

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

BRENO GARONE DOS SANTOS

**CONDICIONAMENTO DE TRAÇO: A ADEQUAÇÃO AOS PRINCÍPIOS DO
CONDICIONAMENTO PAVLOVIANO EM UM MODELO DE DEPENDÊNCIA DE
DROGAS**

Campos dos Goytacazes
2019

**CONDICIONAMENTO DE TRAÇO: A ADEQUAÇÃO AOS PRINCÍPIOS DO
CONDICIONAMENTO PAVLOVIANO EM UM MODELO DE DEPENDÊNCIA DE
DROGAS**

BRENO GARONE DOS SANTOS

Tese 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 Doutor 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

BRENO GARONE DOS SANTOS

**CONDICIONAMENTO DE TRAÇO: A ADEQUAÇÃO AOS PRINCÍPIOS DO
CONDICIONAMENTO PAVLOVIANO EM UM MODELO DE DEPENDÊNCIA DE
DROGAS**

Tese 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 Doutor em Ciência Animal, na Área de Concentração de Produção, Reprodução e Saúde Animal.

Membros da Comissão Examinadora:

Prof^a. Marcela Bermudez Echeverry
(DSc, Fisiologia Humana) – UFABC

Prof^a. Rosemary Bastos
(DSc, Fisiologia) – UENF

Prof^a. Ana Bárbara Freitas Rodrigues
(DSc, Produção Animal) – UENF

Prof^a. Marinete Pinheiro Carrera
(DSc, Psicobiologia) – UENF
(Orientadora)

Agradecimentos

Aos meus pais, Paulo Garone e Lúcia Garone, pelo amor incondicional, pelo carinho, pela amizade e por sempre acreditarem em mim;

A família e amigos por estarem presentes na minha vida, nos melhores e piores momentos;

À minha esposa, Fernanda Ribeiro, pelo companheirismo, amor, carinho, apoio e por conseguir transformar os momentos mais difíceis em algo mais leve;

Aos meus sogros, Silvio Thomaz e Edna Ribeiro, pelo carinho, pela hospitalidade, pela comida deliciosa e por serem pessoas maravilhosas;

À minha orientadora Dr^a Marinete Pinheiro Carrera, pela fundamental orientação, pela colaboração, pelos conselhos e pela enorme dedicação à pesquisa;

Aos colegas de laboratório pela cooperação e solidariedade;

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

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UENF e a CAPES pelo apoio ao desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

No processo de condicionamento farmacológico associado a um contexto ambiental, o início do tratamento com a droga ocorre de maneira contígua com as pistas contextuais. Evidências, entretanto, sugerem que o condicionamento farmacológico também pode ocorrer quando há uma descontinuidade entre o início do efeito da droga e o término das pistas contextuais. No presente trabalho foi primeiramente averiguado se um protocolo cujo tratamento farmacológico ocorre após o término do estímulo contextual, protocolo de traço, (pós-teste), seria capaz de produzir uma resposta condicionada que obedecesse aos princípios do condicionamento Pavloviano que são: Aquisição, Extinção e Recuperação espontânea (Experimento 1). Posteriormente foi realizado um segundo experimento (Experimento 2) com o intuito de comparar os efeitos de sensibilização e condicionamento induzidos por apomorfina administrada antes do teste, protocolo de atraso, imediatamente após o teste e 15 min. após o teste no novo ambiente experimental. Para o Experimento 1 seis grupos de ratos receberam apomorfina (0,05 ou 2,0 mg/kg) e veículo imediatamente ou com um intervalo de 15 minutos após uma breve exposição (5 minutos) a um ambiente experimental novo durante 3 dias consecutivos (fase de indução ao condicionamento). A fase de extinção ocorreu dos dias 4 ao 8, na qual todos os tratamentos pós-teste constituíram-se de veículo. Após dois dias de retirada, nos quais os animais não receberam qualquer manipulação experimental, ocorreu um último teste denominado teste final. Os resultados mostraram que no primeiro dia do Experimento 1, as locomoções dos 6 grupos de ratos foram estatisticamente equivalentes. No segundo dia ficou evidenciada diferenças marcantes entre os graus de atividade dos diferentes grupos, sobretudo, entre aqueles que receberam apomorfina (0,05 ou 2,0 mg/kg) imediatamente pós-teste (I-pós-teste). O grupo que recebera apomorfina em doses baixas (0,05 mg/kg) imediatamente pós-teste, apresentou uma redução da atividade locomotora enquanto que o grupo tratado com apomorfina em doses elevadas (2,0 mg/kg), apresentou aumento da atividade locomotora se comparado ao primeiro dia de teste. Os níveis de atividade locomotora tanto dos grupos veículo quanto dos grupos tratados com apomorfina com intervalo de 15 minutos pós-teste, foram equivalentes aos níveis apresentados durante o primeiro dia do Experimento 1. No terceiro dia do Experimento 1, as diferenças dos níveis de atividade

locomotora entre os grupos tratados com apomorfina imediatamente pós-teste, continuaram crescendo, ao passo que, os níveis de atividade dos grupos veículo e dos grupos tratados com apomorfina com intervalo de 15 minutos pós-teste, se mantiveram inalterados. Durante a fase de extinção, as respostas locomotoras previamente condicionadas, assim como, as diferenças observadas entre os dois grupos de apomorfina imediatamente pós-teste, foram gradualmente eliminadas. Durante o teste final, as diferenças entre os níveis de atividade locomotora entre os dois grupos de apomorfina imediatamente pós-teste foram parcialmente restauradas, sendo este um indicador de recuperação espontânea. Para o Experimento 2 Foram medidos os efeitos sobre a atividade locomotora ao longo de 5 dias de tratamento com apomorfina. Tais efeitos foram induzidos por doses baixas inibitórias que atuam em auto-receptor (0,05 mg / kg) e doses pós-sinápticas elevadas estimulatórias (2,0 mg / kg). Houve três conjuntos de quatro grupos e cada conjunto foi constituído por dois grupos veículo e dois grupos apomorfina (APO-0,05 / APO-2,0). Os conjuntos diferenciavam-se em relação ao momento no qual os tratamentos foram administrados. Um conjunto recebeu o tratamento imediatamente antes da sessão no novo ambiente experimental (pré-teste), outro imediatamente após a exposição ao novo ambiente experimental (I-pós-teste) e o terceiro conjunto recebera o tratamento 15 min. após a sessão no ambiente experimental (15`-pós-teste). Cada sessão experimental teve a duração de 5 min. Ao longo dos primeiros 5 dias do Experimento 2 (fase de indução), os repetidos tratamentos com apomorfina pré-teste e I-pós-teste induziram sensibilização locomotora. Os tratamentos com apomorfina em baixas doses que, ocorreram tanto no pré-teste quanto no I-pós-teste, reduziram progressivamente a locomoção enquanto os tratamentos com doses elevadas pré e I-pós-teste, aumentaram progressivamente a locomoção. Para que houvesse um maior controle sobre os possíveis efeitos não-associativos da apomorfina, os mesmos tratamentos foram administrados 15 minutos após o teste no ambiente experimental (15`-pós-teste). Os resultados de locomoção obtidos para esse grupo, foram equivalentes aqueles encontrados para os grupos veículo. No teste subsequente de condicionamento, ambos os grupos pré e I-pós-teste de apomorfina em baixa dose mostraram uma inibição comportamental condicionada enquanto os grupos pré e I-pós-teste de apomorfina em dose elevada, mostraram uma estimulação comportamental condicionada. Sugere-se, portanto, que ambos os tratamentos medicamentosos,

pré e pós-teste, induzam efeitos por mecanismos similares nos processos de consolidação uma vez que, a baixa dose inibitória de apomorfina diminuiu o grau de saliência e incentivo referente à associação ao novo ambiente e, assim, diminuiu a resposta comportamental. De maneira inversa, o tratamento com apomorfina em alta dose (excitatória) aumentou o valor de saliência e incentivo da associação ambiental e potencializou a resposta comportamental. Os achados do atual estudo são consistentes com os princípios do condicionamento Pavloviano, podendo-se sugerir que representem um condicionamento de traço induzido por drogas.

Palavras-chave: Condicionamento; ambiente novo; consolidação da memória; saliência; sensibilização comportamental; apomorfina; recuperação espontânea; extinção; pós-teste.

ABSTRACT

In the process of pharmacological conditioning associated with an environmental context, the initiation of drug treatment occurs in a contiguous way with contextual clues. Evidence, however, suggests that pharmacological conditioning may also occur when there is a discontinuity between the onset of the drug effect and the termination of contextual cues. In the present study, it was first investigated whether a protocol whose pharmacological treatment occurs after the end of the contextual stimulus, trace protocol (post-test), would be able to produce a conditioned response that obey the principles of Pavlovian conditioning that are: Acquisition, Extinction and Spontaneous Recovery (Experiment 1). Subsequently, a second experiment (Experiment 2) was conducted to compare the effects of sensitization and conditioning induced by apomorphine administered before the test, delay protocol, immediately after the test and 15 min. after the test in the new experimental environment. For Experiment 1, six groups of rats received apomorphine (0.05 or 2.0 mg / kg) and vehicle immediately or within 15 minutes after brief exposure (5 minutes) to a new experimental environment for 3 consecutive days (phase of induction to conditioning). The extinction phase occurred from days 4 to 8, in which all the post-test treatments consisted of vehicle. After two days of withdrawal, in which the animals received no experimental manipulation, a final test occurred. The results showed that on the first day of Experiment 1, the locomotions of the 6 groups of rats were statistically equivalent. On the second day, there were marked differences between the activity levels of the different groups, especially those who received apomorphine (0.05 or 2.0 mg / kg) immediately post-test (I-post-test). The group that received apomorphine at a low dose (0.05 mg / kg) immediately post-test showed a reduction in locomotor activity, while the apomorphine group at high doses (2.0 mg / kg) had an increased locomotor activity compared to the first day of testing. The levels of locomotor activity of both the vehicle groups and the apomorphine-treated groups at 15-minute intervals post-test were equivalent to the levels presented during the first day of Experiment 1. On the third day of Experiment 1, differences in locomotion activity levels between the immediately post-test apomorphine-treated groups continued to increase, whereas the activity levels of the vehicle groups and the apomorphine-treated groups at 15-minute post-test intervals remained unchanged. During the extinction phase, the previously

conditioned locomotor responses, as well as the differences observed between the two apomorphine groups immediately post-test, were gradually eliminated. During the final test, the differences between the levels of locomotor activity between the two apomorphine groups immediately post-test were partially restored, which is an indicator of spontaneous recovery. For Experiment 2 The effects on locomotor activity over 5 days of apomorphine treatment were measured. Such effects were induced by low inhibitory doses acting on auto-receptor (0.05 mg / kg) and high postsynaptic doses (2.0 mg / kg). There were three sets of four groups and each set consisted of two vehicle groups and two apomorphine groups (APO -0.05 / APO-2.0). The sets differed in relation to the time at which the treatments were administered. One set received the treatment immediately before the session in the new experimental environment (pre-test), another immediately after exposure to the new experimental environment (I-post-test) and the third set received the treatment 15 min. after the session in the experimental environment (15`-post-test). Each experimental session lasted 5 min. During the first 5 days of Experiment 2 (induction phase), repeated pre-test and post-test apomorphine treatments induced locomotor sensitization. Low-dose apomorphine treatments, which occurred both in the pre-test and in the I-post-test, progressively reduced locomotion while the pre and I-post-test high dose treatments progressively increased locomotion. In order to have greater control over the possible non-associative effects of apomorphine, the same treatments were administered 15 minutes after the test in the experimental environment (15'-post-test). The locomotion results obtained for this group were equivalent to those found for vehicle groups. In the subsequent conditioning test, both the pre-and I-post-test apomorphine groups at low dose showed a conditioned behavioral inhibition while the high dose apomorphine pre and I-post-test apomorphine groups showed conditioned behavioral stimulation. It is suggested, therefore, that both pre and post-test drug treatments induce effects by similar mechanisms in the consolidation processes since the low inhibitory dose of apomorphine decreased the degree of salience and incentive related to the association with the new environment and thus decreased the behavioral response. Conversely, treatment with apomorphine at high dose (excitatory) increased the salience and incentive value of the environmental association and potentiated the behavioral response. The findings of the current study are consistent with the

principles of Pavlovian conditioning, and may be suggested to represent drug-induced trace conditioning.

Keywords: Conditioning; new environment; memory consolidation; behavioral sensitization; apomorphine; spontaneous recovery; extinction; post-test.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	06
2.1. CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA E EXTINÇÃO	06
2.1.1. A CLASSIFICAÇÃO DA MEMÓRIA	06
2.1.2. AS FASES DA MEMÓRIA.....	07
2.1.3. O ESTUDO DA MEMÓRIA	09
2.1.4. O PROCESSO DE EXTINÇÃO	10
2.2. HABITUAÇÃO E O FATOR DA NOVIDADE.....	12
2.3. CONDICIONAMENTO PAVLOVIANO.....	15
2.4. SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL	20
2.5. SISTEMA DOPAMINÉRGICO	22
2.6. A POMORFINA.....	27
3. HIPÓTESE	29
4. OBJETIVOS GERAIS.....	30
4.1. EXPERIMENTO 1	30
4.2. EXPERIMENTO 2	30
5. ARTIGOS	31
5.1. PRIMEIRO CAPÍTULO: The acquisition, extinction and spontaneous recovery of Pavlovian drug conditioning induced by post-trial dopaminergic stimulation/inhibition, publicado na revista “Pharmacology, Biochemistry and Behavior”	31
5.2. SEGUNDO CAPÍTULO: Repeated pre-trial and post-trial low and high dose apomorphine treatments induce comparable inhibitory/excitatory sensitization and conditioned drug effects.”	38
6. DISCUSSÃO GERAL.....	69
7. CONCLUSÃO.....	76
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1. INTRODUÇÃO

A dependência química pode ser definida como uma doença inserida no contexto da aprendizagem, sem cura, de caráter crônico e progressivo devido a propensão permanente de haver recaída dentre os indivíduos dependentes. O Manual Estatístico e Diagnóstico (DSM-IV) da Associação de Psiquiatria Americana (APA) e a Classificação Internacional de Doenças (CID-10) reconhecem como dependente químico aquele indivíduo que apresente: dificuldade em controlar o consumo da substância psicoativa, persistência no uso da mesma a despeito de suas consequências nocivas e suprimimento das demais atividades devido a motivação elevada para o consumo da substância em questão. Estima-se que 90% dos usuários apresentem o fenômeno da recaída no primeiro ano de tratamento, tornando-o difícil e demorado (MILTON; EVERITT, 2012). Uma característica comum partilhada pelas substâncias de abuso é a ativação do sistema dopaminérgico no sistema nervoso central. De maior importância para o desenvolvimento da dependência é a capacidade que essas substâncias possuem de transformar um estímulo contextual contíguo em estímulo condicionado e de incentivo responsáveis por motivar e manter comportamentos de dependência.

A administração repetida de psicoestimulantes produz sensibilização comportamental e também condicionamento. Ambos os processos estão envolvidos na potencialização dos efeitos da droga. Tais características inerentes às substâncias psicoestimulantes são geralmente atribuídas à capacidade que as mesmas possuem de ativar o sistema dopaminérgico. Assim, a associação da ativação dopaminérgica às pistas contextuais pode transformar o estímulo associado em um estímulo condicionado (EC) e de incentivo, o que acaba por promover ainda mais o comportamento de busca pela droga (ROBINSON; BERRIDGE, 1993; BENINGER; MILLER, 1998). A associação de um efeito produzido por uma substância de abuso com um ambiente específico consiste na matriz essencial em um protocolo experimental de condicionamento Pavloviano induzido por drogas, no qual as pistas/dicas contextuais adquirem propriedades de estímulo condicionado, de forma que uma futura exposição ao

mesmo ambiente é suficiente para evocar uma resposta condicionada mesmo sem a aplicação da droga.

Os efeitos do condicionamento relacionado ao uso de drogas possuem características amplamente reconhecidas. Tal processo pode ser induzido por uma variedade de substâncias de ação central e fora extensivamente estudado usando drogas com potencial de abuso. A ativação locomotora induzida por drogas psicoestimulantes tem sido demonstrada em numerosos relatos como um protocolo confiável para induzir respostas condicionadas ao uso da substância em questão (BENINGER, 1983; BENINGER e HERZ, 1986; BOROWSKY e KUHN, 1991; MAZURSKI e BENINGER, 1991; FONTANA et al., 1993; HEIDBREder e SHIPPENBERG, 1994; MATTINGLY et al., 1994; CAREY e GUI, 1998; BLOISE et al., 2007; BRAGA et al., 2009a; BRAGA et al., 2009b; DE MATOS et al., 2010; DIAS et al., 2010; FILIP et al., 2010).

Tipicamente, nesses estudos, o medicamento psicoestimulante é administrado e o animal é colocado em um ambiente de teste (protocolo de condicionamento Pavloviano de atraso) ao qual já fora previamente habituado, de modo que o início do efeito do medicamento esteja associado aos estímulos do ambiente de teste. Está bem estabelecido na literatura científica que, drogas como anfetamina, cocaína e apomorfina são potentes agonistas dopaminérgicos. Presume-se, portanto, que essa intensa ativação dopaminérgica seja responsável pela estimulação locomotora além de incentivar a associação com estímulos contextuais, de modo que a exposição subsequente, sem a utilização de qualquer medicamento, ao contexto em questão desencadeie efeitos semelhantes à ação dopaminérgica. De fato, numerosos estudos mostraram que aumentos ou diminuições na atividade dopaminérgica, podem ter efeitos importantes sobre a aprendizagem e a memória aumentando ou diminuindo os valores de recompensa e de incentivo dos estímulos associados (BENINGER, 1991; BANASIKOWSKI e BENINGER, 2012).

O condicionamento pavloviano também pode se desenvolver mesmo com uma descontinuidade ou lacuna temporária entre o término de um estímulo condicionado (EC) e o início de um estímulo incondicionado (EI). No protocolo de condicionamento Pavloviano de traço o intervalo entre as apresentações do EC e EI, necessariamente, é breve, na ordem de poucos segundos (PAVLOV,

1927, 1928). O desenvolvimento desse tipo de condicionamento está diretamente relacionado às atividades em algumas estruturas do sistema nervoso central (SNC), como, o hipocampo e o córtex frontal (WEISS et al., 1999). Embora o protocolo de condicionamento de traço associado à droga tenha sido pouco explorado, fora recentemente demonstrado, em trabalhos do nosso laboratório (DE MELLO BASTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2015), que a administração do agonista dopaminérgico apomorfina (APO) imediatamente após a remoção do animal do ambiente de teste (arena experimental), pode modificar o comportamento em uma subsequente exposição ao mesmo ambiente sem qualquer manipulação farmacológica. Esses achados sugerem, portanto, que a droga pode induzir ao comportamento condicionado através do protocolo de condicionamento de traço.

A apomorfina, que é um agonista de ação direta sobre os receptores dopaminérgicos D1 e D2, é de particular interesse no que se refere ao estudo do papel da dopamina no desenvolvimento de condicionamento e sensibilização induzidos por droga, uma vez que esse fármaco possui efeitos pronunciados porém opostos sobre a neurotransmissão dopaminérgica dependendo da dose utilizada. Com dose baixa em ratos (<0,1 mg / kg), a apomorfina pode induzir à uma inibição profunda da atividade locomotora, provavelmente devido à estimulação preferencial sobre auto-receptores dopaminérgicos, o que, diminui a atividade desse neurotransmissor no cérebro (AGHAJANIAN e BUNNEY, 1973; DI CHIARA et al., 1977; MISSALE et al., 1998). Em doses mais elevadas (> 0,5 mg / kg), a apomorfina estimula, preferencialmente, os receptores dopaminérgicos pós-sinápticos atuando como um potente estimulante comportamental prosuzindo hiper-locomoção em ratos (MATTINGLY et al., 1988a; MATTINGLY et al., 1988b; ROWLETT et al., 1997).

O primeiro experimento realizado ao longo do presente trabalho, teve como objetivo avaliar se esses efeitos, produzidos após o teste, da apomorfina são consistentes com os efeitos descritos por Pavlov nos protocolos de condicionamento induzido por drogas. Como primeiro passo nesse processo, é importante determinar se os efeitos obtidos através da aplicação imediata de apomorfina após o teste no ambiente experimental sofrem o processo de extinção quando os tratamentos farmacológicos são retirados. Após a extinção, será importante avaliar, se depois de um intervalo sem qualquer manipulação

experimental, uma subsequente exposição às pistas contextuais resultará em uma recuperação espontânea parcial da resposta previamente condicionada. Tais determinações são de suma importância uma vez que os processos de extinção e recuperação espontânea consistem em características típicas do condicionamento pavloviano.

No presente estudo, ao longo do Experimento 1, foi utilizada uma exposição breve de 5 min, a um novo ambiente teste (ao qual os ratos não foram previamente habituados) que funcionou como um estímulo condicionado contextual (EC). Subsequentemente foi administrada apomorfina nas doses de 2,0 mg/kg ou 0,05 mg/kg, imediatamente após o teste na arena experimental, para induzir os efeitos de uma resposta condicionada. Os tratamentos com doses elevadas e baixas desse fármaco, foram utilizados com intuito de gerar respostas condicionadas opostas. E principalmente, objetivou-se determinar se as respostas condicionadas estimulatórias e inibitórias sofreram padrões similares de aquisição, extinção e recuperação espontânea.

Recentemente, foi demonstrado pelo grupo do nosso laboratório, que tanto os tratamentos com baixas doses quanto com altas doses de apomorfina, administrados imediatamente após uma breve exposição a um novo ambiente, podem induzir hipo e hiperatividade condicionadas respectivamente (SANTOS et al., 2015; 2017). Na medida em que os tratamentos que induziram efetivamente o condicionamento foram aqueles administrados imediatamente após o teste, isto é, que ocorreram durante o período de consolidação da memória, sugere-se que os efeitos dopaminérgicos, induzidos pela apomorfina, modularam o viés de saliência / incentivo da experiência consolidada. É de suma importância ressaltar que, no protocolo convencional de indução do condicionamento farmacológico (protocolo de condicionamento de atraso), os efeitos das drogas são experimentados durante a exposição no ambiente de teste, entretanto, este não é o caso para o condicionamento que ocorre induzido por tratamentos farmacológicos no protocolo de traço. Neste caso específico, as respostas induzidas pelo medicamento não são experimentadas durante a exposição ao ambiente de teste. O Experimento 2 do atual trabalho fora idealizado para averiguar se estes são dois tipos distintos de condicionamento ou se ambos representam efeitos sobre a atividade dopaminérgica durante o processo de consolidação.

Um tratamento dopaminérgico administrado antes da subsequente exposição a um ambiente de teste, pode evocar alterações nas respostas comportamentais emitidas no ambiente, mas também deve-se atentar para o fato de que o estado alterado, provocado pelo fármaco, persiste após o teste e, portanto, pode afetar a consolidação da experiência (DUNCAN, 1948). Em consonância com esta consideração, é possível que ambos os tratamentos medicamentosos, que ocorrem antes ou após o teste no ambiente experimental, induzam efeitos por mecanismos similares nos processos de consolidação e, assim, produzam níveis semelhantes de condicionamento. Para abordar experimentalmente essa possibilidade, o Experimento 2, usou um protocolo único de condicionamento pavloviano associado / não associado com grupos que receberam seus tratamentos farmacológicos antes da exposição na arena experimental (pré-teste), e grupos que receberam seus tratamentos farmacológicos após a experiência na arena (pós-teste).

O presente trabalho busca uma maior compreensão a respeito do processo de condicionamento induzido por um protocolo no qual, o estímulo incondicionado (fármaco) é administrado após o término da apresentação do estímulo condicionado (arena experimental). O maior entendimento sobre os mecanismos envolvidos com esse tipo de aprendizagem associativa, é fundamental para a compreensão da gênese e manutenção da própria dependência química.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Consolidação da memória e extinção

2.1.1. A classificação da memória

O termo memória pode ser definido como o processo de aquisição, formação, conservação e evocação de informações (IZQUIERDO, 2011). O processo de aquisição também é conhecido como aprendizado. Novos aprendizados podem ser armazenados de forma permanente e posteriormente serem utilizados nos momentos em que o organismo requeira. A memória é uma característica biológica comum entre todas as espécies de seres vivos, no entanto, o conteúdo da mesma depende inteiramente das experiências vivenciadas por cada ser (ORDOÑEZ, 2012). A memória é um mecanismo que faz parte de um processo evolutivo que, por sua vez, permite aos animais adquirir, reter e evocar diversos tipos de informações, conferindo assim vantagens adaptativas na medida em que, os indivíduos tornam-se capazes de comparar experiências prévias com situações presentes e, portanto, avaliar qual seria o melhor comportamento para ser expressado. O fenômeno da aprendizagem é responsável por transformar experiências em memórias e, portanto, é o processo pelo qual os humanos e outros animais adquirem conhecimento (KANDEL et al., 2000).

A memória pode ser classificada de acordo com o seu tempo de duração ou de acordo com seu conteúdo (IZQUIERDO, 2011). Segundo o critério temporal, as memórias de trabalho são aquelas cujas informações ficam disponíveis por períodos muito curtos, na ordem de segundos ou minutos. Já as memórias de curta duração consistem naquelas cujas informações persistem por um período um pouco mais longo, na ordem de minutos ou horas. Aquelas informações disponíveis por grandes períodos de tempo, como dias, anos ou décadas, são definidas como memórias de longa duração (KANDEL et al., 2000). Segundo o critério de conteúdo, memórias declarativas ou explícitas são aquelas associadas a eventos ou conhecimento que, por sua vez, podem ser conscientemente evocadas. Memórias episódicas registram fatos e as que registram conhecimento são as memórias semânticas. No caso de animais não

humanos, cujas informações não podem ser verbalizadas, existem diferentes metodologias para avaliar a existência da memória, como por exemplo, modelos de memória episódicas em ratos (BABB e CRYSTAL, 2006; CRYSTAL, 2009).

