÃO EXPERIMENTAL DE 5 MINUTOS	32
4.6	EXPERIMENTO 3: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA IMEDIATAMENTE APÓS O TÉRMINO DA SESSÃO EXPERIMENTAL DE 30 MINUTOS	37
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5	RESULTADOS	40
5.1	EXPERIMENTO 1: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA IMEDIATAMENTE APÓS O TÉRMINO DA SESSÃO EXPERIMENTAL DE 5 MINUTOS	40

5.2 EXPERIMENTO 2: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA 15 MINUTOS APÓS O TÉRMINO DA SESSÃO EXPERIMENTAL DE 5 MINUTOS	44
5.3 EXPERIMENTO 3: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA IMEDIATAMENTE APÓS O TÉRMINO DA SESSÃO EXPERIMENTAL DE 30 MINUTOS.....	46
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	58
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
10 – Anexo	73

1 INTRODUÇÃO

A dependência química é uma doença crônica caracterizada por comportamento compulsivo de busca por prazer, bem-estar, alívio de medo, ansiedade e/ou tensões com uso recorrente de substâncias. Além dos danos ao longo prazo para a saúde, os problemas sociais ao qual o usuário está exposto afetam suas possibilidades de trabalho, prestígio social e relacionamentos familiares. Após décadas de marginalização, é reconhecida, nos dias atuais, como problema social e de saúde pública, porém o estigma persiste.

A Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde classifica o distúrbio dentro dos transtornos mentais e comportamentais devido ao uso de substância psicoativa (F10 ao F19). Segundo o Ministério da Saúde em sua plataforma digital, a dependência química possui um conjunto de sinais e sintomas cognitivos, fisiológicos e comportamentais que se desenvolvem após o uso repetido de uma substância psicoativa, como: dificuldade de controlar o consumo; utilização persistente da substância psicoativa, apesar das suas consequências; maior prioridade dada ao uso da droga em detrimento de outras atividades e obrigações; aumento da tolerância pela droga; e, por vezes, um estado de abstinência física (DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS, 2008).

Segundo o mais recente relatório mundial sobre drogas das Nações Unidas, emitido pelo *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC), o uso de medicamentos controlados e a automedicação vêm aumentando nos últimos anos, assim como a apreensão global de opioides farmacêuticos ilegais, que, em 2016, foi de 87 toneladas, aproximadamente a mesma quantidade de heroína apreendida naquele ano. De 2016 a 2017, a produção global de ópio aumentou 65% para 10.500 toneladas, a maior estimativa registrada pelo órgão. O número de pessoas em todo o mundo que usam drogas pelo menos uma vez por ano permaneceu estável em 2016, com cerca de 275 milhões de pessoas, ou cerca de 5,6% da população mundial entre 15 e 64 anos. Ainda segundo o relatório, os opiáceos causam os maiores danos ao usuário representando 76% das mortes em que os distúrbios de uso de drogas foram implicados (OMS, 2018).

Acredita-se que a dependência ocorra devido a uma combinação de fatores que incluem a predisposição genética, perfil psicológico, contexto sociocultural e exposição ao fármaco (NASCIMENTO; SAKATA, 2011). Pela sensibilização do incentivo (ROBINSON; BERRIDGE, 1993), a dependência acontece pela sensibilização dos sistemas neurais com a administração repetida da droga, criando um aumento progressivo de uma determinada resposta comportamental quando a mesma dose é administrada repetidamente. Os estudos atuais convergem em caracterizar a dependência como uma doença da aprendizagem e da memória.

Desde os trabalhos feitos, na década de 70, por Wikler (1973), O'Brien e colaboradores (1974, 1975), tem se relacionado a dependência com o processo de condicionamento, um tipo de aprendizagem no qual são criadas associações do fármaco com o ambiente, e os estímulos ambientais neutros passam a produzir, sozinhos, respostas fisiológicas e/ou comportamentais semelhantes aos produzidos pela droga (PAVLOV, 1928).

Experimentalmente, o condicionamento pavloviano pode ser classificado de acordo com a apresentação temporal dos estímulos em condicionamento de traço e de atraso. No condicionamento de atraso, o estímulo incondicionado é apresentado antes do estímulo condicionado, ou seja, o fármaco é administrado antes do contexto ambiental, e seus efeitos ocorrem em contiguidade temporal. No modelo experimental de traço, o estímulo incondicionado é apresentado após o término do estímulo condicionado (CAREY et al., 2014). Para que os dois sejam associados, a administração do fármaco deve ser imediatamente após a saída do ambiente experimental (SANTOS et al., 2015, 2017), sendo esse intervalo de consolidação da memória necessariamente breve durando por poucos segundos. Trabalhos realizados em nosso laboratório têm verificado que os processos de condicionamento e sensibilização podem ser eliminados utilizando-se um protocolo de reconsolidação da memória (CARRERA et al., 2012, 2013).

No presente trabalho, foram utilizadas três doses diferentes de morfina, agonista opioide, como tratamento farmacológico em um protocolo de condicionamento de traço— ainda pouco utilizado no estudo de dependência—, em um ambiente novo. Para se avaliar o período de consolidação da memória, dois experimentos breves foram realizados, nos quais os tratamentos foram

administrados dentro ou fora do período de consolidação. Um terceiro experimento, com maior exposição ao ambiente, foi executado para se avaliar o papel da novidade sobre o condicionamento de traço.

Eventos novos geram uma resposta no circuito de recompensa cerebral, que desempenha um papel importante em diversas formas de aprendizagem e memória. Após reconhecidos e familiarizados, esses estímulos ao sistema dopaminérgico diminuem por meio do processo de habituação (YAMAGUCHI, 2004). Diante disso, temos como hipótese que a exposição breve a um ambiente novo deve criar um estímulo tão intenso que deve persistir por tempo suficiente para que se torne associado ao tratamento farmacológico aplicado após a sessão experimental. Buscamos ainda elucidar se a exposição à morfina, imediatamente após uma exposição longa ao ambiente, criará excitação sensorial e motora e associações do fármaco ao ambiente ou sofrerá danos por perda do efeito da novidade.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Verificar, em um protocolo de condicionamento de traço, o efeito de diferentes doses de morfina (10, 5 e 3 mg/kg) no desenvolvimento e na expressão de extinção de uma resposta locomotora condicionada e sensibilizada em ratos.

2.1 ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito da morfina na resposta condicionada e sensibilizada em um protocolo de condicionamento de traço;
- Avaliar se uma resposta locomotora previamente condicionada e sensibilizada produzida por morfina pode sofrer extinção;
- Analisar, no protocolo de condicionamento de traço, a relação entre a resposta locomotora condicionada e sensibilizada e o tempo de exposição ao ambiente experimental.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DEPENDÊNCIA QUÍMICA

A dependência química é reconhecida como doença e um importante problema, tanto social quanto de saúde pública. A Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde (CID) insere-a nos transtornos mentais e comportamentais devido ao uso de substância psicoativa (CID F10 ao F19). Além disso, possui fatores sociais e ambientais que influenciam o seu consumo, e os sistemas neurofisiológicos alterados pelas drogas psicoativas traduzem-na como uma doença do cérebro. Acredita-se que tal distúrbio ocorra devido a uma combinação de elementos que incluem a predisposição genética, perfil psicológico, contexto sociocultural e exposição ao fármaco (NASCIMENTO; SAKATA, 2011). As teorias atuais coincidem ao caracterizar as drogas psicoativas como estímulos que agem em diferentes receptores cerebrais, mas que, por suas peculiaridades de ação sobre o SNC, podem produzir os padrões de comportamento adaptativos típicos da dependência (GARCIA-MIJARES; SILVA, 2006).

A linha que separa o usuário recreativo do usuário dependente é tênue. Segundo Heyman (1996), dependentes diferenciam-se de usuários recreativos pelo tipo de estratégia de escolha que controla seu comportamento. Dependentes são controlados pelo valor reforçador local, imediato, do consumo da droga, em detrimento das outras atividades. Usuários recreativos, por outro lado, são controlados pelo valor reforçador combinado da droga e das atividades concorrentes. Pela Teoria da Sensibilização do Incentivo, produzida por Robinson e Berridge (1993), a dependência acontece pela sensibilização dos sistemas neurais responsáveis pelos estímulos, com administração repetida da droga. O indivíduo, sensibilizado, quando exposto à substância química ou a estímulos associados a ela, deseja-a até mesmo não gostando mais dos seus efeitos. “Gostar” está ligado a processos cognitivos, os quais não são sensibilizados; então o “querer” a droga pode ser irracional. Assim, a fissura por ela, que é igualada ao “querer”, seria um processo que aconteceria mesmo quando o usuário não a deseja mais (GARCIA-MIJARES; SILVA, 2006).

Para a Teoria Neurobiológica de Kalivas (2006), os efeitos da droga facilitam, induzem, modificam e atuam em processos biológicos, modificando a estrutura cerebral. Já os processos de aprendizagem em que a substância e estímulos associados a seus efeitos adquirem controle potente sobre o comportamento diferenciam-se dos processos de aprendizagem envolvidos e, com isso, integram as duas outras teorias. Desse modo, o entendimento das vias de recompensa, neurotransmissores e fatores comportamentais de aprendizagem associativa envolvidos pode ser central no desenvolvimento de terapias para a dependência.

Marcadores imunológicos, bioquímicos e moleculares vêm sendo utilizados no estudo desse distúrbio como uma ferramenta para localizar essas alterações no cérebro. Pesquisas envolvendo a ERK, proteína quinase regulada por sinais extracelulares, já demonstraram a ativação da amígdala pelo aumento da marcação da contagem dessa substância em um novo ambiente (SANGUEDO et al., 2015). Também apontaram que o efeito da sensibilização está associado a um aumento na ativação da ERK no Córtex pré-frontal, representando um efeito neurobiológico que pode ser usado para avaliar o impacto de procedimentos eficazes na reversão das manifestações comportamentais da sensibilização (SANGUEDO et al., 2014, 2015, 2017).

3.2 CONDICIONAMENTO CLÁSSICO

O condicionamento é um tipo de aprendizagem associativa e ocorre pela mudança de comportamento resultante do treino ou da experiência. As impressões e experiências obtidas do ambiente e do mundo, fornecidas pelos sentidos, são associadas umas às outras, dando lugar ao aprendido. O condicionamento pode ser classificado em dois tipos: clássico, também chamado de pavloviano; e o operante, também chamado instrumental (GIUSTA, 1985; DOMJAM, 2005; SANCHIS; SPANALGEL, 2006; DÌAZ, 2011).

No condicionamento operante, o comportamento é mantido ou extinguido por suas consequências: reforços ou punições. Se a probabilidade de ocorrência de uma resposta for modificada pela consequência, ela é operante. Tal ocorrência pode ser exemplificada da seguinte forma: tendo seu comportamento reforçado pela entrega

ocasional de alimentos, um animal que pede comida à mesa está demonstrando um condicionamento operante. Ou seja, se não houver o “prêmio”, o reforço positivo, como consequência dessa ação, o comportamento de pedir irá diminuir, ou até se extinguir (CATANIA, 1999; BARDO; BEVINS, 2000).

O condicionamento clássico é um processo que descreve a gênese e a modificação de comportamentos com base nos efeitos da associação de estímulo-resposta sobre o sistema nervoso central dos seres vivos. Foi descoberto pelo fisiologista russo Ivan Pavlov, no início do século XX, que verificou que os estímulos do som emitido por uma sineta poderiam se associar a um estímulo prazeroso, como o da carne. O som de uma sineta foi então associado diversas vezes com o estímulo do alimento, e, após várias associações, o som da sineta por si só produzia salivação (PAVLOV, 1927 apud MCKIM, 2000).

Quando a comida, um estímulo incondicionado (EI), é apresentada a um cão, gera uma resposta incondicionada (RI), que é a salivação. Estímulos neutros (EN), que não evocam uma resposta específica originalmente, quando associados a um estímulo incondicionado (EI), são capazes de provocar reflexos. O estímulo neutro torna-se, então, um estímulo condicionado (EC), já que, sozinho, passa a produzir uma resposta similar ao do estímulo incondicionado. Essa resposta, resultante do estímulo aprendido, é denominada resposta condicionada (RC); e o processo envolvido, condicionamento clássico ou pavloviano (PAVLOV, 1927). Este não ocorre apenas com estímulos físicos. Drogas como cafeína, cocaína, morfina e álcool podem ter seus efeitos condicionados a estímulos neutros presentes no momento do seu uso. O condicionamento leva à busca da droga, que pode causar surtos de fissura *craving* depois de longos períodos de abstinência. A pessoa deixa de ser usuária, mas a dependência persiste (ARAUJO et al., 2008).

O condicionamento clássico pode ser classificado de dois modos, de acordo com a sua programação temporal: em condicionamento de atraso e em condicionamento de traço. O de atraso é um modelo pavloviano no qual ocorre uma contiguidade temporal entre os estímulos incondicionado e condicionado. O primeiro é administrado antes da colocação do animal no ambiente de teste (EC), de modo que o efeito do medicamento ocorre em contiguidade temporal com os sinais desse mesmo ambiente (PAVLOV, 1927, 1928).

No condicionamento traço, é necessário haver um traço de memória do EC para que seja feita a associação entre estímulos. O EC termina antes do início do EI, e esse intervalo precisa ser breve. Um traço de memória do EC persiste após o seu término, e a memória, ainda em estado lábil, associa-se ao EI (WEISS; DISTERHOFT, 2011; THOMPSON, 2013; SANTOS et al., 2015, 2017). Associações da droga com o ambiente aumentam e impulsionam o comportamento de busca, promovendo a dependência e tendo início no condicionamento de atraso, subsequentemente amplificadas e conduzidas pelo condicionamento de traço (CAREY et al., 2014). A Figura 1 apresenta as diferenças entre os protocolos:

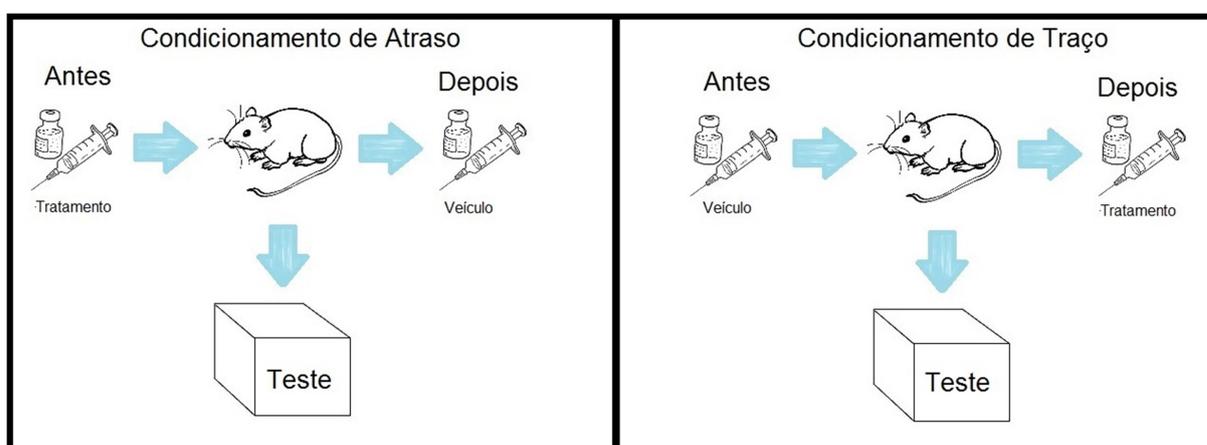


Figura 1 -Protocolos de Condicionamento de atraso e traço. Fonte: elaboração do autor.

