

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

JOÃO MARCOS DE MELLO BASTOS

**INTERFERÊNCIA DA INIBIÇÃO DOPAMINÉRGICA NA JANELA DE
CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA E SEUS EFEITOS NA DEPENDÊNCIA
QUÍMICA À MORFINA**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
2021

JOÃO MARCOS DE MELLO BASTOS

**INTERFERÊNCIA DA INIBIÇÃO DOPAMINÉRGICA NA JANELA DE
CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA E SEUS EFEITOS NA DEPENDÊNCIA
QUÍMICA À MORFINA**

“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. Marinete Pinheiro Carrera

CAMPOS DOS GOYTACAZES
2021

JOÃO MARCOS DE MELLO BASTOS

**INTERFERÊNCIA DA INIBIÇÃO DOPAMINÉRGICA NA JANELA DE
CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA E SEUS EFEITOS NA DEPENDÊNCIA
QUÍMICA À MORFINA**

“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”.

Aprovada em 01 de junho 2021.

Membros da Comissão Examinadora:

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

Prof. Breno Garone dos Santos
(DSc, Ciência Animal) – UNESA

Prof^a. Flávia Regina Cruz Dias
(DSc, Produção Animal) – UNIG

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

CAMPOS DOS GOYTACAZES
2021

À minha esposa Camila, pelo carinho, amor e compreensão.

À minha mãe Eloides, por estar sempre comigo em todas as etapas da minha vida.

Às minhas irmãs Fabiana e Sarah pelo carinho e orações.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre comigo me suprimdo todas as minhas necessidades;

Agradeço à minha esposa Camila, por todo o amor, carinho e companheirismo;

À minha mãe Eloides, minhas irmãs Fabiana e Sarah, minhas sobrinhas Alice e Ana Paula, meu cunhado Helielson, e aos meus sogros Luis e Rosângela, pelo carinho e orações;

Agradeço à minha orientadora, Dr.^a Marinete Pinheiro Carrera, pelo profissionalismo, dedicação e orientação na pesquisa;

Agradeço ao professor Rodrigo R. de Oliveira, pela amizade e por ter me direcionado a entrar na área da pesquisa;

Agradeço à professora Flávia Dias, pela amizade e orientações na jornada acadêmica;

Agradeço o companheirismo e o aprendizado que obtive de todos os membros do nosso grupo do Laboratório de Farmacologia;

Agradeço ao meu grande amigo, Joaquim, pelo companheirismo nos experimentos e nos estudos;

Agradeço à Joana, do biotério Central da UENF, pela gentileza ao entregar os animais;

Agradeço o profissionalismo e gentileza de Jovana Ferraz Cerqueira Campos, Conceição Custódio dos Santos, ao Prof. Ricardo Augusto Mendonça Vieira (coordenador anterior) e ao Prof. Alberto Magno Fernandes da coordenação de pós-graduação em Ciência Animal;

Agradeço à UENF (Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro) e ao CCTA (Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias);

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de Doutorado;

Agradeço aos professores (as) Dr.^a. Ana Bárbara, Dr. Breno Garone e Dr.^a. Flávia Dias, pela participação na banca de análise dessa tese.

Não temas, porque eu sou contigo. Não
te assombres, porque eu sou o teu Deus.
Eu te fortaleço, e te ajudo e te sustento
com a minha destra fiel.

(Isaías, 41:10)

RESUMO

A dependência química é classificada como um transtorno psiquiátrico de caráter crônico, progressivo, marcada pela necessidade incontrolável de usar a droga de forma compulsiva. Tal transtorno pode produzir vários prejuízos às funções cerebrais ligadas à cognição, tais como: emoções; memória e aprendizado; e motivação. No decorrer da doença são muito comuns as reincidivas dos sintomas, ou recaídas, o que torna a terapia difícil e desafiadora. Existem diferentes famílias de drogas de abuso que produzem dependência. Várias delas possuem em comum a capacidade de aumentar a liberação de dopamina em estruturas do sistema de recompensa cerebral e alterar de forma molecular e duradoura estes circuitos. Dentre as drogas de abuso, a morfina é um analgésico agonista opioide que apresenta um grande potencial para produzir dependência. Ela atua de modo a ativar receptores opioides na área tegmentar ventral, levando à ativação da via mesocorticolímbica e à liberação de dopamina em área ligada aos circuitos de recompensa. A neurobiologia da dependência é multifatorial e envolve fatores ambientais e genéticos. Estudos comportamentais demonstraram a existência de dois processos que atuam na gênese e manutenção da dependência química. O primeiro deles é o condicionamento no qual o ambiente ou pistas ambientais associadas à ingestão das drogas podem desencadear um efeito semelhante à droga e induzir um desejo intenso de consumo ou à recaída, e o segundo é a sensibilização comportamental, caracterizada pelo aumento progressivo de uma determinada resposta comportamental, quando a mesma dose da droga é administrada. Drogas de abuso têm grande capacidade de induzir o condicionamento e sensibilização, devido aos seus efeitos estimulantes dopaminérgicos. A associação desses efeitos são os maiores desafios no tratamento da dependência e na sua redução - foco crucial no tratamento. Existem teorias que relacionam o processo de recaída em consequência da formação de memórias associadas à droga. Essas memórias podem manter os comportamentos de busca e consumo de drogas, acarretando o comportamento de procura pela droga no período de abstinência. Sabe-se que as memórias consolidadas retornam ao seu estado vulnerável e precisam passar por um novo processo de estabilização, que depende da síntese proteica e de outros mecanismos moleculares, chamado de processo de reconsolidação. Assim sendo, manipulações dopaminérgicas que visem o bloqueio e/ou atenuação do desenvolvimento de memória, condicionamento e sensibilização podem interferir na dependência química. O objetivo do trabalho foi avaliar se o tratamento antidopaminérgico utilizando a apomorfina na dose de 0,05 mg/kg, prejudicaria/atenuaria a consolidação da memória e expressão dos processos de condicionamento e sensibilização comportamental induzidos por morfina na dose de 10,0 mg/kg. Para analisar tais efeitos, o trabalho foi dividido em dois experimentos, contando com as etapas de: habituação, fase de indução, retirada, teste de condicionamento e teste de sensibilização. No experimento 1, a fase de indução teve duração de cinco dias, nos quais, os animais receberam um tratamento pré-arena de morfina (10,0 mg/kg) ou veículo, após serem

retirados da arena experimental, imediatamente um grupo de animais recebeu o tratamento pós-arena com apomorfina (0,05 mg/kg) ou veículo. O mesmo tratamento pós-arena, foi administrado em outro grupo de animais, mas foi esperado passar 15 minutos após serem retirados da arena. Posteriormente, ocorreu a fase de retirada e, em dias distintos, foram desenvolvidos os testes de condicionamento, retirada e teste de sensibilização comportamental. Já no experimento 2, a fase de indução teve duração de 10 dias, nos quais, os animais receberam um tratamento pré-arena de morfina (10 mg/kg) ou veículo, após serem retirados da arena experimental, imediatamente um grupo de animais recebeu o tratamento pós-arena com apomorfina (0,05 mg/kg) ou veículo. Nesse experimento, não teve o grupo que recebeu o tratamento 15 minutos após os animais serem retirados da arena. Foram aplicadas as mesmas metodologias do experimento 1 para as demais fases. Os resultados mostraram que a morfina produz condicionamento e sensibilização, fortalecendo a consolidação da memória. E os tratamentos farmacológicos administrados durante o período da reconsolidação prejudicam a consolidação da memória. Tomados juntos, os resultados sugerem que manipulações na reconsolidação da memória podem ser uma ferramenta útil no tratamento da dependência química.

Palavras-chave: Dependência Química; Morfina; Condicionamento; Sensibilização; Consolidação da Memória.