É importante ressaltar que as memórias implícitas ou não declarativas, são manifestadas por meio de comportamentos motores, para esse tipo de memória não se faz necessário que haja um processo consciente de evocação. As memórias não declarativas referem-se aos hábitos, processos de aprendizagem associativa como o condicionamento pavloviano, e também a processos que envolvem aprendizagem não associativa como a própria habituação (ORDOÑEZ, 2012).

2.1.2. As fases da memória

A formação de uma memória pode passar por 3 fases iniciais divididas em aquisição, consolidação (armazenamento) e evocação (IZQUIERDO, 2011). O período de tempo entre a percepção de um dado estímulo e o momento no qual esse estímulo é codificado em alguma forma de memória peculiar, é denominado aquisição. (KENTROS et al, 2004). Após o processo de aquisição, a informação é armazenada no sistema de memória de curto prazo, entretanto, para que perdure deve ser armazenada no sistema de memória estável ou de longa duração, sendo assim consolidada. Portanto, pode-se dizer que a consolidação é o processo pelo qual uma informação adquirida é estabilizada para poder ser armazenada como memória de longa duração (DUDAI, 2004). É importante ressaltar que enquanto as memórias estão sendo consolidadas, encontram-se em um estado lábil, sendo assim um processo vulnerável a interferências tanto farmacológicas quanto comportamentais (LATTAL et al., 2006; GLASER et al., 2010). A consolidação, portanto, pode também ser modulada por fatores endógenos ou neuro-humorais, como o nível de estresse (MC GAUGH, 2006; ROOZENDAAL et al., 2009). O tempo transcorrido entre a aquisição de uma memória e seu armazenamento ou estabilização é conhecido como “janela de consolidação”. É exatamente nesse momento em que se pode fazer o maior número de análises sobre os mecanismos envolvidos na formação de memórias (WALLESTEIN et al., 2002; FULTON et al., 2005; KLANN e SWEATT, 2008).

Como produto de um novo aprendizado, uma memória previamente consolidada pode ser extinta. É de extrema importância entender que o processo de extinção não é o mesmo que esquecimento natural, em contrapartida, refere-se a uma inibição temporária da memória original devido a aquisição e expressão de um aprendizado mais recente (THOMPSON, 1976; BOUTON, 1993). Dois processos paralelos podem ocorrer durante a evocação de uma memória previamente consolidada. Quando a evocação é prolongada em ausência das contingências aprendidas, como citado anteriormente, a memória pode ser extinta (HARRIS et al., 2000). Portanto, a extinção nada mais é do que um processo de aquisição de uma nova memória que, por sua vez, pode inibir a evocação da primeira (MORGAN et al., 2003). A memória obtida durante a extinção normalmente coexiste com a memória original e a forma mais clássica de observar esse fato é através do fenômeno denominado “recuperação espontânea”. Tal fenômeno ocorre quando, alguns dias após a extinção a memória do primeiro aprendizado se expressa novamente devido, principalmente, a uma reexposição às contingências aprendidas (QUIRK, 2000).

Por fim existe ainda o processo de reconsolidação da memória, associado às exposições de curta duração aos estímulos aprendidos. A reconsolidação constitui na desestabilização da memória após sua reativação, o que é responsável por tornar uma memória previamente consolidada novamente lábil e, portanto, mais uma vez vulnerável a interferências (NADER e EINARSSON, 2010). Os mecanismos envolvidos na reconsolidação seriam bastante semelhantes aqueles envolvidos no processo de consolidação (ALBERINE, 2005).

Uma questão metodológica de suma importância para o processo de reconsolidação é saber quando a reativação, geralmente induzida através da apresentação de um estímulo condicionado (EC), como, por exemplo, um determinado contexto ambiental, permitiria que a memória de fato entrasse em um processo de reconsolidação e não em um processo de extinção (INDA et al., 2011). Essa distinção é relevante para determinar quando um tratamento farmacológico pode estar afetando o traço original da memória ou um novo traço paralelo produzido pela extinção. Experimentos farmacológicos mais importantes que visaram esclarecer as diferenças entre esses dois processos, foram conduzidos utilizando-se o método de infusão local ou sistêmica de

inibidores da síntese proteica (SUZUKI et al., 2004). Contrariamente ao processo de extinção, os tratamentos aplicados durante o processo de reconsolidação promovem um efeito amnésico persistente, portanto, a memória prévia não é capaz de sofrer o fenômeno da recuperação espontânea, podendo-se concluir, neste caso, que a modificação de fato ocorrera sobre o traço de memória original (DUVARSI e NADER, 2004).

É de suma importância esclarecer que as diferentes fases da memória não são lineares, portanto, uma fase não é pré-requisito para outra. Uma memória de curta duração não necessariamente será futuramente armazenada como uma memória de longa duração, da mesma forma que, uma memória de longa duração não precisa ter sido previamente expressa como uma de curta duração (IZQUIERDO et al., 2002).

2.1.3. O estudo da memória

Historicamente uma das ferramentas mais utilizadas para o estudo dos processos envolvidos com a memória é a farmacologia. A administração de agentes farmacológicos após o teste experimental, permitiu o estudo sobre a influência de alguns compostos no processo de consolidação de uma tarefa (IZQUIERDO et al., 1983b). Tal metodologia possibilitou o conhecimento de uma ampla gama de substâncias neurotransmissoras, receptores, cascatas metabólicas e sistemas moduladores que atuam na consolidação. De uma maneira geral se pode dizer que, as memórias são adquiridas sob a influência de diferentes estados endógenos, que por sua vez são expressos por níveis de concentrações hormonais, ou de substâncias neurotransmissoras como a dopamina, a noradrenalina e a serotonina (IZQUIERDO et al., 1983a). A função primordial desses moduladores é facilitar o processo de formação de memória. Portanto, um desequilíbrio nesse estado endógeno poderia acarretar em mudanças sobre a forma na qual a memória é consolidada ou em certos casos até mesmo inibir a sua formação (IZQUIERDO et al., 1983b). É interessante notar que durante eventos emocionalmente importantes, em geral ocorre o aumento da liberação de catecolaminas, como a dopamina e adrenalina por exemplo (SCHELLING, 2002). Tal fato não só atua como um facilitador para o processo de consolidação desses eventos, como também pode facilitar a

evocação de outras experiências adquiridas sob ação do mesmo estado endógeno (ROOZENDAAL, 2002).

2.1.4. O processo de extinção

A aprendizagem é uma característica fundamental para a sobrevivência de um indivíduo. Contudo, uma vez adquiridas, as associações emocionais nem sempre são expressas. De fato, a regulação da expressão emocional sob as mais variadas condições ambientais é primordial para a saúde mental de qualquer ser vivo. Pode-se afirmar que a forma mais simples de regulação emocional é decorrente do processo de extinção, no qual a resposta condicionada a um determinado estímulo declina quando o reforçador (estímulo de caráter recompensador) está ausente (KALIVAS e MANJI, 2008).

Em 1927 o processo de extinção do condicionamento clássico já havia sido estudado por Pavlov (PAVLOV, 1927). Em seus experimentos pôde-se observar que, uma resposta já extinta referente a um estímulo condicionado (EC) com a passagem do tempo, sofria o processo de recuperação espontânea. Tal constatação indicava que o mecanismo da extinção não era capaz de apagar a memória previamente condicionada, entretanto, atuava como uma forma de inibição da mesma (KONORKI, 1967; PAVLOV, 1927). Em subsequentes estudos foi observado que, as respostas extintas podem retornar por meio de diferentes métodos, como promoção de mudanças referentes ao contexto ou através da reapresentação do estímulo incondicionado (EI) (BOUTON, 1993; RESCORLA e HETH, 1975). Tais descobertas confirmaram que a extinção consiste de fato em uma nova aprendizagem.

Assim como acontece para o condicionamento é muito provável que uma rede de estruturas cerebrais seja responsável pela formação de uma memória de extinção. Portanto, a plasticidade relacionada a extinção em diferentes estruturas não desempenharia funções idênticas. Na amígdala, por exemplo, a plasticidade provavelmente está relacionada à inibição da expressão do medo, enquanto que no hipocampo ou no córtex pré-frontal permite que ocorra uma modulação contextual de tal inibição (BRUCHEY et al., 2007). O envolvimento de uma determinada estrutura cerebral ou processo molecular pode ser

determinado pela fase na qual a aprendizagem de extinção se encontra. Assim como ocorre em outros tipos de aprendizagem, a extinção passa por três fases: aquisição, consolidação e recuperação (evocação). A aquisição da extinção refere-se a aprendizagem inicial que transcorre no momento em que, a resposta condicionada declina durante as seções de um protocolo de extinção. Em sequência vem a fase de consolidação, que pode perdurar por horas, na qual processos moleculares e fisiológicos são responsáveis pela estabilização de uma memória de longa duração da extinção. Posteriormente, a apresentação do EC extinto desencadeia a recuperação ou evocação da extinção, processo este evidenciado pelos baixos níveis de resposta condicionada (KALIVAS e MANJI, 2008).

A teoria de que a aprendizagem de extinção passa por uma fase de consolidação, foi sustentada por dois fatos. Primeiramente fora observado que, agentes farmacológicos administrados antes do treinamento de extinção não interferem na aquisição da extinção, entretanto, tornam o animal incapaz de lembrar de tal aprendizagem em sessões subsequentes. Posteriormente observou-se que, tratamentos farmacológicos administrados imediatamente após o treinamento de extinção, durante a fase de consolidação em si, fazem com que o animal seja incapaz de lembrar da extinção em sessões subsequentes. Portanto, processos de consolidação estão relacionados com a ativação de cascatas moleculares desencadeadas por eventos induzidos durante a aquisição ou, de maneira mais intrigante, podem estar envolvidos com a atividade neuronal iniciada durante o período “pós-treinamento” responsável por fortalecer a memória de extinção (ROUTTENBERG e REKART, 2005; MCGAUGH, 2000).

A recuperação ou evocação da extinção envolve a expressão de uma memória inibitória altamente específica para um determinado contexto. Portanto, espera-se que a recuperação de uma memória de extinção ative redes inibitórias presentes principalmente no hipocampo. Entender o processo da recuperação/evocação da extinção é clinicamente importante, uma vez que, o fenômeno da recaída, presente entre os dependentes químicos, é causado justamente pela falha em recuperar uma memória de extinção induzida por

tratamentos baseados em protocolos de extinção (ROTHBAUM e DAVIS, 2003; RAUCH et al., 2006).

Os processos de aquisição, consolidação e recuperação/evocação da memória de extinção requerem a interação de várias estruturas-chave, incluindo a amígdala basolateral, o córtex pré-frontal e o hipocampo. É de grande importância que sejam identificados os mecanismos envolvidos na regulação da consolidação e na recuperação da extinção. Agentes farmacológicos que facilitam a consolidação e recuperação/evocação da memória de extinção, podem servir como adjuvantes à terapia cognitivo-comportamental relacionada à dependência química, oferecendo uma nova estratégia de tratamento com intuito de melhorar o resultado terapêutico (KALIVAS e MANJI, 2008).

2.2. Habituação e o fator da novidade

A habituação pode ser considerada como a forma mais elementar de aprendizagem não associativa, além de ser a mais difundida dentre todas as formas de aprendizagem. A capacidade que os animais, incluindo seres humanos, possuem de ignorar aqueles estímulos que devido à sua repetição perderam o significado ou simplesmente deixaram de ser novidade, ocorre graças ao processo de habituação. Em seu sentido mais amplo, a habituação é a simples aprendizagem de não responder a estímulos que tendem a se tornar insignificantes na vida do animal (THORPE et al., 1963).

Uma exteriorização do processo de habituação observada em roedores, é a diminuição do comportamento exploratório em resposta à exposição, continuada e repetitiva, a um ambiente novo (LEUSSIS e BOLIVAR., 2006). Quando um roedor é colocado em um ambiente experimental desconhecido, uma arena, por exemplo, começa a formar uma representação interna de toda informação que o cerca. Uma vez que esse "mapa" hipocampal esteja consolidado a exploração do ambiente tende a diminuir, podendo assim dizer que o roedor se tornou habituado ao ambiente (O'KEEFE e NADEL, 1978 apud LEUSSIS e BOLÍVAR, 2006). O comportamento exploratório pode ser mensurado pela mudança na atividade motora, distância percorrida por exemplo (PLATEL e PORSOLT, 1982). Protocolos que envolvem a habituação

comportamental são frequentemente utilizados em experimentos que visam verificar os processos envolvidos na aprendizagem e memória (PLATEL e PORSOLT., 1982).

Existem duas formas clássicas de se observar o processo de habituação denominadas, habituação Inter-sessão (between session) e intra-sessão (within session). Na inter-sessão, a memória adquirida durante sessões anteriores em um determinado ambiente de teste, é verificada quando o roedor, ao longo das sessões experimentais, apresenta um declínio na sua locomoção. Por outro lado, pelo processo de habituação intra-sessão, o declínio de locomoção é analisado especificamente durante o período pelo qual o animal ficou exposto a um determinado ambiente experimental em uma única sessão (LEUSSIS e BOLÍVAR, 2006). O processo de habituação intra-sessão, provavelmente possui um componente de aprendizagem, uma vez que, o roedor explora um dado ambiente e aprende sobre o mesmo, no entanto, neste método não há qualquer tipo de intervalo de retenção que poderia modificar ou interferir na memória do animal. Por esse motivo o processo de habituação por inter-sessão, no qual o roedor deve não somente aprender sobre o ambiente, mas também, reter essa informação, é constantemente considerado melhor indicador dos mecanismos envolvidos com a aprendizagem e memória (LEUSSIS e BOLÍVAR, 2006).

Eventos novos e inesperados são capazes de gerar uma resposta de orientação que desempenha um papel importante em diversas formas de aprendizagem e memória. Tal resposta de orientação involuntariamente "captura" a atenção e rapidamente, através do processo de habituação, ocorre a familiarização referente aos mesmos eventos. Os estudos de Yamaguchi (2004), sustentam a visão de que as regiões pré-frontais e hipocampais, estão envolvidas nos processos de detecção rápida, automática e conseqüentemente na habituação a eventos ambientais inesperados, sendo assim, elementos chave para as respostas de orientação em humanos e animais.

Estímulos novos possuem propriedades recompensadoras (BARDO et al., 1996; PIERCE et al., 1990). Foi constatado que ratos apresentam uma tendência a permanecer por mais tempo em ambientes novos (HUGHES, 1965) e interagem preferencialmente com objetos que representam novidade (BERLYNE, 1950; BEVINS et al., 2002).

Afim de esclarecer se a novidade possui um componente de recompensa, Bevins & Bardo (1999) utilizaram um protocolo de condicionamento por lugar, que consiste em uma derivação do condicionamento Pavloviano, uma vez que trabalha com a relação entre estímulo e resposta, neste caso, o acesso a objetos novos serviu como estímulo. Inicialmente, no experimento conduzido por Bevins & Bardo (1999), os ratos foram colocados no centro de uma câmara com livre acesso a dois compartimentos distintos afim de que os animais escolhessem qual dos compartimentos mais lhes agradava. O próximo passo consistiu no confinamento dos animais, repetidamente, no compartimento com menor aceitação na presença de um objeto novo (representando o estímulo da novidade). Da mesma forma os ratos também foram confinados no compartimento de maior aceitação, porém, sem a presença do fator da novidade. Na última fase durante o teste de pós-condicionamento, realizado na ausência do objeto, os animais apresentaram aumento significativo na preferência pelo compartimento ao qual o estímulo de novidade havia sido previamente associado. Neste caso o caráter de recompensa produzido pela novidade se tornou associado ao ambiente ao qual o mesmo foi pareado por repetidas vezes, levando ao aumento da preferência por tais pistas associadas (BEVINS, 2001).

Fora demonstrado que o acesso à novidade, utilizando-se o mesmo protocolo de condicionamento por lugar, pôde potencializar o efeito produzido pela aplicação intravenosa de cocaína (agonista dopaminérgico indireto) (BEVINS, 2001). Esses achados sugerem uma soma ou simplesmente uma convergência entre os efeitos de recompensa produzidos pela droga e pela novidade, portanto, pode-se dizer que tais processos possuem relação com o sistema dopaminérgico (BEVINS et al., 2002; BESHEER et al., 1999).

Já fora observado que, a exposição a um novo ambiente é capaz de ativar as vias dopaminérgicas mesolímbica e mesocortical no sistema nervoso central que, por sua vez, estão diretamente envolvidas com os mecanismos de recompensa e motivação (LEGAULT e WISE, 2001). Em outros estudos constatou-se que os efeitos excitatórios agudos provocados pela cocaína, são expressos em ambientes experimentais que representem novidade, entretanto, o mesmo não acontece em ambientes experimentais com os quais os sujeitos estejam previamente habituados (CAREY et al., 2005).

Em um estudo recente foi possível obter uma resposta condicionada e sensibilizada de hiperlocomoção e hipolocomoção, referentes às doses elevadas (2,0mg/kg) e baixas (0,05) de apomorfina, através de um protocolo no qual, os tratamentos farmacológicos ocorreram imediatamente após a exposição do animal ao ambiente experimental onde permaneciam por breves períodos de 5 minutos (SANTOS et al., 2015). Essa exposição breve a um ambiente totalmente novo foi capaz de promover uma intensa ativação dopaminérgica responsável pela atribuição dos valores de incentivo e motivação (traduzida em atividade locomotora) possibilitando dessa forma que, os traços sensoriais e motores fossem associados aos efeitos dos tratamentos com apomorfina administrados após o fim da exposição à arena experimental.

2.3. Condicionamento Pavloviano

O condicionamento consiste num modelo de aprendizagem associativa podendo ser definido como, um processo de modificação comportamental dos indivíduos resultante de suas interações com o ambiente (BEAVER, 2001). No início do século XX o fisiologista russo Ivan Petrovick Pavlov descreveu o processo de condicionamento induzido por drogas. Desde então foi postulado que a associação entre os efeitos produzidos por uma determinada droga e o ambiente, no qual tais efeitos são experimentados, consiste num modelo de condicionamento farmacológico (PAVLOV, 1927).

Em um de seus experimentos mais consagrados, Pavlov, emitia um som dois a três minutos após ter administrado, por via subcutânea, o fármaco apomorfina em cães e os efeitos observados eram sialorreia, inquietação e ocasionalmente êmese. O som representa um estímulo neutro ou inespecífico (EN), uma vez que o mesmo não evoca qualquer tipo de resposta específica. A apomorfina por sua vez foi classificada como um estímulo incondicionado (EI), isto é, aquele que produzirá uma mesma resposta em todos os organismos de uma determinada espécie independente de qualquer tipo de condicionamento. As respostas ao estímulo incondicionado (APO), como salivação, inquietação e êmese, foram denominadas respostas incondicionadas (RI) (PAVLOV, 1927).

Após subseqüentes associações entre o som emitido (EN) e a administração de APO (EI), pôde ser constatado por Pavlov que apenas com a

exposição sonora já se obtinham os efeitos produzidos pelo fármaco. Devido a este fato, o som passou a ser denominado estímulo condicionado (EC), uma vez que este por si só foi capaz de produzir as mesmas respostas observadas com a administração do estímulo incondicionado. A resposta resultante do estímulo aprendido foi chamada de resposta condicionada (RC). Pode-se por fim concluir, que quando um fármaco é administrado de maneira repetitiva em um ambiente específico, o estímulo ambiental, através de seu histórico de associação com a exposição ao fármaco, promoverá a expressão seletiva de ambos os efeitos comportamentais e bioquímicos do mesmo (PAVLOV, 1927; MOREM e MEDEIROS, 2007).

Os protocolos de condicionamento induzido por drogas, são extremamente importantes na identificação dos substratos neurais envolvidos em processos complexos como o da aprendizagem e da memória. Tal fato é confirmado pela resposta (RC), expressa diante de um estímulo ambiental (EC), similar à resposta incondicionada, que por sua vez, é desencadeada pela administração de um fármaco (EI). Conclui-se então, que a simples apresentação do estímulo condicionado é capaz de desencadear o processo de evocação de uma resposta armazenada na memória (DAMIANOPOULOS e CAREY, 1992). Substâncias de abuso como a cocaína, anfetamina e apomorfina, agonistas dopaminérgicos indiretos e direto, são amplamente utilizadas na indução de diversos modelos comportamentais em animais. Os resultados obtidos são frequentemente avaliados de acordo com o aumento ou não da locomoção do modelo experimental em questão (FEIFEL et al., 2002).

Em experimentos que seguem o protocolo clássico de condicionamento pavloviano, a apomorfina tem sido o fármaco de escolha na indução de respostas comportamentais condicionadas e sensibilizadas (BARDO e BEVINS, 2000; WEERTS et al., 2007; BRAGA et al., 2009). Os resultados de uma administração repetitiva de agonistas dopaminérgicos, associada a um contexto ambiental, consistem em um modelo de condicionamento clássico de ativação locomotora. Tal ativação locomotora pode ser posteriormente induzida apenas pela administração de uma substância biologicamente inerte (solução salina) no mesmo contexto ambiental (MATTINGLY e GOTSICK, 1989).

Em um estudo de Braga e colaboradores (2009), três doses diferentes de apomorfina, agonista dopaminérgico D1 e D2, foram utilizadas respeitando o

protocolo de condicionamento Pavloviano: 0,05 mg/kg (auto receptor), 0,5 e 2,0mg/kg (pós-sináptica). Na fase de aquisição ou indução ao condicionamento, os ratos receberam, ao longo de 5 dias consecutivos, os tratamentos com apomorfina associados ou não associados a um ambiente externo específico. A fase seguinte consistia num teste de condicionamento no qual os animais recebiam apenas soro fisiológico. Por fim um último teste no qual os ratos recebiam apomorfina (teste de sensibilização). A locomoção foi mensurada por 30 minutos. Durante a fase de aquisição, os tratamentos que receberam apomorfina em doses baixas (0,05mg/kg) associadas ao ambiente externo, tiveram um decréscimo na locomoção enquanto que aqueles tratamentos que receberam doses elevadas, associadas ao meio externo, apresentaram hiperlocomoção. O tratamento com a dose de apomorfina 0,05mg/kg associada ao meio externo, não foi capaz de induzir ao condicionamento mas sim a uma sensibilização locomotora inibitória, ao passo que os tratamentos com doses mais elevadas (0,5 e 2,0mg/kg), provocaram uma resposta locomotora tanto condicionada quanto sensibilizada (BRAGA et al., 2009; DIAS et al., 2010)

O aumento da concentração de dopamina na via mesolímbica, via essa consagrada por sua importante função no circuito de prazer e recompensa cerebral, é um medidor no que se refere a expressão de comportamentos locomotores induzidos por agonistas dopaminérgicos. (KELLY et al., 1975; CARR e WHITE, 1987; SWERDLOW et al., 1990). Estudos mais recentes demonstram que, o núcleo acumbbens, uma das estruturas cerebrais com estreita relação com a via dopaminérgica mesolímbica, possui papel importante dentro do circuito neural responsável pela regulação da expressão das respostas condicionadas a estímulos relacionados a drogas psicoestimulantes (FRANKLIN e DURHAN, 2002; DELAMATER, 2012).

Existem duas formas distintas dos EC e EI serem pareados no condicionamento clássico ou pavloviano. A forma frequentemente utilizada experimentalmente, é aquela na qual, ocorre uma sobreposição entre os EI e EC, este protocolo recebe o nome de condicionamento de atraso. Em contrapartida foi demonstrado por Pavlov, que o processo de condicionamento também ocorre quando a exposição ao EC precede e termina antes do início do EI, este protocolo recebeu o nome de condicionamento de traço. Necessariamente, o intervalo entre o EC e o EI precisa ser breve para que o

condicionamento de traço seja induzido em um protocolo pavloviano (PAVLOV,1927; PAVLOV,1928).

Em experimentos envolvendo o condicionamento induzido por drogas psicoestimulantes o protocolo de atraso no qual, a droga ou EI é administrada antes da apresentação dos animais ao ambiente experimental, que serve como um EC contextual, difere um pouco do protocolo tradicionalmente utilizado por Pavlov, uma vez que no último, o EC é restrito a apenas um sistema sensorial (auditivo, visual ou tátil) e, portanto, pontualmente pareado com o EI (HOLLAMD, 1992). No protocolo de atraso os efeitos psicoestimulantes da droga ocorrem concomitantemente com o EC, isto é, durante a apresentação do animal ao ambiente de teste, transformando o contexto ambiental em um potente complexo de estímulos associados ao EI (CAREY et al.,2014).

Quando já existe um condicionamento induzido por doses elevadas de apomorfina (2,0mg/kg), administradas antes do ambiente teste (protocolo de condicionamento de atraso) e subseqüentes tratamentos são administrados imediatamente após uma exposição de 5 minutos ao ambiente experimental (protocolo de condicionamento de traço), pôde-se observar um aumento significativo da resposta previamente condicionada de hiperlocomoção (CARRERA et al., 2012). Em contrapartida se no lugar do protocolo de condicionamento de traço for utilizado um protocolo de condicionamento de atraso, a resposta de hiperlocomoção previamente condicionada não é aumentada (MARCOS et al.,2014).