A estimulação locomotora é uma resposta produzida por psicoestimulantes comumente utilizada no estudo de condicionamento (MUCHA, 1981; FRANKLIN et al., 2000; FONTANA et al., 1993; BRAGA et al., 2009a, 2009b; MATOS et al., 2010; DIAS et al., 2010; DE MELLO BASTOS et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016; SANTOS et al., 2017). Recentemente trabalhos do nosso laboratório, utilizando um protocolo de condicionamento de traço, mostrou que a apomorfina (agonista D1 e D2), na dose de 2,0 mg/kg (atuando nos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos), produziu aumento da locomoção, e essa resposta locomotora foi condicionada e sensibilizada. A utilização de tal compostona dose de 0,05 mg/kg (atuando nos receptores dopaminérgicos pré-sinápticos) produziu diminuição da locomoção e condicionamento (SANTOS et al., 2015). Em um trabalho posterior, foi mostrado que a substância, quando utilizada em um protocolo de condicionamento de traço, segue

os princípios condicionadores pavlovianos, incluindo: indução, extinção e recuperação espontânea (SANTOS et al., 2017).

Esses achados sugerem que o condicionamento de traço pode ser um importante contribuinte para a potência dos efeitos de drogas condicionadas no desenvolvimento da dependência de substâncias químicas (SANTOS et al., 2015), e o uso desse protocolo, ainda pouco utilizado, pode auxiliar a compreensão dos processos de aprendizagem associativas e não associativas envolvidos na dependência de drogas (CAREY et al., 2014; SANTOS et al., 2015, 2017). O comportamento, no condicionamento de traço, é medido no estado não medicamentoso, representando um dado claro, rápido e uma simples maneira de investigar o possível condicionamento de traço referente às drogas psicoativas.

3.3 SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL

A sensibilização comportamental caracteriza-se pelo aumento progressivo de uma determinada resposta comportamental quando a mesma dose é administrada repetidamente (ROBINSON; BERRIDGE, 1993, 2000). É resultante da liberação de dopamina em áreas relacionadas ao prazer, representando um incentivo para o desejo, a busca e o uso abusivo de drogas, sendo, então, essencial no processo de dependência química.

Em roedores, expressa-se pelo aumento duradouro da atividade locomotora e dos comportamentos rotacional e estereotipado, causados por repetições diárias, em doses fixas de um psicoestimulante (ROBINSON; BECKER, 1986; KALIVAS; STEWART, 1991; CADOR et al., 1995; HEIDARI et al., 2006). Pode ser induzida por substâncias como anfetamina, nicotina, álcool, Δ^9 -tetraidrocanabinol, cocaína, apomorfina e opioides, com a possibilidade de ocorrer a sensibilização cruzada entre drogas. Apesar do fato de diferentes classes de drogas possuírem diferentes locais de ligação no cérebro, todas produzem desenvolvimento de sensibilização comportamental (MISERENDINO; NESTLER, 1995; FRAIOLI et al., 1999; CADONI et al., 2001; VIGANÒ et al., 2003; BLOISE et al., 2007; BRAGA et al., 2009a, 2009b).

Essa sensibilização pode também ser um processo associativo e apenas um fenômeno farmacológico. Seu desenvolvimento também depende do histórico de exposição às drogas e a fatores relacionados ao procedimento experimental. Ações típicas do manipulador, modo de administração ou até o tempo de permanência do animal no ambiente experimental podem determinar o aumento ou a diminuição da resposta locomotora, pois influenciam o estado de alerta dos animais (ROBINSON; BERRIDGE, 1993; HYMAN; MALENKA; NESTLER, 2006; TODTENKOPF; CARLEZON, 2006; SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006).

Diversos estudos com apomorfina, agonista D1/D2, demonstram os efeitos da sensibilização comportamental (BLOISE et al., 2007; BRAGA et al., 2009a, 2009b; MATOS et al., 2010; DIAS et al., 2010; DE MELLO BASTOS et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016; SANTOS et al., 2017). A sensibilização à apomorfina é específica do contexto (BLOISE et al., 2007; BRAGA et al., 2009a, 2009b; DIAS et al., 2010; MATOS et al., 2010) e gera efeitos estimulantes locomotores condicionados (BRAGA et al., 2009a, 2009b; DIAS et al., 2010; MATOS et al., 2010). Assim, os efeitos da sensibilização não estão simplesmente relacionados a fatores farmacológicos, como o acúmulo de drogas ou o metabolismo diminuído de drogas, mas envolvem alterações moleculares (SANGUEDO et al., 2014). Em roedores, segundo Viganò et al. (2003), uma exposição contínua à morfina, agonista opioide, leva ao desenvolvimento de tolerância, e a exposição intermitente produz um aumento dos efeitos locomotores por sensibilização comportamental, que é caracterizada, nesse contexto, por uma resposta comportamental oposta à que ocorre no processo da tolerância, que é a redução do efeito da droga após a sua administração repetida.

A tolerância a opioides é desenvolvida apenas para os efeitos sedativo e de controle de dor. Os efeitos excitatórios envolvidos com processos de recompensa da morfina passam pelo processo de sensibilização. Com tratamento crônico, o efeito sedativo é substituído por uma fase de excitação, imediatamente após a administração dessa substância (VANDERSCHUREN et al., 1997).

3.4 MEMÓRIA

Pode-se conceituar a memória como o processo de aquisição, formação e conservação de informações (IZQUIERDO, 2011). Os aprendizados fornecidos pela aquisição podem ou não ser armazenados de forma permanente. O hipocampo, a amígdala e suas conexões com o hipotálamo e o tálamo regulam a gravação e evocação de todas, de muitas ou, pelo menos, da maioria das memórias.

Esse conjunto de estruturas constitui um sistema modulador que influi na decisão, pelo sistema nervoso, ante cada experiência, de que deve ser gravado e de que deve ou pode ser evocado, e é provável que o reconhecimento da novidade ou não de determinadas ou de todas as situações em geral, por parte do hipocampo, envolva, primariamente, o reconhecimento do contexto espacial de cada estímulo ou configuração de estímulos em particular. O hipocampo informa à amígdala, ao hipotálamo e a diversos núcleos talâmicos associativos que se trata realmente de uma experiência ou ambiente novo (IZQUIERDO, 1984, 1989, 2011).

Recentemente Menezes et al. (2015) demonstraram que, em 5 minutos, a exposição a um novo ambiente evoca a liberação de dopamina, e os efeitos destas sobre os sistemas cerebrais importantes no aprendizado e na memória, como o hipocampo, persistem brevemente após a remoção do novo ambiente. Aumentos e diminuições na atividade dessa substância podem ter efeitos potentes sobre a aprendizagem e a memória, aumentando ou diminuindo os efeitos da recompensa (KOOB e LE MOAL, 2006).

Nestler (2004) afirma que a memória do vício jamais será esquecida, porém estudos comprovam que ela, uma vez que evocada e assim reativada, torna-se instável e sensível à modificação, contrariando as antigas definições (PRZYBYSLAWSKI; SARA, 1997; NADER, 2003; CARRERA et al., 2012). A janela de reconsolidação é curta, e a incorporação de informação farmacológica às memórias ocorre só até os primeiros 5 a 10 minutos após cada experiência; a liberação ou injeção das substâncias para além desse período não é mais efetiva (IZQUIERDO, 1984, 1989).

Sendo assim, a memória, pode ser reativada por reexposição e, em seguida, modificada, pois, de acordo com a Teoria da Reconsolidação da Memória, uma

informação já consolidada, quando é evocada (reativada), torna-se lábil, capaz de ser modificada se, nesse momento, for introduzida uma nova informação ou algum tratamento farmacológico (NADER, 2003). Trabalhos realizados em nosso laboratório têm verificado que os processos de condicionamento e sensibilização podem ser eliminados utilizando-se um protocolo de reconsolidação da memória (CARRERA et al., 2012, 2013).

Em nossos estudos areconsolidação dessa estrutura, foi utilizada a apomorfina, que é um agonista direto dos receptores D1 e D2, e outras pesquisas apresentaram que a administração desse composto em dose elevada (2,0 mg/kg) produz ativação do sistema dopaminérgico e o desenvolvimento do processo de condicionamento e sensibilização comportamental (BRAGA et al., 2009a, 2009b). Por outro lado, a apomorfina em doses baixas (<0,1 mg/kg) atua preferencialmente em autorreceptores D2, produzindo uma diminuição da atividade dopaminérgica, não causando o desenvolvimento de uma resposta condicionada e sensibilizada. Tratamentos após teste na arena, com apomorfina em doses altas (2,0 mg/kg) em ratos com catalepsia condicionada pelo antagonista dopaminérgico, antipsicótico típico, haloperidol (1,0 mg/kg), eliminaram a resposta inicial à catalepsia e, em dose baixa (0,05 mg/kg), aumentaram as respostas da doença tanto sensibilizadas quanto as condicionadas (OLIVEIRA et al., 2016). Essa demonstração, de que os tratamentos medicamentosos dopaminérgicos dados após o teste na arena podem modificar o comportamento dos medicamentos condicionados, tem amplas implicações para os efeitos condicionados dos medicamentos.

3.5 EXTINÇÃO

O termo extinção refere-se ao processo de desaparecimento de uma resposta comportamental de determinado indivíduo. Essa atividade ocorre quando um estímulo condicionado para de fornecer uma resposta condicionada. Assim, esta pode desaparecer se o estímulo condicionado for apresentado repetidas vezes sem a presença do incondicionado, possibilitando que o efeito deixe de existir (MOREIRA; MEDEIROS, 2007).

O processo de extinção já era observado desde os estudos de Pavlov (1927), e, com o passar do tempo, as respostas de estímulo condicionado, extintas, recuperam-se espontaneamente, indicando que a extinção não apaga uma memória condicionada, sendo, sim, uma forma de inibição desta (QUIRK; MUELLER, 2008), existindo, a possibilidade de aumentar a efetividade ou, até mesmo, diminuir a duração de um tratamento de extinção, se o aprendizado desta puder ser facilitado por métodos farmacológicos (DAVIS et al., 2006b).

Como outros tipos de aprendizado, o processo de extinção ocorre não somente em uma estrutura, mas também por meio de uma rede delas, em três fases: aquisição, consolidação e recuperação (QUIRK; MUELLER, 2008). A aquisição de um processo de extinção tem seu início quando uma resposta condicionada está diminuindo com a falta do estímulo incondicionado, sendo seguida por uma fase de consolidação, na qual processos fisiológicos e moleculares estabilizam uma memória de longa duração.

Após um processo de extinção satisfatório, com a apresentação de gatilhos que, no passado, eram condicionados, estes demonstram uma baixa resposta condicionada, porém respostas condicionadas altas, mesmo após um grande período de extinção, indica que o processo não obteve êxito. No mais, diversos motivos influenciam o sucesso do processo de extinção: recuperação espontânea, renovação, reestabelecimento, recuperação espontânea do processo de condicionamento ou, até mesmo, patologias que impeçam a extinção (QUIRK; MUELLER, 2008).

Inicialmente os receptores N-Metyl-D-aspartato (NMDA) foram associados aos processos de extinção. Resultados obtidos, no entanto, apontam divergência no papel desse tipo de receptores neste processo. Observou-se que tratamentos farmacológicos com administração sistêmica do antagonista NMDA MK801 impediram processos de extinção (BAKER; AZORLOSA, 1996; COX; WESTBROOK, 1994), mas a literatura diverge, pois bloqueadores NMDA não preveniram a aquisição da extinção (SANTINI et al., 2001; SUZUKI et al., 2004). Atentando-se, porém, às diferentes afinidades para cada subtipo de receptor das drogas utilizadas, aponta-se que os receptores NMDA sejam necessários para o processo de aquisição da extinção (QUIRK; MUELLER, 2008).

Administrações sistêmicas de naloxona (antagonista opioide) dificultaram a extinção de medo em ratos (MCNALLY; WESTBROOK, 2003), e níveis altos do endocannabinoide anandamida parecem acelerar o processo de extinção tanto de medo quanto de memórias espaciais (VARVEL et al., 2007). Kamprath e Wotjak (2004), por sua vez, argumentam que a extinção possa ser um processo parecido com o de uma habituação.

A recuperação da extinção envolve a expressão de uma memória inibidora e é altamente específica do contexto. Consequentemente, espera-se que essa recuperação ative redes inibitórias, bem como o hipocampo. Entendê-la é clinicamente importante, porque muitas desordens mentais possuem altos níveis de estresse que impedem os processos de extinção, e os transtornos de ansiedade e a recaída do abuso de drogas são causados pela falha em recuperar uma memória de extinção gerada no tratamento baseado em sua eliminação (QUIRK; MUELLER, 2008).

3.6 A VIA DOPAMINÉRGICA

Existem quatro principais vias de transmissão dopaminérgicas no cérebro: a via mesocortical conecta a Área Tegmental Ventral (ATV) ao córtex frontal (CF) e está intimamente ligada com a compulsão e a perda do controle para o consumo de drogas; a via nigro-estriatal conecta a *substantianigra aostriatum* e está relacionada ao controle motor; a via tuberoinfundibular liga o hipotálamo à glândula pituitária, influenciando a secreção de alguns hormônios; e a via mesolímbica está relacionada ao sistema de recompensa e à memória (NESTLER, 2004; ARIAS-CARRIÓN et al., 2010; VOLKOW et al., 2011).

Esta última via inicia-se na ATV, a qual se conecta com todo o sistema límbico por meio do *nucleusaccumbens* (Nac). O sistema límbico é uma estrutura de uma rede complexa que inclui área cortical pré-frontal, hipocampo e amígdala (NESTLER, 2004; RIBAS 2007). Além disso, a via mesolímbica está envolvida na modulação das respostas comportamentais aos estímulos que ativam as sensações de recompensa por meio da dopamina (HYMAN et al., 2006; WOLF, 2002).

Ambos os sistemas, mesolímbico e mesocortical, funcionam paralelamente entre si e com as demais estruturas cerebrais configurando o sistema mesocorticolímbico, o sistema de recompensa cerebral. A dopamina é o principal neurotransmissor presente nesse sistema, porém não o único. Neurotransmissores como a serotonina, noradrenalina, glutamato e o ácido gama-aminobutírico (Gaba) são responsáveis pela modulação do SNC e também estão presentes no sistema de recompensa.

A ativação da via mesocorticolímbica está ligada a vários efeitos comportamentais dos opioides, incluindo os locomotores e os estímulos de recompensa, além dos que atuam de forma direta na formação de associações (LEONE et al., 1991). A dopamina é fundamental para a expressão da sensibilização de opioides, a qual pode ser bloqueada pelo uso de baixas doses de antagonistas dopaminérgicos, em particular, D1 (POLLOCK; KORNETSKY, 1989; VIGANÒ et al., 2003; WOLF et al., 2004), assim como na utilização de agonistas dopaminérgicos, que podem se condicionar a um contexto ambiental com o efeito da ativação locomotora, de modo que esta ação pode então ser induzida utilizando somente veículo, no mesmo contexto ambiental (FONTANA et al., 1993; FEIFEL, 2002).

Injeções de morfina aumentam o influxo de dopamina da ATV, seja inibindo interneurônios Gaba que contêm receptores μ na ATV, seja ativando diretamente neurônios do NAc que contenham receptores μ (KOOB, 1992; NESTLER, 2004; VOLKOW et al., 2011). Na ausência de estimulação glutamatérgica da ATV, não há ativação induzida pela morfina dos neurônios dopaminérgicos (JALABERT, et al., 2011). Antagonistas NMDA, administrados diretamente no NAc, bloqueiam a expressão do condicionamento clássico dos efeitos locomotores da morfina e da anfetamina (BESPALOV; ZVARTAU, 1995).

Chen et al. (2015) demonstraram que, se o controle inibitório Gabaérgico da liberação de glutamato pré-sináptico em neurônios dopaminérgicos da ATV for removido, o efeito da morfina, no disparo desses neurônios, desaparece, indicando que o aumento da atividade neuronal de dopamina na ATV induzido por morfina pode depender principalmente de sua ação desinibitória na liberação pré-sináptica de glutamato.