ABSTRACT

Drug addiction is classified as a chronic, progressive psychiatric disorder marked by the uncontrollable need to use the drug compulsively. Such a disorder can produce several damages to brain functions linked to cognition, such as; emotions, memory and learning and motivation. During the course of the disease, recurrences of symptoms or relapses are very common, which makes therapy difficult and challenging. There are different families of addictive drugs of abuse. Several of them have in common the ability to increase the release of dopamine in structures of the brain reward system and alter these circuits in a molecular and lasting way. Among the drugs of abuse, morphine is an opioid agonist analgesic that has great potential for producing addiction. It acts in a way to activate mi opioid receptors in the ventral tegmental area, leading to activation of the mesocorticolimbic pathway and the release of dopamine in an area linked to the reward circuits. The neurobiology of addiction is multifactorial and involves environmental and genetic factors. Behavioral studies have demonstrated the existence of two processes that act in the genesis and maintenance of drug addiction. The first is conditioning in which the environment or environmental cues associated with drug ingestion can trigger a drug-like effect and induce an intense desire to consume or relapse, and the second is behavioral awareness, characterized by the progressive increase in a certain behavioral response, when the same dose of the drug is administered. Abuse drugs have a great capacity to induce conditioning and sensitization, due to their dopaminergic stimulating effects. The association of these effects are the biggest challenges in the treatment of addiction and its reduction - a crucial focus in treatment. There are theories that relate the relapse process as a result of the formation of memories associated with the drug. These memories can maintain drug-seeking and drug-taking behaviors, leading to drug-seeking behavior in the period of abstinence. It is known that consolidated memories return to their vulnerable state and need to undergo a new stabilization process, which depends on protein synthesis and other molecular mechanisms, called the reconsolidation process. Therefore, dopaminergic manipulations aimed at blocking and/or attenuating the development of memory, conditioning and sensitization can interfere with chemical dependence. The objective of the study was to evaluate whether antidopaminergic treatment using apomorphine at a dose of 0.05 mg / kg, would impair / attenuate the consolidation of memory and expression of the conditioning and behavioral sensitization processes induced by morphine at a dose of 10.0 mg / kg. To analyze these effects, the work was divided into two experiments, with the stages: habituation, induction phase, withdrawal, conditioning test and sensitization test. In experiment 1, the induction phase lasted 5 days, in which, the animals received a pre-arena treatment of morphine (10.0 mg / kg) or vehicle, after being removed from the experimental arena, immediately a group of animals, received the post-arena treatment with apomorphine (0.05 mg / kg) or vehicle. The same post-arena treatment was administered to another group of animals, but it was expected to pass 15 minutes after being removed from the arena. Subsequently, the withdrawal phase took place, and on different days, conditioning, withdrawal and behavioral awareness tests were developed. In experiment 2, the induction phase lasted 10 days, in which, the animals received a pre-arena treatment of morphine (10 mg / kg) or vehicle, after being removed

from the experimental arena, immediately a group of animals, received post-arena treatment with apomorphine (0.05 mg / kg) or vehicle. In this experiment, there was no group that received the treatment 15 minutes after the animals were removed from the arena. The same methodologies as in experiment 1 were applied for the other phases. The results showed that morphine produces conditioning and sensitization, strengthening the consolidation of memory. And the pharmacological treatments administered during the period of reconsolidation, impair the consolidation of memory. Taken together, the results suggest that manipulations in memory reconsolidation may be a useful tool in the treatment of chemical dependency.

Keywords: Drug addiction; Morphine; Conditioning; Awareness; Consolidation of Memory.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Gerais.....	20
2.2 Específicos.....	20
3. HIPÓTESE.....	21
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
4.1 A Dependência Química e os Processos de Aprendizagem e Memória.....	22
4.2 Sistema Dopaminérgico	26
4.3 Morfina.....	30
4.4 A dependência Química e o Sistema Glutamatérgico.....	34
4.5 Fatores que Contribuem para a Dependência Química: Condicionamento Pavloviano e a Sensibilização Comportamental.....	38
4.6 Apomorfina	41
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
5.1 Sujeitos.....	42
5.2 Ambiente experimental.....	43
5.3 Drogas.....	43
5.4 Procedimento experimental	43
6.ARTIGO.....	46
Post-trial low dose apomorphine prevents the development of morphine Sensitization Revista "Behavioural Brain Research"	48
7. DISCUSSÃO GERAL.....	54
8. CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Protocolo do experimento 1.....	44
Figura 2 – Protocolo do experimento 2.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

Ácido gama-aminobutírico (GABA)

Análise de variância (ANOVA)

Apomorfina 0,05 mg/kg (APO-0,05)

Área tegumentar ventral (VTA)

Córtex pré-frontal (CPF)

Estímulo (E)

Estímulo condicionado (EC)

Estímulo incondicionado (EI)

Estímulo neutro (EN)

Metabólito morfina-3-glucoronideo (M3G)

Metabólito morfina-6-glucuronideo (M6G)

Morfina 10 mg/kg (MOR-10)

Núcleo accumbens (NAc)

Organização Mundial de Saúde (OMS)

Preferência condicionada por lugar (PCL)

Proteína inibitória (Gi)

Receptor dopaminérgico tipo 1 (DA1)

Receptor dopaminérgico tipo 2 (DA2)

Receptor opioide do tipo delta (δ)

Receptor opioide do tipo kappa (κ)

Receptor opioide do tipo mi (μ)

Resposta condicionada (RC)

Resposta incondicionada (RI)

Sistema nervoso central (SNC)

Teste de condicionamento (TC)

Veículo (VEÍ)

Via subcutânea (SC)

1. INTRODUÇÃO

A dependência química, também chamada de transtorno por uso de substâncias, é uma doença crônica caracterizada pela busca e uso compulsivo de substâncias psicoativas, apesar das consequências prejudiciais. A decisão inicial de usar a substância é voluntária para a maioria das pessoas, mas o uso repetido pode levar às mudanças cerebrais que desafiam o autocontrole e interferem na capacidade de resistir aos impulsos intensos do uso da substância. Essas alterações cerebrais podem ser persistentes e é por isso que a dependência química é considerada uma doença "recidivante", pacientes em recuperação têm maior risco de voltar ao uso das substâncias mesmo depois de anos de abstinência.

A utilização de substâncias psicoativas, quer sejam lícitas ou ilícitas, tornou-se um problema de saúde em nível mundial. Segundo o último Relatório Mundial Sobre Drogas (2020), divulgado pelo Escritório das Nações Unidas Sobre Drogas e Crime (UNODC), cerca de 269 milhões de pessoas usaram drogas no mundo em 2018, um aumento de 30% em comparação com o ano de 2009. Além disso, mais de 35 milhões de pessoas sofrem de transtornos associados ao uso de drogas.

Quando as pesquisas com metodologias adequadas foram iniciadas para se investigar as causas do comportamento do paciente dependente químico, acreditava-se que essa doença era de cunho moral, ou seja, as pessoas que desenvolviam essa doença eram de alguma forma, moralmente deficientes ou careciam de força de vontade. A superação ou a cura, portanto, envolvia métodos como punição aos malfeitores ou, alternativamente, encorajá-los a reunir força de vontade para quebrar um hábito. O consenso científico mudou desde então. Hoje se reconhece a dependência química como uma doença crônica que altera tanto a estrutura quanto a função do cérebro. Assim como as doenças cardiovasculares prejudicam o coração e o diabetes prejudica o pâncreas, a dependência química sequestra o cérebro.

Com o avanço das pesquisas, descobriu-se que o cérebro registra todos os prazeres da mesma maneira, sejam eles originados de uma substância psicoativa, uma recompensa monetária, um encontro sexual ou uma refeição satisfatória. No cérebro, o prazer tem uma assinatura distinta: a liberação do neurotransmissor

dopamina no *nucleus accumbens*. A liberação de dopamina no *nucleus accumbens* é tão consistentemente ligada ao prazer que essa área cerebral ficou conhecida como o centro de prazer do cérebro. Todas as substâncias que produzem dependência, da nicotina à heroína, produzem um aumento de dopamina no *nucleus accumbens*. E, o aumento de dopamina produzido por substâncias psicoativas é muito maior do que o aumento produzido pelas recompensas naturais (comida, água, sexo).

Acreditou-se por muito tempo que a experiência do prazer produzida pelas substâncias psicoativas era o mecanismo principal da dependência. Assim, pesquisas foram direcionadas na tentativa de diminuir ou bloquear o aumento da DA no sistema de recompensa cerebral e, com isso, atenuar ou eliminar a dependência. Entretanto, essas estratégias terapêuticas não surtiram o efeito desejado. Pesquisas recentes sugerem que a situação é mais complicada. A dopamina não apenas contribui para a experiência do prazer, mas também desempenha um papel na aprendizagem e na memória, dois elementos-chave na transição do uso recreacional para o uso compulsivo.

De acordo com a teoria atual sobre a dependência (HYMAN, 2005), a dopamina interage com outro neurotransmissor, o glutamato, para assumir o controle do sistema de aprendizado relacionado à recompensa do cérebro. Este sistema tem um papel importante na sustentação da vida porque vincula as atividades necessárias para a sobrevivência (como comer e sexo) com prazer e recompensa. O circuito de recompensa cerebral inclui áreas envolvidas com motivação e memória, bem como com prazer. Substâncias psicoativas estimulam o mesmo circuito e então o sobrecarregam. Assim, se reconhece que a dependência química é uma doença da aprendizagem e memória.

A dificuldade no tratamento da dependência química está na propensão à recaída mesmo depois de um longo período sem utilização das substâncias. Acredita-se que estímulos, internos ou externos, associados aos efeitos das substâncias, têm a capacidade de evocar memórias, produzindo um desejo pela substância mesmo durante a abstinência e, assim, precipitar a recaída. Em toda essa fenomenologia há a participação de mecanismos de aprendizagem associativa, pelos quais as drogas podem atuar como estímulos incondicionados ou reforçadores. Há também a

participação de processos psicológicos pelos quais os estímulos podem ser consolidados em sistemas de memória para serem evocados posteriormente. Quando esses estímulos são evocados juntamente com fenômenos subjetivos, como por exemplo, o desejo (*craving*), há a formação do hábito de busca e consumo das substâncias psicoativas.