Em outros estudos do nosso laboratório observou-se que a hipoatividade produzida pela dose baixa de apomorfina (0,05 mg/kg), pode ser condicionada desde que se utilize um protocolo no qual os tratamentos sejam administrados imediatamente após a sessão experimental em um determinado ambiente, no qual os animais já tenham sido previamente condicionados com uma dose elevada de apomorfina (2,0 mg/kg). O tratamento com apomorfina em doses baixas foi ineficaz em animais não condicionados previamente (CARRERA et al., 2012). Neste caso a eficácia do bloqueio da resposta condicionada utilizando-se uma dose baixa de apomorfina administrada imediatamente após o teste na arena foi atribuída ao processo de reconsolidação do traço mnemônico da resposta condicionada. Enquanto uma modificação do traço mnemônico pela reconsolidação da memória não pode ser descartada, outra possibilidade é que

tais resultados também representem um condicionamento de traço, uma vez que a administração de um tratamento após o término do EC, consiste em um protocolo de condicionamento Pavloviano de traço.

Em protocolos típicos do condicionamento de traço, o EC é um estímulo sensorial pontual e o intervalo entre o término do EC e o início do EI é breve, tendo a duração de poucos segundos. Uma breve exposição às pistas contextuais, é capaz de evocar um estímulo ou resposta (devido a ativação dopaminérgica induzida pela novidade) que persista por tempo suficiente para que se torne associado ao tratamento farmacológico administrado após a sessão experimental (CARRERA et al., 2012). Em consonância com essa observação, os resultados de um estudo recente demonstraram que, de fato, uma exposição breve a um ambiente novo foi capaz de promover uma intensa excitação sensorial e motora, possibilitando assim, sua associação com os efeitos dos tratamentos de apomorfina administrados imediatamente após o fim da exposição à arena experimental (SANTOS et al., 2015). Neste caso especificamente, não houve qualquer aprendizagem prévia, ou seja, a primeira exposição dos animais ao complexo de estímulos ocorrera justamente durante a fase de indução com tratamentos administrados imediatamente após o ambiente de teste. Por esse motivo, há fortes indícios de que tais resultados não sejam decorrentes de um efeito sobre a reconsolidação da memória, mas sim, provavelmente reflitam um efeito obtido durante a consolidação do processo de associação entre os estímulos contextuais e farmacológicos.

Pode-se afirmar que o protocolo no qual os tratamentos são administrados imediatamente após o contexto ambiental, traz consigo mecanismos adicionais para a compreensão do processo de condicionamento. Tal afirmação deve-se à constatação de que, tanto uma resposta condicionada quanto sensibilizada à droga pode ser aumentada, através de um protocolo de condicionamento de traço, mesmo após níveis assintóticos de condicionamento terem sido atingidos utilizando-se o condicionamento de atraso (CAREY et al., 2014).

O processo de condicionamento de atraso é mediado pelos mecanismos cerebelares, que estão ligadas às áreas de aprendizagem reflexiva, ao passo que, o condicionamento de traço envolve estruturas hipocámpais e do córtex frontal, sabidamente associadas aos comportamentos voluntários. Uma vez feita tal constatação, sugere-se que, o surgimento de associações potentes com a

substância de abuso, responsáveis por aumentar e impulsionar o comportamento de busca e promover dessa forma a dependência, tem início no condicionamento de atraso e subsequentemente são amplificadas e conduzidas a funções cerebrais superiores pelo condicionamento de traço (CAREY et al.,2014).

Estímulos condicionados situacionais podem agir como gatilhos, que iniciam no paciente dependente um desejo intenso pela droga (*drug craving*), mesmo durante períodos de abstinência. Esses efeitos associativos são considerados os maiores obstáculos para o tratamento da dependência produzida pelas drogas psicoestimulantes. De fato, pacientes dependentes químicos apresentam alta reatividade àqueles estímulos associados aos efeitos da droga (KAPLAN et al. 2011).

O contexto ambiental é de extrema importância para o processo de condicionamento, este último, portanto, pode ser definido como um tipo de aprendizagem na qual uma mudança comportamental expressa pelo indivíduo é resultado direto de sua interação com o ambiente que o cerca. Por fim, o condicionamento é estabelecido quando os efeitos das substâncias psicoativas são associados ao contexto ambiental, tornando as lembranças adquiridas no ambiente em questão associadas ao uso da droga e aos seus efeitos (BEAVER, 2001). Devido ao condicionamento Pavloviano, o contexto ambiental promove por si só um comportamento de busca pela substância psicoativa, decorrente do seu histórico de associação com o ambiente, mesmo após longos períodos de abstinência, sendo, por sua vez, um importante contribuinte para a gênese e manutenção da dependência química (BADIANI e ROBINSON, 2004; CAPRIOLI et al., 2007).

2.4. Sensibilização comportamental

A administração repetida de substâncias psicoestimulantes frequentemente resulta em um fenômeno denominado tolerância reversa ou sensibilização comportamental. Tal fenômeno pode ser caracterizado pelo aumento progressivo da atividade locomotora induzido pela droga, além do surgimento de uma hipersensibilidade comportamental duradora mesmo quando cessada a administração da substância em questão (ROBINSON e BECKER,

1986; CADOR et al., 1995). Em um protocolo de indução farmacológica, a sensibilização comportamental é representada pelo aumento da resposta com a repetição exata da mesma dose da droga. Apesar de consistir em uma forma de aprendizagem não associativa, reconhecidamente, o contexto ambiental possui grande influência nesse processo (O'BRIEN et al., 1996).

Segundo Berridge e colaboradores (1995), o processo de sensibilização consiste em um fator determinante para o uso abusivo de drogas. O desejo de buscar determinada droga é um estado de incentivo resultante da liberação de dopamina pelos neurônios dopaminérgicos que, por sua vez, se encontram sensibilizados devido à repetida exposição aos fármacos psicoestimulantes, principalmente, em áreas mesolímbicas e mesocorticais. Pode-se concluir, portanto, que aqueles indivíduos cujos sistemas dopaminérgicos se encontram sensibilizados são mais vulneráveis ao abuso e à dependência de drogas.

Nesse contexto a sensibilização é caracterizada por uma resposta comportamental oposta à que ocorre no processo da tolerância, processo este no qual, a mesma dosagem de um determinado fármaco produz efeitos de resposta cada vez mais brandos e, portanto, para que haja o aumento de determinada resposta será necessário elevar a dose da droga. O processo de sensibilização é facilmente induzido por agonistas dopaminérgicos, principalmente pelas drogas ditas psicoestimulantes como a cocaína e as anfetaminas. Tal resposta é expressa pelo aumento da atividade locomotora em ratos devido a administrações diárias e em doses fixas de tais drogas. A sensibilização está diretamente relacionada com aspectos da vulnerabilidade à recaída, reforçando a autoadministração de drogas em ratos. É importante ressaltar que a apomorfina pode promover, além da hiperlocomoção, o aumento da estereotipia que no caso dos ratos seriam os comportamentos de cheirar, lamber, roer, defecar e urinar (HYMAN et al., 2006; VALJENT et al., 2006).

Substâncias como anfetamina, álcool, cocaína, opioides, nicotina e apomorfina são capazes de induzir à sensibilização comportamental, que assim como a dependência química, pode persistir por meses ou anos mesmo após a interrupção do tratamento (KARLER et al., 1990; PAULSON et al., 1991; CASTNER e GOLDMAN-RAKIC, 1999; HOPE et al., 2006).

A sensibilização comportamental induzida pela cocaína está intimamente relacionada com o aumento dos níveis extracelulares de dopamina no núcleo

accubens. Este consiste num dos principais mecanismos correlacionados com os efeitos comportamentais e fisiológicos, que podem ser observados, após a administração da substância em questão (KALIVAS e DUFFY, 1991). O aumento da concentração extracelular de dopamina, promove a ativação das vias dopaminérgicas mesolímbicas e mesocorticais (CANNON; BSEIKRI, 2004), essas vias, que possuem papel fundamental no sistema de recompensa e prazer cerebral, originam-se na área tegumentar ventral do mesencéfalo (ATV) e projetam-se para o estriado ventral e demais regiões do sistema límbico, como o septo e a amígdala, assim como para diversas áreas do córtex pré-frontal (GRAEFF e GUIMARÃES, 1998; LENT, 2001).

O fármaco psicoestimulante apomorfina, que é um agonista dopaminérgico direto, mimetiza as ações da dopamina induzindo à sensibilização locomotora que pode ser mantida ainda por dezessete dias após o término do tratamento com a droga. Embora seja aceito que este fármaco promova um aumento da sensibilidade do receptor ou aumento do número de receptores, acredita-se que após tratamentos crônicos os receptores dopaminérgicos presentes no corpo estriado diminuem em número ou, pelo menos, não mudam de forma, o que evidencia o importante papel dos fatores condicionantes sobre a expressão da sensibilização (MATTINGLY e GOTTISICK, 1989). O processo da sensibilização está intimamente relacionado ao contexto ambiental, devido ao fato de que, durante um tratamento a resposta obtida pelo aumento da locomoção é muito maior quando o fármaco é administrado por repetidas vezes no mesmo ambiente (HYMAN et al., 2006).

O processo de sensibilização, tendo como característica o aumento da locomoção em animais, foi evidenciado nos trabalhos realizados por Carey e colaboradores (2008), nos quais o tratamento com apomorfina na dose elevada de 2,0mg/kg induziu à hiperlocomoção, ao passo que, o tratamento com apomorfina em dose baixa inibiu à locomoção.

2.5. Sistema dopaminérgico

A dopamina é um neurotransmissor da família das catecolaminas sendo amplamente conhecida por seus papéis na regulação da atividade motora e de

processos cognitivos, principalmente, na modulação das funções motivacionais relacionadas à recompensa, neuroplasticidade e alertar o organismo para estímulos novos (De OLIVEIRA et al., 2011). Outras funções são também atribuídas a esse neurotransmissor tais como: regulação endócrina, processos emotivos, modulação cardíaca, motilidade gastrointestinal, liberação de catecolaminas e função renal (GOODMAN e GILMAN, 2006; KATZUNG, 2005; MISSALE et al., 1998; RANG et al., 2001; VOLKOW et al., 2011). Dentre as principais patologias envolvendo o sistema dopaminérgico estão a doença de Parkinson e a esquizofrenia. Além disso, o sistema dopaminérgico é o principal alvo dos estudos relacionados à dependência química em modelos animais (NESTLER et al., 2001; WOLF, 2002).

Os receptores de dopamina são membros da família de proteínas receptoras acopladas à proteína G. São conhecidos cinco tipos de receptores dopaminérgicos divididos em duas famílias, D1 e D2. Na família D1 encontram-se os receptores D1 e D5 ao passo que na família D2 encontram-se os receptores D2, D3 e D4. Originalmente essa classificação deveu-se ao seu efeito sobre a formação de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Quando os receptores da família D1 são ativados, leva ao aumento de AMPc, enquanto a ativação de receptores da família D2 leva à inibição da produção de AMPc (BERKE e HYMAN, 2000; BERRIDGE e ROBINSON, 1998; HYMAN et al., 2006).

Os receptores dopaminérgicos podem ainda ser classificados como pré ou pós-sinápticos. Os pré-sinápticos ou auto receptores pertencem à família D2 e atuam na regulação da liberação de dopamina para as células pós-sinápticas. A imensa maioria encontra-se nos dendritos e corpos celulares da substância negra e da área tegumental ventral (ATV). Essas estruturas contêm neurônios dopaminérgicos e são as principais responsáveis pela produção e liberação de dopamina para as demais estruturas encefálicas. Os receptores pós-sinápticos, entretanto, podem pertencer às famílias D1 e D2 (BERKE e HYMAN, 2000; HYMAN et al., 2006). Sabe-se que os receptores da família D1 estão relacionados com um efeito estimulante através da ação da enzima adenilato ciclase (AC), o que propicia a elevação do AMPc intracelular (BERKE e HYMAN, 2000; HYMAN et al., 2006). Tais receptores são localizados principalmente no

sistema límbico, nos núcleos putâmem e accumbens, tálamo, hipotálamo e no tubérculo olfatório (MISSALE et al., 1998). Por sua vez, o receptor D2 tem ação inibitória através da inibição da atividade da adenilato ciclase, diminuição do influxo de cálcio e abertura dos canais de potássio. Estes receptores estão localizados principalmente no corpo estriado, nos núcleos caudado, putâmem, na porção *core* do accumbens e no tubérculo olfatório, sendo também presentes nos córtex pré-frontal, giro cingulado, temporal, amígdala e hipotálamo (BERKE e HYMAN, 2000; COOPER et al., 2003; GOODMAN e GILMAN, 2006; KATZUNG, 2005; HYMAN et al., 2006; NESTLER et al., 2001).

A estimulação farmacológica sobre os receptores D2 por agonistas dopaminérgicos diretos, como a apomorfina, ou indiretos, como cocaína e anfetaminas, é responsável pelo aumento da atividade locomotora e do comportamento estereotipado em ratos (KATZUNG, 2005). No que se refere ao papel da dopamina na formação de associações entre estímulos e respostas, a ativação da hiperlocomoção, induzida por doses elevadas de apomorfina, pode ser facilmente condicionada às pistas ambientais associadas (CARRERA et al., 2012). Em contrapartida, os tratamentos com apomorfina em doses baixas induzem a um efeito pronunciado de hipoatividade, entretanto, mesmo após repetidos pareamentos entre esses efeitos inibitórios da apomorfina com as pistas ambientais, obedecendo a um protocolo de condicionamento de atraso, no qual os tratamentos farmacológicos EI antecedem o teste no ambiente experimental EC, não é produzida uma resposta locomotora inibitória condicionada (BRAGA et al., 2009a, 2009b; de MELLO BASTOS et al., 2014). Essa disparidade é consistente com a importância da dopamina nos processos de aprendizagem e memória, de modo que, esse comportamento inibitório manifestado em resposta ao tratamento com doses baixas de apomorfina, é reflexo da inatividade dopaminérgica quando ambos os sistemas sensoriais e motores estão suprimidos. Esta circunstância é aparentemente única à indução de hipoatividade pela apomorfina, uma vez que, quando essa hipoatividade é induzida por antagonistas pós-sinápticos da dopamina, como o haloperidol, o condicionamento é observado mesmo quando a supressão locomotora é severa (BANASIKOWSKI e BENINGER, 2012a, 2012b). Tal diferença pode estar relacionada aos efeitos antagônicos que esses fármacos promovem sobre os

neurônios dopaminérgicos. Doses baixas de apomorfina estimulam seletivamente auto receptores dopaminérgicos desligando os neurônios de dopamina, já o antagonismo produzido pelo haloperidol ocorre tanto nos receptores pós-sinápticos quanto em auto receptores e este último aumenta a atividade dos neurônios dopaminérgicos (CAREY e DEVEAUGH-GEISS, 1984).

Os receptores dopaminérgicos estão amplamente distribuídos principalmente na substância negra, ATV e hipotálamo dando assim origem as quatro principais vias dopaminérgicas do sistema nervoso central: Via mesolímbica, via mesocortical, via nigroestriatal e via tuberoinfundibular. A via mesolímbica é uma das vias dopaminérgicas mais importantes, estando diretamente relacionada às funções mais consagradas da dopamina como o prazer e a recompensa. Essa via tem início na ATV que é uma região rica em dopamina cobrindo parte do mesencéfalo, projetando o potencial de ação dopaminérgico para outra área importante do SNC denominada de núcleo accumbens (NAc) (ADINOFF, 2004). É no NAc que a dopamina exerce, em um primeiro instante, sua ação como mediadora dos sentimentos de prazer e recompensa. Portanto, no instante em que um determinado indivíduo tem contato com um estímulo de caráter recompensador ou prazeroso, como comida, sexo ou drogas, ocorre liberação de dopamina cujos sinais percorrem da ATV ao NAc o que é responsável pela criação de sensações positivas que acabam por reforçar e modular o comportamento. Embora a estimulação dopaminérgica no NAc seja de extrema importância para a manutenção do organismo, a hiperestimulação, causada por substâncias psicoativas como a cocaína, pode levar à dependência química. Tais substâncias elevam excessivamente a atividade dopaminérgica na via mesolímbica provocando um intenso estado de euforia (YADAV et al., 2014).

Assim como ocorre na via mesolímbica na via mesocortical as projeções dopaminérgicas se originam na ATV. Potenciais de ação provenientes da ATV se encaminham para diferentes regiões do córtex pré-frontal que por sua vez são extremamente importantes para os processos cognitivos, memória e tomada de decisão (GUZMÁN, 2016). Portanto, quando ocorre alguma disfunção envolvendo a via mesocortical, os indivíduos afetados demonstram pouca

capacidade de concentração além de apresentar perda da habilidade de tomar decisões (YADAV et al., 2014).

A via nigroestriatal está envolvida no planejamento das ações motoras. Nessa via as projeções dopaminérgicas têm início na substância negra e se projetam para os núcleos caudados e putamem integrantes dos gânglios basais. Tal via contém cerca de oitenta por cento de toda a dopamina presente no SNC. Os neurônios dopaminérgicos presentes na via nigroestriatal, são responsáveis pela estimulação motora voluntária. Um dos principais aspectos da doença de Parkinson é justamente uma quantidade reduzida de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal (GUZMÁN, 2016).

Na via tuberoinfundibular os neurônios dopaminérgicos originam-se nos núcleos arqueados e periventriculares do hipotálamo se projetando até a região infundibular do hipotálamo. Nessa via a dopamina é liberada na circulação porta conectando-se à glândula pituitária onde a função da dopamina é inibir a liberação de prolactina. A prolactina é uma proteína secretada pela pituitária que permite a produção de leite e possui importantes funções metabólicas, sexuais e também imunológicas. O bloqueio dos receptores D2 impede que a dopamina exerça sua função inibitória o que acarreta numa hiperprolactinemia (GUZMÁN, 2016). Essa elevação da concentração de prolactina pode gerar distúrbios como amenorreia, diminuição da libido, diminuição da massa óssea, infertilidade e galactorreia (MAJUMDAR e MANGAL, 2015).

De maneira geral pode-se dizer que as vias dopaminérgicas, principalmente a mesolímbica e a mesocortical, são de grande importância para a formação de memórias de longa duração resultantes da administração crônica de psicoestimulantes. Segundo Kalivas & Volkow (2005), quando se fala de estruturas relacionadas ao sistema dopaminérgico, a neurobiologia tem focado suas pesquisas em três principais áreas cerebrais associadas à dependência química: o córtex pré-frontal, a amígdala e o núcleo acumbens (LI et al., 2006). Além das estruturas previamente citadas, é importante ressaltar o papel desempenhado pelo estriado dorsal (núcleos caudado-putamen), sendo um dos maiores constituintes dos gânglios basais, está associado a uma das principais vias dopaminérgicas primariamente envolvidas na regulação da função motora. Estudos sugerem que o estriado dorsal pode estar relacionado com a indução e/

ou a expressão da sensibilização comportamental (BEDINGFIELD *et al.*, 1996; PIERCE e KALIVAS, 1995; TODTENKOPF *et al.*, 2002; TODTENKOPF *et al.*, 2004).

Atualmente o córtex pré-frontal é um importante guia para estudos de memória, especialmente relacionados à sensibilização comportamental, uma vez que foi demonstrado que lesões nesta área dificultam o estabelecimento do processo de sensibilização. Além disso, as projeções do córtex pré-frontal para o núcleo acumbens, hipocampo e amígdala são importantes nas funções de recompensa (KALIVAS e VOLKOW, 2005; WOLF, 2002). Os processos de aprendizagem associativa e respostas associadas a pistas contextuais, estão diretamente relacionados com as estruturas do córtex pré-frontal. Estudos realizados em dependentes químicos, durante a síndrome de abstinência, demonstram que há um aumento do fluxo sanguíneo além da ativação metabólica nessa região como também na amígdala (LI *et al.*, 2006).

O núcleo acumbens (estriado ventral) pode ser histologicamente dividido em dois compartimentos, o *shell* e o *core*. O primeiro, interligado ao hipotálamo, contribui para o processo de estabelecimento de associações aprendidas entre os eventos motivacionais e as percepções ambientais, sendo assim uma área intimamente ligada à emoção por meio da qual a dopamina influencia a resposta a novos estímulos de recompensa (ITO *et al.*, 2004). Já o *core* medeia a expressão do comportamento aprendido em resposta aos eventos motivacionais relevantes (KALIVAS; VOLKOW, 2005).

2.6. Apomorfina

A apomorfina (APO) é uma substância alcaloide derivada da morfina (não-narcótica) pertencente à classe das dibenzoquilonas. Apresenta características lipofílicas sendo assim suscetível a oxidações pela exposição à luz ou ao ar. Os receptores dopaminérgicos (D1, D2, D3, D4 e D5) são os principais sítios de ativação da apomorfina, tal ativação ocorre de forma não seletiva. A APO também possui atividade nos receptores de serotonina e alfa-adrenérgicos. Alguns estudos indicam que este fármaco é um agonista parcial dos receptores D1 (LEWITT, 2004; LI *et al.*, 2006; RIBARIC, 2012).

A apomorfina, segundo a sua aplicação clínica, começou a ser utilizada no final do século 19 no tratamento de doenças como depressão, insônia e esquizofrenia, também fora utilizada devido à sua potente atividade emética (LEWITT, 2004). Com o tempo a APO passou a ser usada no tratamento do vício e da Doença de Parkinson, na qual sugere-se que este fármaco atue ativando os receptores D2 do núcleo caudado e putâmem contribuindo dessa forma para a redução dos efeitos parkinsonianos. Alguns estudos também relatam a utilização da APO no tratamento da Doença de Alzheimer (MATTINGLY e GOTTISICK, 1989; LEWITT, 2004). Entretanto, na medicina humana devido a efeitos adversos, teve seu uso substituído pela levodopa. Contudo, ainda é usada como emético principalmente como parte do protocolo de tratamento de envenenamento na medicina veterinária.

Tratamentos contínuos com agonistas dos receptores dopaminérgicos são potentes reforçadores da atividade comportamental. Sabidamente doses elevadas de apomorfina potencializam o desenvolvimento de dois processos importantes de aprendizagem, processo de sensibilização comportamental (tolerância reversa), medido pelo aumento contínuo da atividade locomotora, e condicionamento comportamental (MATTINGLY e GOTTISICK, 1989; LI et al, 2012). Em modelos experimentais de dependência química induzida pela apomorfina pode-se observar que a dose mais elevada desse fármaco (2,0 mg/kg) é capaz de produzir tanto uma resposta locomotora condicionada quanto sensibilizada (BLOISE et al., 2007; BRAGA et al., 2009a, b; DE MATOS et al., 2010; DIAS et al., 2010). Isso se deve ao fato de que, na presença de estímulos contextuais, o tratamento repetido com doses elevadas de agonistas dopaminérgicos induz à uma potente ativação dopaminérgica no hipocampo e no córtex. A associação entre os estímulos contextuais e a ativação dopaminérgica é fortalecida e reforçada pela ativação concomitante das outras estruturas dopaminérgicas pertencentes ao sistema de recompensa cerebral. Esse aumento na atividade pós-sináptica da dopamina, produzido por agentes dopaminérgicos associados a estímulos contextuais, possivelmente possibilita ao sistema mnemônico uma associação duradoura e potente com as pistas contextuais funcionando como um facilitador do processo de consolidação da memória (ROBLEDO et al. 1992).

3. HIPÓTESE

Os efeitos da resposta condicionada obtida através de um protocolo no qual os tratamentos farmacológicos ocorrem após o teste na arena experimental, devem ser consistentes com os efeitos descritos por Pavlov nos protocolos de condicionamento induzido por droga. Para isso, os efeitos obtidos através da aplicação imediata de apomorfina após o teste na arena experimental sofrerão os processos de aquisição, extinção e recuperação espontânea.

Ambos os protocolos de condicionamento induzido por drogas, tanto com tratamentos pré, quanto com tratamentos após o teste no ambiente experimental, representam efeitos sobre a atividade dopaminérgica durante o processo de consolidação e produzirão níveis semelhantes de condicionamento.

4. OBJETIVOS GERAIS

4.1. Experimento 1

Avaliar se os efeitos obtidos através da aplicação de apomorfina (em doses elevadas e baixas) após o teste na arena experimental são consistentes com os efeitos descritos por Pavlov nos protocolos de condicionamento induzido por droga. Para tanto, deve-se avaliar se tais efeitos sofrerão os processos de aquisição, extinção e recuperação espontânea.

4.2. Experimento 2

Comparar os padrões das respostas condicionadas e sensibilizadas, induzidas por doses elevadas (2,0 mg/ kg) e doses baixas (0,05 mg/ kg) de apomorfina, obtidas através de dois protocolos, um no qual os tratamentos ocorrem antes da arena experimental (protocolo de condicionamento de atraso) e outro no qual os tratamentos ocorrem imediatamente após a arena experimental (protocolo de condicionamento de traço).

5. ARTIGOS

Os dois artigos publicados com os dados desta tese serão apresentados em dois capítulos. No primeiro capítulo, o artigo “The acquisition, extinction and spontaneous recovery of Pavlovian drug conditioning induced by post-trial dopaminergic stimulation/inhibition, publicado na revista “Pharmacology, Biochemistry and Behavior” será apresentado.

No segundo capítulo, o artigo “Repeated pre-trial and post-trial low and high dose apomorphine treatments induce comparable inhibitory/excitatory sensitization and conditioned drug effects, publicado na revista “Pharmacology, Biochemistry and Behavior” será apresentado.