Os receptores opioides e seus ligantes endógenos de dinorfina são altamente expressos no NAc também presentes na ATV. A ativação do sistema receptor de dinorfina/opioide pode servir como um mecanismo de retroalimentação para contrabalançar os altos níveis de DA liberados por drogas de abuso, opondo-se aos efeitos das drogas nos circuitos de recompensa (TRIGO et al., 2010).

3.7 OPIOIDES

O ópio é uma mistura de alcaloides extraídos da papoula (*Papaversomniferum*), que é cultivada desde 3.400 a.C., na Mesopotâmia. De ação analgésica, narcótica e hipnótica, os opiáceos são alcaloides naturais, como a morfina ou a codeína, sendo opioide o termo usado amplamente para descrever compostos que atuam nos receptores homônimos (TRESCOT et al., 2008). Em várias civilizações antigas, como Suméria, Egito, Grécia Antiga ou, ainda, no Império Romano, os extratos da papoula já eram utilizados como remédio. Essa planta é a principal fonte natural de ópio e teve suas origens na Ásia Menor. De lá, foi levada para a Grécia, crescendo, desde então, em todo o mundo, em países com climas similares (MACHT, 1915; BENYHE et al., 2015; DUARTE, 2015).

No século XVII, surgiram preparações de ópio muito difundidas, como o Pó de Dover e o Elixir Paregórico, uma tintura feita ópio (MACHT, 1915). A morfina, comumente considerada como o analgésico opioide base de comparação para os demais, só foi isolada em 1804, pelo farmacêutico alemão Friedrich Sertürner, que a nomeou em homenagem a *Morpheus*, o deus dos sonhos na mitologia greco-romana. Nos dias atuais, é a droga de escolha no tratamento de pacientes com dor moderada ou grave (STUART-HARRIS et al., 2000; TRESCOT et al., 2008; PATHAN; WILLIAMS, 2012; DUARTE, 2015).

Existem diferentes tipos de receptores opioides: mu (μ), kappa (κ), delta (δ) (NESTLER, 2004; WALDHOER; BARTLETT; WHISTLER, 2004; CORBETT et al., 2009; MALDONADO, 2010; MARTINS et al., 2012; BODNAR, 2016; BENYHE et al., 2015) e o “opioid receptor-like” ORL-1, também conhecido como NOP-R (FIORAVANTI; VANDERAH, 2008). O receptor Sigma (σ), ativado pela substância SKF 10047, já foi tido como pertencente à família dos receptores opioides, porém,

hoje, aponta-se que este seja um local de ligação para o alucinógeno (fenciclidina), localizado no receptor de glutamato NMDA (DHAWAN et al., 1996; MARTINS et al., 2012).

Estabelecida por farmacologistas, a nomenclatura dos receptores δ , κ e μ é contestada por biólogos moleculares, que pregam a mudança na qual os receptores passariam a serem chamados de DOR, KOR e MOR (delta, kappa e mu, respectivamente) (DHAWAN et al., 1996; CORBETT et al., 2009; MCKIM, 2000; MARTINS et al., 2012). O sistema opioide endógeno consiste em três famílias de peptídeos opioides: endorfinas, encefalinas e dinorfinas; e três famílias de receptores: Mu (MOR), Delta (DOR) e Kappa (KOR).

Os peptídeos opioides e seus receptores têm uma distribuição disseminada, presentes não apenas no sistema nervoso, mas também em órgãos como o coração, os pulmões e o fígado; em os tratos gastrointestinais e reprodutivos (CORBETT et al., 2009; FENG, 2012), porém essa disseminação é seletiva nos sistemas nervosos central e periférico, particularmente em circuitos envolvidos na modulação de dor, recompensa, respostas ao estresse e controle autonômico (BENARROCH, 2012).

Os receptores opioides μ (mu), MOR, regulam funções como a nocicepção, o ciclo respiratório e o trânsito intestinal. Estão amplamente expressos em todas as áreas cerebrais pertencentes aos circuitos de dependência e são preferencialmente distribuídos no tálamo, estriado, *locuscoeruleus* e núcleo do trato solitário. Os receptores δ (Delta), DOR, por sua vez, são encontrados principalmente no córtex, corpo estriado e os núcleos pontinos, além de serem responsáveis primariamente pela analgesia, mas também por modular funções cognitivas e de dependência física. Já os receptores κ (kappa), KOR, quando ativados, possuem funções de nocicepção, termorregulação, controle de diurese e secreção neuroendócrina e são localizados no hipotálamo, NAc, *substantianigra*, ATVe no núcleo do trato solitário. Por fim, os receptores ORL-1, são encontrados no córtex, amígdala, hipocampo, tálamo e hipotálamo (WALDHOER; BARTLETT; WHISTLER, 2004; MALDONADO, 2010; BODNAR, 2016).

Os receptores opioides são todos acoplados à proteína G e causam a inibição da atividade da adenilciclase e da fosforilação da proteína dependente de AMP

cíclico, um efeito que inibe a excitabilidade da membrana e a liberação do transmissor. Produzem inibição pré-sináptica da liberação de diferentes neurotransmissores como glutamato, Gaba, glicina, norepinefrina, acetilcolina e dopamina (DHAWAN et al., 1996; WALDHOER; BARTLETT; WHISTLER, 2004; NESTLER, 2004; MARTINS et al., 2012; BENYHE et al., 2015). Os opioides modulam a atividade dopaminérgica no sistema mesolímbico, provocando um aumento na liberação de dopamina no NAc (KOOB, 1992; NESTLER, 2004; VOLKOW et al., 2011). Os receptores μ mediam o reforço positivo após ativação direta (morfina) ou indireta (álcool, canabinoides e nicotina), e a compreensão da função desse receptor é central para o desenvolvimento de terapias de dependência (CONTET, KIEFFER e BEFORT, 2004). Tal ativação ainda se encaixa na hipótese dopaminérgica de recompensa, mas a excitação dos neurônios dopaminérgicos resulta da inibição dos interneurônios locais do Gaba (JOHNSON; NORTH, 1992).

3.8 MORFINA

A morfina é utilizada para controlar dores moderadamente severas a exclusivamente severas e possui fortes efeitos nos sistemas de recompensa (BESPALOV; ZVARTAU, 1996; CHEN et al., 2015; DI CHIARA; IMPERATO, 1988; LIU et al., 2014; MORI et al., 2016; STEIDL et al., 2017), apresentando-se como o opiáceo protótipo do receptor μ e um derivado do fenantreno (TRESKOT et al., 2008).

A morfina, por ser uma base fraca com pH de 8,5, pKa de cerca de 8 (PUBCHEM, 2018), apresenta melhores efeitos quando administrada pelas vias parenterais. Aproximadamente 1/3 da morfina intravenosa se liga a proteínas plasmáticas, e, quando está livre é rapidamente redistribuída em tecidos parenquimatosos e, no momento em que é utilizada por via oral, apresenta baixa biodisponibilidade, sendo então absorvida no intestino com um metabolismo significativo de primeira passagem e extensivamente metabolizada no fígado. As concentrações para atingir o pico plasmático, após a administração da substância, variam de 5 a 10 minutos (STUART-HARRIS et al., 2000; WALDHOER et al., 2004).

A meia-vida de eliminação da morfina é de aproximadamente 120 minutos, com 90% sendo expelida dentro de 24 horas após a administração (TRESCOT et al., 2008). Possui volume de distribuição de 3-5 L/Kg, *clearance* plasmático de aproximadamente 15-20 ml/min/Kg no adulto e ligação às proteínas plasmáticas da ordem dos 20-35%. Cerca de 10% da morfina é excretada na urina de forma inalterada (STUART-HARRIS et al., 2000). No fígado, ela sofre glucuronidação, formando morfina-6-glicuronídeo (M6G) e morfina-3-glicuronídeo (M3G), cuja excreção se dá pela urina (90%) e pelas fezes (7% a 10%); sua eliminação pelo suor é desprezível (HASSELSTROM; SÄWE, 1993; STUART-HARRIS et al., 2000; WALDHOER et al., 2004; GREGORI et al., 2014).

Utilizamos, nesta pesquisa, a morfina, droga com extremo potencial viciante, e, diante disso, temos como hipótese que a exposição breve a um ambiente novo deve criar um estímulo tão intenso que deve persistir por tempo suficiente para que se torne associado ao tratamento farmacológico aplicado após a sessão experimental. Buscamos ainda elucidar se a exposição à morfina imediatamente após uma exposição longa ao ambiente criará excitação sensorial, motora e associações do fármaco ao ambiente ou sofrerá danos por perda do efeito da novidade.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SUJEITOS

Foram utilizados ratos machos, albinos, Wistar, com peso inicialmente entre 200-300g (n=84) e fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Uenf), Campos dos Goytacazes, RJ. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas individuais (25 x 18 x 17cm) até o final do experimento. Ração padronizada de laboratório e água filtrada estavam disponíveis gratuitamente em todos os momentos. As gaiolas foram mantidas em uma sala com temperatura constante de 22 + 2°C, com o ciclo de luz claro e escuro no intervalo de 12 horas (luzes acesas às 7h e desligadas às 19h). Todos os experimentos ocorreram entre as 14h e as 18h. Durante 7 dias, antes de todos os procedimentos

experimentais, cada animal foi pesado e manuseado diariamente durante 5 minutos. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os Princípios éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) bem como a lei federal 11.794 e foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais (Ceua – Uenf) sob o protocolo n° 395.

4.2 APARATOS, MEDIDAS COMPORTAMENTAIS E AMBIENTE EXPERIMENTAL

Os experimentos comportamentais foram conduzidos em quatro salas experimentais idênticas, funcionando simultaneamente. Cada sala possuía uma arena de campo aberto (60 x 60 x 45cm), cujas paredes e assoalhos são pintados na cor preta. Uma câmera de circuito fechado (IKEGAMI, modelo ICD-49) instalada 60cm acima da arena foi usada para registrar dados comportamentais. A locomoção, medida como distância percorrida (m), foi analisada automaticamente usando EthoVision (NOLDUS, Holanda). O procedimento de teste completo foi conduzido automaticamente sem a presença do experimentador na sala onde ocorreu. Todos os testes comportamentais foram realizados sob luz vermelha fraca para evitar a possível aversão à luz branca e aumentar o contraste entre o sujeito branco e o fundo escuro da arena, além de despertar menos estresse nos sujeitos e favorecer a ativação locomotora (NASELLO et al., 1998). Em cada sala experimental, um ventilador forneceu ruído de fundo, com ativação e desligamento imediatos de acordo com a presença ou ausência do animal no ambiente.

4.2 FÁRMACO

Utilizou-se sulfato de morfina (CRISTALIA, SP, Brasil), a partir de ampolas de 10 mg (1 ml), o qual foi injetado subcutaneamente na nuca em doses de 3, 5 e 10 mg/kg (POWELL; HOLTZMAN, 2001; SHARF et al., 2010; VANDERSCHUREN et al., 1997, 1999). Utilizou-se uma solução salina a 0,9% como veículo. Todas as doses foram administradas em um volume de 1,0 ml/kg de peso corporal. As soluções foram preparadas antes de cada experimento.

4.3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram conduzidos de acordo com o protocolo modificado de condicionamento de traço de Santos et al. (2015). O procedimento constituiu-se das seguintes fases:

4.3.1 Fase de indução (1º-3º dia)

Os animais foram divididos aleatoriamente nos grupos experimentais e, por três dias consecutivos, receberam veículo por via subcutânea (SC) antes de serem colocados individualmente na arena experimental onde a locomoção foi medida. O tempo de duração do animal na arena, por sua vez, variou conforme o experimento. Após o término da sessão experimental, os sujeitos receberam seus respectivos tratamentos imediatamente depois do teste de 5 minutos (I-POST; Experimento 1), 15 minutos após o teste de 5 minutos (15`-POST; Experimento 2) ou imediatamente após teste de 30 minutos (I-POST30; Experimento 3).

4.3.2 Fase de Extinção (4º-8º dia)

Os animais receberam veículo e imediatamente foram colocados na arena experimental para o registro de sua atividade locomotora. O tempo de duração do experimento variou conforme os experimentos: 5 minutos (Experimentos 1 e 2) ou 30 minutos (Experimento 3). Após o término da sessão experimental, os animais

receberam veículo imediatamente (I-POST; Experimento 1), 15 minutos após o teste (15'-POST; Experimento 2) ou imediatamente após teste de 30 minutos (I-POST30; Experimento 3).

4.3.3 Fase de Retirada (9º-10º dia)

Todos os animais foram submetidos a um período de retirada de drogas por dois dias consecutivos, durante os quais eles permaneceram em suas caixas-viveiro, sem receber tratamento farmacológico ou manipulação comportamental.

4.3.4 Teste Final (11º dia)

Todos os animais receberam veículo (SC) antes de serem colocados na arena experimental onde a locomoção foi medida durante um período de 30 minutos. A Tabela 1 apresenta a linha de tempo experimental.

Tabela 1 - Linha do tempo.

Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Fase de Indução			Fase de Extinção					Retirada		Teste Final

Fonte: elaboração do autor.

4.4 EXPERIMENTO 1: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA IMEDIATAMENTE APÓS O TÉRMINO DA SESSÃO EXPERIMENTAL DE 5 MINUTOS

Esse experimento seguiu a metodologia descrita no item 4.3, sendo que os tratamentos farmacológicos foram administrados imediatamente após o término da sessão experimental de 5 minutos. A Tabela 2 apresenta o protocolo geral desse procedimento.

Tabela 2 - Procedimento Experimental – Experimentos 1 e 2.

Fase de Indução	Fase de Extinção	Fase de Retirada	Teste Final
Dias 1-3	Dias 1-5	2 dias	1 dia
5 min. arena	5 min. arena		30 min. arena

Fonte: elaboração do autor.

Os grupos experimentais foram assim constituídos:

- VEI-I-POST (n=7): os indivíduos desse grupo receberam veículo (SC) imediatamente após sua retirada da arena experimental;
- MOR-3-I-POST (n=7): os indivíduos desse grupo receberam morfina 3 mg/kg (SC) imediatamente após sua retirada da arena experimental;
- MOR-5-I-POST (n=7): os indivíduos desse grupo receberam morfina 5 mg/kg (SC) imediatamente após sua retirada da arena experimental;
- MOR-10-I-POST (n=7): os indivíduos desse grupo receberam morfina 10 mg/kg (SC) imediatamente após sua retirada da arena experimental.

A Tabela 3 apresenta os grupos experimentais.

Tabela 3: Grupos do experimento 1

Grupos Iniciais	Fase de Indução		Fase de Extinção		Teste Final		Grupos Finais
	Imediatamente	Imediatamente	Imediatamente	Imediatamente	Imediatamente	Imediatamente	
VEI (n=28)	Pré-arena	Pós-arena	Pré-arena	Pós-arena	Pré-arena	Pré-arena	VEI-I-POST (n=7)
	VEI	VEI	VEI	VEI	VEI	VEI	MOR-3-I-POST (n=7)
	VEI	MOR-3	VEI	VEI	VEI	VEI	MOR-5-I-POST (n=7)
	VEI	MOR-5	VEI	VEI	VEI	VEI	MOR-10-I-POST (n=7)

VEI = Veículo; MOR-3 = Morfina 3mg/kg; MOR-5 = Morfina 5mg/kg; MOR-10 = Morfina 10mg/kg; I-POST = Imediatamente após o teste comportamental.

4.5 EXPERIMENTO 2: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA 15 MINUTOS APÓS O TÉRMINO DA SESSÃO EXPERIMENTAL DE 5 MINUTOS

Esse experimento seguiu a metodologia descrita no item 4.3, sendo que os tratamentos farmacológicos foram administrados 15 minutos após o término de cada sessão experimental de duração de 5 minutos. A Tabela 2, presente no item 4.4, apresenta o protocolo geral desse experimento.