A consolidação da memória é o processo pelo qual as informações recém-adquiridas passam por uma estabilização para serem armazenadas permanentemente (LECHNER et al., 2016), ou seja, há a formação de uma memória de curta duração ao se experimentar os efeitos da droga somados ao contexto ambiental, e à medida em que ocorre esta associação, a memória de curta duração sofre modificações bioquímicas e se transforma em memória de longa duração, sendo esse processo caracterizado como consolidação da memória.

Já está bem estabelecido na literatura que fatores ambientais associados aos efeitos produzidos pela droga favorecem a manutenção do quadro da dependência química, posto que dois processos importantes estejam envolvidos no fortalecimento da dependência. O primeiro é o processo de condicionamento pavloviano, sendo esse um tipo de aprendizagem associativa na qual ocorre uma mudança comportamental na medida em que o indivíduo/animal interage com o ambiente (arena experimental). O segundo é o processo de sensibilização comportamental, que se desenvolve a partir de administrações repetidas da droga, nas quais ocorre um aumento progressivo dos efeitos no decorrer dos dias, mesmo quando se utiliza a mesma concentração da droga.

Estudos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa nos mostram que o condicionamento e a sensibilização podem ser enfraquecidos por um protocolo conhecido como tratamento de reconsolidação da memória (BASTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2015; LEITE et al., 2019). O processo de reconsolidação da memória ocorre quando as memórias já consolidadas são evocadas e, nesse momento, as memórias ficam lábeis e susceptíveis às mudanças (BESNARD et al., 2012). A explicação para isso é que após a desestabilização, as memórias precisam ser reconsolidadas, passando assim para um estado estável e, dessa forma, podem continuar existindo. Tal mecanismo cerebral, provavelmente reflete a natureza

dinâmica do fortalecimento da fixação das memórias de longo prazo (consolidação da memória). Vale ressaltar que a estabilização inicial de um traço de memória via consolidação é necessária para sua persistência e, quando for necessário acessá-la, entretanto, o processo de reconsolidação pode ser necessário para manter a relevância de traços de memória, pois esses estão em contínua modificação (LEE, 2009; LEE et al., 2017).

A pesquisa desenvolvida por Bastos e colaboradores (2014) mostrou o desenvolvimento e a expressão da sensibilização comportamental e do condicionamento quando a apomorfina na dose de 2,0 mg/kg foi administrada nos animais antes da exposição à arena experimental. No entanto, estes resultados foram atenuados quando se administrou apomorfina na dose de 0,05 mg/kg imediatamente após uma exposição breve (cinco minutos) ao ambiente experimental, utilizando o protocolo de reconsolidação da memória. Ressaltando ainda que, o protocolo de reconsolidação só produziu efeito quando foi administrado imediatamente após os animais serem retirados da arena experimental, ou seja, dentro da “janela de reconsolidação”. Foi observado também que a administração de apomorfina 0,05 mg/kg, 15 minutos após a exposição dos animais à arena experimental, não surtiu efeito, desse modo, os animais não apresentaram mudanças comportamentais. Vale ressaltar que, a apomorfina na dose de 0,05 mg/kg estimula, em sua maioria, os receptores dopaminérgicos do tipo D₂ pré-sinápticos, refletindo sua ação inibitória na liberação da dopamina. Observa-se ainda no mesmo experimento, uma redução na atividade locomotora dos animais nos grupos que receberam apomorfina 0,05 mg/kg imediatamente após a exposição ao ambiente experimental.

Em continuação da pesquisa realizada por Bastos e colaboradores (2014), o presente trabalho estudou se o tratamento com apomorfina 0,05 mg/kg imediatamente após o término da sessão experimental, ou seja, dentro da janela de consolidação, enfraquecerá uma resposta locomotora condicionada e sensibilizada, produzida por morfina 10 mg/kg. A morfina é classificada como um agonista exógeno dos receptores opioides e sua ação analgésica a faz ser indicada para o tratamento das dores crônicas e intensas. Entretanto, o seu potencial para produzir dependência limita o seu uso clínico. Na área tegmentar ventral (VTA), a morfina atuando nos seus

receptores μ -opioides localizados em neurônios gabaérgicos, inibe a liberação do neurotransmissor GABA, o que resulta na desinibição dos neurônios dopaminérgicos, levando o aumento desse neurotransmissor no núcleo *accumbens* (PIERCE e KUMARCSAN, 2006; DARBANDI et al., 2008).

Diante do exposto, o presente trabalho busca uma maior compreensão dos efeitos da morfina na formação de uma memória associativa à droga e o enfraquecimento de uma resposta locomotora condicionada e sensibilizada por meio da manipulação farmacológica durante o processo de consolidação da memória.

2. OBJETIVOS

2.1 - Geral

Avaliar se o tratamento antidopaminérgico utilizando a apomorfina na dose de 0,05 mg/kg prejudicará a consolidação da memória, condicionamento, e sensibilização comportamental produzidos previamente por morfina na dose de 10,0 mg/kg.

2.2 - Específicos:

- a) Produzir o desenvolvimento de uma resposta locomotora condicionada e sensibilização por meio da administração da morfina na dose de 10,0 mg/kg, utilizando um protocolo de condicionamento pavloviano de atraso.

- b) Verificar se o tratamento com apomorfina na dose de 0,05 mg/kg, na janela de consolidação da memória, será capaz de atenuar ou bloquear o desenvolvimento e a expressão da sensibilização comportamental e condicionamento previamente produzido por morfina 10 mg/kg.

- c) Verificar se a magnitude da resposta produzida pelo protocolo de tratamento de consolidação da memória irá variar em função do tempo decorrido para a administração dos tratamentos. Para isso, um grupo receberá os tratamentos imediatamente após o término da sessão experimental e outro grupo receberá os tratamentos 15 minutos após o término.

- d) Verificar se a magnitude da resposta produzida pelo protocolo de tratamento de consolidação da memória continuará produzindo seu efeito, mesmo quando administrado em ratos previamente sensibilizados e condicionados em período de 10 dias na fase de indução.

3. HIPÓTESE

A diminuição na atividade da dopamina durante o processo de consolidação da memória prejudicará as associações com as pistas contextuais afetando o desenvolvimento e a expressão de uma resposta locomotora sensibilizada e condicionada produzida por morfina 10,0 mg/kg.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 A Dependência Química e os Processos de Aprendizagem e Memória

A dependência química é conceituada como o uso compulsivo de substâncias psicoativas, apesar das consequências negativas. Os objetivos dos pacientes dependentes se restringem a obter, usar e se recuperar de drogas, apesar do fracasso em papéis vitais, doença médica, riscos de encarceramento e outros problemas. Uma característica importante da dependência é a sua persistência (HSER et al., 2001; MCLELLAN ET AL., 2000). Embora alguns indivíduos possam interromper o uso compulsivo de tabaco, álcool ou drogas ilegais por conta própria, para um grande número de indivíduos tornados vulneráveis por fatores genéticos e não genéticos (MERIKANGAS et al., 1998; KENDLER et al., 2003; RHEE et al., 2003), a dependência química prova ser uma condição recidivante, crônica e recorrente (MCLELLAN et al., 2000). O problema central no tratamento da dependência é que mesmo após períodos prolongados sem drogas, bem após o último sintoma de abstinência ter diminuído, o risco de recaída, muitas vezes precipitada por sinais associados às drogas, permanece muito alto (WIKLER e PESCOR, 1967; O'BRIEN et al., 1998).

Nos distúrbios de memória costumam serem consideradas apenas condições que envolvam a perda de memória, mas e se o cérebro lembrar muito ou registrar associações patológicas com muita força? Durante a última década, os avanços na compreensão do papel da dopamina na aprendizagem relacionada à recompensa (SCHULTZ et al., 1997) contribuíram para o estabelecimento da hipótese de "aprendizagem patológica" de dependência que é consistente com observações de longa data sobre o comportamento de pacientes dependentes (WIKLER e PESCOR, 1967). Adicionalmente, trabalhos computacionais recentes a respeito da ação da dopamina (MONTAGUE et al., 2004; REDISH, 2004), sugeriram mecanismos através dos quais as substâncias psicoativas e os estímulos associados a elas podem alterar

os processos motivacionais. Ao mesmo tempo, as investigações celulares e moleculares mostram semelhanças entre as ações das substâncias psicoativas e formas normais de aprendizagem e memória (HYMAN e MALENKA, 2001; NESTLER, 2002; CHAO e NESTLER, 2004; KELLEY, 2004). Assim, a dependência representa uma usurpação patológica dos mecanismos neurais de aprendizagem e memória que, em circunstâncias normais, servem para moldar os comportamentos de sobrevivência relacionados à busca de recompensas e às pistas que as predizem (HYMAN e MALENKA, 2001; WHITE, 1996; ROBBINS e EVERITT, 1999; BERKE e HYMAN, 2000; ROBBINS e EVERITT, 2002).