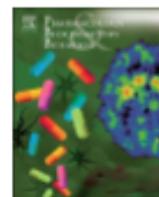
5.1. Primeiro capítulo

“The acquisition, extinction and spontaneous recovery of Pavlovian drug conditioning induced by post-trial dopaminergic stimulation/inhibition, publicado na revista “Pharmacology, Biochemistry and Behavior”.



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacology, Biochemistry and Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh

Research article

The acquisition, extinction and spontaneous recovery of Pavlovian drug conditioning induced by post-trial dopaminergic stimulation/inhibition

Breno Garone Santos^a, Robert J. Carey^b, Marinete Pinheiro Carrera^{a,*}^a Behavioral Pharmacology Group, Laboratory of Morphology and Pathology Animal Health, State University of North Fluminense Darcy Ribeiro, Avenida Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes 28013-600, RJ, Brazil^b Research and Development (151), VA Medical Center and SUNY Upstate Medical University, 800 Irving Avenue, Syracuse, NY 13210, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Trace-conditioning
Post-trial
Novel environment
Extinction
Spontaneous recovery
Apomorphine

ABSTRACT

In contextual drug conditioning, the onset of the drug treatment is contiguous with the contextual cues. Evidence suggests that drug conditioning also can occur if there is a discontinuity between the onset of the drug effect and offset of the contextual cues. Here we examine whether post-trial contextual drug conditioning conforms to several Pavlovian conditioning tenets namely: acquisition, extinction and spontaneous recovery. Six groups of rats received apomorphine (0.05 or 2.0 mg/kg) and vehicle immediately or after a 15 min delay following a 5 min non-drug exposure to an open-field during three successive days (conditioning phase). The extinction phase occurred on days 4–8, in which all post-trial treatments were vehicle injections. After 2 days of non-testing, the final test was performed. The results showed that on the first test day, the activity levels of the 6 groups were statistically equivalent. On test day 2, there were marked differences in activity levels selectively between the two immediate post-trial apomorphine treatment groups. The immediate low dose apomorphine group displayed a reduction in activity and the immediate high dose group an increase in activity relative to their day 1 levels. The activity levels of both vehicle groups and both apomorphine delay groups remained equivalent to their day 1 activity levels. On test day 3, the differences in activity levels between the two immediate post-trial apomorphine groups increased but the activity levels of the vehicle groups and the 15 min delay post-trial apomorphine groups remained unchanged. In the extinction phase, the conditioned activity differences between the two immediate post-trial apomorphine groups were gradually eliminated. During the final test, the activity differences between the immediate post-trial apomorphine groups were partially restored, indicative of spontaneous recovery. These findings are consistent with several basic elements of Pavlovian conditioning and are supportive of drug induced trace conditioning.

1. Introduction

Conditioned drug effects are widely recognized features of a variety of centrally acting drugs and have been extensively studied using drugs with addictive potential. In preclinical experimentation, locomotor activation induced by psychostimulant drugs has been demonstrated in numerous reports to be a reliable treatment to induce conditioned drug effects (Beninger, 1983; Beninger and Herz, 1986; Borowsky and Kuhn, 1991; Mazurski and Beninger, 1991; Fontana et al., 1993; Heidbreder and Shippenberg, 1994; Mattingly et al., 1994; Carey and Guí, 1998; Bloise et al., 2007; Braga et al., 2009a; Braga et al., 2009b; de Matos et al., 2010; Dias et al., 2010; Filip et al., 2010).

Typically, in these studies, the psychostimulant drug is administered and the animal is subsequently placed into a habituated test environment so that the drug effect onset is associated with the test environ-

ment cues. In that, drugs such as amphetamine, cocaine and apomorphine have potent dopaminergic agonist activity, it is generally assumed that this dopamine activation evokes locomotor stimulation and incentivizes associated contextual stimuli such that the subsequent non-drug exposure to the context elicits dopamine like effects. Indeed, numerous studies have shown that increases/decreases in dopamine activity can have potent effects upon learning and memory by increasing/decreasing the reward and incentive value of associated stimuli (e.g. Beninger, 1991; Banasikowski and Beninger, 2012).

Pavlovian conditioning also can occur with a temporal CS/UCS discontinuity or gap between the termination of a conditioned stimulus (CS) and the onset of an unconditioned stimulus (UCS). In Pavlov's trace conditioning preparation, a punctate stimulus was used and the CS-UCS gap was brief, approximately a few seconds (Pavlov, 1927, 1928). In recent trace conditioning investigations using punctate stimuli as

* Corresponding author.

E-mail address: marinete@uenf.br (M.P. Carrera).

conditioned stimuli, the CS/UCS gap is of the order of 0.5 s and the central representation of the CS trace has been firmly connected to CNS activity in brain structures such as the hippocampus and frontal cortex (Siegel, 2014; Weiss et al., 1999). While trace conditioning has not been explored in drug conditioning, we have shown in several recent reports (de Mello Bastos et al., 2014; Santos et al., 2015) that administration of the dopaminergic drug apomorphine immediately after an animal has been removed from an open field can modify subsequent non-drug open field behavior. These findings are suggestive of drug induced trace conditioning. We have found that the direct acting D1/D2 agonist apomorphine is of particular interest for the study of the role of dopamine in psychostimulant drug conditioning and sensitization, in that this drug can have pronounced but opposite effects upon dopamine neurotransmission depending upon dose level. Using a low dose range in rats (< 0.1 mg/kg), apomorphine can induce a profound inhibition of movement presumably by preferential stimulation of dopamine auto-receptors and thereby inhibiting dopamine activity in the brain (Aghajanian and Bunney, 1973; Di Chiara et al., 1977; Missale et al., 1998). At higher dose levels (> 0.5 mg/kg), apomorphine increasingly stimulates dopamine post-synaptic receptors in addition to auto-receptors and is a potent behavioral stimulant generating hyper-locomotion (Mattingly et al., 1988a; Mattingly et al., 1988b; Rowlett et al., 1997).

In order to extend our observations of apomorphine induced post-trial effects, we undertook to evaluate whether these post-trial effects of apomorphine are consistent with Pavlovian conditioned drug effects. As a first step in this process, it is important to determine if the immediate post-trial apomorphine effects we have previously observed undergo extinction when the post-trial treatments are withdrawn and, in addition, following extinction if a non-exposure interval to the test cues results in a partial spontaneous recovery of the response. These determinations are of substantial importance in that extinction and spontaneous recovery are typical features of Pavlovian conditioning. In the present study, we used a brief 5 min exposure to a novel open-field environment as the contextual CS and subsequently administered 2.0 mg/kg apomorphine or 0.05 mg/kg apomorphine immediately post-trial to induce the conditioned response effects. We used the low and high dose treatments in order to generate opposite conditioned response effects. The rationale for this strategy was to eliminate issues related to the post-trial injection procedure per-se in that our prediction based on the opposite behavioral impacts of these two dose level post-trial treatments was that the conditioned effects would be bidirectional. By using low and high doses of apomorphine, the conditioning expectation was that the conditioned responses would be in line with the behavioral response induced by the two dose levels of apomorphine (0.05 behavioral inhibition and 2.0 behavioral stimulation). Therefore, the conditioned responses induced by the low and high dose apomorphine post-trial treatments would be opposite (response inhibition/response stimulation). In addition, we wanted to determine if the conditioned stimulatory and inhibitory responses underwent similar patterns of acquisition, extinction and spontaneous recovery. We also included apomorphine groups given the same post-trial treatments but after a 15 min delay in order to control for drug exposure per-se and vehicle groups given vehicle treatments either immediately or 15 min post-trial in order to be able to assess changes in the baseline behavioral responses over the course of the experiment. The present report details the findings of this investigation.

2. Methods

2.1. Subjects

Male Wistar albino rats provided from the animal facility at CECAL/FIOCRUZ (Rio de Janeiro, Brazil), initially weighing 200–250 g, were housed in individual plastic cages (25 × 18 × 17 cm) until the end of the experiments. Food and water were freely available at all times. The vivarium was maintained at a constant temperature (22 ± 2 °C), and a

12/12 h light/dark cycle (lights on at 07:00 h and off at 19:00 h). All experiments were carried out between 14:00 and 18:00 h. In order to mitigate possible stress factors linked to handling and injections, for 7 days prior to all experimental procedures each animal was weighed and handled daily for 5 min. All experiments were conducted in strict accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

2.2. Apparatus and behavioral measurements

The behavioral measurements were conducted in a black open field chamber (60 × 60 × 45 cm). A closed-circuit camera (IKEGAMI, model ICD-49) mounted 60 cm above the arena was used to record behavioral data. Locomotion, measured as distance traveled (m), was automatically analyzed using EthoVision (Noldus, The Netherlands). The complete test procedure was conducted automatically without the presence of the experimenter in the test room. All behavioral testing was conducted under dim red light to avoid the possible aversive quality of white light and to enhance the contrast between the white subject and the dark background of the test chamber. Masking noise was provided by a fan located in the experimental room that was turned on immediately prior to placing the animal in the experimental arena and turned off upon removal of the animal from the experimental arena (i.e., test chamber).

2.3. Drugs

Apomorphine-HCl (Sigma, St. Louis, MO, USA) dissolved in 0.1% ascorbate/saline (2.0 mg/ml), was injected subcutaneously in the nape of the neck at a dose of 2.0 and 0.05 mg/kg. A 0.1% ascorbate/saline solution was used as vehicle for the apomorphine experiments. All doses were administered in a volume of 1.0 ml/kg body weight. Drug solutions were freshly prepared before each experiment.

2.4. Experimental procedure

The experiments were conducted following a modified protocol from Santos et al. (2015). The post-trial drug/vehicle injections were administered either immediately or after a 15 min delay. For both the immediate and delay post-trial groups, all rats received pre-trial vehicle injections immediately before being placed into the experimental arena for 5 min. This pre-test vehicle injection procedure was done in order to insure uniform handling prior to placement into the arena and to leave open the later possibility of introducing pre-test drug treatments. In addition, it allowed for an assessment of the role of injection linked drug conditioning in that the delay and immediate post-trial apomorphine groups would have received equivalent drug injections and therefore any conditioning linked specifically to the injection procedure itself would be the same for both groups. For the immediate post-trial groups, injections were made straight after removal from the test environment following completion of the test session (I-POST). For the immediate post-trial treatments, the rats were equally subdivided into three groups in which one group received vehicle (VEH-I-POST $n = 7$), a second group received apomorphine 0.05 mg/kg (APO 0.05-I-POST; $n = 7$) and a third group received apomorphine 2.0 mg/kg (APO 2.0-I-POST; $n = 7$). The conditioning induction phase was conducted on three successive days (test days 1–3). On the following day the extinction phase was initiated during which all animals received vehicle injections post-trial. There were 5 extinction sessions of 5 min duration with one session conducted per day (test days 4–8). After completion of this extinction phase, the animals were not tested again until test day 11. On test day 11, all groups were tested for 30 min. The purpose of this test day was two-fold. One objective was to assess whether a spontaneous recovery of conditioning would occur following a non-test interval. The second objective was to assess whether the possible spontaneous recovery of conditioning was selective to the

beginning of the 30 min session or has a broader less selective impact upon behavior during the 30 min test session.

The delay post-trial treatments followed the same protocol, except that the post-trial injections were administered 15 min after removal from the test environment (15-POST). The three delayed groups were: VEH-15'-POST ($n = 6$), APO-0.05-15'-POST ($n = 6$) and APO-2.0-15'-POST ($n = 6$).

2.5. Statistics

The initial test day results were analyzed using a one-way ANOVA. In that statistical equivalence among groups was obtained for day 1, the subsequent statistical comparisons were made between similar post-trial treatment group pairs: (APO-0.05-I-POST versus APO-2.0-I-POST); (APO-0.05-15'-POST versus APO-2.0-15'-POST) and (VEH-I-POST versus VEH-15'-POST). This presentation of the data analysis was done in that it provided both simplicity and clarity of the results obtained over the course of the 11 day experiment. Furthermore, based on prior experimentation, we predicted that conditioning effects would be limited to the immediate apomorphine groups and therefore this format would best highlight these conditioned effects. Two-way ANOVAs were performed for each group pair and when interactions were obtained ($p < 0.05$), t -tests were performed to assess differences on specific test days. In addition, paired t -tests were performed in some instances for within group comparisons to their initial baseline activity scores. Two-way ANOVAs were also performed on the 5 min within session activity scores on day eleven's 30 min test session.

3. Results

Fig. 1 shows the locomotor activity during the first day of the conditioning phase for the immediate and delay groups. A one-way ANOVA showed that there was no difference among the experimental groups [$F(5, 33) = 0.54$; $p > 0.05$].

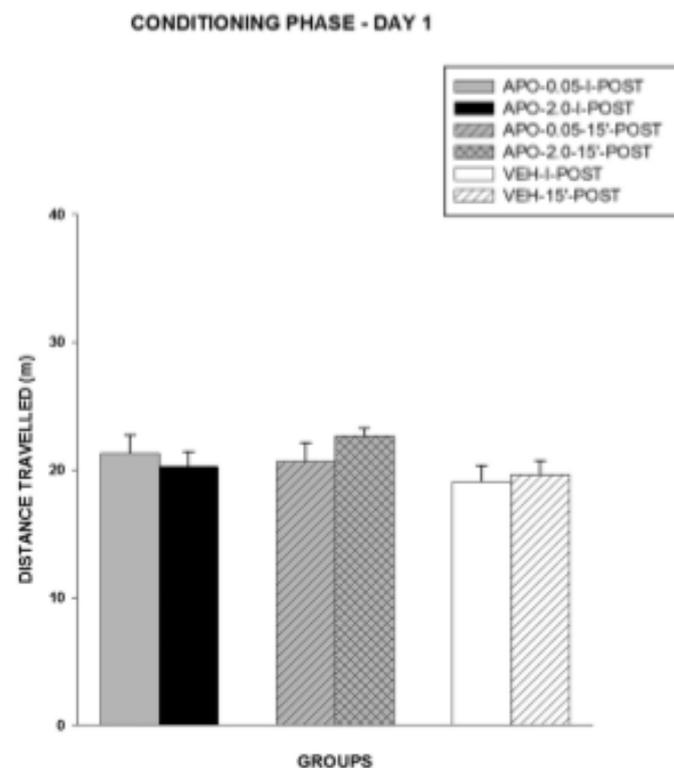


Fig. 1. Means and S.E.M. of locomotion distance in meters (m) during the initial 5 min novel open-field test for the six treatment groups on day 1, before they received their first post-trial injections.

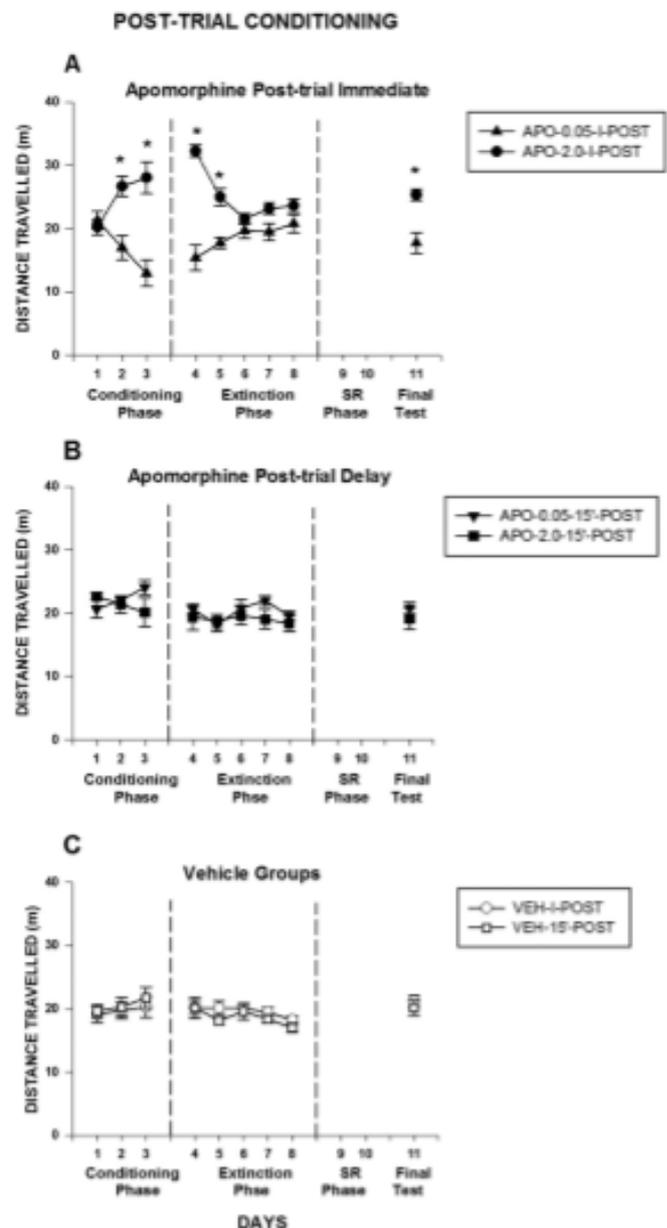


Fig. 2. Means and S.E.M. of locomotion distance in meters (m) in each of the 5 min open-field tests over the course of the 11 day experiment. Days 1–3 were the conditioning sessions, days 4–8 were extinction sessions and day 11 was the spontaneous recovery test. 2A shows the results for 0.05 and 2.0 mg/kg apomorphine immediate post-trial groups; 2B shows the results for 0.05 and 2.0 mg/kg apomorphine 15 min delay post-trial groups; 2C shows the results for the vehicle immediate and 15 min delay post-trial groups. * denotes ($p < 0.05$; ANOVA followed by t -test).

Fig. 2 shows the locomotor activity of all the experimental phases for pairs of the immediate and delay groups over the course of the 11-day experiment. For the apomorphine post-trial immediate groups (Fig. 2A), a repeated two-way ANOVA showed an interaction groups \times days [$F(8, 96) = 8.75$; $p < 0.01$], an effect of groups [$F(1, 12) = 70.92$; $p < 0.01$] but no effect of days [$F(8, 96) = 1.0$; $p > 0.05$]. An independent t -test showed that on day 1 there was no difference between groups ($p > 0.05$). However, from day 2 until day 5, the APO-2.0-I-POST group had higher locomotor activity than the APO-0.05-I-POST group ($p < 0.05$). From day 6 until day 8, there was no difference between groups ($p > 0.05$). However, on day 11 the APO-2.0-I-POST group had higher locomotor activity than the APO-0.05-I-POST group ($p < 0.05$). In addition to these between group differences, the groups were also different on these test days from their initial

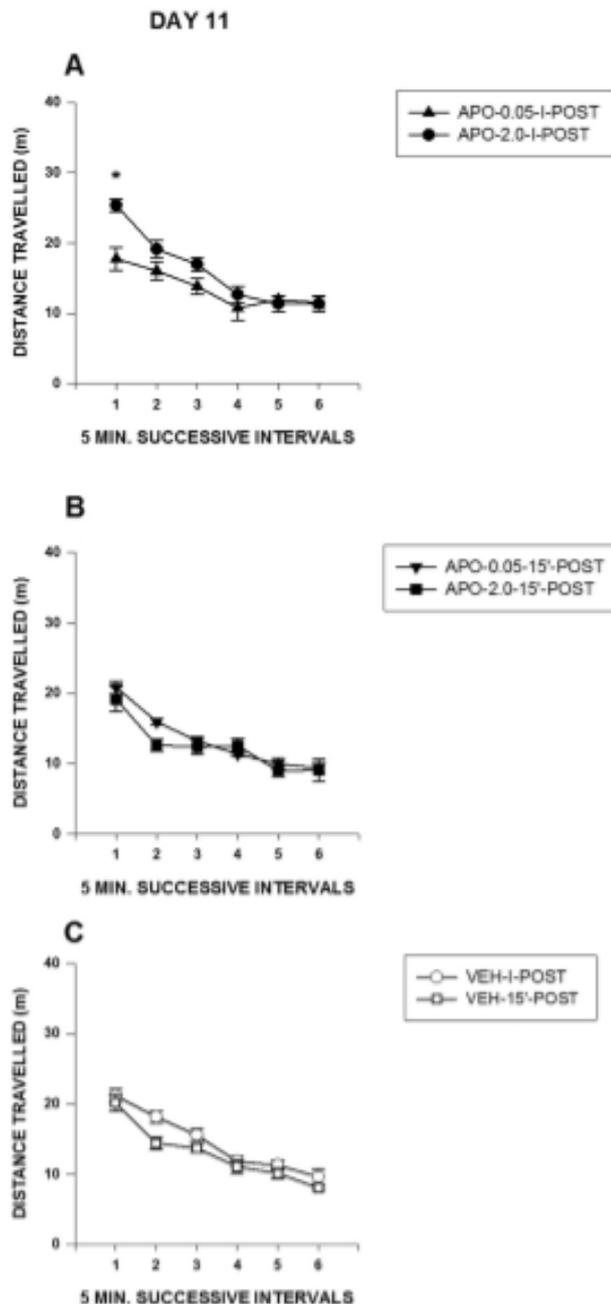


Fig. 3. Means and S.E.M. of locomotion distance in meters (m) in successive 5 min intervals during the 30 min day 11 test for (A) immediate post-trial apomorphine groups, (B) 15 min delay apomorphine post-trial groups and (C) the immediate and delay vehicle groups. * denotes ($p < 0.05$; ANOVA followed by t -test).

test day activity scores ($p < 0.05$ paired t -tests). It is of interest to note that the scores on day 11 were similar to day 5 of extinction and day 2 of conditioning. In addition, the absence of a day effect in conjunction with a highly significant group effect indicates that the group effects were essentially symmetrical, with the stimulatory increases in the 2.0 group balanced by the inhibitory decreases in the 0.05 group. For the apomorphine post-trial delay groups (Fig. 2B), a repeated two-way ANOVA indicated that there were no statistically significant differences ($p > 0.05$). Similarly, for vehicle groups (Fig. 2C), a repeated two-way ANOVA showed there were no statistically significant differences ($p > 0.05$).

Fig. 3 shows the locomotor activity on day 11 for the three pairs of immediate and delay post-trial groups. For the comparison between the immediate post-trial apomorphine (2.0 mg/kg) versus immediate post-

trial apomorphine (0.05 mg/kg) during the day 11 test (Fig. 3A), a repeated two-way ANOVA showed an interaction of groups X intervals [$F(5, 60) = 3.60$; $p < 0.05$], an effect of groups [$F(1, 12) = 8.24$; $p < 0.05$] and an effect of intervals [$F(5, 60) = 27.50$; $p < 0.01$]. An independent t -test showed that during interval 1, the APO-2.0-I-POST group had higher locomotion than the APO-0.05-I-POST group ($p < 0.05$). However, from intervals 2 through 6 there were no statistically significant differences between the groups ($p > 0.05$). For the comparison between the delay post-trial apomorphine (2.0 mg/kg) versus delay post-trial apomorphine (0.05 mg/kg) (Fig. 3B), a repeated two-way ANOVA showed that there was an effect of intervals [$F(5, 50) = 50.60$; $p < 0.01$] but there was no effect of groups [$F(1, 10) = 1.1$; $p > 0.05$] and no interaction groups X intervals [$F(5, 50) = 1.81$; $p > 0.05$]. For the comparison between the immediate post-trial vehicle injections versus delay post-trial vehicle injections (Fig. 3C), a repeated two-way ANOVA showed that there was an interval effect [$F(5, 55) = 71.32$; $p < 0.01$] but no effect of groups and no interaction groups X intervals ($p > 0.05$).

4. Discussion

Initially, prior to any drug treatments, the behavioral response to the novel environment of all groups was similar. Consistent with our previous findings (Santos et al., 2015) the immediate but not the 15 min delayed post-trial apomorphine treatments had marked stimulatory/inhibitory effects upon subsequent non-drug behavior in the novel open field. In fact, following the first post-trial apomorphine treatment in the immediate treatment groups, marked stimulatory/inhibitory effects were evident for the day 2 non-drug test and these differences increased with additional immediate post-trial apomorphine treatments.

The fact that the same apomorphine treatments given after a 15 min post-trial delay had no effect upon subsequent non-drug behavior seemingly rules out non-associational factors such as drug carry-over factors or drug conditioning linked to the injections in that the delay and immediate groups would have acquired equivalent injection linked conditioning. In addition, the return of locomotor behavior toward baseline levels following an extinction protocol is consistent with a post-trial conditioning effect. Interestingly, the behavioral response to the test environment in the 5 min test sessions for the apomorphine delay and vehicle groups remained essentially unchanged over the course of the experiment.

Evidently, the brevity of the exposure to the novel open-field was insufficient to promote between session habituation. As has been detailed by Nasello et al. (1998), the use of red light illumination in an open-field fosters a high level of exploratory behavior and this consideration may account for the persistent high level of locomotor activity over the course of the repeated brief exposures to the open-field. This apparent stability in the behavioral baseline appears to strengthen the case for a drug conditioning interpretation of the immediate post-trial apomorphine effects in that alternative possibilities such as retardation/facilitation of habituation appear untenable in the absence of evidence for habituation in the comparison groups.

It is also interesting that the result indicative of a spontaneous recovery (Pavlov, 1928) was restricted to the initial 5 min of the 30 min habituation test and that otherwise all groups underwent equivalent within session habituation. This indicates that the immediate post-trial treatments induced associative effects were specific to the initial exposure to the test environment rather than a more generalized association to test environment cues. The occurrence of spontaneous recovery is also of significance with regard to drug conditioning more broadly in that extinction is a treatment modality for drug addiction (Kaplan et al., 2011), so that spontaneous recovery potentially is an important limiting factor in the efficacy of extinction in a drug treatment protocol.