Os grupos experimentais foram assim constituídos:

- VEI-15`-POST (n=7): os indivíduos desse grupo receberam veículo (SC) 15 minutos após sua retirada da arena experimental;
- MOR-3-15`-POST (n=7): os indivíduos desse grupo receberam morfina 3 mg/kg (SC) 15 minutos após sua retirada da arena experimental;
- MOR-5-15`-POST (n=7): os indivíduos desse grupo receberam morfina 5 mg /kg (SC) 15 minutos após sua retirada da arena experimental;
- MOR-10-15`-POST (n=7): os indivíduos desse grupo receberam morfina 10 mg /kg (SC) 15 minutos após sua retirada da arena experimental;

A Tabela 4 mostra os grupos experimentais do Experimento 2.

Tabela 4: Grupos do experimento 2

Grupos Iniciais	Fase de Indução		Fase de Extinção		Teste Final		Grupos Finais
	Imediatamente	15 minutos	Imediatamente	15 minutos	Imediatamente		
VEI (n=28)	Pré-arena	Pós-arena	Pré-arena	Pós-arena	Pré-arena		
	VEI	VEI	VEI	VEI	VEI		VEI-15'-POST (n=7)
	VEI	MOR-3	VEI	VEI	VEI		MOR-3-15'-POST (n=7)
	VEI	MOR-5	VEI	VEI	VEI		MOR-5-15'-POST (n=7)
	VEI	MOR-10	VEI	VEI	VEI		MOR-10-15'-POST (n=7)

VEI = Veículo; MOR-3 = Morfina 3mg/kg; MOR-5 = Morfina 5mg/kg; MOR-10 = Morfina 10mg/kg; MOR-10 = Morfina 10mg/kg; 15'-POST = 15 minutos após o teste comportamental.

4.6 EXPERIMENTO 3: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA IMEDIATAMENTE APÓS O TÉRMINO DA SESSÃO EXPERIMENTAL DE 30 MINUTOS

Esse experimento seguiu a metodologia descrita no item 4.3, sendo que as sessões experimentais da fase de indução e de extinção tiveram a duração de 30 minutos cada. A Tabela 5 apresenta o protocolo geral desse experimento.

Tabela 5 - Procedimento Experimental – Experimento 3.

Fase de Indução	Fase de Extinção	Fase de Retirada	Teste Final
Dias 1-3	Dias 1-5	2 dias	1 dia
30 min. arena	30 min. arena		30 min. arena

Fonte: elaboração do autor.

Os grupos experimentais foram assim constituídos:

- VEI-I-POST30 (n=7): os indivíduos desse grupo receberam veículo (SC) imediatamente após sua retirada da arena experimental;
- MOR-3-I-POST30 (n=7): os indivíduos desse grupo receberam morfina 3 mg/kg (SC) imediatamente após sua retirada da arena experimental;
- MOR-5-I-POST30 (n=7): os indivíduos desse grupo receberam morfina 5 mg/kg (SC) imediatamente após sua retirada da arena experimental;
- MOR-10-I-POST30 (n=7): os indivíduos desse grupo receberam morfina 10 mg/kg (SC) imediatamente após sua retirada da arena experimental.

A Tabela 6 apresenta os grupos experimentais do Experimento 3.

Tabela 6: Grupos do experimento 3

Grupos Iniciais	Fase de Indução		Fase de Extinção		Teste Final		Grupos Finais
	Imediatamente	Imediatamente	Imediatamente	Imediatamente	Imediatamente	Imediatamente	
VEI (n=28)	Pré-arena	Pós-arena	Pré-arena	Pós-arena	Pré-arena	Pré-arena	VEI-I-POST30 (n=7)
	VEI	VEI	VEI	VEI	VEI	VEI	
	VEI	MOR-3	VEI	VEI	VEI	VEI	MOR-3-I-POST30 (n=7)
	VEI	MOR-5	VEI	VEI	VEI	VEI	MOR-5-I-POST30 (n=7)
	VEI	MOR-10	VEI	VEI	VEI	VEI	MOR-10-I-POST30 (n=7)

VEI = Veículo; MOR-3 = Morfina 3mg/kg; MOR-5 = Morfina 5mg/kg; MOR-10 = Morfina 10mg/kg; I-POST30 = Imediatamente após teste comportamental de 30 minutos.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os resultados da fase de indução e extinção, utilizou-se ANOVA com medidas repetidas para analisar os dados locomotores para determinar o efeito de grupo, o efeito do dia, bem como as interações entre as variáveis. Quando foi registado um efeito significativo da interação grupo versus dia, os dados foram analisados por ANOVA de um fator, seguido do teste post-hoc de Duncan. Para os dados comportamentais obtidos a partir do teste final, o tempo total deste foi dividido em 6 intervalos de 5 minutos cada, e as informações foram analisadas usando uma ANOVA de dois fatores com medidas repetidas; e, quando uma interação significativa foi encontrada, os resultados foram analisados usando uma ANOVA de uma via. Sempre que indicado pela ANOVA (efeitos de grupo com valores de $p < 0,05$), possíveis diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste de múltiplas faixas de Duncan.

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA IMEDIATAMENTE APÓS O TÉRMINO DA SESSÃO EXPERIMENTAL DE 5 MINUTOS

A Figura 2 mostra a atividade locomotora durante a fase de indução, do experimento imediato. A ANOVA de medidas repetidas mostrou que houve interação grupos X dias [F (6, 48) = 11,41; p <0,01], efeito dos grupos [F (3, 24) = 10,65; p <0,01] e efeito dos dias de tratamento [F (2, 48) = 23,33; p <0,01]. A fim de se analisar a interação grupo X dias, utilizou-se a ANOVA de um fator seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan (grupos dentro dos dias).

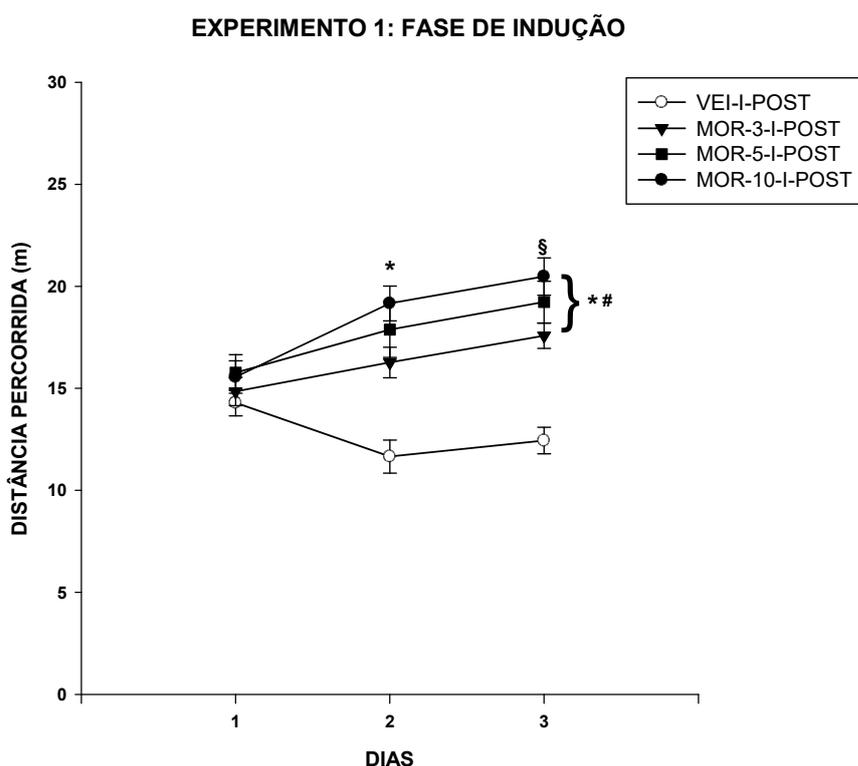


Figura 2 - Médias e Erro padrão da média para distância percorrida (m) durante os 3 dias sucessivos da fase de indução * p <0,05 versus grupo veículo (ANOVA de uma via em cada dia seguido pelo teste de múltiplas faixas de Duncan). § p <0,05 morfina 10 mg/kg versus grupo morfina 3 mg/kg (ANOVA de um fator seguido pelo teste de Duncan). # p <0,01 primeiro dia de indução versus o terceiro dia de indução para cada grupo morfina (teste t para amostras dependentes). Fonte: elaboração do autor.

Os resultados mostram que, no dia 1, não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$). Do dia 2 até o dia 3, os grupos morfina apresentaram maior locomoção que o grupo veículo ($p < 0,05$), e, no dia 2, não houve diferença entre os grupos morfina ($p > 0,05$). No dia 3, no entanto, o grupo morfina 10 mg/kg apresentou maior locomoção que o grupo morfina 3 mg/kg ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos morfina 10 mg/kg e morfina 5 mg/kg ($p > 0,05$), assim como não houve diferença entre os grupos morfina 5 mg/kg e morfina 3 mg/kg ($p > 0,05$). Na análise dos efeitos dos tratamentos ao longo dos dias de administração, os resultados mostraram que, para todos os grupos de morfina, a locomoção sofreu aumento ($p < 0,05$), mostrando o desenvolvimento da resposta locomotora sensibilizada.

A Figura 3 mostra a atividade locomotora durante a fase de extinção do experimento imediato. A ANOVA de medidas repetidas mostrou que houve apenas efeito dos grupos [$F(3, 24) = 10,82$; $p < 0,01$]. Não houve efeito de dias de tratamento [$F(4, 96) = 0,92$; $p > 0,05$] e nem interação grupo X dias [$F(12, 96) = 0,31$; $p > 0,05$]. A ANOVA de um fator seguida do Teste de Duncan mostrou que os grupos morfina apresentaram maior locomoção que o grupo veículo ($p < 0,05$). O grupo morfina 10 mg/kg, no entanto, apresentou maior locomoção que os grupos morfina 5 mg/kg e morfina 3 mg/kg ($p < 0,05$); e o grupo morfina 5 mg/kg, maior locomoção do que o grupo morfina 3 mg/kg ($p < 0,05$).

EXPERIMENTO 1: FASE DE EXTINÇÃO

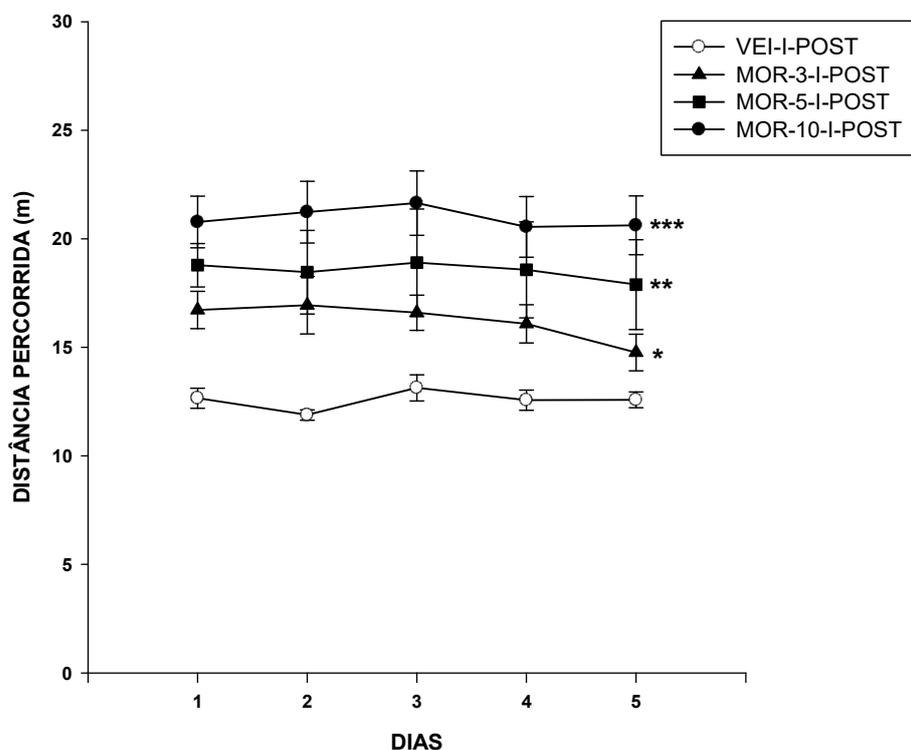


Figura 3 - Média e erro padrão da média para distância percorrida (m) durante os 5 dias sucessivos da fase de extinção para grupos de imediatos. *** $p < 0,05$ versus todos os grupos. ** $p < 0,05$ versus 3,0 mg/kg de morfina e grupo veículo, * $p < 0,05$ versus grupo veículo (ANOVA de um fator seguido pelo teste de Duncan). Fonte: elaboração do autor.

A Figura 4 apresenta a atividade locomotora durante o teste final do Experimento 1. Para se realizar uma análise dentro da sessão experimental, os 30 minutos de teste foram divididos em 6 intervalos de 5 minutos cada. A ANOVA por medidas repetidas mostrou que houve uma interação grupos X intervalos [$F(15, 120) = 4,63$; $p < 0,01$], um efeito de intervalos [$F(5, 120) = 88,74$; $p < 0,01$], mas não houve efeito dos grupos [$F(3, 24) = 2,50$; $p = 0,088$]. Para se analisar melhor a interação dias X grupo, utilizou-se a ANOVA de um fator seguido do teste de Duncan. Os resultados mostraram que, no Intervalo 1, o grupo morfina 10 mg/kg apresentou locomoção mais alta que o grupo morfina 3 mg/kg e o grupo veículo ($p < 0,05$). Não houve diferença entre o grupo morfina 10 mg/kg e o grupo morfina 5 mg/kg ($p > 0,05$). Os resultados também mostraram que este último apresentou

maior locomoção que o grupo veículo ($p > 0,05$). Não houve diferença entre o grupo morfina 5 mg/kg e o grupo morfina 3 mg/kg ($p > 0,05$), e não houve diferença entre o grupo morfina 3 mg/kg e o grupo veículo ($p > 0,05$). No Intervalo 2, o grupo morfina 10 mg/kg apresentou maior locomoção que os demais grupos ($p < 0,05$), com exceção do grupo morfina 5 mg/kg ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos morfina 5 mg/kg e o grupo morfina 3 mg/kg ($p > 0,05$), e não houve diferença entre o grupo morfina 3 mg/kg e grupo veículo ($p > 0,05$). Do Intervalo 3 ao Intervalo 6, não houve diferenças entre os grupos ($p > 0,05$).

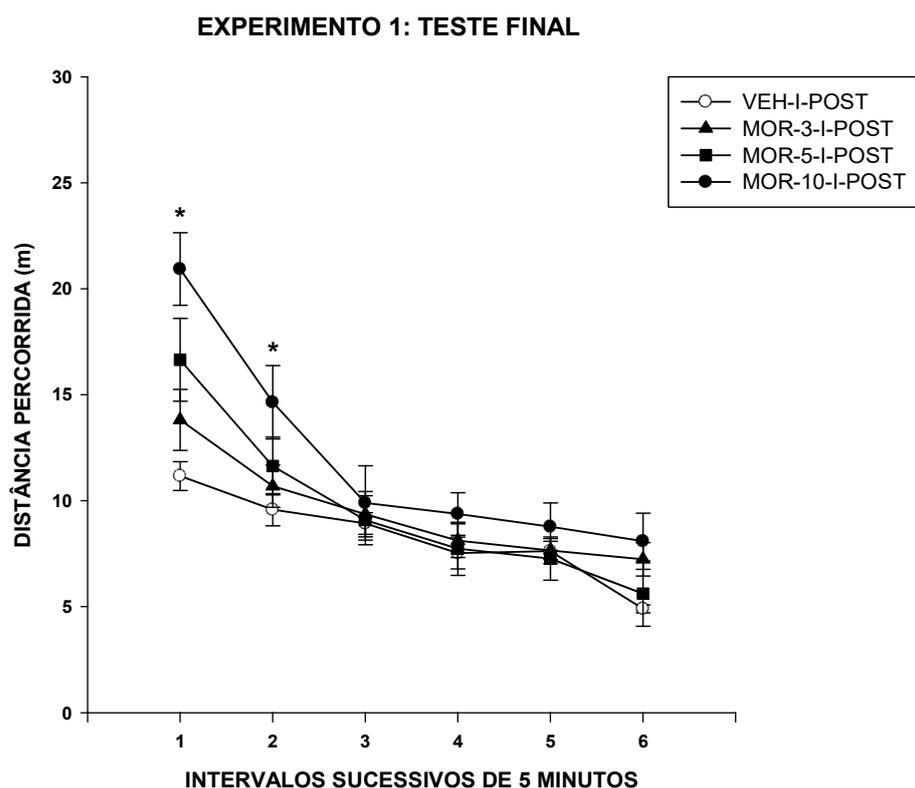


Figura 4 - Médias e erro padrão da média para distância percorrida (m) durante os 30 minutos do teste final. * $p < 0,05$ versus grupo veículo (ANOVA de um fator seguido pelo teste de Duncan). Fonte: elaboração do autor.