É fato inquestionável que a DA está envolvida com experiências prazerosas. Entretanto, agora também se sabe que a DA desempenha um papel importante na aprendizagem e memória - dois elementos-chaves na transição do uso recreacional da substância psicoativa para a compulsão, ou seja, dependência. A memória é um dos mais importantes processos neuropsicológicos responsáveis pela expressão da identidade pessoal de um indivíduo, por ajudar no desenvolvimento das atividades cotidianas. Sendo um arcabouço de informações armazenadas e posteriormente acessadas, quando necessário, principalmente para a própria conservação da vida, uma vez que, o aprendizado adquirido com experiências passadas quer sejam traumáticas ou não, auxiliam na tomada de decisões atuais (MOSCOVITCH, 2004; MANENTI, et al., 2017).

Para que uma nova memória se forme, a princípio, as memórias recém-adquiridas, ou seja, memórias de curta duração, precisam passar por processos neurobiológicos para se tornarem estáveis, formando então, uma memória de longa duração e sugerindo que o indivíduo consolidou a memória (NADER, 2015). A consolidação da memória refere-se à transformação ao longo do tempo das representações internas dependentes da experiência e de bases neurobiológicas. Neste processo, considera-se que ocorra uma incorporação das modificações sinápticas e celulares nos circuitos cerebrais, nos quais a memória é inicialmente codificada e consegue prosseguir através de reativações recorrentes. Estas reativações ocorrem tanto durante a vigília quanto durante o sono, resultando na

distribuição de informações para locais adicionais e na integração de novas informações no aprendizado já existente (LEE, 2009; KWAPIS et al., 2020).

As memórias não são apenas registros estáveis de experiência, mas sim, são entidades flexíveis e dinâmicas que podem ser modificadas ou atualizadas para manter as suas relevâncias em face das mudanças de informações. O processo de atualização das memórias depende da reconsolidação que, por sua vez, vai influenciar no fortalecimento das memórias existentes e nos comportamentos associados a algum contexto (JAROME et al., 2015). Pode também atuar no enfraquecimento, pois causa a modificação da memória original e por consequência pode resultar em alterações comportamentais (SCHOLL, et al., 2015).

Segundo a teoria da reconsolidação da memória, quando ocorre a necessidade de ativar algum tipo de lembrança, é necessário promover a recuperação e reativação das memórias consolidadas, resultando na desestabilização do traço de memória subjacente (ALBERINI e LEDOUX, 2013). Uma vez desestabilizada, a memória entra no processo de instabilidade, ficando vulnerável às modificações que podem variar desde uma amnésia, passando pelo fortalecimento do traço de memória, até a incorporação de novas informações (BALDERAS et al., 2015). A reativação das memórias parece reverter os efeitos “estabilizadores” proporcionados pelos processos iniciais da consolidação da memória, indicando um possível enfraquecimento nas mudanças sinápticas que ocorreram após a aquisição de uma informação (KAANG e CHOI, 2011).

Estudos mostraram que para desestabilizar um traço de memória após o processo de consolidação, é necessário que ocorra um estímulo relacionado à lembrança da aprendizagem inicial (DUDAI, 2004; NADER, 2003; SCHILLER e PHELPS, 2011). Por exemplo, no condicionamento do medo, muitas vezes envolve uma breve re-exposição ao estímulo condicionado no dia seguinte ao treinamento (NADER et al., 2000). Este protocolo foi pensado para estimular a reativação da memória previamente consolidada, contudo, uma vez ativado este processo, a memória entra em seu estado instável e vulnerável às modificações, refletindo um estado semelhante ao estado da memória apresentada na aquisição inicial (ALBERINI e LEDOUX, 2013; DUDAI, 2004; LEE et al., 2017). A labilidade do traço de memória

é normalmente avaliada indiretamente por meio da administração de agentes amnésicos que evitam a reconsolidação como, por exemplo, anisomicina (inibidor da síntese de proteínas), administrado após reativação de memória (NADER et al., 2000). Tem-se, como resultado, o bloqueio do processo de reconsolidação da memória que é fundamental para a formação da memória de longa duração (JAROME et al., 2013).

Trabalhos utilizando modelos animais mostraram que após algumas exposições combinando as pistas das drogas (morfina 10 mg/kg ou apomorfina 2,0 mg/kg) com pistas ambientais (arena experimental), foi possível a formação de uma memória associada, observando uma memória associativa durável e estável, pois indica a consolidação da memória (BASTOS et al, 2014; SANTOS et al., 2015; FERREIRA et al., 2020). Quando as pistas das drogas no ambiente induzem na recuperação desse traço de memória, sugere-se uma fase lábil sendo necessário o processo de reconsolidação para a restabilização desta memória (MILLER e MARSHALL 2005; DONG e NESTLER, 2014). Segundo LEE e colaboradores (2012), tratamentos farmacológicos administrados no intervalo de tempo conhecido como “janela de reconsolidação” influenciam um novo processo de armazenamento da memória, promovendo a desestabilização do traço original da memória, tornando-a lábil e susceptível às alterações.

Trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa, utilizando um modelo de dependência química aplicado em ratos *wistar*, mostraram que a utilização da apomorfina na dose baixa (0,05 mg/kg) administrada no período da janela de reconsolidação, foi capaz de atenuar o condicionamento e a sensibilização comportamental, produzidos previamente por apomorfina na dose 2,0 mg/kg (CARRERA et al., 2012; BASTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2018), e também atenuou a sensibilização comportamental e condicionamento produzidos previamente por morfina na dose de 10 mg/kg (LEITE et al., 2019; FERREIRA et al., 2020). Ressaltando que, o mesmo tratamento com apomorfina 0,05 mg/kg quando administrado fora do período de reconsolidação, ou seja, 15 minutos após a exposição dos animais ao ambiente experimental, não surtiu efeitos comportamentais, sinalizando a importância do tratamento dentro do período da reconsolidação da memória.

4.2 Sistema Dopaminérgico

A dopamina (DA) é considerada crucial na dependência de drogas, devido ao seu envolvimento nos mecanismos de recompensa no mesencéfalo (TRITSCH, SABATINI, 2012). A dopamina é um neurotransmissor da classe das catecolaminas, predominante no cérebro, sendo sintetizada pelos neurônios mesencefálicos na substância negra (SN) e na área tegmental ventral (ATV) (DONG e NESTLER, 2014). A DA desempenha um papel importante na regulação de muitas funções e, além das funções motoras, também é importante nas funções como motivação, cognição, emoção e secreção neuroendócrino (SALAMONE e CORREA, 2012).

Todos os efeitos desenvolvidos pela DA no sistema dopaminérgico são expressos devido às interações com receptores específicos de dopamina. A DA interage com os receptores de membrana pertencentes à família dos receptores acoplados à proteína G (STEINBERG et al., 2013). A ativação dos receptores leva à formação de segundos mensageiros que levam a uma ativação ou repressão de vias de sinalizações específicas (STOCCHI, 2011; BEAULIEU e GAINETDINOV 2011). Baseando-se nas propriedades estruturais e farmacológicas, os receptores dopaminérgicos foram divididos em duas famílias. A família dos receptores D1 (D1-like) compreendendo os receptores D1 e D5, e a família dos receptores a D2 (D2-like) fazendo parte os receptores D2, D3 e D4. Os receptores D1 e D5 possuem características semelhantes, da mesma forma que os receptores D2, D3 e D4 que também são semelhantes entre si (MANNOURY et al., 2011; PRINGSHEIM et al., 2014).

No Sistema Nervoso Central (SNC), os receptores D1 são altamente expressos na região nigroestriatal e nas áreas mesolímbicas/mesocorticais, ou seja, no *nucleus accumbens*, substância nigra, bulbo alfatório, amígdala e córtex frontal. Em níveis mais reduzidos, podem ser encontrados no hipocampo, cerebelo, áreas talâmicas e áreas hipotalâmicas (BEAULIEU e GAINETDINOV, 2011). Os receptores D1 desempenham um importante papel na regulação do sistema de recompensa, atividade locomotora, na aprendizagem e memória. A ativação desta família de

receptores ativa a enzima adenilato ciclase (AC), levando a formação de AMPc, com consequente ativação da proteína quinase A (PKA). Também estão envolvidos nas vias de transdução de sinal que estão ligadas a vários distúrbios neuropsiquiátricos, ativando a fosfolipase C e induzindo a liberação de cálcio intracelular (HA et al., 2012).