It has been documented that exposure to a novel environment evokes a dopamine response in brain areas important in reward and

motivation (Legault and Wise, 2001). In several previous reports, we have shown that acute cocaine stimulant effects occur in a novel test environment but not in a habituated test environment (Carey et al., 2005; Carey and Damianopoulos, 2006). In fact, we showed that the stimulant response produced by cocaine is prevented by extensive habituation to the test environment. In that the locomotor stimulant efficacy of cocaine depends upon dopamine release, these findings are consistent with a strong dopamine release by a novel environment but a much weaker dopamine release by a habituated environment.

Consistent with the importance of environmental novelty to dopamine release and post-trial apomorphine conditioning, we have shown previously that apomorphine post-trial effects are not observed if the animals are habituated to the test environment (de Mello Bastos et al., 2014). Particularly germane to the interpretation of the present results is the recent report by Menezes et al. (2015). In their study, the authors demonstrated that the placement of an animal into a novel environment evokes a dopamine response in brain areas important in memory and information processing. Of particular importance to the present study, the dopamine activation they observed was shown to persist after the animal was removed from the novel environment and subsequently facilitated the acquisition of a new learning task analogous to a dopaminergic drug treatment. This finding offers a mechanism by which the post-trial apomorphine treatments used in the present experiment could enhance/diminish the dopamine trace elicited by a novel environment. Seemingly, the high dose apomorphine would be able to amplify the dopamine residual signal that had been generated by the novel environment. Subsequently, when the animal was re-exposed to the open-field, the post-synaptic downstream dopamine response is enhanced and therefore the incentive value of the novel environment could be increased. Conversely, the low dose post-trial apomorphine treatment would serve to decrease the dopamine signal elicited by the open-field and consequently the dopamine response and the incentive value of the novel environment could be diminished.

While the low dose post-trial apomorphine conditioning would seem to represent a relatively straightforward conditioned reduction in the dopamine signal generated by the open-field and consequently elicit a diminished behavioral response, the high dose apomorphine effects are less easily accounted for in terms of a conditioned increase in dopamine release by the open-field placement. The behavioral effects produced by a high dose of apomorphine are on post-synaptic output of the dopamine system. Indeed, it has been demonstrated in several previous studies (Carey, 1986a, 1986b), that apomorphine can induce conditioned dopaminergic responses by stimulation of post-synaptic dopamine receptors in dopamine denervated animals. Furthermore, this apomorphine induced conditioned behavior is not altered by pre-treatment with a combined D1 and D2 dopamine receptor antagonist (Carey, 1992). Critically, this same antagonist pre-treatment completely blocked the effects of the dopaminergic agonist that induced the conditioned behavior. These findings showed that the conditioned response in the dopamine denervated animal is not mediated either by dopamine or dopamine receptors but rather by the association of contextual cues with downstream systems that had been activated by apomorphine stimulation of the post-synaptic dopamine receptors. It would be interesting to experimentally investigate if the conditioned fraction of the increase in open-field activity induced by the immediate high dose apomorphine post-trial treatment in the present study persists following a D1/D2 receptor block that would otherwise eliminate the non-conditioned locomotor activity in the open-field.

Finally, it is important to recognize that an important difference between conventional drug conditioning and putative post-trial drug conditioning observed in the present study is the differential linkage of the drug state to the contextual cues. In contrast to conventional contextual drug conditioning wherein the drug state occurs in the presence of the contextual cues, in post-trial drug conditioning the drug state is never experienced in the test environment. Consequently, issues imbedded in conventional drug conditioning such as response conti-

guity conditioning (Guthrie, 1952), drug state dependent habituation effects (Carey et al., 2003), and drug stimulus contributions to the contextual cues (Carey et al., 1999; Wang et al., 2013) are eliminated. The latter factor is of substantial importance in relation to the contribution of the environmental cues to the conditioned response. In conventional dopaminergic drug conditioning, the activated dopaminergic state induced by the drug treatment can incentivize the contextual cue complex, comprised of the external cues plus the cues generated by the drug state. Consequently, a conditioning test conducted in the presence of the same environmental situation but in the absence the drug state cues represents only a partial set of contextual cues. In post-trial drug conditioning implicated in the present study, the dopaminergic post-trial treatment is seen as modulating the ongoing dopamine trace associated with the contextual cues and is thereby able to alter the incentive value of these cues.

In conclusion, the present findings that the behavioral effects induced by post-trial apomorphine administrations undergo extinction and spontaneous recovery appear consistent with Pavlovian conditioning. Thus, post-trial drug administration appears to be an efficacious way to induce conditioned drug effects and is relevant to the addictive properties of drugs wherein strong anticipatory behavior, followed by drug use, would appear to be an important way in which the conditioned anticipatory and drug seeking behavior trace is potentiated by the subsequent drug taking. Notwithstanding the importance of dopamine to incentive motivation and drug addiction, it also needs to be recognized that other systems are implicated particularly the serotonin system as detailed in a recent review (Müller and Homberg, 2015), so that post-trial serotonergic drug treatments may also be effective in inducing conditioned drug effects and be relevant to processes induced by addictive drugs.

Acknowledgements

UENF, CNPq (308090/2012-8) and FAPERJ (E-26/110.538/2014) supported this research. B.G.S. is a recipient of a fellowship from CAPES-Brazil. We thank Dr. Richard Ian Samuels for revision of the text.

References

- Aghajanian, G.K., Bunney, B.S., 1973. Central dopaminergic neurons: neurophysiological identification and responses to drugs. In: Usdin, E., Snyder, S.H. (Eds.), *Frontiers in Catecholamine Research*. Pergamon, New York, pp. 643–648.
- Banasikowski, T.J., Beninger, R.J., 2012. Haloperidol conditioned catalepsy in rats: a possible role for D1-like receptors. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 15, 1525–1534.
- Beninger, R.J., 1983. The role of dopamine in locomotor activity and learning. *Brain Res.* 287, 173–196.
- Beninger, R.J., 1991. Receptor subtype-specific dopamine agonists and antagonists and conditioned behaviour. In: Willner, P., Scheel-Kruger, J. (Eds.), *The Mesolimbic Dopamine System: From Motivation to Action*. Wiley, Chichester, pp. 273–299.
- Beninger, R.J., Herz, R.S., 1986. Pimozide blocks establishment but not expression of cocaine-produced environment-specific conditioning. *Life Sci.* 38, 1425–1431.
- Bloise, E., Carey, R.J., Carrera, M.P., 2007. Behavioral sensitization produced by a single administration of apomorphine: implications for the role of Pavlovian conditioning in the mediation of context-specific sensitization. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86, 449–457.
- Borowsky, B., Kuhn, C.M., 1991. Chronic cocaine administration sensitizes behavioral but not neuroendocrine responses. *Brain Res.* 543, 301–306.
- Braga, P.Q., Dias, F.R., Carey, R.J., Carrera, M.P., 2009a. Low dose apomorphine induces context-specific sensitization of hypolocomotion without conditioning: support for a new state dependent retrieval hypothesis of drug conditioning and sensitization. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 93, 128–133.
- Braga, P.Q., Dias, F.R., Carey, R.J., Carrera, M.P., 2009b. Behavioral sensitization to dopaminergic inhibitory and stimulatory effects induced by low vs. high dose apomorphine treatments: an unconventional dose and response reversal sensitization challenge test reveals sensitization mechanisms. *Behav. Brain Res.* 204, 169–174.
- Carey, R.J., 1986a. A conditioned anti-parkinsonian drug effect in the hemi-parkinsonian rat. *Psychopharmacology* 89, 269–272.
- Carey, R.J., 1986b. Conditioned rotational behavior in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the substantia nigra. *Brain Res.* 365, 379–382.
- Carey, R.J., 1992. Pavlovian conditioning of *l*-dopa induced movement. *Psychopharmacology* 107, 203–210.
- Carey, R.J., Damianopoulos, F.N., 2006. Cocaine conditioning and sensitization: the

- habituation factor. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84, 128–133.
- Carey, R.J., Guì, J., 1998. Cocaine conditioning and cocaine sensitization: what is the relationship? *Behav. Brain Res.* 92, 67–76.
- Carey, R., Damianopoulos, K., DePalma, G., 1999. Issues in the pharmacological modification of cocaine conditioning: evidence that the stimulus properties of drugs can interact with contextual cues to activate or inactivate cocaine conditioned stimuli. *Behav. Brain Res.* 101, 189–206.
- Carey, R.J., DePalma, G., Damianopoulos, E., 2003. Cocaine-conditioned behavioral effects: a role for habituation processes. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 74, 701–712.
- Carey, R.J., DePalma, G., Damianopoulos, E., 2005. Acute and chronic cocaine behavioral effects in novel versus familiar environments: open-field familiarity differentiates cocaine locomotor stimulant effects from cocaine emotional behavioral effects. *Behav. Brain Res.* 158, 321–330.
- Di Chiara, G., Porceddu, M.L., Pratta, W., Gessa, G.L., 1977. Postsynaptic receptors are not essential for dopaminergic feedback regulation. *Nature* 267, 270–272.
- Dias, F.R., Carey, R.J., Carrera, M.P., 2010. Apomorphine-induced context-specific behavioral sensitization is prevented by the D1 antagonist SCH-23390 but potentiated and uncoupled from contextual cues by the D2 antagonist sulpiride. *Psychopharmacology* 209, 137–151.
- Filip, M., Alenina, N., Bader, M., Przegaliński, E., 2010. Behavioral evidence for the significance of serotonergic (5-HT) receptors in cocaine addiction. *Addict. Biol.* 15, 227–249.
- Fontana, D., Post, R.M., Weiss, S.R., Pert, A., 1993. The role of D1 and D2 dopamine receptors in the acquisition and expression of cocaine-induced conditioned increases in locomotor behavior. *Behav. Pharmacol.* 4, 375–387.
- Guthrie, E.R., 1952. *The Psychology of Learning*, Revised ed. Harper and Brothers, New York.
- Heidbreder, C.A., Shippenberg, T.S., 1994. U-69593 prevents cocaine sensitization by normalizing basal accumbens dopamine. *Neuroreport* 5, 1797–1800.
- Kaplan, G.B., Heinrichs, S.C., Carey, R.J., 2011. Treatment of addiction and anxiety using extinction approaches: neural mechanisms and their treatment implications. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 97, 619–625.
- Legault, M., Wise, R.A., 2001. Novelty-evoked elevations of nucleus accumbens dopamine: dependence on impulse flow from the ventral subiculum and glutamatergic neurotransmission in the ventral tegmental area. *Eur. J. Neurosci.* 13, 819–828.
- de Matos, L.W., Carey, R.J., Carrera, M.P., 2010. Apomorphine conditioning and sensitization: the paired/unpaired treatment order as a new major determinant of drug conditioned and sensitization effects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 96, 317–324.
- Mattingly, B.A., Gotsick, J.E., Salamanca, K., 1988a. Latent sensitization to apomorphine following repeated low doses. *Behav. Neurosci.* 102, 553–558.
- Mattingly, B.A., Gotsick, J.E., Marin, C., 1988b. Locomotor activity and stereotypy in rats following repeated apomorphine treatments at 1-, 3-, or 7-day intervals. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 31, 871–875.
- Mattingly, B.A., Hart, T.C., Lim, K., Perkins, C., 1994. Selective antagonism of dopamine D1 and D2 receptors does not block the development of behavioral sensitization to cocaine. *Psychopharmacology* 114, 239–242.
- Mazurski, E.J., Beninger, R.J., 1991. Effects of selective drugs for dopaminergic D1 and D2 receptors on conditioned locomotion in rats. *Psychopharmacology* 105, 107–112.
- de Mello Bastos, J.M., Dias, F.R., Alves, V.H., Carey, R.J., Carrera, M.P., 2014. 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. *Behav. Brain Res.* 260, 139–147.
- Menezes, J., Alves, N., Borges, S., Roehrs, R., de Carvalho Myskiw, J., Furlini, C.R., Izquierdo, I., Mello-Carpes, P.B., 2015. Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on D1-subtype dopamine receptors in hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E1652–E1658.
- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G., 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 78, 189–225.
- Müller, C.P., Homberg, J.R., 2015. The role of serotonin in drug use and addiction. *Behav. Brain Res.* 277, 146–192.
- Nasello, A.G., Machado, C., Bastos, J.F., Felício, L.F., 1998. Sudden darkness induces a high activity-low anxiety state in male and female rats. *Physiol. Behav.* 63, 451–454.
- Pavlov, I.P., 1927. *Conditioned Reflex*. Oxford University Press, London.
- Pavlov, I.P., 1928. *Lectures on Conditioned Reflexes*. Oxford University Press, London.
- Rowlett, J.K., Mattingly, B.A., Bardo, M.T., 1997. Locomotor activity and dopamine synthesis following 1 and 15 days of withdrawal from repeated apomorphine treatments. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 57, 13–18.
- Santos, B.G., Carey, R.J., Carrera, M.P., 2015. Post-trial induction of conditioned apomorphine stimulant and inhibitory response effects: evidence for potent trace conditioning of drug effects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 129, 79–86.
- Siegel, J.J., 2014. Modification of persistent responses in medial prefrontal cortex during learning in trace eyeblink conditioning. *J. Neurophysiol.* 112, 2123–2137.
- Wang, B., You, Z.B., Oleson, E.B., Cheer, J.F., Myal, S., Wise, R.A., 2013. Conditioned contribution of peripheral cocaine actions to cocaine reward and cocaine-seeking. *Neuropsychopharmacology* 38, 1763–1769.
- Weiss, C., Bouwmeester, H., Power, J.M., Disterhoft, J.F., 1999. Hippocampal lesions prevent trace eyeblink conditioning in the freely moving rat. *Behav. Brain Res.* 99, 123–132.

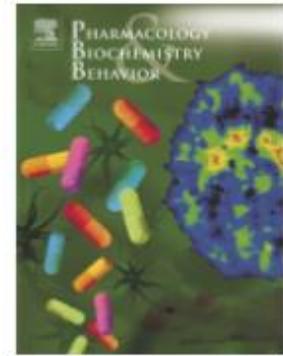
5.2 – Segundo capítulo

“Repeated pre-trial and post-trial low and high dose apomorphine treatments induce comparable inhibitory/excitatory sensitization and conditioned drug effects”.

Accepted Manuscript

Repeated pre-trial and post-trial low and high dose apomorphine treatments induce comparable inhibitory/excitatory sensitization and conditioned drug effects

Breno Garone Santos, Robert J. Carey, Marinete Pinheiro Carrera



PII: S0091-3057(18)30252-1
DOI: doi:[10.1016/j.pbb.2018.09.011](https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.09.011)
Reference: PBB 72647
To appear in: *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*
Received date: 26 May 2018
Revised date: 23 September 2018
Accepted date: 25 September 2018

Please cite this article as: Breno Garone Santos, Robert J. Carey, Marinete Pinheiro Carrera , Repeated pre-trial and post-trial low and high dose apomorphine treatments induce comparable inhibitory/excitatory sensitization and conditioned drug effects. *Pbb* (2018), doi:[10.1016/j.pbb.2018.09.011](https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.09.011)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Repeated pre-trial and post-trial low and high dose apomorphine treatments induce comparable inhibitory/excitatory sensitization and conditioned drug effects.

Breno Garone Santos¹, Robert J Carey², Marinete Pinheiro Carrera¹

¹Behavioral Pharmacology Group, Laboratory of Morphology and Pathology Animal Health, State University of North Fluminense Darcy Ribeiro, Avenida Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes, 28013-600, RJ, Brazil.

²Department of Psychiatry SUNY Upstate Medical University, 800 Irving Avenue, Syracuse, NY 13210, USA

Corresponding author: Marinete Pinheiro Carrera, Behavioral Pharmacology Group, Laboratory of Animal Morphology and Pathology, State University of North Fluminense Darcy Ribeiro, Avenida Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes, 28013-600, RJ, Brazil. Phone: +55-22-27397197; e-mail: marinete@uenf.br

Abstract

This investigation was undertaken to compare the sensitization/conditioned effects induced by apomorphine given pre-trial versus administered immediately post-trial or 15 min. post-trial. We measured the effects on locomotor activity of 5 daily apomorphine treatments induced by an inhibitory low auto-receptor dose (0.05 mg/kg) and a stimulatory high postsynaptic dose (2.0 mg/kg). Three sets of four groups were used and each set of four groups was comprised of two vehicle and two apomorphine groups (0.05/2.0 apomorphine). The only difference among the three sets of four groups each was when the treatments were administered relative to placement in the novel environment. One set received the treatment pre-test, another set was injected immediately after and the third set injected 15 min. after 5 min. test sessions in a novel environment. The repeated pre and immediate post-test apomorphine treatments induced locomotor sensitization over the 5 days of treatment. The low dose pre and immediate post-test treatments progressively decreased locomotion and the high dose pre and immediate post-test progressively increased locomotion. Critically the tests for the immediate post-test groups were non-drug and for both the pre-test and immediate post-test groups sensitization effects did not occur until the second test day. To control for non-associative apomorphine effects the same apomorphine treatments were given post-test after a 15 minute delay and were found to be equivalent to vehicle. In a subsequent conditioning test, both the pre and immediate post-test low dose apomorphine groups showed conditioned behavioral inhibition and the pre and immediate post-test high dose apomorphine groups showed conditioned behavioral stimulation. We propose that the inhibitory low dose apomorphine decreased the salience/incentive of the novel environment association and thereby decreased the behavioral response and conversely that the high dose excitatory apomorphine treatment increased the salience/incentive value of the novel environment association and potentiated the behavioral response.

Key Words: Novel environment; memory reconsolidation; salience; behavioral sensitization; conditioning; apomorphine.

1. Introduction

It has been long known that apomorphine (APO) is a direct acting D1/D2 receptor agonist. An interesting aspect of the apomorphine dopamine receptor interaction is that apomorphine can have opposite effects on dopamine activity in the brain depending upon dose level. In rats, at low dose levels (<0.1 mg/kg; s.c.), apomorphine preferentially stimulates auto-receptors and can sharply reduce dopamine (DA) neural activity and dopamine metabolism in the brain (Aghajanian and Bunney, 1973; Carey et al., 2004, Carey et al., 2008; Di Chiara et al., 1977; Missale et al., 1998). This neural inhibition is accompanied by pronounced behavioral inactivity (Bloise et al., 2007; Braga et al., 2009a, 2009b; Carey et al., 2004). In contrast, at higher dose levels (> 0.5 mg/kg) apomorphine increasingly stimulates post-synaptic dopamine receptors and generates behavioral stimulation (Bloise et al., 2007; Braga et al., 2009a, 2009c; Damianopoulos and Carey, 1992; de Matos et al., 2010; Mattingly et al., 1997, 1988). Numerous studies have shown that in rats high doses of direct as well as indirect acting dopamine agonists induce locomotor hyper-activity and that these effects undergo conditioning and sensitization (Anagnostaras and Robinson, 1996; Bloise et al., 2007; Braga et al., 2009b; de Matos et al., 2010; Keller and Delius, 2001; Mattingly et al., 1997, 1988; Rowlett et al., 1997). These conditioned effects are typically conceptualized in terms of Pavlovian conditioning wherein the drug induced behavioral effects act as the unconditioned response (UCR) and are associated with the contextual cues that serve as the conditioned stimulus (CS).

Recently we have shown that low as well as high dose apomorphine treatments administered shortly after a brief exposure to a novel environment can induce conditioned hypo and hyper-activity,

respectively (Santos et al., 2015; 2017). If the post-trial injections are delayed 15 min. then the treatments are equivalent to vehicle injections. In that the effective post-trial treatments occurred during the post-trial consolidation period, we have suggested that the dopaminergic effects of apomorphine modulated the salience/incentive bias of the consolidated experience. In conventional drug conditioning wherein the drugs effects are experienced in the testing environment, it is possible to argue for Pavlovian response conditioning, but this is clearly not the case for post-trial drug conditioning in that the drug-induced responses are not experienced in the test environment. The question arises therefore as to whether these are two different types of conditioning or if both represent effects on dopamine activity during consolidation. That is, a dopaminergic treatment administered prior to exposure to a test environment can evoke alterations in the behavioral responses emitted in the test environment but yet it is also the case that the altered drug state continues after the test trial and therefore can impact the consolidation of the experience (Duncan, 1948). In line with this consideration, it is possible that both pre- and post-trial drug treatments induce conditioned effects by similar effects on consolidation processes and thereby induce similar levels of conditioning. To experimentally address this possibility the present investigation used a unique paired/unpaired Pavlovian conditioning protocol with one pretest and two posttest groups. The pre-test group received the drug treatments prior to placement in a novel environment, one post-test group received the drug treatments immediately after placement in the novel environment in order to overlap with the consolidation process and a third group received the drug treatments 15 minutes posttest so that it was unpaired with either the test environment or the consolidation process. The present report details the findings of this investigation.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Male Wistar albino rats provided by the State University of North Fluminense Darcy Ribeiro, initially 80 days old and weighing 200-300 g were housed in individual plastic cages (25 X 18 X 17 cm) until the end of the experiment, in order to control for potential untoward social/behavioral effects related to the apomorphine treatments (Matto et al., 2000; Rudissaar et al., 2008). Food and water were freely available at all times. The vivarium was maintained at a constant temperature (22 ± 2 °C), and a 12/12 h light/dark cycle (lights on at 07:00h and off at 19:00h). All experiments occurred between 14:00 and 18:00 h. In order to mitigate possible stress factors linked to handling and injections for 7 days prior to all experimental procedures, each animal was weighed and handled daily for 5 min. All experiments were conducted in strict accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and in accordance with the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior (SBNeC) for the care and use of laboratory animals.

2.2. Drugs

Apomorphine-HCl (Sigma, St. Louis, MO, USA) was dissolved in 0.9% saline solution and was injected subcutaneously in the nape of the neck at a dose of 0.05 mg/kg and 2.0 mg/kg. A 0.9% saline solution was used as vehicle. All doses were administered in a volume of 1.0 ml/kg body weight. Drug solutions were freshly prepared before each experiment.

2.3. Apparatus and behavioral measurements

The behavioral experiments were conducted in a black open field chamber (60 x 60 x 45 cm). A closed-circuit camera (IKEGAMI, model ICD-49) mounted 60 cm above the arena was used to record behavioral data. Locomotion, measured as distance traveled (m), was automatically analyzed using EthoVision (Noldus, The Netherlands). The complete test procedure was conducted automatically without the presence of the experimenter in the test room. All behavioral testing was conducted under dim red light to avoid the possible aversive quality of white light and to enhance the contrast between the white subject and the dark background of the test chamber. Testing under red light conditions is less stressful and also favors locomotor activation as the rats are transferred from the ambient light of the vivarium to the red light of the testing room (Nasello et al., 1998). A fan in the experimental room provided masking noise. The fan was turned on immediately prior to placing the animal in the experimental arena and turned off upon removal of the animal from the experimental arena.

2.4. Experimental procedure

There were 4 pretest groups, 4 immediate posttest groups and 4 posttest delay groups for a total of 12 groups (n=6). In each set of 4 groups there were 2 vehicle (VEH) groups, and 2 apomorphine (APO) groups that received either 2.0 or 0.05 mg/kg APO. The pretest groups were injected just prior to placement in the novel environment, the immediate posttest groups were injected immediately after removal from the novel environment and the posttest delay groups were injected 15 minutes after removal from the novel environment. The test sessions were restricted to 5 minutes in order to retard the development of habituation to the novel environment experience and maintain a stable behavioral baseline.

The experiment was carried out in 3 phases: induction, conditioning test, and sensitization challenge test. In the induction protocol, all groups received 5 daily 5 min. tests in the novel open-field. In the conditioning phase, all groups received vehicle prior to a 5 min. placement in the same test arena. In the sensitization challenge protocol the test session was 30 min. and the VEH/2.0 APO injections were administered immediately pretest.

The group treatment assignments for the sensitization challenge test in the pre-test groups were as follows: one VEH pre-test group received VEH; the second VEH pre-test group received APO 2.0 mg/kg; the 0.05 mg/kg APO pre-test group received 2.0 mg/kg APO; the 2.0 mg/kg APO pre-test group received APO 2.0. The same sensitization challenge protocol used for the pre-test groups was followed for the four immediate and four delay post-test groups. In the immediate post-test groups one VEH group received VEH, the other VEH group received 2.0 APO, the 0.05 APO post-test group received 2.0 APO and the 2.0 APO post-test group received 2.0 APO. The same group treatment assignments were employed for the delay post-test groups. Table 1 and table 2 present, respectively, the experimental design and the experimental groups.

2.5. Statistics

For all 3 phases, in the induction protocol, a repeated two-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine the group and day effects, as well as the possible interactions between variables. When a significant effect of group versus day interaction was recorded, data were further evaluated by one-way ANOVA followed by the Duncan post-hoc test using $p < 0.05$ as the criterion for statistical significance. The behavioral data obtained from the conditioning tests and sensitization challenge tests were evaluated using a one-way ANOVA. Wherever indicated by the ANOVA (group effects with p -values < 0.05), possible differences among groups were further analyzed by Duncan's

multiple range tests. Paired t tests were used to evaluate possible changes in behavior from induction day 1 to day 5 within specific selected groups.