5.2 EXPERIMENTO 2: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA 15 MINUTOS APÓS O TÉRMINO DA SESSÃO EXPERIMENTAL DE 5 MINUTOS

A Figura 5 apresenta a atividade locomotora durante a fase de indução do Experimento 2, com 15 minutos de atraso. A ANOVA de medidas repetidas mostrou que houve apenas efeito de dias de tratamento [$F(2, 48) = 46,0$; $p < 0,01$]. Não houve efeito dos grupos [$F(3, 24) = 0,08$; $p > 0,05$] e nem interação grupo X dia [$F(6, 48) = 1,70$; $p > 0,05$].

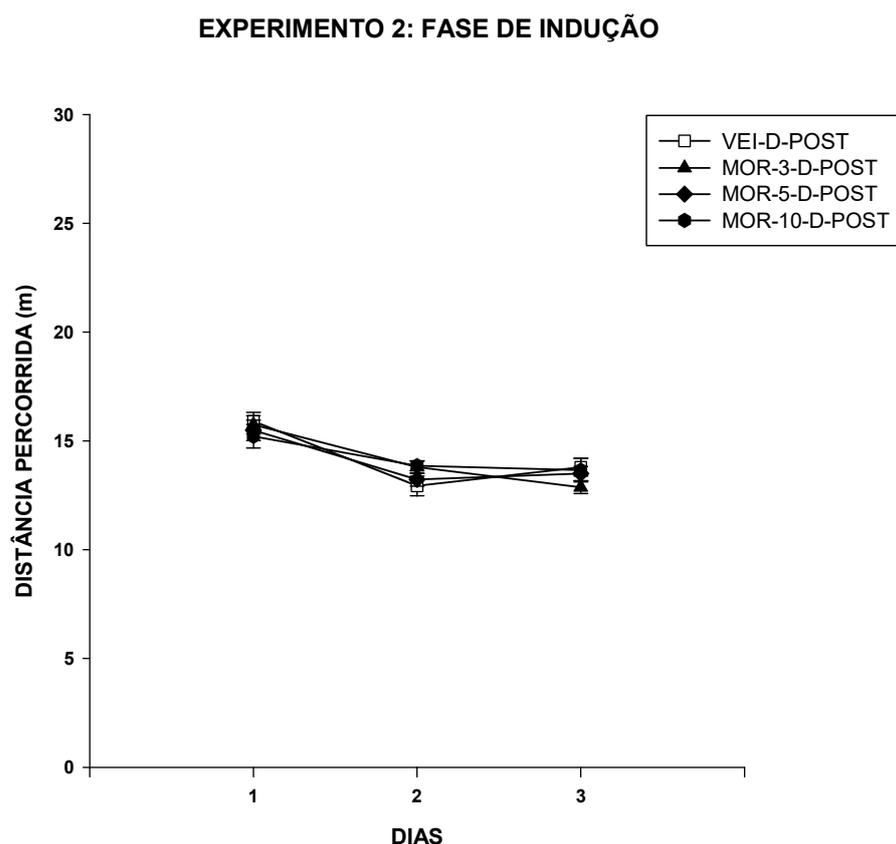


Figura 5 - Médias e Erro padrão da média para distância percorrida (m) durante os 3 dias da fase de indução do Experimento 2, com 15 minutos de atraso. Fonte: elaboração do autor.

A Figura 6 mostra a atividade locomotora durante a fase de extinção do Experimento 2, com 15 minutos de atraso. A ANOVA de medidas repetidas mostrou que não houve efeito dos grupos [$F(3, 24) = 1,82; p > 0,05$], efeito de dias de tratamento [$F(4, 96) = 0,50; p > 0,05$] e nem interação de grupo X dias [$F(12, 96) = 0,43; p > 0,05$].

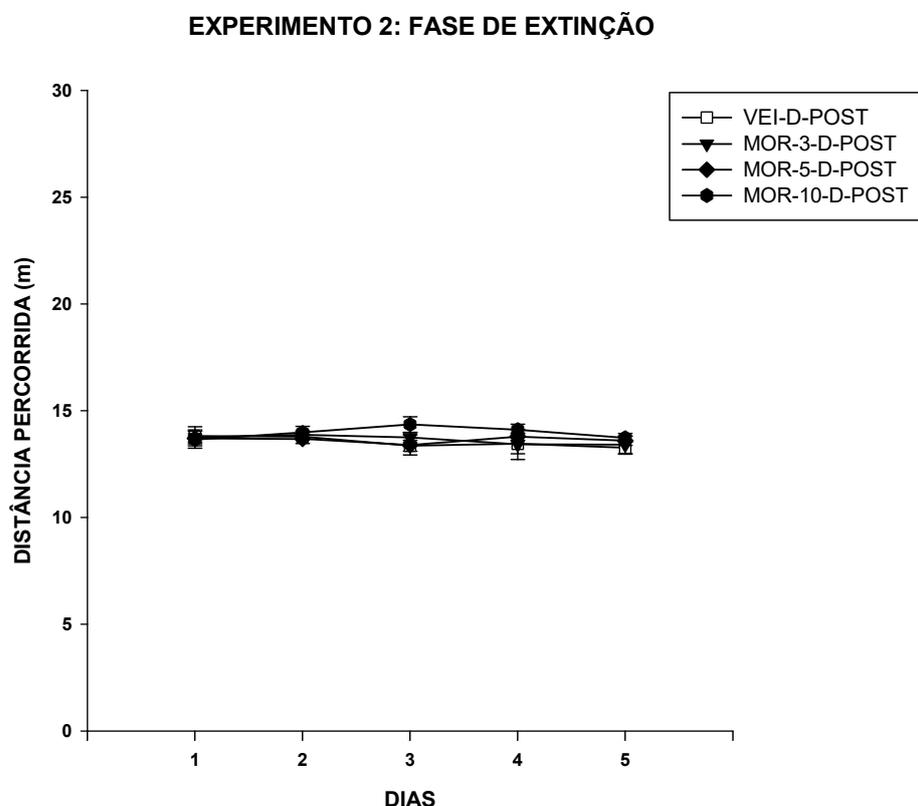


Figura 6 - Média e erro padrão da média para distância percorrida (m) durante os 5 dias sucessivos da fase de extinção para o Experimento 2, com 15 minutos de atraso. Fonte: elaboração do autor.

A Figura 7 apresenta a atividade locomotora durante o teste final para o Experimento 2, com 15 minutos de atraso. Para se realizar uma análise dentro da sessão experimental, os 30 minutos de teste foram divididos em 6 intervalos de 5 minutos cada. A ANOVA por medidas repetidas mostrou apenas um efeito de intervalos [$F(5, 120) = 101,54; p < 0,01$]. Não houve efeitos de grupo [$F(3, 24) = 0,60; p > 0,05$] e nenhuma interação intervalos X grupos [$F(15, 120) = 0,83; p > 0,05$].

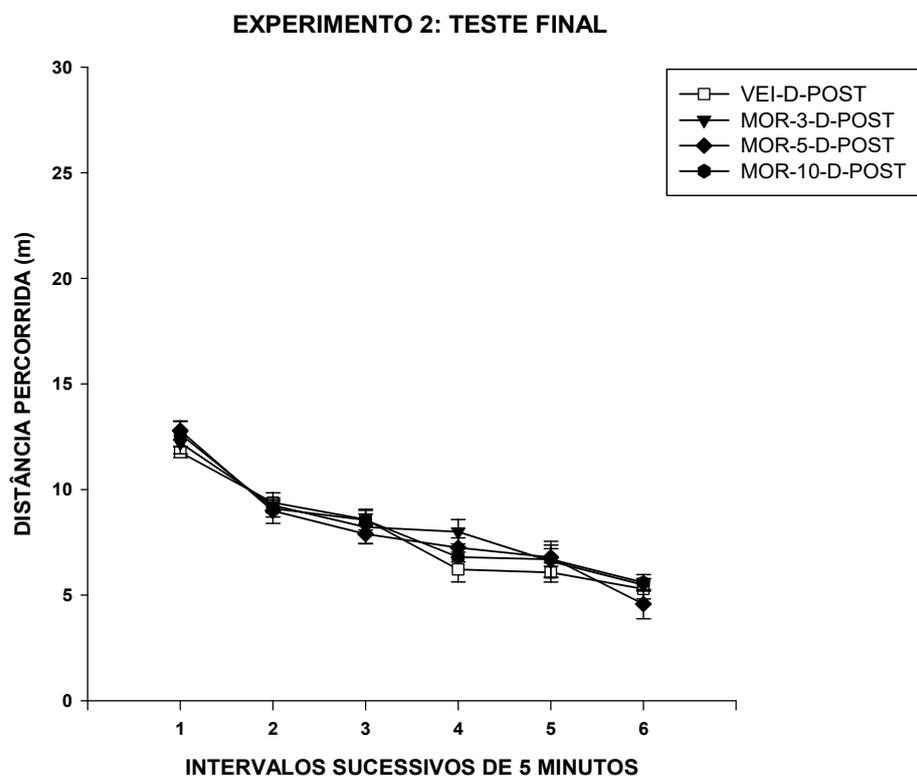


Figura 7 - Médias e erro padrão da média para distância percorrida (m) durante os 30 minutos do teste final para o Experimento 2, com 15 minutos de atraso. Fonte: elaboração do autor.

5.3 EXPERIMENTO 3: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA IMEDIATAMENTE APÓS O TÉRMINO DA SESSÃO EXPERIMENTAL DE 30 MINUTOS

A Figura 8 mostra a atividade locomotora para a fase de indução do Experimento 3. A ANOVA de medidas repetidas mostrou somente efeito dos dias de tratamento [$F(2, 48) = 19.73$; $p < 0.01$]. Não houve efeito de grupos [$F(3, 24) = 0.61$; $p > 0.05$] nem interação grupos X dias [$F(6, 48) = 0.60$; $p > 0.05$]. O teste de Duncan mostrou que o dia 1 teve maior locomoção que o dia 2 e o dia 3 ($p < 0.05$).

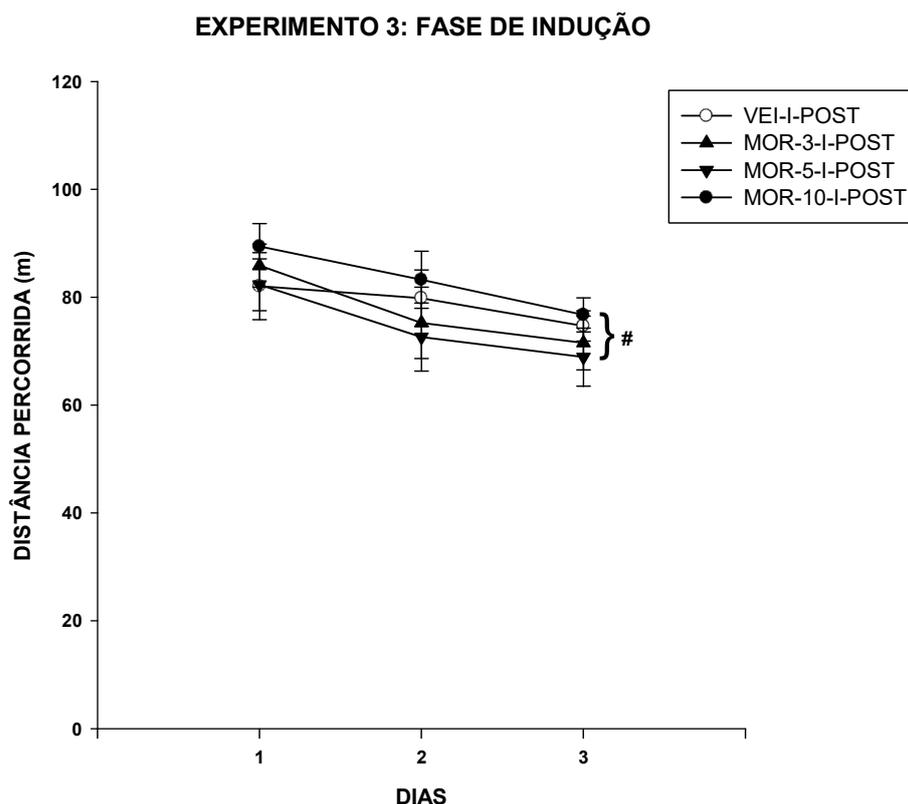


Figura 8 - Médias e Erro padrão da média para distância percorrida (m) durante os 3 dias sucessivos. da fase de indução para o Experimento 3, com 30 minutos de duração, # $p < 0,05$ primeiro dia de indução versus o terceiro dia de indução para cada grupo de morfina (teste t).
Fonte: elaboração do autor.

A Figura 9 mostra a atividade locomotora para a fase de extinção do Experimento 3, com 30 minutos de duração. A ANOVA de medidas repetidas mostrou que não houve efeito de grupos [$F(3, 24) = 1.50$; $p > 0.05$], efeito de dias de tratamento [$F(4, 96) = 0.25$; $p > 0.05$] nem interação entre grupos X dias [$F(12, 96) = 0.42$; $p > 0.05$].

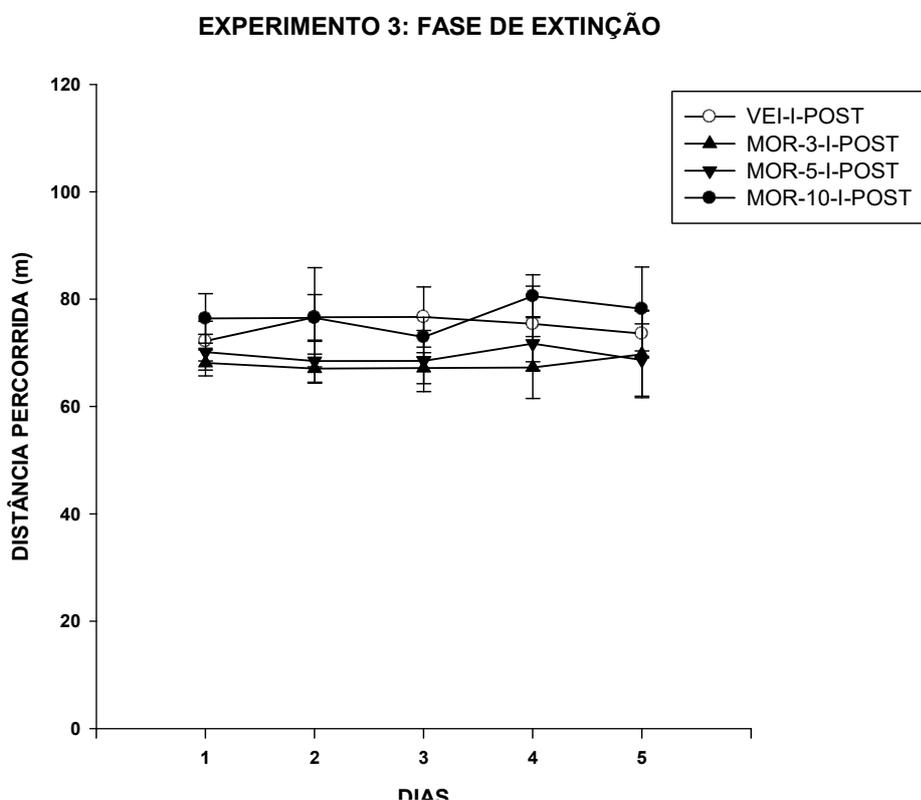


Figura 9 - Média e erro padrão da média para distância percorrida (m) durante os 5 dias sucessivos da fase de extinção do Experimento 3, com 30 minutos de duração. Fonte: elaboração do autor.