Os receptores D2 são encontrados em quantidades mais elevadas no corpo estriado, *nucleus accumbens*, tubérculo olfatório, bem como na substância nigra, área tegmental ventral, hipotálamo, corticais, septo, amígdala e hipocampo. A ativação desta família de receptores inibe a atividade da enzima adenilato ciclase (AC), levando a não formação de AMPc, com consequente não ativação da proteína quinase A (PKA), destacando que os receptores D2 desempenham um papel importante na atividade comportamental e extrapiramidal (HEDLUND et al., 2016). Os receptores D2 pré-sinápticos são também autorreceptores somatodendríticos e diminuem a excitabilidade neuronal reduzindo principalmente a síntese de DA, o empacotamento e, por fim, a inibição da liberação de DA (LI et al., 2015).

Há uma diferença na afinidade de DA entre os receptores do tipo D1 e receptores do tipo D2. Os receptores D2-like parecem ter uma afinidade 10 a 100 vezes maior para DA do que a família D1-like (TRITSCH e SABATINI, 2012). Essas diferenças na afinidade parecem sugerir um papel diferencial para os dois receptores, dado que os neurônios de DA podem ter dois padrões diferentes de liberação de DA, "tônica" ou "fásica", com base em suas propriedades de disparo (GRACE et al., 2007; PARK e ENIKOLOPOV, 2010).

A DA é distribuída no SNC através de seis vias. A via mesolímbica transporta dopamina da área tegmentar ventral (VTA), que está localizada no mesencéfalo, para o estriado ventral, que inclui o núcleo *accumbens* e o tubérculo olfatório (IKEMOTO, 2010). A ativação dessa via está relacionada à recompensa, influenciando diretamente o desenvolvimento da dependência química. Especificamente, essa via está associada aos processos cognitivos relacionados à recompensa que incluem a saliência de incentivo ("querer"), a resposta de prazer ("gostar") de certos estímulos e o reforço positivo. Além disso, essa via está também associada aos processos cognitivos relacionados à aversão (HYMAN et al., 2006; PIGNATELLI e BONCI, 2015).

As projeções da via mesocortical têm origem no VTA no qual os estímulos desenvolvidos são encaminhados para várias partes do cortex pré-frontal, destacando-se as funções cognitivas, como percepção, atenção, memória, linguagem e funções executivas (SEEMAN, 2015). As vias mesolímbica e mesocortical têm um papel crucial nos mecanismos de aprendizagem e memória, principalmente quando estão relacionados aos comportamentos que expressam reforço e recompensa (BEAULIEU et al., 2012). Por isso, a junção dessas duas vias é denominada projeção mesocorticolímbica (COOPER et al., 2017) e abrange as projeções do VTA, o complexo amígdaloide, o hipocampo, o córtex cingulado e o bulbo olfatório (HYMAN et al., 2006).

A via nigroestriatal transmite dopamina da região *pars compacta* da substância negra (SNc) para o núcleo caudado e putâmen. A substância negra está localizada no mesencéfalo, enquanto o núcleo caudado e o putâmen estão localizados no estriado dorsal. Essa via é responsável pela atividade locomotora, mas também está relacionada aos processos cognitivos relacionados à recompensa e aprendizagem associativa (RIVERA et al., 2013).

A via tuberoinfundibular origina-se no hipotálamo e tem sua projeção para a hipófise. Está envolvida na regulação neuroendócrina e na geração do ciclo vigília/sono. Nesta via também, a dopamina atua inibindo a liberação de prolactina, tendo como efeito negativo subsequente na frequência cardíaca e no tonus vascular (MAJUMDAR; MANGAL, 2015).

A via incerto-hipotalâmica é uma via dopaminérgica curta que vai da zona incerta ao hipotálamo. É uma região diencefálica mal definida localizada na junção do hipotálamo medial com a zona incerta. Essa região é caracterizada pela presença do grupo dopaminérgico A13 e também por células expressando o hormônio concentrador de melanina (MCH) e o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) (SITA et al., 2007), e tem um papel no comportamento sexual (GIULIANO e ALLARD, 2001).

A via hipotálamo-espinhal origina-se principalmente do núcleo paraventricular, áreas hipotalâmicas laterais e posteriores. Este trajeto desce através da substância cinzenta periaquedutal e da formação reticular adjacente (SKAGERBERG e

LINDVALL, 1985). Neurônios dopaminérgicos hipotalâmicos A11 se projetam para todos os níveis da medula espinhal e fornecem a principal fonte de dopamina espinhal. Os receptores de dopamina são expressos em nociceptores primários, bem como em neurônios espinhais localizados em diferentes lâminas no corno dorsal da medula espinhal, sugerindo que a dopamina pode modular os sinais de dor, agindo tanto em alvos pré-sinápticos quanto pós-sinápticos (PUOPOLO, 2019; MEGAT et al., 2017).

Já está estabelecido na literatura que o sistema dopaminérgico está envolvido na regulação de várias funções fisiológicas, como a atividade locomotora, cognição, memória, prazer, recompensa, vício, dor, modulação de vias neuroendócrinas e aprendizagem. Clinicamente, a modulação de todos os circuitos dopaminérgicos, fornece base anatômica não apenas para entender o mecanismo de agentes dopaminérgicos, mas também, para entender as reações expressas pelo organismo de acordo com as experiências apresentadas (HOWE et al., 2013; SYED et al., 2016; PATRIARCHI et al., 2018).

A DA é o neurotransmissor que tem sido classicamente associado aos efeitos reforçadores das drogas de abuso, devido ao fato de que, a maioria das substâncias que produzem dependência aumentam a concentração extracelular de DA em regiões límbicas, incluindo o *nucleus accumbens* (NAc) (KOOB e BLOOM 1988; DI CHIARA e IMPERATO, 1988). Essas evidências acumuladas levaram à hipótese dopaminérgica da dependência, na qual a dopamina é o elemento chave para a gênese da dependência. Entretanto, existe também aumento da concentração de DA em consequência do disparo fásico dos neurônios dopaminérgicos. Esse aumento dopaminérgico desempenha um papel importante na codificação de recompensas e nos estímulos associados à recompensa (SCHULTZ et al., 2000), e aparentemente não codifica especificamente a recompensa em si, mas para a saliência, que além da recompensa inclui estímulos aversivos, novos e inesperados (ZINK et al., 2003). Também foi observado que a DA codifica para a motivação em se obter a recompensa em vez de codificar para a recompensa em si (MCCLURE et al., 2003).

Essas visões atualizadas sobre o papel da DA no reforço fornecem uma perspectiva diferente sobre as drogas de abuso, sugerindo que as drogas são reforçadoras não apenas porque são prazerosas, mas porque, ao aumentar a

concentração de DA, as substâncias psicoativas estão sendo consideradas/processadas como estímulos salientes que irão motivar inerentemente novas aquisições de mais droga (independente da droga ser conscientemente percebida como prazerosa ou não) e assim, facilitar a aprendizagem condicionada (FENU e DI CHIARA 2003; VOLKOW et al., 2004).

4.3 Morfina

A morfina é um alcaloide natural derivado da papoula do ópio *Papaver somniferum*, sendo o opioide mais amplamente usado para tratamento de dor moderada a intensa. Os medicamentos opioides são utilizados como analgésicos para tratamento de dores crônicas, relacionadas ou não ao câncer e doenças terminais (CHOU ET AL., 2009; FLEMING et al., 2010). Sendo um dos principais medicamentos indicados para tratamento de dor intensa, a utilização da morfina aumentou significativamente no passar das décadas. No entanto, o uso crônico de opioides pode resultar em tolerância analgésica, hiperalgesia e outros efeitos colaterais, que afetam seriamente a segurança e o conforto dos pacientes no período do tratamento. A tolerância à morfina é a principal causa da diminuição do controle da dor e do aumento da dose, o que torna os efeitos colaterais relacionados mais sérios e generalizados (BEKHIT, 2010; VOLKOW e MCLELLAN, 2016).

A morfina é quase 100% absorvida pelo trato gastrointestinal após administração oral e agindo como um substrato para o transportador de efluxo de glicoproteína-P da membrana, que é expresso no epitélio intestinal e o endotélio da barreira hematoencefálica (EDEROTH et al., 2004; KHARASCH et al., 2003). A morfina é rapidamente distribuída para tecidos altamente perfundidos, como pulmões, rins e fígado, e aproximadamente 15-35% da morfina está ligada às proteínas plasmáticas, predominantemente à albumina e em menor grau à glicoproteína ácida alfa-1 (EDEROTH et al., 2004; OLESEN et al., 2012). Quando a morfina é administrada por vias intramuscular e subcutânea, observa-se um pico de ação que

se desenvolve entre 15 a 20 minutos, por via intravenosa, e o pico do efeito analgésico é obtido aos 20 minutos (SVERRISDÓTTIR et al., 2014; STEIN, 2015).