3. Results

Figure 1 shows the results of the pre-test treatment groups. Figure 1A presents the findings obtained on each day of the five days of the induction protocol. A repeated two-way ANOVA showed an interaction of groups X days [$F(12, 80) = 10.13; p < 0.01$], an effect of groups [$F(3, 20) = 10.22; p < 0.01$] but no effect of days of treatment [$F(3, 80) = 1.83; p > 0.05$]. A one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range to further analyze the interaction of group X days showed that on day 1, there was no difference among the groups ($p > 0.05$). On day 2, there was a difference between the pre-test 0.05 APO and the pre-test 2.0 APO groups ($p < 0.03$). From days 3-5, the PRE-TEST 0.05 APO group had lower locomotion than the all groups ($p < 0.05$) and on days 3-5 the PRE-TEST 2.0 APO group had higher locomotion than the all groups ($p < 0.05$). For the PRE-TEST VEH group, a paired t-test showed that there was no statistical difference between the day 1 and day 2 [$t(5) = 1.70; p > 0.05$] and no difference between the day 1 and day 5 [$t(5) = 0.24; p > 0.05$]. For the other PRE-TEST VEH group, a paired t-test showed that there was no statistical difference between the day 1 and day 2 [$t(5) = 0.60; p > 0.05$] and no difference between the day 1 and day 5 [$t(5) = 0.70; p > 0.05$]. For the PRE-TEST 0.05APO group, a paired t-test showed that there was no difference between the day 1 and day 2 [$t(5) = 2.40; p = 0.065$] but there was a difference between the day 1 and day 5 [$t(5) = 12.51; p < 0.01$]. For the PRE-TEST 2.0APO group, a paired t-test showed that there was no difference between the day 1 and day 2 [$t(5) = 2.20; p = 0.085$] but there was a difference between the day 1 and day 5 [$t(5) = 4.20; p < 0.01$].

The results for the conditioning test protocol are shown in Fig. 1B. A one-way ANOVA

showed that there was difference among the groups [$F(3, 20) = 12.60$; $p < 0.01$] and Duncan's test showed that the PRE-TEST 2.0 APO group had higher locomotion than all other groups ($p < 0.05$) and the PRE-TEST 0.05 APO group had the lower locomotion than the all groups ($p < 0.05$). The within session analysis of the sensitization challenge test are presented in Fig. 1C. The 30 min total test was divided into 6 intervals of 5 min. each. A repeated two-way ANOVA showed an interaction of groups X intervals [$F(15, 100) = 2.05$; $p < 0.05$], an effect of groups [$F(3, 20) = 7.2$; $p < 0.01$] and an effect of intervals [$F(5, 100) = 48.61$; $p < 0.01$]. A one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range to further analyze the interaction of group X days showed that from intervals 1-4, the PRE-TEST 2.0 APO group had higher locomotion scores than all other groups ($p < 0.05$). From intervals 5-6, there were no differences among the groups ($p > 0.05$). The total locomotion scores for the sensitization challenge test protocol are presented in Fig. 1D. A one-way ANOVA followed by Duncan's test showed that the only difference among the groups [$F(3, 20) = 7.24$; $p < 0.01$] was that the PRE-TEST 2.0 APO group had higher locomotion scores than all other groups ($p < 0.05$).

Figure 2 shows the results for the immediate (I) post-test groups. Figure 2A presents the activity scores (m) for each of the five sessions in the induction protocol. A repeated two-way ANOVA showed an interaction groups X days [$F(12, 80) = 17.60$; $p < 0.01$], an effect of groups [$F(3, 20) = 53.62$; $p < 0.01$] and an effect of days of treatment [$F(4, 80) = 3.03$; $p < 0.05$]. A one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range tests to further analyze the interaction of group X days showed that on day 1, there was no difference among the groups ($p > 0.05$). However, from days 2, 3, 4, and 5, the I post-test 2.0 APO group had higher locomotion than all other groups ($p < 0.05$). The results also showed that on days 3,4 and day 5, the I POST-TEST 0.05 APO group displayed lower locomotion than the all groups ($p < 0.05$).

For the I POST-TEST VEH group, a paired t-test showed that there was no statistical

difference between the day 1 and day 2 [$t(5) = 0.08$; $p > 0.05$] and no difference between the day 1 and day 5 [$t(5) = 0.26$; $p > 0.05$]. For the other I POST-TEST VEH-group, a paired t-test showed that there was no statistical difference between the day 1 and day 2 [$t(5) = 1.40$; $p > 0.05$] and no difference between the day 1 and day 5 [$t(5) = 0.82$; $p > 0.05$]. For the I POST-TEST 0.05APO group, a paired t-test showed that there was difference between the day 1 and day 2 [$t(5) = 4.85$; $p < 0.01$] and between the day 1 and day 5 [$t(5) = 8.20$; $p < 0.01$]. For the I POST-TEST 2.0APO group, a paired t-test showed that there was difference between the day 1 and day 2 [$t(5) = 4.0$; $p < 0.01$] and between the day 1 and day 5 [$t(5) = 5.60$; $p < 0.01$].

For the conditioning test (Fig. 2B), one-way ANOVA showed a difference among the groups [$F(3, 20) = 13.01$; $p < 0.01$] and Duncan's test showed that the I POST-TEST 2.0 APO group had higher locomotion than all other groups ($p < 0.05$) and the I POST-TEST 0.05 APO group had lower locomotion than the other groups ($p > 0.05$). The within session analysis of the sensitization challenge test are presented in Fig. 3C. The 30 min total test was divided into 6 intervals of 5 min. each. A repeated two-way ANOVA showed an interaction of groups X intervals [$F(15, 100) = 2.10$; $p < 0.01$], an effect of groups [$F(3, 20) = 4.20$; $p < 0.05$] and an effect of intervals [$F(5, 100) = 36.50$; $p < 0.01$]. A one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range to further analyze the interaction of group X days showed that on intervals 1 and 2, I POST-TEST 2.0 APO group had higher locomotion scores than all other groups ($p < 0.05$). From intervals 3-6, there were no differences among the groups ($p > 0.05$). For the total sensitization challenge test protocol (Fig. 2D), a one-way ANOVA followed by Duncan's test showed that there was difference among the groups [$F(3, 20) = 4.20$; $p < 0.05$]. The I POST-TEST 2.0 APO group had the higher locomotion scores than all other groups ($p < 0.05$).

Figure 3 presents the results obtained in the 15 min. delay post-test phase. The results for the five-day induction protocol are presented in Fig. 3A. A repeated two-way ANOVA showed no effect

of groups [$F(3, 20) = 0.14$; $p > 0.05$], no effect of days of treatment [$F(4, 80) = 0.82$; $p > 0.05$] and no interaction groups X days [$F(12, 80) = 0.16$; $p > 0.05$]. For the conditioning test protocol (Fig. 2B), one-way ANOVA showed that there was no difference among the experimental groups [$F(3, 20) = 0.63$; $p > 0.05$]. The within session analysis of the sensitization challenge test are presented in Fig. 3C. The 30 min total test was divided into 5 min. 6 intervals. A repeated two-way ANOVA showed only an effect of intervals [$F(5, 100) = 260.0$; $p < 0.01$]. There was no effect of groups [$F(3, 20) = 0.31$; $p > 0.05$] and no interaction of groups X intervals [$F(15, 100) = 0.62$; $p > 0.05$]. For the total the sensitization challenge test protocol (Fig. 3D), a one-way ANOVA showed that there was no difference among the groups [$F(3, 20) = 0.31$; $p > 0.05$].

4. Discussion

If this experiment had been conducted using a conventional Pavlovian paired/unpaired protocol the findings would have conformed to the extant apomorphine sensitization/conditioning literature in that the paired groups, in this case the pretest apomorphine groups, exhibited sensitization and conditioning effects but not the unpaired apomorphine groups in this case the delay groups. The unique contribution of this study was that it included groups that received these same apomorphine treatments but immediately posttest. In that, these latter groups were always tested without drug it was surprising to find that the behavioral effects in these groups mirrored the pretest or conventional paired groups. While the progressive behavioral changes with repeated treatments in the induction phase in the pretest groups fit nicely with drug sensitization effects the same description cannot be applied to the immediate posttest groups in that the effects in these groups were obtained in the non-drug state. A particularly interesting facet of the effects of the repeated treatments in the induction phase is that there were no effects on day 1 for any of the apomorphine groups. For the

posttest groups this is expected in that the testing on day 1, as well as all five of the induction days, were done under VEH conditions in that the apomorphine treatments were not administered until after completion of the test sessions. By the second test session however, apomorphine effects were observed in both the pretest and immediate posttest groups. It needs to be noted that the effects in the pretest groups represented the effects of a second set of apomorphine injections whereas on induction session 2 the immediate posttest apomorphine treatments effects on behavior were attributable to a single apomorphine treatment administered posttest the previous day. These same apomorphine injections given posttest to the delay group the previous day, however, were without effect.

In several previous reports (de Mello Bastos et al., 2014; Santos et al., 2015; 2017), we reported that post-test apomorphine administered immediately following a 5 min. placement in a novel environment modified subsequent non-drug behavior in the same environment. To account for these immediate post-test effects we have suggested that the apomorphine treatments altered the level of dopamine activity during consolidation and in this way modified the incentive value of the association. Seemingly, it could be argued that the same process occurred for the pretest apomorphine treatments. That is, the pre-test apomorphine effects on dopamine would be present during consolidation so that the pretest apomorphine effects on consolidation would be similar to the posttest apomorphine effects. When considered in this way the delayed onset of the pre-test apomorphine effects until the second test session and the similarities between the pre-test and immediate posttest apomorphine effects on the rates of progressive changes induced by pre-test and immediate post-test apomorphine during induction are consistent. Clearly, at this stage, this analysis is only of heuristic utility and will require rigorous experimental validation.

While the use of electroconvulsive shock (ECS) by Duncan (1949) drew attention to the importance of the immediate post-trial period after a learning trial for memory consolidation, the

severe and global impact of ECS on brain activity made such a manipulations less useful as a tool to uncover post-trial processes pertinent to memory. Insight into the various mechanisms that mediate post-trial treatment memory modulatory effects was developed from a large series of studies that showed that post-trial pharmacological modification of the post-trial hormonal and neurotransmitter effects that persist post-trial during consolidation of a learning trial substantially enhance/impair retention (Gasbarri and Tomaz, 2012; Gold et al., 1982; Messier, 2004; Roozendaal and McGaugh, 2011).

It has been also suggested that the hormonal and neurotransmitter effects that briefly continue post-trial are relevant to Pavlovian conditioning (Carey, 1987) in that these effects are a continuation of the unconditioned response (UCR) present during consolidation and in the case of aversive conditioning contribute to the emotional intensity of the association. These considerations are relevant to the present findings in that it has been shown that exposure to novel stimuli elicits dopamine release (Legault and Wise, 2001). Importantly, (Menezes et al., 2015) has reported that a 5 min. exposure to a novel environment evokes a dopamine release that persists after removal from the novel environment with the activation of dopaminergic systems important in associative systems such as the hippocampus. We suggest that the low and high dose apomorphine treatments we administered immediately after removal from the novel environment were in effect paired with the novel environment induced dopamine activation such that the low dose apomorphine attenuated the dopamine activation and the high dose apomorphine enhanced the dopamine activation state. In that dopamine inactivation/activation decreases/enhances the salience/incentive value of stimuli (Beninger, 1983; Koob et al., 1998), we suggest that the apomorphine induced dopaminergic salience/incentive effects are paired to the consolidation of the stimulus-response association. That is, associations consolidated in a

state of high dopamine activation have an enhanced salience/incentive value and associations consolidated in a state of low dopamine activation have a reduced salience/incentive value. That is, the post-trial low dose of apomorphine would lower the level of dopamine activity during consolidation such that the incentive value of the novel environment stimuli incorporated into memory would be diminished and the subsequent behavioral response would similarly be attenuated. For the post-trial high dose apomorphine treatment, the dopamine activation state would be elevated and the consolidated novel environment association would be increased in incentive value and the subsequent behavioral response potentiated.

This analysis is different from a direct effect on memory in that if the posttest effects in this paradigm were viewed as enhanced/impaired effects on memory the pattern of changes in behavioral activity with repeated treatments would be different than was observed in the present study. That is, an apomorphine pro-dopamine enhancement of memory for the novel environment would make the environment more familiar and less novel and thereby decrease, not increase behavioral activity in subsequent tests. Conversely, an apomorphine anti-dopamine amnesic effect would simply maintain environmental novelty with repeated tests but not decrease behavioral activity below the initial activity level.

Another point of interest in the present findings was obtained in the sensitization challenge test. That is, while both the pretest and immediate posttest 2.0 APO groups exhibited sensitization effects in the challenge test the effect was substantially more prominent in the pretest group. It is important to note that the testing protocols for sensitization and conditioning have important differences. In tests for Pavlovian conditioned drug effects, the conditioned response is assessed in the presence of the conditioned stimuli absent the drug treatment. In contrast, for sensitization, both the drug treatment and conditioned stimuli are present. Several

investigators (eg. Carey et al., 2005; Wilkinson et al., 2009) have demonstrated that drug treatments can provide drug stimuli that can contribute to the contextual stimulus complex. This latter consideration is pertinent to the present findings in the challenge test in that the apomorphine drug stimuli may have interfered with the association in the posttest group. In order to address this possibility however it would be necessary to have additional 2.0 APO pretest and posttest groups that were tested with VEH so that the effects of the APO challenge test effects could be differentiated from the non-drug conditioned effects.

This close correspondence between pre- and post-trial apomorphine effects when paired with a novel environment does not occur if the test environment is highly familiar then the effects of pre-versus post-trial apomorphine treatments are very different. As we have reported previously (de Mello Bastos et al., 2014), low/high dose post-trial apomorphine treatments given immediately after a 5 min exposure to a familiar test environment have no effect on subsequent activity in the test environment. Evidently, the environmental experience has already been consolidated so that there is no consolidation process for the post-trial dopamine activation induced by the post-trial apomorphine treatment to interact with. On the other hand, if low/high dose apomorphine treatments are given pre-test just before a 5 min. exposure to a familiar environment, the apomorphine treatments have prominent behavioral effects in the test environment on the first drug treatment. The high dose apomorphine treatment induces behavioral stimulation and conditioning occurs (de Mello Bastos et al., 2014). In this drug treatment/behavioral test arrangement the dopamine activation evoked by a high dose of apomorphine transforms the habituated stimuli into highly salient and incentive stimuli analogous to novel environment stimuli and consolidation mechanisms are activated post-trial in a state of heightened dopamine activation. Thus, the high dose apomorphine treatment can transform

habituated stimuli into salient incentive stimuli and the dopamine stimulant effects can persist post-trial to modify the consolidation processes.

In conclusion, the present findings indicate that the use of a brief exposure to a novel environment with pre/post-test drug treatments can provide a useful protocol to examine new ways to study drug conditioning. In addition, the essential equivalence that was observed between pre- and immediate post-trial treatments but not delayed posttest treatments points to a potential important role of drug induced dopaminergic activity during consolidation for the induction of sensitized and conditioned drug effects that are such important contributors to drug addiction.

Acknowledgements

This research was supported by UENF and FAPERJ (nº E-26/203.551/2015). B.G.S. is a recipient of a fellowship from CAPES-Brazil. We wish to thank Dr. Richard Ian Samuels (UENF) for his collaboration.

References

Aghajanian, G.K., Bunney, B.S., 1973. Central dopaminergic neurons: neurophysiological identification and responses to drugs, in: Usdin, E., Snyder, S., (Eds.), *Frontiers in Catecholamine Research*. Pergamon Press, Oxford, pp. 643-648.

Anagnostaras, S.G., Robinson, T.E., 1996. Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: modulation by associative learning. *Behav Neurosci.* 110:1397-414.

Beninger, R.J., 1983. The role of dopamine in locomotor activity and learning. *Brain Res.* 287:173-196.

Bloise, E., Carey, R.J., Carrera, M.P., 2007. Behavioral sensitization produced by a single administration of apomorphine: implications for the role of Pavlovian conditioning in the mediation of context-specific sensitization. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86: 449-457.

Braga, P.Q., Dias, F.R., Carey, R.J., Carrera, M.P., 2009c. Behavioral sensitization to dopaminergic inhibitory and stimulatory effects induced by low vs. high dose apomorphine treatments: an unconventional dose and response reversal sensitization challenge test reveals sensitization mechanisms. *Behav. Brain Res.* 204: 169-174.

Braga, P.Q., Dias, F.R., Carey, R.J., Carrera, M.P., 2009b. Low dose apomorphine induces context-specific sensitization of hypolocomotion without conditioning: support for a new state dependent retrieval hypothesis of drug conditioning and sensitization. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 93: 128-133.

Braga, P.Q., Galvanho, J.P., Bloise, E., Carey, R.J., Carrera, M.P., 2009a. The expression of locomotor sensitization to apomorphine is dependent on time interval between injection and testing. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 91: 278-282.

Carey, R.J., 1987. Post-trial hormonal treatment effects: memory modulation or perceptual distortion? *J Neurosci Methods.* 22:27-30.

Carey, R.J., DePalma, G., Damianopoulos, E., Hopkins, A., Shanahan, A., Müller, C.P., Huston, J.P., 2004. Dopaminergic and serotonergic autoreceptor stimulation effects are equivalent and additive in the suppression of spontaneous and cocaine induced locomotor activity. *Brain Res.* 1019: 134-143.

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

Carey, R.J., Huston, J.P., Müller, C.P., 2008. Pharmacological inhibition of dopamine and serotonin activity blocks spontaneous and cocaine-activated behaviour. *Prog. Brain Res.* 172: 347-360.

Damianopoulos, E.N., Carey, R.J., 1992. Pavlovian conditioning of CNS drug effects: a critical review and new experimental design. *Rev. Neurosci.* 3: 65-77.

de Matos, L.W., Carey, R.J., Carrera, M.P., 2010. Apomorphine conditioning and sensitization: the paired/unpaired treatment order as a new major determinant of drug conditioned and sensitization effects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 96: 317-324.

de Mello Bastos, J.M., Dias, F.R., Alves, V.H., Carey, R.J., Carrera, M.P., 2014. 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. *Behav. Brain Res.* 260: 139-147.

Di Chiara, G., Porceddu, M.L., Fratta, W., Gessa, G.L., 1977. Postsynaptic receptors are not essential for dopaminergic feedback regulation. *Nature*. 267: 270-272.

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

Gasbarri, A., Tomaz, C., 2012. Memory and motivational/emotional processes. *Front Behav Neurosci.* 6:1-2.

Gold, P.E., Murphy, J.M., Cooley, S., 1982. Neuroendocrine modulation of memory during development. *Behav Neural Biol.* 35:277-293.

Keller, S., Delius, J.D., 2001. Discriminative learning occasioned by the administration of a dopamine agonist. *Psychopharmacology.* 157:320-323.

Koob, G.F., Sanna, P.P., Bloom, F.E., 1998. Neuroscience of addiction. *Neuron.* 21: 467-476.

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

Mattingly, B.A., Gotsick, J.E., Salamanca, K., 1988. Latent sensitization to apomorphine following repeated low doses. *Behav. Neurosci.* 102: 553-558.

Mattingly, B.A., Koch, C., Osborne, F.H., Gotsick, J.E., 1997. Stimulus and response factors affecting the development of behavioral sensitization to apomorphine. *Psychopharmacology.* 130: 109-116.

Matto, V., Vaarmann, A., Rudissaar, R., Pruus, K., Skrebuhhova-Malmros, T., Allikmets, L., 2000. Apomorphine-induced aggressive behaviour and post-mortem monoamine content in male Wistar rats. *Neurosci Lett.* 289:131-134.

Menezes, J., Alves, N., Borges, S., Roehrs, R., de Carvalho Myskiw, J., Furini, C.R., Izquierdo, I., Mello-Carpes, P.B., 2015. Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on D1-subtype dopamine receptors in hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 112: 1652-1658.

Messier, C., 2004. Glucose improvement of memory: a review. *Eur J Pharmacol.* 490:33-57.

Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G., 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 78:189-225.

Nasello, A.G., Machado, C., Bastos, J.F., Felicio, L.F., 1998. Sudden darkness induces a high activity-low anxiety state in male and female rats. *Physiol Behav.* 63:451-454.

Rowlett, J.K., Mattingly, B.A., Bardo, M.T., 1997. Locomotor activity and dopamine synthesis following 1 and 15 days of withdrawal from repeated apomorphine treatments. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 57:13-18.

Roozendaal, B., McGaugh, J.L., 2011. Memory modulation. *Behav Neurosci.* 125:797-824.

Rudissaar, R., Harro, J., Pruus, K., Rincken, A., Allikmets, L., 2008. Repeated administration of the dopaminergic agonist apomorphine: development of apomorphine aggressiveness and changes in the interaction between dopamine D(2) receptors and G-proteins. *Pharmacol Rep.* 60:827-833.

Santos, B.G., Carey, R.J., Carrera, M.P., 2015. Post-trial induction of conditioned apomorphine stimulant and inhibitory response effects: evidence for potent trace conditioning of drug effects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 129:79-86.

Santos, B.G., Carey, R.J., Carrera, M.P., 2017. The acquisition, extinction and spontaneous recovery of Pavlovian drug conditioning induced by post-trial dopaminergic stimulation/inhibition. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 156: 24-29.

Wilkinson, J.L., Li, C., Bevins, R.A., 2009. Pavlovian drug discrimination with bupropion as a feature positive occasion setter: substitution by methamphetamine and nicotine, but not cocaine. *Addict Biol.* 14:165-173.

Figure Captions

Figure 1. Means and S. E. M.s for distance travelled (m) during the pre-test phase. Figure 1A presents the locomotor activity over the course of 5 daily 5 min. tests for each of the vehicle (VEH) and apomorphine (APO) groups that received APO/VEH injections immediately prior to testing. * $p < 0.05$ versus all other groups. # $p < 0.05$ day 1 versus day 5 paired t tests. Figure 1B shows the activity levels of the VEH and APO groups for the 5 min. VEH conditioning test. * $p < 0.05$ versus all other groups. Figure 1C shows the total activity scores of the VEH and APO groups in the 30 min. 2.0 mg/kg apomorphine challenge test. * $p < 0.05$ versus all other groups (ANOVA followed by Duncan's multiple range test).

Figure 2. Means and S. E. M.s for distance travelled (m) during post-test phase. Figure 2A presents the locomotor activity over the course of 5 daily 5 min. tests for each of the vehicle and apomorphine groups that received APO/VEH injections immediately after completion of the test session. * $p < 0.05$ versus all other groups. & $p < 0.05$ day 1 versus day 2 and # day 1 versus day 5 paired t tests. Figure 2B shows the activity levels of the VEH and APO groups for the 5 min. VEH conditioning test. * $p < 0.05$ versus all other groups. Figure 2C shows the total activity scores of the VEH and APO groups in the 30min. 2.0 mg/kg apomorphine challenge test. * $p < 0.05$ versus all other groups (ANOVA followed by Duncan's multiple range test).

Figure 3. Means and S. E. M.s for distance travelled (m) during the post-test delay phase. Figure 3A presents the locomotor activity over the course of 5 daily 5 min. tests for each of the vehicle and apomorphine groups that received APO/VEH injections 15 minutes after completion of the test session. Figure 3B shows the activity levels of the VEH and APO groups for the 5 min. VEH

conditioning test. Figure 3C shows the total activity scores of the VEH and APO groups in the 30min. 2.0 mg/kg apomorphine challenge test (ANOVA followed by Duncan's multiple range test).

ACCEPTED MANUSCRIPT

Table 1: Experimental design.

Days	1	2	3	4	5	6	7
	Induction					Conditioning Test	Sensitization Test

Table 2: Experimental groups.

Initial Groups	Induction (1-5 days)		Conditioning Test	Sensitization Test	Final Groups
Pre-test Treatments					
VEH VEH APO-0.05 APO-2.0	Immediate pre-arena	Immediate post-arena	Immediate pre-arena	Immediate pre-arena	PRE-TEST VEH-VEH PRE-TEST VEH- 2.0APO PRE-TEST 0.05APO- 2.0APO PRE-TEST 2.0APO- 2.0APO
	VEH	VEH	VEH	VEH	
	VEH	VEH	VEH	APO-2.0	
	APO-0.05 APO-2.0	VEH VEH	VEH VEH	APO-2.0 APO-2.0	
Immediate (I) Post-test Treatments					
VEH VEH APO-0.05 APO-2.0	Immediate pre-arena	Immediate post-arena	Immediate pre-arena	Immediate pre-arena	I POST-TEST VEH- VEH I POST-TEST VEH- 2.0APO I POST-TEST 0.05APO-2.0APO I POST-TEST 2.0APO- 2.0APO
	VEH	VEH	VEH	VEH	
	VEH	VEH	VEH	APO-2.0	
	VEH	APO-0.05 APO-2.0	VEH VEH	APO-2.0 APO-2.0	
15 Min. Delay (D) Post-test Treatment					
VEH VEH APO-0.05 APO-2.0	Immediate pre-arena	15' min. post-arena	Immediate pre-arena	Immediate pre-arena	D POST-TEST VEH- VEH D POST-TEST VEH- 2.0APO D POST-TEST 0.05APO-2.0APO D POST-TEST 2.0APO-2.0APO
	VEH	VEH	VEH	VEH	
	VEH	VEH	VEH	APO-2.0	
	VEH	APO-0.05 APO-2.0	VEH VEH	APO-2.0 APO-2.0	

VEH=vehicle; APO-0.05=apomorphine 0.05 mg/kg; APO-2.0=apomorphine 2.0 mg/kg; I=immediate; D= 15 min. delay

Highlights

- Repeated apomorphine treatment effects on behavior in a novel environment.
- Low and high dose apomorphine conditioned and sensitized locomotor effects.
- Similar sensitization effects of pre versus immediate post-trial apomorphine.
- Similar conditioned effects of pre versus immediate post-trial apomorphine.
- No conditioned or sensitization effects with delayed post-trial apomorphine.