A Figura 10 mostra a atividade locomotora para o teste final do experimento de 30 minutos de duração. Para se realizar uma análise dentro da sessão experimental, os 30 minutos de teste foram divididos em 6 intervalos de 5 minutos cada. A ANOVA por medidas repetidas mostrou somente uma interação de grupos X intervalos [$F(11, 264) = 20.40$; $p < 0.01$], sem efeito de grupos [$F(3, 24) = 1.30$; $p > 0.05$] e sem interação dos grupos X intervalos [$F(33, 264) = 1.05$; $p > 0.05$]. O teste de Duncan mostrou que houve uma diminuição da locomoção com o passar dos intervalos. Em outras palavras, os primeiros intervalos obtiveram uma maior locomoção que os últimos ($p > 0.05$).

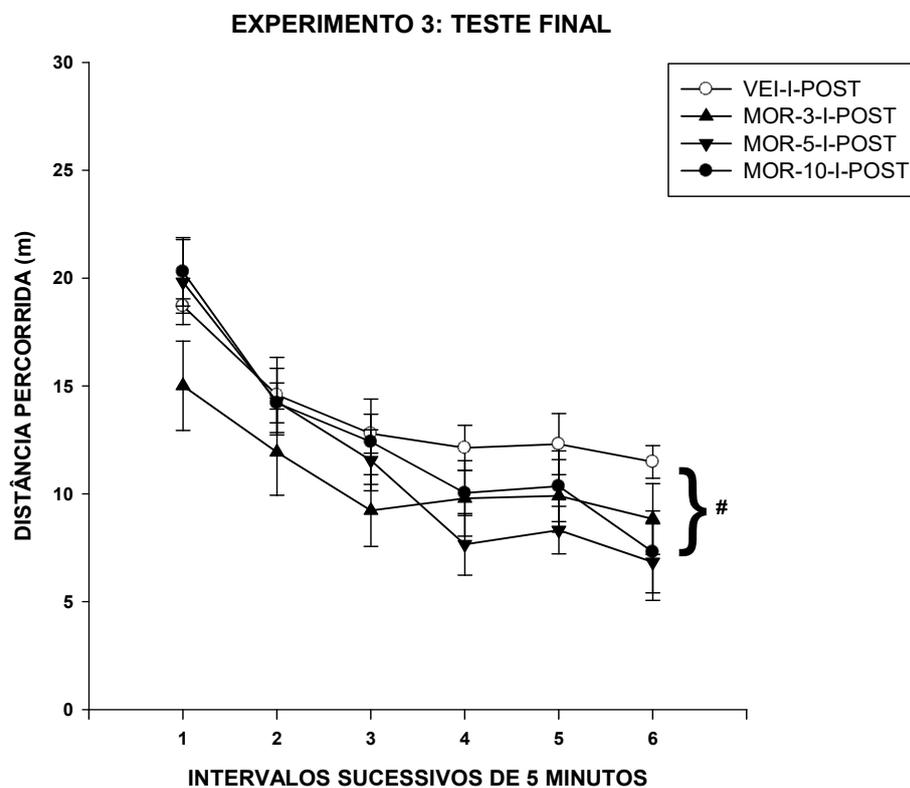


Figura 10 - Médias e erro padrão da média para distância percorrida (m) durante os 30 minutos do teste final do Experimento 3 com 30 minutos, # $p < 0,01$ primeiro intervalo X último intervalo (ANOVA de um fator em cada intervalo seguido pelo teste de Duncan). Fonte: elaboração do autor.

6 DISCUSSÃO

Utilizamos, nesta pesquisa, três doses diferentes de morfina (10, 5 e 3 mg/kg) em um modelo de condicionamento de traço, e os resultados mostraram que a administração imediatamente após uma breve exposição (5 minutos) a um ambiente novo influenciou significativamente o comportamento locomotor dos ratos, comparando-se os três dias dos testes de indução. Todos os grupos que receberam morfina logo após uma exposição breve a um novo ambiente apresentaram aumento na locomoção ao longo dos dias de administração, e a dose mais elevada (10 mg/kg) produziu, no terceiro dia de teste, um aumento locomotor superior quando comparado ao grupo de dose mais baixa (3 mg/kg). Quando os mesmos tratamentos foram administrados 15 minutos após a primeira exposição de 5 minutos ao ambiente novo, não foi observado aumento da locomoção. Esses resultados corroboram os que foram obtidos por pesquisas do nosso laboratório utilizando apomorfina em um modelo de protocolo de condicionamento de traço (SANTOS, et al., 2015, 2017).

Em ratos, a apomorfina, em doses baixas (<0,1 mg/kg; SC) preferencialmente, estimula os autorreceptores D2 e pode reduzir drasticamente a atividade neural e o metabolismo da dopamina no cérebro (AGHAJANIAN; BUNNEY, 1973; CAREY et al., 2004, 2008; DI CHIARA et al., 1977; MISSALE et al., 1998). Quando uma dose baixa de apomorfina é administrada antes do teste, ou seja, antes de o animal ser colocado na arena experimental, a inibição dos neurônios dopaminérgicos induz uma inatividade comportamental pronunciada (BLOISE et al., 2007; BRAGA et al., 2009a, 2009b; CAREY et al., 2004). Em doses mais elevadas (> 0,5 mg/kg), a apomorfina estimula os receptores de dopamina pós-sinápticos e, quando administrada antes da arena, gera estimulação comportamental (BLOISE et al., 2007; BRAGA et al., 2009a, 2009c; DAMIANOPOULOS; CAREY, 1992; DE MATOS et al., 2010; MATTINGLY et al., 1997, 1988). Não somente os efeitos comportamentais produzidos pela apomorfina, após o teste na arena, coincidem, portanto, com os efeitos induzidos pela apomorfina administrada antes desse teste, mas também os efeitos dessa substância tornam-se exagerados com os tratamentos repetidos com apomorfina após o teste na arena.

Nos estudos que utilizaram apomorfina em um protocolo de condicionamento de traço do nosso laboratório (SANTOS et al., 2015, 2017), os tratamentos com dose alta (2,0 mg/kg) e baixa (0,05 mg/kg) de apomorfina, administrados em contiguidade temporal com o novo período de consolidação do ambiente após o teste na arena, induziram, de forma confiável, atividade comportamental locomotora condicionada. Nota-se, no entanto, que, quando os mesmos tratamentos foram administrados imediatamente após uma breve exposição similar, porém em um ambiente familiar previamente explorado e consolidado, os tratamentos após o teste na arena não induziram condicionamento (DE MELLO BASTOS et al., 2014; LEITE et al., 2018), o que aponta para uma necessidade de um estímulo novo para a associação do ambiente em um tratamento dado após a saída da arena.

Apesar de não atuar diretamente nos receptores dopaminérgicos, como a apomorfina, a morfina possui fortes efeitos que promovem a liberação de dopamina (BESPALOV; ZVARTAU, 1996; CHEN et al., 2015; DI CHIARA; IMPERATO, 1988; LIU et al., 2014; MORI et al., 2016; STEIDL et al., 2017). Os receptores opioides μ , ativados pela morfina, modulam o reforço positivo após estimulação direta dopaminérgica no sistema mesolímbico, provocando um aumento na liberação de dopamina no núcleo *accumbens* (KOOB, 1992; NESTLER, 2004; VOLKOW et al., 2011). A dopamina é fundamental para a expressão da sensibilização de opioides, e o entendimento de como outras famílias de receptores atuam, interferem, mediam ou modulam a atuação da dopamina nas regiões responsáveis pelo prazer pode trazer luz aos processos que atuam na neurogênese e na manutenção da adicção. Injeções de morfina aumentam o influxo de dopamina da área tegmentar ventral, seja inibindo interneurônios Gaba, que contém receptores μ , na área tegmentar ventral, ou ativando diretamente neurônios do núcleo *accumbens* que contenham receptores μ (KOOB, 1992; NESTLER, 2004; VOLKOW et al., 2011).

É interessante comparar os dados dos experimentos e observar que a morfina induz hiperlocomoção em um protocolo de condicionamento de traço, assim como a apomorfina, devendo-se levar em conta as diferentes vias em que a morfina atua. Apenas um único tratamento após a sessão experimental na arena com morfina foi suficiente para induzir uma resposta condicionada, e, além disso, a resposta condicionada provou ser bastante resistente à extinção. Tendo um padrão

de dose dependente, nenhum dos grupos das diferentes doses do Experimento 1 sofreu processos de extinção da resposta condicionada, tendo apenas o grupo morfina 10 mg/kg apresentando maior locomoção que os grupos morfina 5 mg/kg e morfina 3 mg/kg; e o grupo morfina 5 mg/kg, maior locomoção do que o grupo morfina 3 mg/kg. Também é interessante que a resposta da morfina condicionada não se extinguiu nos grupos de 5 e 10 mg/kg e só se extinguiu após a quinta sessão de extinção na dose mais baixa (3 mg/kg) de grupo morfina.

Quando um protocolo de atraso é usado com o comportamento locomotor, como a variável dependente, a sensibilização e o condicionamento ocorrem com tratamentos repetidos de morfina (LEITE et al., 2018). Em um protocolo convencional de condicionamento clássico (condicionamento de atraso), os tratamentos são administrados antes do teste e “associados” ao ambiente deste; e um grupo controle “não-associado” recebe o mesmo tratamento, mas após um determinado tempo e em um ambiente diferente para controlar os efeitos da exposição ao fármaco per se.

No presente estudo, todos os tratamentos medicamentosos foram administrados após a sessão experimental na arena. Nos Experimentos 1 e 3, os grupos receberam seus tratamentos logo após essa sessão, e, no Experimento 2, receberam o mesmo tratamento, mas 15 minutos após a sessão experimental, no mesmo lugar. O tratamento imediato pós-arena foi projetado para se sobrepor ao processo de consolidação pós-teste e deu origem ao “grupo de consolidação associado”, enquanto, para os grupos de 15 minutos de atraso, o tratamento pós-teste foi concebido para ocorrer após o processo de consolidação ter sido concluído e origina um “grupo pós-consolidação não associado”. A administração repetida dos tratamentos com morfina após 15 minutos de remoção do ambiente de teste não teve efeito.

Quando utilizado em um estímulo breve de 5 minutos de exposição ao ambiente experimental, o condicionamento foi encontrado após um único tratamento imediato com morfina, e a resposta condicionada aumentou com tratamentos repetidos. A mesma ocorrência, porém, não aconteceu quando a exposição a um tempo de duração da sessão experimental da fase de indução foi maior. Segundo Izquierdo (2011) os tratamentos aplicados após a exposição à arena experimental

são efetivos quando aplicados após a aquisição, no período denominado por ele pós-treinamento. As informações ambientais novas associam-se às memórias como mais um estímulo, e a incorporação de informação farmacológica às memórias ocorre só até os primeiros 5 a 10 minutos após cada experiência; a liberação ou injeção das substâncias, além desse período, não é mais efetiva (IZQUIERDO, 1984, 1989), apontando para a importância do intervalo de consolidação imediato pós-arena.

Não houve aumento da locomoção nos grupos tratados imediatamente, após uma exposição longa de 30 minutos ao ambiente novo; ao contrário dos obtidos no tratamento imediato após uma exposição breve de 5 minutos, tendo o primeiro dia do Experimento 3 maior locomoção que os dias 2 e 3, apontando para um processo de habituação durante a sessão, ao qual o contexto da arena, antes estimulador pelo fator da novidade, se perdeu, ressaltando a importância do fator novidade no aumento dos disparos de dopamina, e sua importância em processos de consolidação da memória. Este resultado é semelhante aos nossos achados anteriores, usando injeções de apomorfina após o ensaio, depois de uma breve exposição a um novo ambiente (DE MELLO-BASTOS et al., 2014; SANTOS, 2015, 2017).

A ativação dopaminérgica oriunda de processos motivados pelo fator da novidade confirma sua importância nos processos de consolidação e reconsolidação de memórias. Sendo esses resultados consistentes com a formação de uma associação entre a supressão da dopamina e as pistas do ambiente experimental, resultam na perda da capacidade excitatória das pistas ambientais, como ocorre em uma habituação. O hipocampo ativa neurônios b-endorfinérgicos que despertam locais vinculados com a modulação dos processos de memória. A exposição a estímulos ou ambientes previamente visitados não é seguida de ativação do sistema b-endorfinérgico, nem do hipocampo (IZQUIERDO, 1984, 1989, 2011).

Um desenvolvimento importante na compreensão dos efeitos condicionados de drogas tem sido o reconhecimento de que, quando uma resposta condicionada provocada por estímulo é ativada, a memória ou associação tornam-se novamente instáveis, de modo que os eventos que ocorrem durante a reconsolidação podem modificar a associação. Embora a ênfase dos trabalhos sobre o tópico tenha sido em

maneiras de interferir ou atenuar a associação durante a reconsolidação (LEITE et al., 2018; LEE et al. 2006; BERMAN; DUDAI, 2001, 2004; DUBIEC et al., 2002; EISENBERG et al., 2003; EISENHARDT; MENZEL, 2007; NADER, 2003; NADER et al., 2000), a associação também pode ser fortalecida por tratamentos que são administrados durante a reconsolidação (CAREY et al., 2014).

De acordo com esta última consideração, o aumento progressivo na resposta condicionada que observamos, com tratamentos repetidos de morfina pós-teste, pode ser visto como um fortalecimento progressivo do condicionamento pelos efeitos do tratamento que ocorrem durante a reconsolidação. Essa análise é consistente com a forte resistência e persistência de efeitos condicionados de drogas induzidas por drogas aditivas, pois indica que, com o uso repetido de um medicamento viciante, ocorre um ciclo de consolidação/reconsolidação para que as pistas condicionadas se tornem cada vez mais fortalecidas e adquiram mais controle sobre o comportamento, à medida que eles continuam sendo reconsolidados com o uso continuado de drogas.

Em nossos estudos de reconsolidação da memória, foi utilizada a apomorfina em dose elevada (2,0 mg/kg), e esta produziu ativação do sistema dopaminérgico e o desenvolvimento do processo de condicionamento e sensibilização comportamental (BRAGA et al., 2009a, 2009b). Por outro lado, a apomorfina em doses baixas (<0,1 mg/kg) atua preferencialmente em autorreceptores D2, produzindo uma diminuição da atividade dopaminérgica e não criando o desenvolvimento de uma resposta condicionada e sensibilizada. Tratamentos pós-arena, com apomorfina em altas doses (2,0 mg/kg) em ratos com catalepsia condicionada pelo antagonista dopaminérgico, antipiscótico típico, haloperidol (1,0 mg/kg), eliminou a resposta inicial à catalepsia; e, em dose baixa (0,05 mg/kg), aumentou as respostas de catalepsia tanto sensibilizadas quanto as condicionadas (OLIVEIRA et al., 2016). Essa demonstração, de que os tratamentos medicamentosos dopaminérgicos pós-arena podem modificar o comportamento dos medicamentos condicionados, tem amplas implicações para os efeitos condicionados dos medicamentos.