Aproximadamente 90% da eliminação da morfina são por metabolismo hepático. A conjugação com ácido glicurônico forma a morfina-3-glicuronídeo (M3G) e o morfina-6-glicuronídeo (M6G) analgesicamente ativo (CHRISTRUP, 1997; GUTSTEIN e AKIL, 2018). E 10% de uma dose de morfina são excretadas de forma inalterada, enquanto 45-55% é excretado como M3G, 10-15% como M6G e 5% como metabólitos menores. Além disso, foi sugerido que uma pequena fração de morfina pode passar para circulação enterohepática e pode ser encontrada sem alterações e como glicuronídeos na bile (HASSELSTROM e SAWE, 1993; MAZOIT et al., 2007; STAAHL et al., 2008).

O sistema opioide compreende quatro tipos de receptor: μ (Mi; MOP), δ (Delta; DOP), κ (Kappa, KOR) e nociceptina (NOP) (MCDONALD et al., 2015). A nomenclatura da União Internacional de Farmacologia Clínica e Básica (IUPHAR) considera MOP (μ), KOP (κ) e DOP (δ) como receptores opioides "clássicos", uma distinção baseada na sensibilidade ao antagonista opioide naloxona. O receptor de nociceptina (NOP) é designado para o receptor de peptídeo N/OFQ, que atualmente é classificado como um membro não opioide da família de receptores opioides, com base nas semelhanças na estrutura e localização com os receptores opioides clássicos, mas que não possui sensibilidade à naloxona (MCDONALD et al., 2015).

Todos os subtipos de receptores opioides acoplam-se preferencialmente às proteínas G inibitórias e à ativação dos receptores, por exemplo, MOP com morfina, leva a uma variedade de processos celulares; (i) fechamento dos canais de cálcio dependentes de voltagem, (ii) estimulação do efluxo de potássio levando à hiperpolarização e (iii) redução da produção de monofosfato de adenosina cíclica (AMPC) por meio da inibição da enzima adenilato ciclase. No geral, isso resulta na redução da excitabilidade das células neuronais, levando a uma redução na transmissão dos impulsos nervosos e inibição da liberação de neurotransmissores (RANG et al., 2018; MCDONALD et al., 2015). Os receptores opioides estão localizados principalmente em áreas do SNC relacionadas com a nocicepção (que controla a dor) e com o sistema de recompensa (envolvido com a dependência

química) e também em áreas periféricas como o trato gastrointestinal e o sistema respiratório (GUTSTEIN e AKIL, 2005; STEIN et al., 1991).

Os receptores $M\mu$ apresentam dois subtipos, o subtipo $M\mu_1$, que medeia a analgesia e pelo qual a morfina possui uma maior afinidade e, o subtipo $M\mu_2$, que está envolvido na depressão respiratória e nos efeitos adversos relacionados ao sistema gastrointestinal (KRISTENSEN et al., 1995). Localizam-se por todo o sistema nervoso, existindo pré ou pós-sinapticamente, dependendo dos tipos de células. Entretanto, densidades elevadas desse receptor são encontradas na substância cinzenta periaquedutal (SCP), uma área do mesencéfalo envolvida no controle central da transmissão nociceptiva. Propõe-se que a analgesia produzida por opioides ocorra através do bloqueio da atividade inibitória do GABA nessa região cerebral, isto é, o efeito inibitório do disparo do receptor MOP bloqueia as ações inibitórias do GABA, removendo seu bloqueio tônico e estimulando o fluxo antinociceptivo para a medula espinhal (PASTERNAK e PAN, 2013).

Por outro lado, esses receptores também estão localizados no SNC em áreas envolvidas com a função sensorial e a função motora, incluindo regiões relacionadas com a integração e percepção dos sentidos, por exemplo, o córtex cerebral e a amígdala, que fazem parte do sistema límbico (MCDONALD et al., 2015). Além disso, os MOPs localizam-se no núcleo *accumbens* e no VTA, que juntamente com o córtex pré-frontal, amígdala e o hipocampo integram um circuito relacionado com a dependência (STAAHL et al., 2014).

A descoberta de que a capacidade da morfina em produzir dependência química foi abolida em camundongos sem o receptor opioide μ demonstrou inequivocamente que esses receptores medeiam essas ações (MATTHES et al., 1996). É importante ressaltar que uma série de estudos mostrou que as propriedades de reforço do álcool, canabinoides e nicotina - cada um dos quais atua em um receptor diferente - também estão fortemente diminuídas nesses camundongos mutantes. A abordagem genética, portanto, destaca os receptores μ como interruptores moleculares convergentes, que medeiam o reforço após a ativação direta (morfina) (CONTET et al., 2004).

As duas estruturas encefálicas que são importantes para o início da ação recompensadora da morfina são o NAc e o VTA. No VTA, os neurônios gabaérgicos mantêm um controle inibitório tônico sobre os neurônios dopaminérgicos, os quais se projetam principalmente para o NAc (via mesolímbica) e o córtex pré-frontal (via mesocortical). Dessa forma, o neurônio gabaérgico controla a liberação de DA nessas vias. Quando a morfina atua por mecanismos inibitórios nos receptores μ localizados nos neurônios gabaérgicos, há a inibição dos neurônios gabaérgicos, com consequente desinibição dos neurônios dopaminérgicos, o que leva ao aumento de liberação de DA no NAc (MATTHEWS e GERMAN, 1984; KLITENICK et al., 1992; JOHNSON e NORTH, 1992). Adicionalmente, quando a morfina se liga aos receptores μ no NAc, ocorre uma diminuição na liberação do GABA, o que ocasiona um aumento na liberação de dopamina, ativando assim o sinal de recompensa da morfina por toda região cerebral (CHARTOFF e CONNERY, 2014; ROSAS et al., 2016).

Os receptores do tipo DOP são encontrados no bulbo olfatório, córtex cerebral, *nucleus accumbens* e no putâmen caudado. Os receptores DOP estão localizados pré-sinápticamente nos aferentes primários, onde inibem a liberação do neurotransmissor. Através de ambos os sítios espinhais e supraespinhais, o receptor está envolvido nas ações antinociceptiva/analgésica de alguns opioides. Os agonistas do receptor DOP também mostraram reduzir a motilidade do trato gastrointestinal e causar depressão respiratória, limitando o interesse clínico (ZHANG et al., 1998; WANG et al., 2010).

Os receptores KOP estão amplamente distribuídos no cérebro, medula espinhal (substância gelatinosa) e nos tecidos periféricos. Níveis elevados do receptor foram detectados tanto em estruturas encefálicas relacionadas com a nocicepção (por exemplo, substância cinzenta periaquedutal, núcleos da rafe, núcleos talâmicos da linha média, *locus coeruleus*) como em estruturas encefálicas relacionadas à recompensa (por exemplo, córtex pré-frontal, VTA, NAc, amígdala, hipocampo). Foram identificados três subtipos de receptores KOP: $\kappa 1$, $\kappa 2$ e $\kappa 3$ (DE COSTA et al., 1989; ROTHMAN et al., 1989) e a ativação dos KOPs produz efeitos variados que incluem alteração da nocicepção, consciência, controle motor e humor. A

desregulação desse sistema receptor foi implicada na dependência de álcool e drogas (ANDERSON e BECKER, 2017; KARKHANIS et al., 2017).

No nível celular, o N/OFQ produz ações semelhantes às dos opioides clássicos, resultando em excitabilidade neuronal reduzida e inibição da liberação do transmissor. Os estudos iniciais concentraram-se no papel do N/OFQ e NOP na dor. No entanto, a administração exógena de N/OFQ demonstrou ter efeitos na locomoção, estresse e ansiedade, alimentação, aprendizagem e memória recompensa e atividade urogenital (LAMBERT, 2008; SHOBLOCK, 2007).

As drogas opioides como a morfina, possuem a capacidade de ativar indiretamente o sistema dopaminérgico na via mesolímbica por meio predominantemente dos receptores opioides $M\mu$ presentes no VTA e NAc, e existe possibilidade deste mecanismo influenciar as modulações neurais de diferentes sistemas, como por exemplo, sistemas mediados pelo GABA, acetilcolina, glutamato, endocanabinoides (FISEROVA et al., 1999; KOOB e VOLKOW 2010; SUSTKOVA-FISEROVA et al., 2014; SUSTKOVA-FISEROVA et al., 2016).

4.4 A Dependência Química e o Sistema Glutamatérgico

Tradicionalmente, as pesquisas sobre dependência concentravam-se nos mecanismos que envolvem a dopamina e os opioides endógenos. Mais recentemente, percebeu-se que o glutamato também desempenha um papel central nos processos subjacentes ao desenvolvimento e manutenção da dependência e os mecanismos glutamatérgicos podem ser responsáveis por mudanças plásticas no cérebro que levam ao comportamento de dependência e à recaída (SPANAGEL e WEISS, 1999; BARDO, 1998). A DA interage com o glutamato nos sistemas de aprendizagens relacionadas à recompensa. O circuito de recompensa inclui áreas envolvidas com a motivação e memória, bem como o prazer. Assim, substâncias que produzem dependência também estimulam o sistema de recompensa e o sistema de aprendizagem e memória.