IMMEDIATE PRE-TEST TREATMENTS

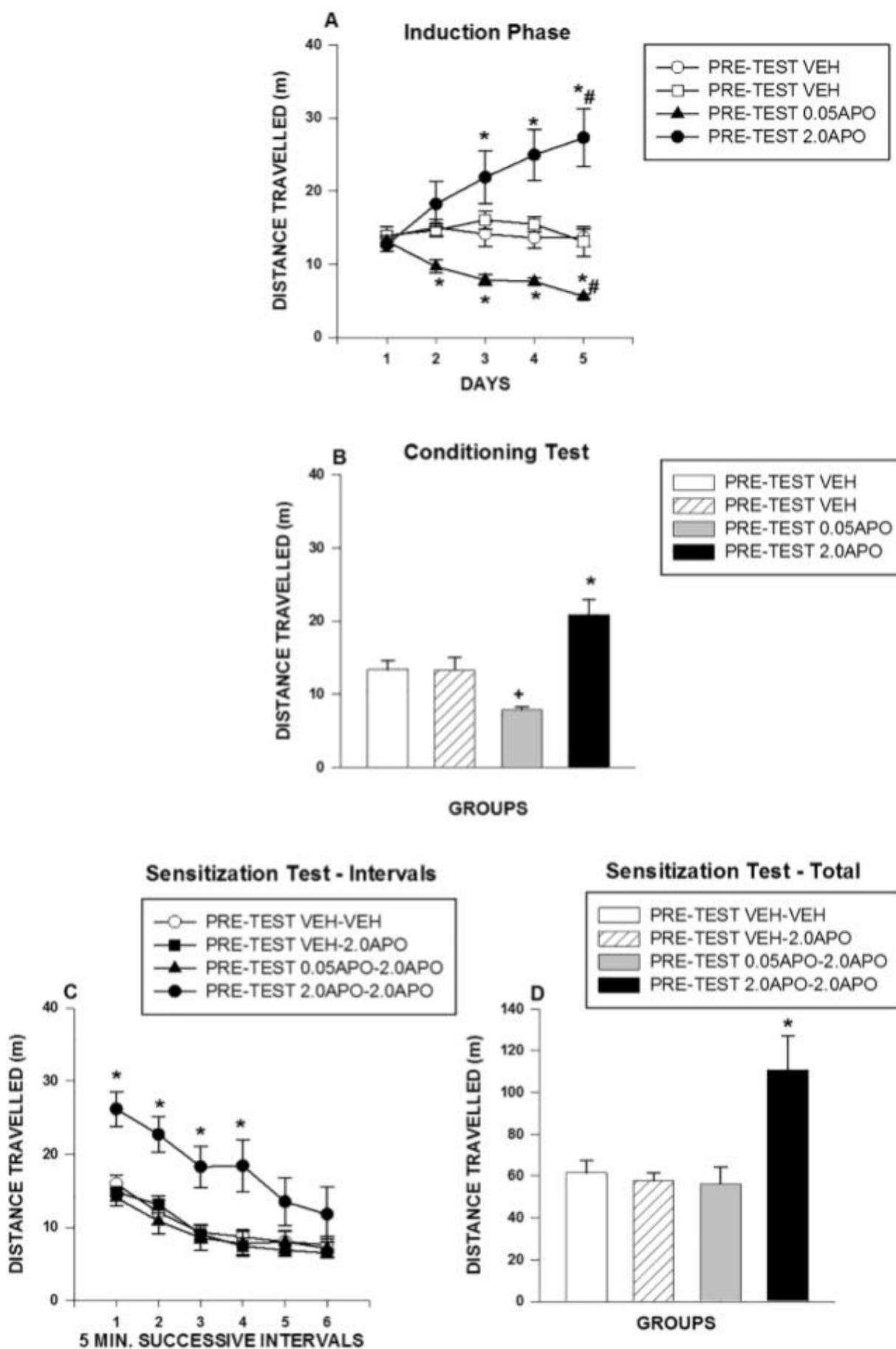


Figure 1

IMMEDIATE (I) POST-TEST TREATMENTS

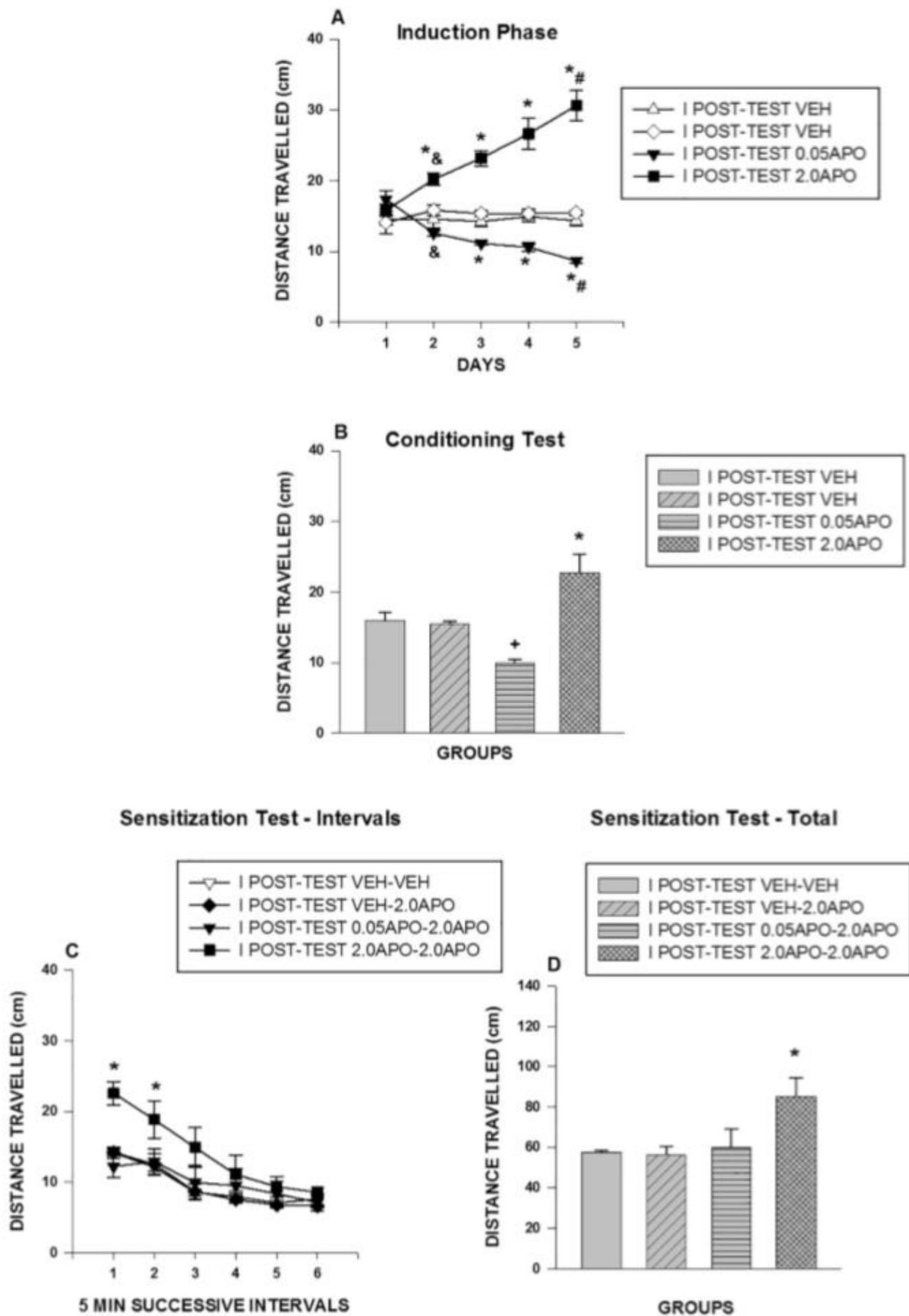


Figure 2

15 MIN. DELAY (D) POST-TEST TREATMENTS

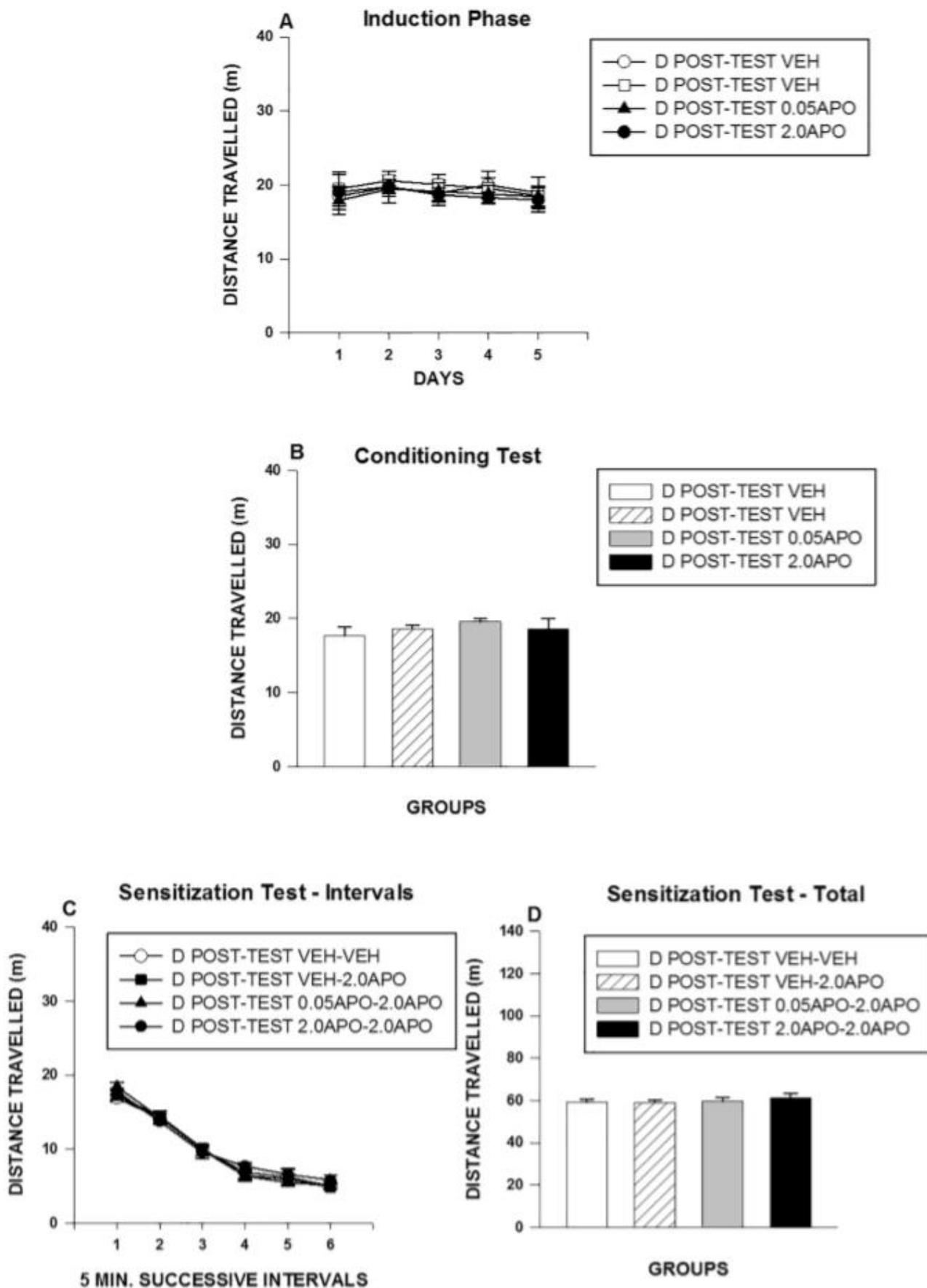


Figure 3

6. DISCUSSÃO GERAL

Interessantemente durante a primeira exposição ao ambiente experimental, dia um da fase de indução, a resposta comportamental de todos os diferentes grupos do atual trabalho, incluindo os grupos do Experimento 1 e do Experimento 2, foi semelhante. O mesmo padrão de resposta pôde ser verificado em estudos anteriores (SANTOS et al., 2015). Os tratamentos com apomorfina aplicados imediatamente após ou antes do teste no ambiente experimental (arena), diferentemente do que ocorrera com tratamentos de apomorfina aplicados 15 minutos após o teste, mostraram efeitos estimulantes ou inibitórios marcantes sobre o comportamento locomotor durante as subsequentes exposições às arenas experimentais (fase de indução dos Experimentos 1 e 2). É interessante perceber que, somente depois do primeiro tratamento com apomorfina aplicado imediatamente após o teste no ambiente experimental, e o segundo tratamento com apomorfina aplicado antes do teste (Experimento 2), foi que os efeitos estimulatórios/ inibitórios se tornaram evidentes, portanto, tais resultados só puderam ser observados a partir do 2º dia da fase de indução em ambos os Experimentos. As divergências referentes à locomoção obtida pelos diferentes grupos experimentais, aumentaram significativamente ao longo dos subsequentes dias de testes com apomorfina.

O fato dos tratamentos com o mesmo fármaco, apomorfina, administrados com um intervalo de 15 minutos após o teste na arena, não terem sido capazes de modificar o comportamento locomotor ao longo dos subsequentes dias de exposição ao ambiente experimental, supostamente exclui qualquer outro fator, que não esteja relacionado com o processo associativo, para justificar os resultados obtidos em ambos os Experimentos. Além disso, o retorno do comportamento locomotor aos níveis basais após um protocolo de extinção, observado ao longo do Experimento 1, é totalmente consistente com o efeito previsto para um protocolo de condicionamento Pavloviano. Vale ressaltar que, a resposta comportamental ao ambiente de teste nas sessões de 5 minutos, referente tanto aos grupos de veículo quanto aos que receberam seus tratamentos com intervalo de 15 minutos, permaneceu essencialmente inalterada ao longo das fases de indução do Experimento 1 e 2.

Evidentemente, a exposição breve ao novo ambiente de teste impossibilitou a ocorrência de habituação entre as sessões experimentais o que manteve o valor de novidade. Como foi detalhado por Nasello et al. (1998), o uso da iluminação de cor vermelha na arena experimental promove elevado nível de comportamento exploratório e essa consideração, juntamente com fator da novidade, podem explicar a persistência da atividade locomotora ao longo das repetidas e breves exposições ao campo aberto (arena). Essa estabilidade, na linha de base comportamental, fortalece a interpretação de que ocorrera de fato um condicionamento entre os efeitos da apomorfina, administrada imediatamente após os testes (durante as fases de indução dos Experimentos 1 e 2), e o ambiente experimental. Vale ressaltar que possibilidades alternativas como retardamento ou facilitação do processo de habituação parecem insustentáveis para justificar os dados atuais, uma vez que não houve qualquer evidência do mesmo para as respostas comportamentais referentes a todos os grupos controles.

Vale observar que o resultado indicativo de recuperação espontânea (PAVLOV, 1928), observado no Experimento 1, tenha ocorrido de forma restrita aos 5 min iniciais do teste de habituação de 30 min (teste final). Tal fato sugere que, os tratamentos administrados imediatamente após o teste na arena experimental, responsáveis pela indução de efeitos associativos, foram específicos no que tange a exposição inicial ao ambiente de teste, em detrimento de uma associação de caráter mais geral referente às pistas contextuais. De maneira mais ampla, a ocorrência do fenômeno de recuperação espontânea é extremamente significativo no que diz respeito ao condicionamento relacionado ao uso de drogas, uma vez que o protocolo de extinção é amplamente utilizado como método de tratamento para dependência química (KAPLAN et al., 2011). Sendo assim, a recuperação espontânea é um fator limitante importante no que se refere à eficácia do processo de extinção como um protocolo de tratamento.

Já fora previamente documentado que, a exposição a um novo ambiente é capaz de ativar as vias dopaminérgicas mesolímbica e mesocortical no sistema nervoso central que, por sua vez compreendem importantes estruturas cerebrais relacionadas com os mecanismos de recompensa e motivação (LEGAULT e WISE, 2001). Em estudos anteriores, fora demonstrado que os efeitos estimulantes agudos provocados pela cocaína ocorrem em

ambientes experimentais que representem novidade, entretanto, o mesmo não acontece em ambientes experimentais com os quais os sujeitos estejam previamente habituados (CAREY et al., 2005; CAREY e DAMIANOPOULOS, 2006). De fato, fora demonstrado que a resposta estimulante induzida pela cocaína pode ser atenuada por uma habituação extensiva ao ambiente experimental. Como, reconhecidamente, a eficácia de uma resposta locomotora excitatória da cocaína depende da liberação de dopamina, os resultados do presente estudo são consistentes com uma elevada liberação de dopamina devido ao fato do ambiente experimental representar uma novidade, entretanto, a liberação dopaminérgica é consideravelmente mais fraca quando ocorre habituação ao ambiente experimental.

Vale ressaltar que existe uma diferença importante entre o processo de condicionamento por drogas convencional (protocolo de condicionamento de atraso) e o protocolo de condicionamento por drogas cujos tratamentos ocorrem após o teste no ambiente experimental (condicionamento de traço). Tal diferença está relacionada à forma como se dá a ligação entre as pistas contextuais e o fármaco em questão. Em contraste com o condicionamento farmacológico contextual convencional, em que o estado fisiológico provocado pelo fármaco ocorre na presença de pistas contextuais, no condicionamento farmacológico de traço, a resposta farmacológica nunca é experimentada no ambiente do teste. O problema mais frequente do protocolo convencional refere-se às contribuições dos estímulos da droga para as pistas contextuais ocorrendo assim a sobreposição entre o estímulo incondicionado e o estímulo neutro (CAREY et al., 1999; WANG et al., 2013). Este último fator é de suma importância em relação à contribuição das pistas ambientais para o desenvolvimento de uma resposta condicionada. No condicionamento convencional produzido por agonistas dopaminérgicos, o estado de ativação dopaminérgica, induzido pelo tratamento medicamentoso, pode adquirir propriedades de incentivo para o complexo de pistas contextuais, constituído tanto pelas pistas externas quanto pelas pistas geradas pelo estado fisiológico do medicamento. Consequentemente, um teste de condicionamento conduzido na presença da mesma situação ambiental, mas na ausência dos sinais do estado medicamentoso, representa apenas um conjunto parcial das pistas contextuais.

Para o presente trabalho é importante observar que, os grupos experimentais, cujos tratamentos farmacológicos foram realizados imediatamente após o teste, nunca estiveram sob o efeito da droga quando dentro da arena experimental. Entretanto, os efeitos comportamentais expressos por esses grupos, se equipararam às respostas comportamentais obtidas pelos grupos associados que, por sua vez, obedeciam ao protocolo pavloviano convencional, isto é, cujos tratamentos farmacológicos antecederam o teste no ambiente experimental (Experimento 2). Em trabalhos anteriores do nosso laboratório (de MELLO BASTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2015; 2017), foi observado que tratamentos com apomorfina administrados imediatamente após uma sessão experimental com 5 minutos de duração em um ambiente de teste novo, foram capazes de modificar a resposta comportamental em uma subsequente sessão no mesmo ambiente experimental sem a utilização da droga. Para explicar esses efeitos obtidos através do protocolo de condicionamento de traço, sugerimos que os tratamentos com apomorfina foram capazes de alterar o nível de atividade da dopamina durante o processo de consolidação da memória e, desse modo, modificaram o valor de incentivo da associação. Aparentemente, o mesmo processo poderia justificar os efeitos obtidos pelos tratamentos com apomorfina antes do teste no ambiente experimental (protocolo de atraso), uma vez que os efeitos da apomorfina sobre a dopamina estariam presentes durante o processo de consolidação, portanto, os efeitos dos tratamentos “pré-teste” sobre a consolidação seriam similares aos produzidos pelos tratamentos aplicados imediatamente após o teste. Tal argumento parece fazer sentido uma vez que, o efeito referente aos tratamentos “pré-teste” com apomorfina só pode ser observado a partir da segunda sessão experimental da fase de indução do Experimento 2. Outro fato importante que corrobora para o mesmo argumento, diz respeito às similaridades observadas quanto as mudanças progressivas na resposta comportamental, obtidas ao longo dos 5 dias da fase de indução (Experimento 2), para ambos os protocolos de tratamentos com apomorfina.

A compreensão sobre os diversos mecanismos envolvidos com os efeitos moduladores que os tratamentos após o teste exercem sobre a memória, foi desenvolvida através de uma ampla gama de estudos. Tais estudos demonstraram que tratamentos farmacológicos, aplicados dentro de um

protocolo de “pós-teste”, são capazes de modificar a expressão de efeitos hormonais e de neurotransmissores que, por sua vez, podem melhorar ou prejudicar o processo de consolidação da memória (GASBARRI e TOMAZ, 2012; GOLD et al., 1982; MESSIER, 2004; ROOZENDAAL e MCGAUGH, 2000; DUNCAN, 1949).

Foi sugerido que os efeitos hormonais e de neurotransmissores que persistem por um breve período após o teste são relevantes para o condicionamento pavloviano (CAREY, 1987), na medida em que tais efeitos representam uma continuação da resposta incondicionada (RI) presente durante o processo de consolidação e, portanto, contribuem para a intensidade da associação. Essas considerações são relevantes para os achados do presente estudo, uma vez que a exposição a novos estímulos provoca a liberação de dopamina (LEGAULT e WISE, 2001). É interessante ressaltar que (MENEZES et al., 2015) relataram que uma exposição breve de 5 minutos a um novo ambiente evoca uma liberação de dopamina capaz de persistir após a remoção do indivíduo desse ambiente, com a ativação de vias dopaminérgicas envolvidas com importantes estruturas cerebrais e sistemas associativos, como o hipocampo. Para o presente estudo sugerimos que os tratamentos com dose baixa e elevada de apomorfina, administradas imediatamente após a remoção do animal da arena (ao longo das fases de indução dos Experimentos 1 e 2), foram associadas com a ativação dopaminérgica induzida pelo ambiente de teste (que por sua vez não perdeu a característica da novidade) de tal forma que, a dose baixa de apomorfina atenuou a ativação da dopamina e a dose elevada de apomorfina aumentou o estado de ativação da dopamina. Uma vez que a inativação ou ativação da dopamina diminui ou aumenta o valor de saliência ou incentivo dos estímulos (BENINGER, 1983; KOOB et al., 1998), sugerimos que os efeitos de saliência e incentivo dopaminérgicos, induzidos pela apomorfina, são, portanto, associados ao processo de consolidação da associação existente entre estímulo e resposta. Dessa forma, as associações consolidadas em um estado de elevada ativação dopaminérgica possuem valores de incentivo e saliência reforçados, ao passo que, associações consolidadas em um estado de baixa ativação dopaminérgica possuem valores reduzidos. Seguindo esse raciocínio, a dose baixa de apomorfina, aplicada imediatamente após o teste, diminuiria o nível de atividade da dopamina durante o processo de consolidação,

de modo que, o valor de incentivo dos novos estímulos ambientais incorporados à memória seria diminuído e a subsequente resposta comportamental seria similarmente atenuada. Para o tratamento com doses altas de apomorfina, aplicados imediatamente após o teste, o estado de ativação da dopamina seria elevado e a associação consolidada referente ao ambiente novo seria aumentada quanto ao seu valor de incentivo e, conseqüentemente, a subsequente resposta comportamental seria potencializada.

Outro ponto interessante foi observado no teste de sensibilização realizado no último dia do Experimento 2 do presente estudo. Embora, na fase de indução, tanto o grupo que recebera seu tratamento com apomorfina na dose de 2,0 mg/kg antes do teste na arena, quanto o grupo que recebera seu tratamento com apomorfina na mesma dose imediatamente após o teste, tenham exibido uma resposta locomotora sensibilizada (durante o teste de sensibilização), o efeito foi substancialmente mais proeminente no grupo pré-teste. É importante ressaltar que os protocolos de teste para sensibilização e condicionamento possuem diferenças substanciais. Em testes para avaliar os efeitos farmacológicos condicionados de Pavlov (Teste de condicionamento do Experimento 2), a resposta condicionada é avaliada exclusivamente na presença dos estímulos condicionados, sem que o tratamento farmacológico esteja presente. Em contraste, para sensibilização, tanto o tratamento medicamentoso quanto os estímulos condicionados estão presentes. Alguns trabalhos prévios (CAREY et al., 2005; WILKINSON et al., 2009) demonstraram que os tratamentos farmacológicos podem fornecer estímulos medicamentosos que, por sua vez, podem contribuir para o complexo de estímulo contextual. Essa consideração é importante para a interpretação dos dados obtidos no teste de sensibilização do Experimento 2, uma vez que, os estímulos incondicionados da apomorfina podem ter interferido no processo de associação. A fim de melhor abordar esta possibilidade, no entanto, seria necessário dispor de outros grupos APO 2.0 pré-teste e pós-teste que, durante o teste de sensibilização fossem testados com veículo de modo que, os efeitos provocados pela aplicação de apomorfina na dose de 2,0 mg/kg, nesse último teste, possam ser diferenciados dos efeitos exclusivos do condicionamento.