Admite-se, de fato, que as memórias se armazenam no córtex e dependem, para sua integração, no momento da evocação, de numerosas conexões aferentes e

eferentes dessas regiões. Claramente, o hipocampo e a amígdala não são sítios de armazenamento. Um tipo de informação adicional provém da ação da b-endorfina liberada por experiências novas (IZQUIERDO, 1984). Esta se incorpora às memórias como mais um estímulo, de modo que a incorporação de informação farmacológica às memórias ocorre só até os primeiros 5 a 10 minutos após cada experiência; a liberação ou injeção das substâncias para além desse período não é mais efetiva (IZQUIERDO, 1984, 1989). Recentemente foi mostrado por Menezes et al. (2015) que, em 5 minutos, a exposição a um novo ambiente evoca a liberação de dopamina, e os efeitos desta sobre os sistemas cerebrais importantes no aprendizado e na memória, como o hipocampo, persistem brevemente após a remoção do novo ambiente. Como a morfina possui fortes efeitos pró-dopamina (BESPALOV E ZVARTAU, 1996; CHEN et al., 2015; DI CHIARA; IMPERATO, 1988; LIU et al., 2014; MORI et al., 2016; STEIDL et al., 2017).

Quando, após 72 horas da sessão de extinção, um teste final de 30 minutos foi utilizado, os grupos que recebiam morfina após uma breve exposição demonstraram uma resposta condicionada, que foi ainda evocada nos 2 grupos de morfina de dosagem mais elevada, mas foi limitada aos 5-10 minutos iniciais dos 30 minutos da sessão de teste. Essas observações são consistentes com os efeitos da resposta condicionada, na medida em que esta é considerada uma réplica fracionária da resposta incondicionada (PAVLOV, 1927).

O teste final funcionou como um teste de condicionamento, no qual os animais foram administrados com salina e colocados imediatamente na arena experimental por 30 minutos. Os efeitos de hiperlocomoção, induzidos com morfina imediatamente após um teste (Experimento 1), foram bem evidentes inicialmente. Ao longo dos 30 minutos de teste, entretanto, houve uma diminuição progressiva da locomoção, ao ponto que o nível de atividade locomotora de todos os grupos tornou-se semelhante entre eles. 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 5 minutos, demonstrando um possível efeito de habituação nos grupos veículos. Nos outros dois experimentos, ocorreu, durante a fase de extinção, uma habituação ao ambiente, não sendo manifestados comportamentos associativos

nem farmacológicos da morfina.

No uso do protocolo empregado neste estudo, todo o comportamento é medido no estado não medicamentoso, representando uma simples maneira de investigar o possível condicionamento de traço referente às drogas psicoativas. A constatação de que doses de morfina, aplicadas imediatamente após a sessão experimental, geraram um aumento tão acentuado da resposta comportamental, acima do nível induzido pelo novo ambiente, aponta para os mecanismos do condicionamento de traço como potencialmente importantes para o desenvolvimento da intensidade característica do comportamento condicionado a drogas tipicamente observado no processo da dependência química.

O uso de vários tratamentos com antagonistas da morfina, em um protocolo pós-arena, para tentar reverter o condicionamento da morfina, também evitaria questões de interpretação relacionadas a mudanças induzidas por drogas na avaliação comportamental, bem como a introdução de fatores de estímulo de drogas que podem ocorrer quando um medicamento é administrado antes do teste. Também é interessante utilizar este protocolo em um modelo de preferência de lugar (KOBRIIN et al., 2017), mas, em vez de associar pré-tratamentos de morfina a um dos dois ambientes de preferência de lugar, deve-se administrar essa substância pós-teste após uma breve exposição a um dos dois ambientes distintos de preferência por lugar. Aparentemente, o ambiente associado com um tratamento pós-arena com morfina seria o ambiente preferido em um teste de preferência por lugar. Tal descoberta apontaria para uma maneira de estudar a inclusão de uma recompensa de drogas positiva no processo de consolidação da memória. Nesse sentido, Wise (2004) articulou uma grande dificuldade no tratamento da dependência química, a saber, que os efeitos da droga se emaranham na memória. A esse respeito, foi recentemente relatado (DE MARCO; VENNERI, 2018) que o comprometimento de uma estrutura cerebral subcortical de dopamina, a área tegmentar ventral, que é importante na mediação de efeitos de recompensa, tem sido implicado em variados deficit de memória humana. É pertinente que esta seja a estrutura cerebral da dopamina ativada pela morfina (CHEN et al., 2015).

Assim, esse protocolo parece fornecer uma maneira simples e eficiente de investigar o condicionamento da morfina que evita as complexidades, como o papel

dos estímulos interoceptivos (CAREY, 1989; CAREY et al., 2005) que estão presentes nos protocolos convencionais de condicionamento de drogas.

7 CONCLUSÃO

- A administração de morfina, nas doses de 3mg/kg, 5mg/kg e 10mg/kg, imediatamente após uma exposição de 5 minutos a um novo ambiente experimental, alterou a atividade locomotora, produzindo um aumento progressivo em todas as doses ao longo das três sessões, o que caracteriza o desenvolvimento de uma resposta locomotora sensibilizada;
- Essa exposição influenciou significativamente o comportamento nas subsequentes exposições ao mesmo ambiente teste sem o uso de fármaco, porém a extinção não obteve efeito;
- No teste final de condicionamento, com duração de 30 minutos, os efeitos de hiperlocomoção foram bem acentuados inicialmente, mas, ao longo dos 30 minutos de teste, o nível de atividade locomotora de todos os diferentes grupos tornou-se semelhante entre eles, o que, por sua vez, é consistente com os efeitos esperados em um condicionamento;
- A administração de morfina, nas doses de 3mg/kg, 5mg/kg e 10mg/kg, 15 minutos após a exposição de 5 minutos a um novo ambiente experimental, não surtiu efeito;
- A administração de morfina, nas doses de 3mg/kg, 5mg/kg e 10mg/kg, imediatamente após uma exposição de 30 minutos a um novo ambiente experimental, não surtiu efeito;
- O aumento no nível de atividade locomotora no decorrer das três sessões experimentais de 5 minutos, e não da de 30 minutos, indica que a ativação sensorial e motora, produzida pelo novo ambiente, persistiu ao longo das três sessões de tratamento com drogas pós-teste, na exposição rápida. Já na exposição longa, o estímulo de novidade perdeu-se. Aparentemente, foi essa novidade contínua do ambiente de teste que possibilitou que os efeitos do condicionamento de traço se acumulassem no decorrer das três sessões experimentais.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os presentes resultados sugerem que os efeitos da morfina sobre a atividade da dopamina podem aumentar a atividade desta durante os processos de consolidação/reconsolidação da memória; e aumentar a saliência e o valor de incentivo das pistas associadas e sua capacidade de desencadear os efeitos condicionados da morfina. Além disso, como o número e a variedade de sinais que se tornam progressivamente consolidados/reconsolidados em conjunto com a administração repetida de morfina, o desfazer do estado de dependência torna-se progressivamente mais problemático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHAJANIAN, G.K.; BUNNEY, B.S. **Central dopaminergic neurons: neurophysiological identification and responses to drugs.** In: *Frontiers in Catecholamine Research*, Pergamon Press. Oxford. 1973. p. 643-648.

AGUILAR, L. R.; PILLON, S. C. Percepción de tentaciones de uso de drogas en personas que reciben tratamiento. **Revista Latino-Americana de Enfermagem.** v. 13, p. 790-797, 2005.

ARAUJO, R. B. et al. Craving and chemical dependence: concept, evaluation and treatment. **J. Bras. Psiquiatr.**,v. 57, n. 1, p. 57-63, 2008.

ARIAS-CARRIÓN, O. et al. Dopaminergic reward system: a short integrative review. **International Archives of Medicine**, v. 3, p. 24, 2010.

AYHAN, I. H.; RANDRUP, A. Behavioural and pharmacological studies on morphine-induced excitation of rats. Possible relation to brain catecholamines. **Psychopharmacologia**, v. 29, n. 4, p.317-328, 1973.

BABBINI, M.; DAVIS, W. M. Time-dose relationships for locomotor activity effects of morphine after acute or repeated treatment. **Br. J. Pharmac.**, n.46, p.213-224, 1972.

BAKER, J. D.; AZORLOSA J.L. The NMDA antagonist MK-801 blocks the extinction of Pavlovian fear conditioning. **Behav.Neurosci.**, n.110, p. 618–620, 1996.

BAJIC, D. et al. Endogenous Cholinergic Neurotransmission Contributes to Behavioral Sensitization to Morphine. **PlosOne**, v. 10, n. 2, 2015.

BARDO, M. T.; BEVINS, R.A. Conditioned place preference: what does it add to our understanding of pre clinical reward. **Psychopharmacology**, v. 153, p. 31-43, 2000.

BARDO, M.T.; DONOHEW, R.L.; HARRINGTON, N.G. Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. **Behav. Brain Res.**, n.77, p.23-43, 1996.

BARDO, M. T.; ROWLETT, J. K.; HARRIS, M. J. Conditioned place preference using opiate and stimulant drugs: a meta-analysis. **Neuroscience&Biobehavioral Reviews**, v. 19, n. 1, p. 39-51, 1995.

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. **BehavBrain. Res.**, n.260, p.139-147,2014.

BENARROCH, E. E. Endogenous opioid systems: current concepts and clinical correlations. **Neurology**, n. 79, p. 807,2012.

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

BENINGER, R.J.The role of dopamine in locomotor activity and learning. **Brain. Res.**, n. 6, p. 173-196, 1983.

BENINGER R. J.; MILLER, R. Dopamine D1-like receptors and reward-related incentive learning. **Neurosci.Biobehav. Rev.**, n.22, p.335-345, 1998.

BENYHE, S.; ZÁDOR, F.; ÖTVÖS, F. Biochemistry of opioid (morphine) receptors: binding, structureand molecular modelling. **Acta BiologicaSzegeadiensis**,v.59, p.17-37, 2015.

BESPALOV, A.Y.; ZVARTAU, E.E. Intraaccumbens administration of NMDA receptor antagonist (+/-)-CPP prevents locomotor activation conditioned by morphine and amphetamine in rats. **Pharmacol Biochem. Behav.**, n. 55, p. 203-207,1996.

BEVINS, R.A. et al. Novel-object place conditioning: behavioral and dopaminergic processes in expression of novelty reward. **Behav. Brain Res.**, n.129, p.41-50, 2002.

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**, n.86, p.449-457, 2007.

BERMAN, D.E.; DUDAI, Y. Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. **Science**, v. 291, p. 2417-2419, 2001.

BODNAR, R. J. Endogenous opiates and behavior: 2014. **Peptides**, v. 75, p. 18-70, 2016.

BRAGA, P.et al. The expressionof locomotor sensitization to apomorphine is dependent on time interval between injection and testing.**Pharmacol Biochem.Behav.**, n.91, p.278-82, 2009a.

BRAGA, P. 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, p. 128-33, 2009b.

CADONI, C.; DI CHIARA, G. Reciprocal changes in dopamine responsiveness in the nucleus accumbens shell and core and in the dorsal caudate-putamen in rats sensitized to morphine. **Neuroscience**, v. 90, p. 447-455, 1999.

CADOR, M.; BJIJOU, Y.; STINUS, L. Evidence of a complete independence of the neurobiological substrates for the induction and expression of behavioral sensitization to amphetamine. **Neuroscience**, v.65, p.385-395, 1995.

CAREY, R. J. Stimulant drugs as conditioned and unconditioned stimuli in a classical conditioning paradigm. **Drug Development Research**, v. 16, n. 2-4, p. 305-315, 1989.

CAREY, R. J. et al. Dopaminergic and serotonergic autoreceptor stimulation effects are equivalent and additive in the suppression of spontaneous and cocaine induced locomotor activity. **Brain research**, v. 1019, n. 1-2, p. 134-143, 2004.

CAREY, R. J. et al. Stimulus gated cocaine sensitization: interoceptive drug cue control of cocaine locomotor sensitization. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 82, n. 2, p. 353-360, 2005.

CAREY, R. J.; HUSTON, J. P.; MUELLER, Christian P. Pharmacological inhibition of dopamine and serotonin activity blocks spontaneous and cocaine-activated behaviour. **Progress in brain research**, v. 172, p. 347-360, 2008.

CAREY, Robert J.; CARRERA, Marinete Pinheiro; DAMIANOPOULOS, Ernest 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.

CARRERA, Marinete Pinheiro 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. **Behavioural brain research**, v. 236, p. 244-250, 2013.

CARRERA, Marinete Pinheiro et al. Reversal of apomorphine locomotor sensitization by a single post-conditioning trial treatment with a low autoreceptor dose of apomorphine: a memory re-consolidation approach. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, n. 1, p. 29-34, 2011.

CARRERA, M. P. et al. Most-trial apomorphine at an auto receptor 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.

CATANIA. A. C. **Aprendizagem**: comportamento, linguagem e cognição. Porto Alegre: Artmed, 1999. Capítulo 12: Comportamento Respondente: Condicionamento.

CHEN, M. et al. Morphine disinhibits glutamatergic input to VTA dopamine neurons and promotes dopamine neuron excitation. **Elife**, v. 4, p. e09275, 2015.

CONTET, C.; KIEFFER, B. L.; E BEFORT, K. Mu opioid receptor: a gateway to drug addiction. **CurrentOpinion in Neurobiology**, n.14, p.370-378, 2004.

CORBETT, A. D. et al. 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. **British JournalofPharmacology**, n.147, p.153-162, 2009.

COX, J.; WESTBROOK, R. F. The NMDA receptor antagonist MK-801 blocks acquisition and extinction of conditioned hypoalgesic responses in therat. **Q. J. Exp.Psychol. B.**, n. 47, p. 187-210, 1994.

DAMIANOPOULOS, E. N.; CAREY, R. J. Pavlovian conditioning of CNS drug effects: a critical review and new experimental design. **Neuroscience**, v.3, p.65-77, 1992.

DAVIS, M. et al. Effectsof D-cycloserineonextinction: translation from preclinical to clinical work. **Biologicalpsychiatry**, v. 60, n. 4, p. 369-375, 2006.

DE MARCO, M.; VENNARI, A. Volume and Connectivity of the Ventral Tegmental Area are Linked to Neurocognitive Signatures of Alzheimer's Disease in Humans. **J.Alzheimers. Dis.**, v. 63, p. 167-180, 2018.

DEGENHARDT, L. et al. The global epidemiology and burden of opioid dependence: results from the global burden of disease 2010 study. **Addiction.**, v.109, n.8, p. 1320-1333, 2014.

DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS (DATASUS). 2008. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br/cid10/V2008/WebHelp/f10_f19.htm>. Acesso em: 15 jan. 2019.

DHAWAN, B. N. et al. Classification of Opioid Receptors. **American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.48, n.4, 1996.

DI CHIARA, G., IMPERATO, A. Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. **J.Pharmacol. Exp.Ther.**, n. 244, p. 1067-1080, 1988.

DI, G. Chiara et al. Post synaptic receptors are not essential for dopaminergic feedback regulation. **Nature**, v. 267, n. 5608, p. 270-272, 1977.

DIAS, F. R. C.; 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 sulpiride. **Psychopharmacology**, v. 209, n. 2, p. 137-151, 2010.

DÍAZ, F. **O processo de aprendizagem e seus transtornos**. Salvador: EDUFBA, 2011.

DOMJAN, M. Pavlovian conditioning: A functional perspective. **Annu. Rev. Psychol.**, v.56, p.179-206, 2005.

DUARTE, D. F. Opium and Opioids: a brief history. Rev. Bras.**Anestesiologia**,v. 55, n. 1, p.135-146, 2005.

DUDAI, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? **Annu. Rev. Psychol.**, v. 55, p. 51-86, 2004.