Existem evidências substanciais de que o papel do glutamato na dependência está relacionado direta ou indiretamente às modificações da atividade do sistema dopaminérgico. O sistema dopaminérgico mesocorticolímbico está intrinsecamente conectado às estruturas glutamatérgicas ou seus eferentes. Tanto a região do corpo celular no VTA quanto a região terminal no NAc recebem projeções glutamatérgicas de várias estruturas corticolímbicas, como o córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo (GORELOVA e YANG, 1997; KELLEY et al., 1982), estruturas que estão relacionadas com a avaliação de recompensa, condicionamento e aprendizagem (EVERITT et al., 1991; EVERITT et al., 1999).

A interação entre glutamato e dopamina no VTA e NAc é bastante complexa, mas em termos simplificados, a entrada glutamatérgica no VTA aumenta a atividade das células dopaminérgicas e aumenta a liberação de dopamina no NAc (TZSCHENTKE e SCHMIDT, 2000). No nível do NAc, o glutamato também facilita a transmissão dopaminérgica, presumivelmente por influenciar presinápticamente a liberação de dopamina (BLAHA et al., 1997; FLORESCO et al., 1998). A dopamina também afeta a transmissão glutamatérgica. Por exemplo, a dopamina modula os sinais glutamatérgicos no NAc originados da amígdala e do hipocampo de uma maneira consistente com o conceito de um mecanismo de passagem ou seleção de entrada (FLORESCO et al., 2001). Como mencionado acima, a ativação da projeção do córtex pré-frontal para o VTA produz liberação de DA no NAc, e este parece ser um processo chave na mediação da recompensa produzidos por cocaína e morfina (TZSCHENTKE e SCHMIDT, 2003).

Os receptores glutamatérgicos são classificados em duas famílias: os receptores ionotrópicos e metabotrópicos. Existem três famílias de receptores ionotrópicos glutamatérgicos, que agem como canais de cátions: os receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), os de alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e os de cainato (receptores de cainato) (DINGLELINE e MCBAIN, 1993). Já os receptores metabotrópicos são acoplados à proteína G e são subclassificados em três grupos com base na homologia de sequência, acoplamento de proteína G e seletividade de ligante. O grupo I inclui os receptores mGluRs 1 e 5; o grupo II inclui

os receptores mGluRs 2 e 3, e o grupo III inclui os receptores mGluRs 4, 6, 7 e 8 (NISWENDER e CONN, 2010).

Uma das principais funções dos receptores glutamatérgicos parece ser a modulação da plasticidade sináptica, uma propriedade do cérebro considerada vital para a memória e o aprendizado. Foi demonstrado que os receptores metabotrópicos e ionotrópicos têm efeito na plasticidade sináptica (DEBANNE et al., 2003). O aumento ou a diminuição no número de receptores ionotrópicos glutamatérgicos em uma célula pós-sináptica pode levar à potenciação de longo prazo (do inglês *long-term potentiation*, LTP) ou depressão de longo prazo (do inglês *long-term depression*, LTD) dessa célula, respectivamente (MAREN et al., 1993; PÉREZ-OTAÑO e EHLERS, 2005; ASZTÉLY e GUSTAFSSON, 1996). Além disso, os receptores metabotrópicos glutamatérgicos podem modular a plasticidade sináptica, regulando a síntese de proteína pós-sináptica por meio de sistemas de segundos mensageiros (WEILER e GREENOUGH, 1993).

O glutamato e seus receptores são elementos centrais na formação e evocação da memória devido ao seu papel no LTP, mecanismo celular chave da memória e do aprendizado (BASHIR et al., 1993, GRANGER et al., 2013). A LTP é uma forma de plasticidade sináptica, um termo que se refere aos processos bioquímicos pelos quais as sinapses respondem aos padrões de atividade, seja pelo fortalecimento em resposta ao aumento da atividade ou pelo enfraquecimento em resposta à diminuição da atividade. Assim, a LTP é o componente de fortalecimento persistente da plasticidade. É um dos principais mecanismos celulares subjacentes ao modo como o cérebro codifica as memórias (COOKE e BLISS, 2006; BLISS e COLLINGRIDGE, 1993).

Apesar de estar bem estabelecido o papel do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico na dependência produzida por opiáceos/opioides (MALDONADO, 2003), estudos recentes sugerem que uma modificação na plasticidade neuronal nas sinapses glutamatérgicas pode estar relacionada às mudanças observadas na dependência (PU et al., 2002; BAO et al., 2007; RADA et al., 1991). Evidências acumuladas demonstram uma relação entre a modulação do sistema glutamatérgico e o uso abusivo de opioides. Por um lado, o uso crônico de opiáceos altera a

transmissão glutamatérgica (MARTIN et al., 1999a; MARTIN et al., 1999b; XU et al., 2003). Por outro lado, a regulação do sistema glutamatérgico, como o bloqueio de receptores (TANGANELLI et al., 1991; TRUJILLO e AKIL, 1991) ou ativação de transportadores (MAO et al., 2002; NAKAGAWA et al., 2001), previne ou atenua o desenvolvimento da dependência induzida por opiáceos. Além disso, trabalhos mostram que a morfina promove a liberação de glutamato dos terminais glutamatérgicos dos neurônios do córtex pré-frontal medial que se projetam para os neurônios glutamatérgicos do VTA-DA. Assim, a morfina desinibe a entrada (*input*) glutamatérgica para os neurônios dopaminérgicos no VTA e promove a estimulação dos neurônios dopaminérgicos. Nos terminais glutamatérgicos no VTA, a liberação de glutamato está sob o controle inibitório tônico do GABA. A morfina atuando nos receptores μ localizados nos neurônios gabaérgicos promove a inibição desses neurônios, o que leva à desinibição da liberação do glutamato (CHEN et al., 2015; YANG et al., 2020).

Em resumo, existe uma interação entre o sistema dopaminérgico e glutamatérgico na dependência química. Quando o uso da substância psicoativa é iniciado, a neurotransmissão dopaminérgica e glutamatérgica no sistema mesocorticolímbico é ativada. Com a continuidade do uso da substância, as projeções dopaminérgicas podem ser alteradas diferencialmente, resultando em alteração da interação dopamina-glutamato, o que leva a substância psicoativa ter um controle aberrante sobre o comportamento e sobre o consumo compulsivo. A mudança da ingestão controlada para a compulsiva também pode envolver uma mudança do NAc como a estrutura que controla a produção comportamental. Durante a abstinência e o período livre de drogas, a atividade dopaminérgica e glutamatérgica, dentro do sistema mesocorticolímbico, normalizam, mas permanece em estado de hipersensibilidade. A exposição à droga, o estresse e também a exposição aos estímulos condicionados podem desencadear uma recaída completa (TZSCHENTKE e SCHMIDT, 2003).

4.5 Fatores que Contribuem para a Dependência Química: Condicionamento Pavloviano e a Sensibilização Comportamental

O condicionamento pavloviano ou condicionamento clássico é uma forma de aprendizagem na qual há uma associação entre dois estímulos, o estímulo condicionado (EC) e o estímulo incondicionado (EI) (LIU et al., 2016). Esse modelo/método tem sido útil para se estudar os processos de aprendizagem e alterações comportamentais envolvidos na dependência química uma vez que na dependência química há a formação de uma memória associativa da droga com o ambiente (KOOB e VOLKOW, 2010).

Nos estudos farmacológicos com roedores utilizando o método de condicionamento pavloviano, a substância psicoativa é o estímulo incondicionado (EI) que produz uma resposta incondicionada (RI). Já na arena experimental, na qual os animais irão experienciar os efeitos da substância psicoativa, é o estímulo condicionado (EC). A arena experimental por si só não produz efeitos fisiológicos e/ou comportamentais semelhantes aos efeitos das substâncias psicoativas, mas à medida que esses dois estímulos são apresentados juntamente e de forma repetida, o estímulo neutro passa a ter a capacidade de predizer o estímulo incondicionado e será capaz de manifestar uma resposta (resposta condicionada, RC) semelhante à resposta produzida pelo EI. Operacionalmente, após a administração da substância psicoativa (EI), o animal é colocado na arena (EC) e, após várias repetições desse protocolo, quando o animal é colocado na arena sem a administração da substância psicoativa, o animal será capaz de emitir uma série de reações semelhantes aos produzidos pela substância psicoativa, ou seja, a resposta condicionada (BASTOS et al., 2014; CAREY et al., 2014; SANTOS et al., 2015).

No condicionamento pavloviano, a motivação de um animal para entrar em contato ou evitar o estímulo condicionado (EC) está diretamente relacionada à força produzida pela associação do EC com o estímulo incondicionado (EI), ou seja, quanto mais confiável e recompensatória for a associação, mais motivado o animal se torna

para produzir uma resposta condicionada (RC) (ANSELME et al., 2013; ROBINSON et al., 2014).