Essa estreita correspondência entre as respostas comportamentais, observadas no presente estudo, obtidas através dos tratamentos com

apomorfina tanto no protocolo de condicionamento de atraso (pré-teste), quanto no protocolo de condicionamento de traço (pós-teste), não ocorreria se o ambiente de teste fosse familiar aos animais. Neste caso, os resultados obtidos através da comparação entre os efeitos dos tratamentos pré-teste de apomorfina com os efeitos dos tratamentos pós-teste, seriam muito diferentes. Como relatado previamente (de MELLO BASTOS et al., 2014), os tratamentos com dose baixa / elevada de apomorfina, administrados imediatamente após uma exposição de 5 min a um ambiente de teste familiar, são incapazes de afetar a atividade comportamental subsequente no mesmo ambiente de teste. Evidentemente, nesse caso, a experiência ambiental já fora previamente consolidada e, portanto, não há processos de consolidação passíveis de interação com a atividade dopaminérgica induzida pelos tratamentos com apomorfina aplicados imediatamente após o teste. Por outro lado, se os tratamentos com dose elevada de apomorfina forem administrados antes da exposição de 5 minutos a um ambiente familiar, os efeitos comportamentais observados serão proeminentes. A ativação dopaminérgica evocada pela dose elevada de apomorfina é capaz de transformar os estímulos habitados em estímulos de incentivo altamente salientes, análogos aos estímulos provocados pelo fator da novidade de um ambiente não familiar, e, portanto, os mecanismos de consolidação são ativados. Dessa forma, o tratamento com doses elevadas de apomorfina é capaz de transformar estímulos habitados em estímulos salientes de incentivo e os efeitos estimulantes da dopamina podem persistir após o teste para modificar os processos de consolidação.

7. CONCLUSÃO

- As recentes descobertas de que os efeitos comportamentais induzidos pelas administrações de apomorfina imediatamente após o teste, sofrem extinção e recuperação espontânea parecem consistentes com as características do condicionamento pavloviano.
- O protocolo de condicionamento de traço, parece ser uma maneira eficiente de induzir efeitos condicionados à droga sendo relevante para a gênese e manutenção das propriedades abusivas das mesmas.
- Os resultados obtidos no presente estudo também indicam que, o uso de uma breve exposição a um novo ambiente com tratamentos farmacológicos pré / pós-teste, pode fornecer um protocolo útil para examinar novas formas de estudar o processo de condicionamento induzido por drogas.
- A equivalência da resposta condicionada e sensibilizada obtida tanto pelo protocolo de condicionamento de atraso, quanto pelo protocolo de condicionamento de traço, mas que não pôde ser observada nos tratamentos que ocorreram 15 minutos após o teste na arena experimental, aponta para um papel importante desempenhado pela atividade dopaminérgica, induzida pelo fármaco, durante o processo de consolidação da memória.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADINOFF, B. Neurobiologic Processes in Drug Reward and Addiction. **Harvard Review of Psychiatry**, v. 12(6) p. 305–320, 2004.

AGHAJANIAN, G.K., BUNNEY BS. Central dopaminergic neurons: neurophysiological identification and responses to drugs. In: Snyder S, Usdin E, editors. *Frontiers in catecholamine research*. **New York: Pergamon**, p. 643–8, 1973.

ALBERINI, C.M. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? **Trends Neurosci**, v. 28 p. 51–56, 2005.

BABB, S.J., CRYSTAL, J.D. Episodic-like memory in the rat. *Curr Biol* v. 16, p.1317-1321, 2006. BADIANI, A; ROBINSON, T.E. Drug-induced neurobehavioral plasticity: the role of environmental context. **Behavioral Pharmacology**, v. 15, p. 327-39, 2004.

BANASIKOWSKI, T.J., BENINGER, R.J. Haloperidol conditioned catalepsy in rats: a possible role for D1-like receptors. **Int J Neuropsychopharmacol** v.15;p.1525–34, 2012a.

BANASIKOWSKI, T.J., BENINGER, R.J. Reduced expression of haloperidol conditioned catalepsy in rats by the dopamine D3 receptor antagonists nafadotride and NGB 2904. **Eur Neuropsychopharmacol** n.22; p.761–8, 2012b

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

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

BEDINGFIELD, J. B.; CALDER, L. D.; THAI, D. K. KARLER, R. The role of the striatum in the mouse in behavioral sensitization to amphetamine. **Pharmacology Biochemistry and Behavioral**, v.56, p. 305-310, 1996.

BENINGER, R.J. The role of dopamine in locomotor activity and learning. **Brain Res.** 287:173196, 1983.

BENINGER, R.J. Receptor subtype-specific dopamine agonists and antagonists and conditioned behaviour. In: Willner, P., Scheel-Kruger, J. (Eds.), **The Mesolimbic Dopamine System: From Motivation to Action.** Wiley, Chichester, pp. 273–299, 1991

BENINGER, R.J., Herz, R.S. Pimozide blocks establishment but not expression of cocaine-produced environment-specific conditioning. **Life Sci.** 38, 1425–1431, 1986.

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

BERKE, J. D.; HYMAN, S. E. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. **Neuron**, v. 25, p. 515–532, 2000.

BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E. The mind of an addicted brain: neural sensitization of wanting versus liking. **Current Direct Psychology Science.**, v.4, p. 71-76, 1995.

BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E. What's the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? **Brain Research Reviews**, v. 28, p. 309–369, 1998.

BESHEER, J., JENSEN, H.C., BEVINS, R.A. Dopamine antagonism in a novel-object preference and a novel-object place conditioning preparation with rats. **Behav. Brain Res.** n.103, p.35–44, 1999.

BEVINS, R.A., BARDO, M.T. Conditioned increase in place preference by access to novel objects: antagonism by MK-801. **Behav. Brain Res.** n.99; p.53–60, 1999.

BEVINS, R.A., BESHEER, J., PALMATIER, M.I., JENSEN, H.C., PICKETT, K.S., EUREK, S. Novel-object place conditioning: behavioral and dopaminergic processes in expression of novelty reward. **Behav. Brain Res.** n.129, p.41–50, 2002.

BEVINS, R.A., KOZVAROVA, J., ARMIGER, T.J. Environmental familiarization in rats: differential effects of acute and chronic nicotine. **Neurobiol. Learn. Mem.** n.75; p.63–76, 2001.

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.449-57, 2007.

BOROWSKI, B., KUHN, C.M. Chronic cocaine administration sensitizes behavioral but no neuroendocrine responses. **Brain Res**, 543: 301-306, 1991.

BOUTON, M.E. Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. **Psychol Bull**, 114:80–99, 1993.

BRAGA, P., GALVANHO, J.P., BLOISE, E., CAREY, R.J., CARRERA, M.P. The expression of locomotor sensitization to apomorphine is dependent on time interval between injection and testing. **Pharmacol Biochem Behav.** n.91, p.278–82, 2009a.

BRAGA, P.Q., DIAS, F.R., CAREY, R.J., CARRERA, M.P. 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.

BRUCHEY, A.K., SHUMAKE, J., GONZALEZ-LIMA F. Network model of fear extinction and renewal functional pathways. **Neuroscience**, 145:423–437, 2007.

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.

CANNON, C.M., BSEIKRI, R. Is dopamine required for natural reward? Claire, M; Mustafa, R. **Psychopharmacology and Behavioral**, v. 81, p. 741-48, 2004.

CAPRIOLI, D. et al. Modeling the role of environment in addiction. **Neuro Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 31, p. 1639-53, 2007.

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

CAREY, R.J., CARRERA, M.P., DAMIANOPOULOS EN. A new proposal for drug conditioning with implications for drug addiction: The Pavlovian two-step from delay to trace conditioning. **Behav Brain Res**, n.275; p.150-156, 2014.

CAREY, R.J., DAMIANOPOULOS, E.N. Cocaine conditioning and sensitization: the habituation factor. **Pharmacol. Biochem. Behav**, n. 84, p. 128–133, 2006.

CAREY, R.J., DAMIANOPOULOS, E.N., SHANAHAN, A.B. Cocaine conditioned behavior: a cocaine memory trace or an anti-habituation effect. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 90, p. 625–31, 2008.

CAREY, R.J., DEVEAUGH-GEISS, J. Treatment schedule as a determinant of the development of tolerance to haloperidol. **Psychopharmacology (Berl)** n.82; p.164–7, 1984.

CAREY, R.J., GUI, J. Cocaine conditioning and cocaine sensitization: what is the relationship? **Behav. Brain Res.** 92, 67–76, 1998.

CARR, G.D., WHITE, N.M. Effects of systemic and intracranial amphetamine injections on behavior in the open field: a detailed analysis. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 27, p. 113-122, 1987.

CARRERA, M.P., CAREY.R.J., DIAS.F.R.C., SAMPAIO, F.S., MATOS, L.W. Most-trial apomorphine at an autoreceptor dose level can eliminate apomorphine conditioning and sensitization: Support for the critical role of dopamine in re-consolidation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.236, p.244-250, 2012.

CASTNER, S. A., GOLDMAN-RAKIC, P. S. Long-lasting psychotomimetic consequences of repeated low-dose amphetamine exposure in rhesus monkeys. **Neuropsychopharmacology**, v. 20, p.10–28, 1999.

COOPER, J., BLOOM, F., ROTH, R. **The biochemical basis of neuropharmacology**. Oxford University Press, New York, 2003.

CRYSTAL, J.D. Elements of episodic- like memory in animal models. **Behav Processes** v. 80, p.269-277, 2009.

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.

DE 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.317-24, 2010.

DE MELLO BASTOS, J.M., DIAS, F.R., ALVES, V.H., CAREY RJ, CARRERA MP. 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. **Behav Brain Res** n.260; p.139–47, 2014.

DE OLIVEIRA, A.R., REIMER, A.E.; MACEDO, C.E.A.; CARVALHO, M.C.; SILVA, M.A.S.; BRANDÃO, M.L. Conditioned fear is modulated by D2 receptor pathway connecting the ventral tegmental área and basolateral amygdale. **Neurobiology of learning and memory**, v.95, p.37-45, 2011.

DELAMATER, A.R. Issues in the extinction of specific stimulus-outcome associations in Pavlovian conditioning. **Behavioural Processes**, p. 11, 2012.

DIAS, F.R., CAREY, R.J., CARRERA, M.P. Apomorphine-induced context specific behavioural sensitization is prevented by the D1 antagonist SCH-23390 but potentiated and uncoupled from contextual cues by the D2 antagonist sulpiride. **Psychopharmacology**, v. 209, p. 137-157-1, 2010.

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

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

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

DUVARCI, S., NADER, K. Characterization of fear memory reconsolidation. **J Neurosci**, v. 24, p.9269-9275, 2004.

FEIFEL, D., KRISTIANNE, P., ELIZABETH, J.M., CHRISTOPHER, J.M. Sensorimotor gating effects produced by repeated dopamine agonists in a

paradigm favoring environmental conditioning. **Psychopharmacology**, v. 162, p. 138-146, 2002.

FILIP, M., ALENINA, N., BADER, M., PRZEGALIŃSKI, E. Behavioral evidence for the significance of serotonergic (5-HT) receptors in cocaine addiction. **Addict. Biol.**, v. 15, p. 227–249, 2010.

FONTANA, D. et al. The role of D1 and D2 dopamine receptor in the acquisition and expression of cocaine-induced conditioned increases in locomotor behavior. **Behavioral Pharmacology**. v. 4, p. 375-387, 1993.

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

GLASER, V., CARLINI, V.P., GABACH, L., GHERSI, M., DE BARIOGLIO, S.R., RAMIREZ, O.A., PEREZ, M.F., LATINI, A. The intra-hippocampal leucine administration impairs memory consolidation and LTP generation in rats. **Cell Mol Neurobiol** v.30, p.1067-1075, 2010.

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

GRAEFF, F.G., GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. 1ª. São Paulo (SP): Atheneu; 1998.

GUZMÁN, F. (N.D.). The Four Dopamine Pathways Relevant to Antipsychotics Pharmacology [Video blog post]. November 15, 2016.

HARRIS, J.D. Habituated response decrement in the organism. **Psychological Bulletin**, v.40, p.385-422, 2000.

HEIDBRENNER, C.S., SHIPPENBERG, T.S. U-69593 prevents cocaine sensitization by normalizing basal accumbens dopamine. **NeuroReport**, 5: 1797-1780, 1994.

HOLLAND, P.C. **Occasion setting in Pavlovian conditioning**. In: Medlin DL, editor. *The psychology of learning and motivation*. San Diego: Academic Press; p. 28, 1992.

HOPE, B. T. et al. Cocaine-induced locomotor activity and Fos expression in nucleus accumbens are sensitized for 6 months after repeated cocaine administration outside the home cage. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 867-875, 2006.

HYMAN, S. E. et al. Neural Mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. **The annual review of neuroscience**. v. 29, 2006.

INDA, M.C., MURAVIEVA, E.V., ALBERINI, C.M. Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. **J Neurosci** v.31, p.1635-1643, 2011.

ITO, R., ROBBINS, T.W., EVERITT, B.J. Differential control over cocaine seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. **Nature Neuroscience**, v. 7, p.97-389, 2004.

IZQUIERDO, I., DIAS, R.D. Endogenous state-dependency:memory regulation by post-training and pre-testing administration of ACTH, beta -endorphin, adrenaline and tyramine. **Braz J Med Biol Res**, v. 16, p.55-64, 1983 a.

IZQUIERDO, I., DIAS RD. Memory as a state dependent phenomenon: role of ACTH and epinephrine. **Behav Neural Biol**, v. 38, p.144-149, 1983 b.

IZQUIERDO, I. *Memória*. Porto Alegre: Artes Médicas; 2002.

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

KALIVAS, P.W., DUFFY, P. Similar effects of daily cocaine and stress on mesocorticolimbic dopamine neurotransmission in the rat. **Biological Psychiatry**, v. 25, p. 913-928, 1991.

KALIVAS, P.W., MANJI, H. K. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. **Neuropsychopharmacology**, v.33, p. 56-72, 2008.

KALIVAS, P. W., VOLKOW, N. D. The Neural Basis of Addiction: A Pathology of Motivation and Choice. **Am J Psychiatry**, 2005

KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H., JESSEL, T.M. Fundamentos da neurociência e do comportamento. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000.

KAPLAN, G.B., HEINRICHS, S.C., CAREY, R.J. Treatment of addiction and anxiety using extinction approaches: Neural mechanisms and their treatment implications. **Pharmacol Biochem Behav**, n.97; p.619-625, 2011.

KARLER, R., CHAUDHRY, I.A., CALDER, L.D., TURKANIS, S.A. Amphetamine behavioral sensitization and the excitatory amino acids. **Brain Research**, v. 537, p. 76–82, 1990.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia: Básica & Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 9 ed., 2005.

KELLY, P.H., SEVIOUR, P.W., IVERSEN, S.D. Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. **Brain Research**, v. 94, p. 507–522, 1975.

KENTROS, C.G., AGNIHOTRI, N.T., STREATER, S., HAWKINS, R.D., KANDEL, E.R. Increased attention to spatial context increases both place field stability and spatial memory. **Neuron** v.42, p.283-295, 2004.

KLANN, E., SWEATT, J.D. Altered protein synthesis is a trigger for long-term memory formation. **Neurobiol Learn Mem**, v. 89, p.247-259, 2008

KONORSKI, J. Integrative Activity of the Brain. University of Chicago Press; 1967.

LATTAL, K.M., BERGER, G. Anisomycin disrupt a contextual memory following reactivation in a cocaine induce locomotor activity paradigm. **Behavioral Neuroscience**, v. 121, p. 156-163, 2006.

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

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. Edição São Paulo: Atheneu; 2001.

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

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

LI, A. et al. Apomorphine-induced activation of dopamine receptors modulates FGF-2 expression in astrocytic cultures and promotes survival of dopaminergic neurons. **The FASEB Journal**, 2012 Disponível em: <<http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.05-5510fje>>.

LI, A., et al. Apomorphine-induced activation of dopamine receptors modulates FGF-2 expression in astrocytic cultures and promotes survival of dopaminergic neurons. **The FASEB Journal**. v.20, p.1263-5, 2006.

MAJUMDAR, A., MANGAL, N. S. Hyperprolactinemia. In Principles and Practice of Controlled Ovarian Stimulation in ART. **Springer India**. pp. 319-328, 2015

MARCOS, J.M.B., DIAS, F.R.C., ALVES, V.H.N., CAREY, R.J., CARRERA, M.P. Drug memory substitution during re-consolidation: A single inhibitory autoreceptor apomorphine treatment given during psychostimulant memory re-consolidation replaces psychostimulant conditioning with conditioned inhibition

and reverses psychostimulant sensitization. **Behavioural Brain Research** v.260; p.139–147, 2014.

MATTIGLY, B. A., GOTSICK, C. M. Locomotor activity and stereotypy in rats following repeated apomorphine treatments at 1-, 3-, or 7- day intervals. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 31, p. 871-875, 1988.

MATTINGLY, B. A., GOTTISICK, J. E. Conditioning and experimental factors affecting the development of sensitization to apomorphine. **Behaviour Neuroscience**, 1989

MATTINGLY, B. A., HART, T.C., LIM, K., PERKINS, C. Selective antagonism of dopamine D1 and D2 receptors does not block the development of behavioral sensitization to cocaine. **Psychopharmacology**, 114: 239-242, 1994.

MATTO, V., VAARMANN, A., RUDISSAAR, R., PRUUS, K., SKREBUHHOVA-MALMROS, T., ALLIKMETS, L. Apomorphine-induced aggressive behaviour and post-mortem monoamine content in male Wistar rats. **Neurosci Lett**, n. 289,p.131-134, 2000.

MAZURSKI, E.J., BENINGER, R.J. Effects of selective drugs for dopaminergic D1 and D2 receptors on conditioned locomotion in rats. **Psychopharmacology**, v. 105, p. 107–112, 1991.

MCGAUGH, J.L. Memory--a century of consolidation. **Science**, n. 287, p. 248–251, 2000.

MILTON, A.L., EVERITT, B.J. The persistence of maladaptative memory: addiction, drug memories and anti-relapsed treatments. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 36:1119-1139, 2012.

MISSALE, C., NASH, S. R., ROBINSON, S. W., JABER, M., CARON, M. G. Dopamine receptors: from structure. **Physiology Review**, v. 78, 189-225,1998.

MOREM, M.B., MEDEIROS, C.A. Princípios Básicos de Análise do Comportamento. Ed. **Artmed**, p. 30-46, 2007.

MORGAN, M.A., SCHULKIN, J., LEDOUX, J.E. Ventral medial prefrontal cortex and emotional perseveration: the memory for prior extinction training. **Behav Brain Res**, n. 146, p.121–130, 2003.

NADEL, L., SAMSONOVICH, A., RYAN, L., MOSCOVITCH, M. Multiple trace theory of human memory: computational, neuroimaging, and neuropsychological results. **Hippocampus** v.10, p.352-368, 2000.

NADER, K., EINARSSON, E.O. Memory reconsolidation: an update. **Ann N Y Acad Sci** v.1191, p.27-41, 2010

NASELLO, A.G., MACHADO, C., BASTOS, J.F., FELICIO, L.F., 1998. Sudden darkness induces a high activity-low anxiety state in male and female rats. **Physiol Behav**, v. 63, p. 451-454, 1998.

NESTLER, E. J., HYMAN, S. E., MALENKA, R.C. **Molecular neuropharmacology**. McGraw-Hill, New York, 2001.

O'KEEFE, J., NADEL, L. **Hippocampus as a cognitive map**. Oxford University Press, Londres, 1978.

O'BRIEN, C. P. **Dependência e uso abusivo de drogas**. IN: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN, A. G. (eds.). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9 ed. McGraw Hill Interamericana, p. 405-420, 1996.

ORDOÑEZ, R.A.S. Reconsolidação da memória e dependência de estado: mecanismos de atualização. Dissertação de Mestrado, UFRGS, 133p, 2012.

PAULSON, P. E., CAMP, D. M., ROBINSON, T. E. The time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. **Psychopharmacology**, 1991. v. 103, p. 480–492, 1991.

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

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

PIERCE, R.C., CRAWFORD, C.A., NONNEMAN, A.J., MATTINGLY, B.A., BARDO, M.T. Effects of forebrain dopamine depletion on novelty-induced place preference behavior in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** n.36, p.321–325, 1990.

PIERCE, R. C., KALIVAS, P. W. Amphetamine produces sensitized increases in locomotion and extracellular dopamine preferentially in the nucleus accumbens shell of rats administered repeated cocaine. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 275, p. 1019-1029, 1995.

PLATEL, A., PORSOLT, R.D. Habituation of exploratory activity in mice: a screening test for memory enhancing drug. **Psychopharmacology.** n.78; p.346-352, 1982.

QUIRK, G.J., RUSSO, G.K., BARRON, J.L., LEBRON, K. The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished fear. **J Neurosci**, v. 20, p. 6225–6231, 2000.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M. O Sistema Nervoso Central. IN:**Farmacologia**. Ed.Guanabara Koogan. 4^a ed. Caps. 31,34,39, 2001.

RAUCH, S.L., SHIN, L.M., PHELPS, E.A. Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: human neuroimaging research--past, present, and future. **Biol Psychiatry**, v. 60, p. 376–382, 2006

RESCORLA, R.A., HETH, C.D. Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus. **Exp Psychol Anim Behav Process**, v.1, p. 88–96, 1975

RIBARIC, Samo. The Pharmacological Properties and Therapeutic Use of Apomorphine. **Molecules**, v. 17, 2012.

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. **Brain Research Reviews**, 11:157-189, 1986.

ROBINSON, C.E., BERRIDGE, K.C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Res Rev** n.18; p.247–91, 1993.

ROBLEDO, P., MALDONADO-LOPEZ, R., KOOB, G.F. Role of dopamine receptors in the nucleus accumbens in the rewarding properties of cocaine. **Ann N Y Acad Sci** n.654; p.509–512, 1992.

ROOZENDAAL, B., MCEWEN, B.S., CHATTARJI, S. Stress, memory and the amygdala. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, p. 423-433, 2009.

ROOZENDAAL, B. Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. **Neurobiol Learn Mem**, v. 78, p. 578-595, 2002.

ROTHBAUM, B.O., DAVIS, M. Applying learning principles to the treatment of post-trauma reactions. **Ann N Y Acad Sci**, n. 1008, p. 112–121, 2003.

ROUTTENBERG, A., REKART, J.L. Post-translational protein modification as the substrate for long-lasting memory. **Trends Neurosci**, v. 28, p. 12–19, 2005.

ROWLETT, JK., MATTINGLY, B.A., BARDO, M.T. Locomotor activity and dopamine synthesis following 1 and 15 days of withdrawal from repeated apomorphine treatments. **Pharmacol Biochem Behav** n.57; p.13–8, 1997.

RUDISSAAR, R., HARRO, J., PRUUS, K., RINKEN, A., ALLIKMETS, L. Repeated administration of the dopaminergic agonist apomorphine: development of apomorphine aggressiveness and changes in the interaction between

dopamine D(2) receptors and G-proteins. **Pharmacol Rep**, v. 60, p. 827-833, 2008.

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. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v.156, p. 24-29, 2017.

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. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v.129 p. 79-86, 2015.

SCHELLING, G. Effects of stress hormones on traumatic memory formation and the development of posttraumatic stress disorder in critically ill patients. **Neurobiol Learn Mem**, v. 78, p. 596-609, 2002.

SUZUKI, A., JOSSELYN, S.A., FRANKLAND, P.W., MASUSHIGE, S., SILVA, A.J., KIDA, S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. **J Neurosci**, v. 24, p. 4787-4795, 2004.

SWERDLOW, N.R., MANSBACH, R.S., GEYER, M.A., KOOB, G.F., BRAFF, D.L. Amphetamine disruption of prepulse inhibition of acoustic startle is reversed by depletion of mesolimbic dopamine. **Psychopharmacology**, v. 100, p. 413-416, 1990.

THOMPSON, R.F. The search for the engram. **Am Psychol**, v. 31, p. 209-227, 1976.

THORPE, W.H. **Learning and instinct in animals**. 2. ed. London, Methuen, 1963.

TODTENKOPF, M. S., CARREIRAS, T., MELLONI, R.H., STELLAR, J. R. The dorsomedial shell of nucleus accumbens facilitates cocaine induced locomotor

activity during of behavioral sensitization. **Behavioral Brain Research**, v. 131, p. 9-16, 2002.

TODTENKOPF, M. S., STELLAR, J. R., WILIAMS, E. A., ZAHM, D. S. Differential distribution of parvalbumin immunoreactive neuros in the striatum of cocaine sensitized rats. **Neuroscience**, v.127, p. 35-42, 2004.

VALJENT, E. et al. Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. **BMC Neuroscience**, 2006.

VOLKOW, N. D. *et al.* Addiction: Beyond dopamine reward circuitry. **PNAS**, v. 108, n. 37, 2011.

WALLENSTEIN, G.V., VAGO, D.R., WALBERER, A.M. Time-dependent involvement of PKA/PKC in contextual memory consolidation. **Behav Brain Res**, v. 133, p. 159-164, 2002.

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., BOUWMEESTER, H., POWER, J.M., DISTERHOFT, J.F., 1999. Hippocampal lesions prevent trace eyeblink conditioning in the freely moving rat. **Behav. Brain Res**, v. 99, p. 123–132.

WOLF, M. E. Addiction: making the connection between behavioral changes and neuronal plasticity in specific pathways. **Mol Intervent**, v. 2, p. 146-157, 2002.

YADAV, S. K., PRAKASH, J., CHOUHAN, S., WESTFALL, S., VERMA, M., SINGH, T. D., SINGH, S. P. Comparison of the neuroprotective potential of Mucuna pruriens seed extract with estrogen in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced PD mice model [Abstract]. **Neurochemistry International**, 65, 1-13, 2014.

YAMAGUCHI, S., HALE, L.A., D'ESPOSITO, M. et al. Rapid Prefrontal–Hippocampal Habituation to Novel Events. **The Journal of Neuroscience**, v.23, p.5356 –5363, 2004.