DUNCAN, C.P. Habit reversal induced by electroshock in the rat, J. **Comp. Physiol. Psychol.**, v. 41, n. 11-16, 1948.

EIKELBOOM, R.; STEWART, J. Conditioning of Drug-Induced Physiological Responses. **Psychological Review**, v.89, n.5, p.507-528,1982.

EISENBERG, M. et al.Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. **Science**, v. 301, p. 1102-1104, 2003.

EISENHARDT, D.; MENZEL, R. Extinction learning, reconsolidation and the internal reinforcement hypothesis. **Neurobiol. Learn Mem.**, v. 87, p. 167-173, 2007.

EPSTEIN, D. H. et al. Real-Time Electronic Diary Reports of Cue Exposure and Mood in the Hours Before Cocaine and Heroin Craving and use. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 66, n.1, 2009.

EVERITT, B. J.; WOLF, M. E. Psychomotor Stimulant Addiction: A Neural Systems Perspective. **The Journal of Neuroscience**,v.22, n. 9, p.3312-3320, 2002.

FEIFEL, D. et al. Sensorimotor gating effects produced by repeated dopamine agonists in a paradigm favoring environmental conditioning. **Psychopharmacology**, v. 162, p.138-146, 2002.

FIORAVANTI B.; VANDERAH T. W. The ORL-1 Receptor System. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, n. 8, p. 1442-1451, 2008.

FONTANA, D.; POST, R.; PERT, A. Conditioned increases in mesolimbic dopamine overflow by stimuli associated with cocaine. **Brain Research**,v. 629, n. 1, p.31-39, 1993.

FRAIOLI, S. et al. Susceptibility to amphetamine-induced locomotor sensitization is modulated by environmental stimuli. **Neuropsychopharmacology**, v. 20, p. 533-541, 1999.

FRANKLIN, T. R.; DRUHAN, J.P. Involvement of the nucleus accumbens and medial pre frontal cortex in the expression of conditioned hyperactivity to a cocaine-associated environment in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 23, p. 633-644, 2002.

GARCIA-MIJARES, M.; SILVA, M. Dependência de drogas. **Psicologia USP**, v. 17, n. 4, p. 213-240, 2006.

GARDNER, Eliot L. **Addiction and brain reward and anti-reward pathways**. In: *Chronic Pain and Addiction*. Karger Publishers, 2011. p. 22-60.

GIUSTA, A. S. Concepções de aprendizagem e práticas pedagógicas. **Educação em Revista**, Belo Horizonte, n. 1, p. 24-31, 1985.

GREGORI, S. D. et al. Clinical Pharmacokinetics of Morphine and Its Metabolites During Morphine Dose Titration for Chronic Cancer Pain. **TherDrugMonit**, v.36, n.3, 2014.

HANDAL, M. et al. Behavioural sensitization in mice induced by morphine-glucuronide metabolites. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.90, n.4, p.578-585, 2008.

HASSELSTRÖM, J.; SÄWE, J. Morphine Pharmacokinetics and Metabolism in Humans. **Clinical Pharmacokinetics**,v. 24, n. 4, p.344-354, 1993.

HEIDARI, P. et al. Influence of Morphine and Dopamine Receptor Sensitization on Locomotor Activity in Mice. **Pharmacology**. n.78, p.185–192, 2006.

HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C; NESTLER E. J. Neural Mechanisms of Addiction: The Role of Reward-Related Learning and Memory. **Annu. Rev. Neurosci.**, n.29, p.565-98, 2006.

IZQUIERDO, I. Endogenous state dependency: memory depends on the neurohumoral and hormonal states present after training and at the time of testing. In: LYNCH, G.;McGAUGH, J. L.; WEINBERGER, N. M. **Neuro biology of learning and memory**. New York:Guilford Press, 1984. p. 65-77.

IZQUIERDO, Ivan. The pathogenesis of the amnesia of Alzheimer's disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 8, n. 9, p. 325, 1987.

IZQUIERDO, I. Different forms of posttraining memory processing. **Behav. Neural Biol.**, no prelo, 1989.

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

JALABERT M. et al. Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. **PNAS**, v. 108, n. 39, p. 16446-16450, 2011.

JOHNSON S. W.; NORTH R. A. Opioids Excite Dopamine Neurons by Hyperpolarization of Local Interneurons. **The Journal of Neuroscience**, n. 2, p. 483-488, 1992.

KALIVAS, P.W.; DUFFY, P. Sensitization to repeated morphine injection in the rat: possible involvement of A10 dopamine neurons. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, n. 241, p. 204-212, 1987.

KALIVAS, P. W.; HU, X. T. Exciting inhibition in psychostimulant addiction. **Trends in Neurosciences**, v. 29, n. 11, p. 610-616, 2006.

KALIVAS, P. W.; STEWART, J. Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. **Brain Res. Rev.**, v.16, p.223-44, 1991.

KAMPRATH K; WOTJAK, C. T. Nonassociative learning processes determine expression and extinction of conditioned fear in mice. **Learn Mem.**, n. 11, p. 770-786, 2004.

KOBRIN, K.L. et al. Dopamine D1 receptor agonist treatment attenuates extinction of morphine conditioned place preference while increasing dendritic complexity in the nucleus accumbens core. **Behav. Brain. Res.**, n. 322, p. 18-28, 2017.

KOOB, G. F. Neural mechanisms of drug reinforcement. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 654, n. 1, p. 171-191, 1992.

KOOB, G.F.; LE MOAL, M. **Neurobiology of addiction**. London: Academic Press, 2006.

KUHAR, M.; RITZ, M.; BOJA, J. The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. **Trends in Neurosciences**, v. 14, n. 7, p.299-302, 1991.

LEE, J.L.; MILTON, A.L.; EVERITT, B.J. Cue-induced cocaine seeking and relapse are reduced by disruption of drug memory reconsolidation, **J. Neurosci.**, v. 26, p. 5881-5887, 2006.

LEITE JUNIOR, J.B. et al. Reversal elimination of morphine conditioned behavior by an anti-dopaminergic post-trial drug treatment during re-consolidation. **Behav. Brain. Res.**, 2018.

LEITE-MORRIS, K.A. et al. GABA(B) receptor activation in the ventral tegmental area inhibits the acquisition and expression of opiate-induced motor sensitization, **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, n. 308, p. 667-678, 2004.

LEONE, P.; POCOCCO, D.; WISE, R. Morphine-dopamine interaction: ventral tegmental morphine increases nucleus accumbens dopamine release. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.39, n. 2, p.469-472, 1991.

LEUSSIS, M.P.; BOLIVAR, V.J. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2006.

LIU, X.S. et al. Dopamine D3 receptor-regulated NR2B subunits of N-methyl-D-aspartate receptors in the nucleus accumbens involves in morphine-induced locomotor activity. **CNS Neurosci. Ther.**, v. 20, p. 823-829, 2014.

MACHT, D. History of opium. **The Journal of American Medical Association**, v. 44, n. 6, 1915.

MALDONADO, R. Le système opioïde endogène et l'addiction aux drogues. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, n. 68, p. 3-11, 2010.

MARTINS, R. T. et al. Opioid receptors to date. **Rev. Dor. São Paulo**, v. 13, n. 1, p. 75-9, 2012.

MATOS, L. W.; CAREY, R. J.; CARRERA, M. P. Apomorphine conditioning and sensitization: the paired/treatment order as a new major determinant of drug conditioned and sensitization effects. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, n.96, p.317-324, 2010.

MATTINGLY, B.A.; GOTSICK, J.E.; SALAMANCA, K. Latent sensitization to apomorphine following repeated low doses. **Behav. Neurosci.**, v. 102, n. 4, p. 553-558, 1988.

MATTINGLY, B.A. et al. Stimulus and response factors affecting the development of behavioral sensitization to apomorphine. **Psychopharmacology**, v. 130, n. 2, p. 109-116, 1997.

MCKIM, W. A. **Drugs and behavior**: an introduction to behavioral pharmacology. 7. ed. Boston: Editora Pearson, 2012.

MCNALLY, G.P.; WESTBROOK, R.F. Opioid receptors regulate the extinction of Pavlovian fear conditioning. **Behav. Neurosci.**, n. 117, p. 1292-1301, 2003.

MENEZES, J. et al. Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on D1-subtype dopaminergic receptors in hippocampus. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 13, p. E1652-E1658, 2015.

MISERENDINO, M. J.; NESTLER, E. J. Behavioral sensitization to cocaine: modulation by the cyclic AMP system in the nucleus accumbens. **Brain Research**, v. 674, p. 299-306, 1995.

MISSALE, C. et al. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiol. Rev.**, v. 78, n. 1, p. 189-225. 1998.

MORI, T. et al. Differential activation of dopaminergic systems in rat brain basal ganglia by morphine and methamphetamine. **Neuroscience**, n. 13, p. 164-170, 2016.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Database. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5288826>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

NADER, K.; SCHAFFER, G. E.; LE DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, v. 406, p. 722-726, 2000.

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

NASCIMENTO D. C. H.; SAKATA, R. K. Opioid dependence in chronic pain patients. **Rev. Dor. São Paulo**, v. 12, n. 2, p.160-165, 2011.

NESTLER, E. J. Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.25, n.4, 2004.

OLIVEIRA, L. R. et al. Post-trial dopaminergic modulation of conditioned catalepsy: A single apomorphine induced increase/decrease in dopaminergic activation immediately following a conditioned catalepsy response can reverse/enhance a haloperidol conditioned and sensitized catalepsy response. **Behavioural Brain Research**, n. 311, p.87-98, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. World Drug Report 2018: opioid crisis, prescription drug abuse expands; cocaine and opium hit record highs. **The World Drug Report**, 2018.

PATHAN, H.; WILLIAMS, J. Basic opioid pharmacology: an update. **British Journal of Pain**, v.6, n. 1, p. 11-16, 2012.

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

PAVLOV, I.P. **Lectures on conditioned reflexes**. London: Oxford University Press, 1928.

Dal Pizzol T. S. et al. Non-medical use of psychoactive medicines among elementary and high school students in Southern Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 1, p. 109-115, 2006.

POLASTRON, J.; MEUNIER, J.; JAUZAC, P. Chronic morphine induces tolerance and desensitization of μ -opioid receptor but not down-regulation in rabbit. **European Journal of Pharmacology**, v.266, n.2, p.139-146, 1994.

POLLOCK, J.; KORNETSKY, C. Evidence for the role of dopamine D1 receptors in morphine induced stereotypic behavior. **Neuroscience Letters**, n.102, p.291-296, 1989.

PRATTA, E. M.; SANTOS, M. A. O processo saúde-doença e a dependência química: interfaces e evolução. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 25, n. 2, p. 203-211, 2009.

PRZYBYZLAWSKI, J.; SARA, S.J. Reconsolidation of memory after its reactivation. **Behavioral Brain Research**, v. 84, p. 241-246, 1997.

RIBAS, G. C. Neuroanatomical basis of behavior: history and recent contributions. **Rev. Bras. Psiquiatria**, v.29, n. 1, p.63-71, 2007.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The neural basis of drug craving: an incentive sensitization theory of addiction. **BrainResearch Reviews**, v. 18, p. 247-291, 1993.

ROBINSON, T. E.; BECKER, J.B. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. **Brainresearch reviews**, v. 11, n. 2, p. 157-198, 1986.

ROBINSON, T. E; BERRIDGE, K.C. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. **Addiction**, v. 95, p. 91-117, 2000.

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

SANTINI E.; MULLER R. U.; QUIRK, G. J. Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA independent to NMDA-dependent memory. **J. Neurosci.**, n. 21, p. 9009-9017, 2001.

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: evidence for potent trace conditioning of drug effects. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, n.156, p.24-29, 2017.

SHIPPENBERG, T. S.; HEIDBREder, C.; LEFEVOUR, A. Sensitization to the conditioned rewarding effects of morphine: pharmacology and temporal characteristics. **European Journal of Pharmacology**, v. 299, n. 1-3, p. 33–39, 1996.

SPANAGEL, R.; ALMEIDA, O.F.; SHIPPENBERG, T.S. Long lasting changes in morphine-induced mesolimbic dopamine release after chronic morphine exposure. **Synapse**, v. 14, n. 3, p. 243-245, 1993.

STEIDL, S. et al. Opioid-induced rewards, locomotion, and dopamine activation: a proposed model for control by mesopontine and rostro medial tegmental neurons. **Neurosci.Biobehav. Rev.**, n. 83, p. 72-82, 2017.

STUART-HARRIS, R. et al. The pharmacokinetics of morphine and morphine glucuronide metabolites after subcutaneous bolus injection and subcutaneous infusion of morphine. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 49, n. 3, p.207-214, 2001.

SUZUKI, A. et al. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. **J.Neurosci.**, n. 24, p. 4787-4795, 2004.

SWIFT, R. M.; LEWIS, D. C. **Farmacologia da dependência e abuso de drogas**. In: GOLAN, D. E. et al. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 2. ed. Nova Quanabara, 2009

THOMPSON R. F. An Essential Memory Trace Found. **Behavioral Neuroscience**, v.127, n.5, p.669-675, 2013.

TODTENKOPF, M. S.; CARLEZON, W. A. Contribution of drug doses and conditioning periods to psychomotor stimulant sensitization. **Psychopharmacology**, n.185, p.451-458, 2006.

TRESCOT, A. M. et al. Opioid Pharmacology. **Pain Physician 2008**: Opioid Special Issue, n. 11, p. 133-153, 2008.

TRIGO, J.M. et al. The endogenous opioid system: a common substrate in drug addiction. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 108, p. 183-194, 2010.

VARVEL, S.A. et al. Inhibition of acetylcholinesterase accelerates acquisition and extinction rates in a spatial memory task. **Neuropsychopharmacology**, n. 32, p. 1032-1041, 2007.

VANDERSCHUREN, L. J. et al. Morphine-induced long-term sensitization to the locomotor effects of morphine and amphetamine depends on the temporal pattern of the pre-treatment regimen. **Psychopharmacology**, v.131, n. 2, p. 115-122, 1997.

VANDERSCHUREN, L. J. et al. Dopaminergic mechanisms mediating the long-term expression of locomotor sensitization following pre-exposure to morphine or amphetamine. **Psychopharmacology**, v.143, n.3, p.244-253, 1999.

VANDERSCHUREN, L. J. et al. A single exposure to morphine induces long-lasting behavior a land neurochemical sensitization in rats. **EuropeanJournalofNeuroscience**, v. 14, n. 9, p. 1533-1538, 2001.

VIGANÒ, D. et. al. μ opioid receptor signaling in morphine sensitization. **Neuroscience**, v. 117, n. 4, p.921-929, 2003

VOLKOW, N. D. et al. Addiction: Beyond dopamine reward circuitry. The National Academy of Sciences, v. 108, n. 37, 2011.

WALDHOER,M.; BARTLETT, S. E.; WHISTLER, J. L. Opioid Receptors. **Annual Review of Biochemistry**,v.73, n. 1, p.953-990, 2004.

WEERTS, E; FANTERGROSSI, W.E; GOODWIN, A.K. The Value of Nonhuman Primates in Drug Abuse.Research. **American Psychological Association**, v. 15, p. 309-327, 2007.

WEISS, C. & DISTERHOFT, J. F. Exploring Prefrontal Cortical Memory Mechanisms With Eyeblink Conditioning. **BehavioralNeuroscience**. v.125, n.3, p.318-326, 2011.

WOLF, M. E. et al. Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. **Neuropharmacology**, v. 47 61–79, 2004.

YAMAGUCHI, S. et al. Rapid Prefrontal–Hippocampal Habituation to Novel Events. **The Journal of Neuroscience**, v.23, p.5356–5363, 2004.

ZADINA J.E. et al. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. **Nature** n.386, p. 499-502, 1997

10 – Anexo

O presente trabalho foi publicado no artigo “Morphine administered post-trial can induce potent conditioned morphine effects” pela *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. doi.org/10.1016/j.pbb.2019.02.014