Estudos utilizando o modelo de condicionamento de preferência de lugar (CPL), um modelo utilizado para se estudar o papel das associações do contexto ambiental com os comportamentos relacionados às recompensas, quer sejam recompensas naturais ou substâncias psicoativas mostraram que a ativação neuronal na VTA é necessária para a aquisição de CPL produzida por morfina (HARRIS et al., 2007; MOADDAB et al., 2009). Em outro estudo, foi mostrado que a estimulação *in vivo* das projeções dopaminérgicas da VTA para o núcleo *accumbens* resultou no aumento da resposta condicionada produzida pela morfina observada no modelo de CPL (KOO et al., 2012).

Trabalhos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa utilizando um modelo de dependência química, mostraram que após um período de cinco dias de associação entre administração de morfina 10 mg/kg e a arena experimental, houve a expressão de uma resposta locomotora condicionada. O interessante desses trabalhos é que os animais permaneceram na arena experimental por um período de cinco minutos diários, mostrando que esse tempo foi suficiente para o desenvolvimento de uma resposta condicionada nos animais, provavelmente devido à força produzida pela associação entre a morfina e o ambiente, com a formação de uma memória relacionada a essa associação (LEITE et al., 2019; BASTOS et al., 2020).

Outro fator que contribui para o desenvolvimento e manutenção da dependência química é a sensibilização comportamental. A sensibilização comportamental é um processo neuroadaptativo caracterizado por um aumento em um determinado comportamento, após a administração repetida da mesma concentração de uma substância psicoativa (STEKETEE e KALIVAS, 2011; CARRARA et al., 2014). Já está estabelecido na literatura que as substâncias psicoativas como, por exemplo, morfina, cocaína, heroína e anfetamina, produzem a sensibilização comportamental (VANDERSCHUREN et al., 2010; PICKENS et al., 2011; MCKIN, 2013, OLIVEIRA et al., 2019).

As áreas encefálicas como a VTA no mesencéfalo, NAc e córtex pré-frontal medial (CPFm) são importantes para o desenvolvimento da sensibilização. Especificamente, as projeções dopaminérgicas da VTA e as projeções glutamatérgicas do CPFm para o NAc estão envolvidas no desenvolvimento da sensibilização comportamental, com destaque para o NAc que é um substrato neural essencial para sua expressão (PISANI et al., 2001; HALEEM et al., 2015; MULLER e HOMBERG, 2015; KOOB e VOLKOW, 2016).

Estudos mostraram que a associação do contexto ambiental com as drogas de abuso, em algumas circunstâncias, pode ser um fator determinante para o desenvolvimento da sensibilização comportamental (MCDUGALL et al., 2011, 2014; RUEDA et al., 2012). É importante ressaltar que a sensibilização é um processo de aprendizagem não associativo, mas, contudo, é potencializada quando ocorre em conjunto com ambiente experimental habitual (VANDERSCHUREN, 2001; MCKIN, 2013). Assim, a sensibilização comportamental pode ser dependente e independente do contexto. O trabalho de Wang e colaboradores (2013) mostrou que o grupo de animais que recebeu morfina na dose de 20 mg/kg em um contexto habitual expressou a sensibilização comportamental. No trabalho de Marinho e colaboradores (2015), foi observado que uma única administração de morfina na dose 20 mg/kg foi suficiente para induzir tanto a sensibilização comportamental quanto as neuroadaptações em roedores após o teste desafio de droga.

Recentemente, Leite e colaboradores (2019) mostraram que a morfina na dose de 10 mg/kg administrada por via subcutânea desenvolveu a sensibilização comportamental em roedores, na qual ocorreu após um período de cinco dias de associação entre administração de morfina 10 mg/kg e a arena experimental. O protocolo de administração utilizado foi em um período de cinco dias, de modo que o animal permaneceu no ambiente experimental por apenas cinco minutos ao dia. Vale destacar que a sensibilização foi duradoura, uma vez que os animais expressaram a sensibilização comportamental no teste desafio do experimente.

4.6 Apomorfina

A APO é uma substância agonista do sistema dopaminérgico, atuando em receptores do tipo D1 e D2, mas mostra maior afinidade para receptores D1 em comparação com receptores D2 (STOCCHI et al., 2011).

Após ser distribuída sistemicamente, a apomorfina possui uma elevada porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas. Seu metabolismo ocorre através de várias vias enzimáticas, incluindo oxidação, n-desmetilação, sulfatação, glicuronidação e metabolismo pela COMT (catecol-o-metil-transferase), assim como por oxidação não enzimática (KVERNMO et al., 2006), passa por um intenso processo de metabolismo de primeira passagem quando administrada por via oral, necessitando de uma grande concentração da droga para promover o efeito terapêutico e por consequência da dose, podem aparecer efeitos colaterais como náuseas, vômitos, hipotensão postural e função renal prejudicada que vai refletir na elevação de ureia e creatinina no organismo. Devido aos efeitos colaterais, a administração subcutânea é a via indicada, podendo chegar a um pico plasmático entre 40-60 minutos, com início de ação entre 7-10 minutos (LEES, 1993; MARTINEZ-MARTIN et al., 2011; POEWE et al., 2014).

A apomorfina possui receptores localizados pré e pós-sinápticos (LI et al., 2012; RIBARIC, 2012). Em dose baixa de 0,05 mg/kg, a APO ativa receptores pré-sinápticos do tipo D2, refletindo uma ação antidopaminérgica e tendo como resultado, a diminuição da atividade locomotora em animais experimentais (BASTOS et al., 2014; FERREIRA et al., 2020). Por outro, a administração da dose de 2,0 mg/kg, ativa receptores do tipo D1 e D2 pós-sinápticos, observando o aumento da atividade locomotora em modelos animais. E vale ressaltar que a APO tem o potencial de produzir os processos de condicionamento de sensibilização comportamental que estão inteiramente ligados no quadro da dependência química (SANTOS et al., 2015; SANGUEDO et al., 2017).

A pesquisa desenvolvida por Bastos et al. (2014) mostrou o desenvolvimento e a expressão da sensibilização comportamental e do condicionamento quando a apomorfina na dose de 2,0 mg/kg foi administrada nos animais antes da exposição à

arena experimental. No entanto, estes resultados foram atenuados quando se administrou apomorfina na dose de 0,05 mg/kg imediatamente após uma exposição breve (cinco minutos) ao ambiente experimental. Os resultados também mostraram que a administração de apomorfina 0,05 mg/kg 15 minutos após o término da sessão experimental na arena não surtiu efeito, ou seja, não houve a atenuação da sensibilização comportamental e nem do condicionamento. Quando a apomorfina 0,05 mg/kg foi administrada antes da sessão experimental na arena, observou-se uma redução na atividade locomotora. Assim, a apomorfina na dose de 0,05 mg/kg se torna uma substância interessante para estudos envolvendo o bloqueio da liberação de dopamina.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Sujeitos

Foram utilizados ratos machos, albinos, Wistar, pesando entre 200-250g, provenientes do Biotério Central da UENF, Campos dos Goytacazes, RJ. Os animais ficaram mantidos em gaiolas individuais de plástico tendo acesso livre à água e à ração padronizada de laboratório. As gaiolas ficaram em uma sala do setor de Farmacologia do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA), com temperatura controlada (22 ± 2.0 C) e com ciclo de luz claro e escuro de 12 em 12 horas (luz das 7 às 19 horas). O experimento foi conduzido na fase clara, no horário entre 7:00 e 12:00 horas. Os animais foram manipulados individualmente por cinco minutos diários, durante sete dias antes do início do procedimento experimental. O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) protocolo nº 395 da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

5.2 Ambientes experimentais

O presente experimento foi desenvolvido em quatro salas experimentais (3 X 2m) contendo iluminação vermelha, temperatura controlada (22 ± 2.0 C) e o som de um ventilador em cada sala como ruído de fundo. Cada sala contendo sua arena quadrada medindo 60 x 60 x 45 cm, cujas paredes e assoalhos são pintados na cor preta e câmera filmadora para os testes comportamentais. Para a análise do comportamento locomotor, foram utilizadas câmeras em uma altura de 60 cm acima da arena acoplada a um computador PC compatível contendo um sistema de análise de imagens *EthoVision* (Noldus), localizado fora da sala experimental, a qual quantificou a atividade locomotora em distância percorrida (m).

5.3 Drogas

A morfina (Cristália, Brasil) foi utilizada na dose de 10,0 mg/kg, e administrada por via subcutânea (SC). O volume de administração foi de 1ml/kg.

A apomorfina-Hcl (Sigma, ST. Louis, Mo, USA) – foi utilizada na dose de 0,05 mg/Kg (volume de administração: 1 ml/kg) dissolvida em solução salina, sendo administrada por via subcutânea.

A solução salina (NaCl 0,9%) 1 ml/kg, foi utilizada como veículo e foi administrada por via subcutânea.

As soluções foram preparadas antes de cada dia experimental.

5.4 Procedimento experimental

A figura 1 apresenta o protocolo utilizado no experimento 1.

A figura 2 apresenta o protocolo utilizado no experimento 2.

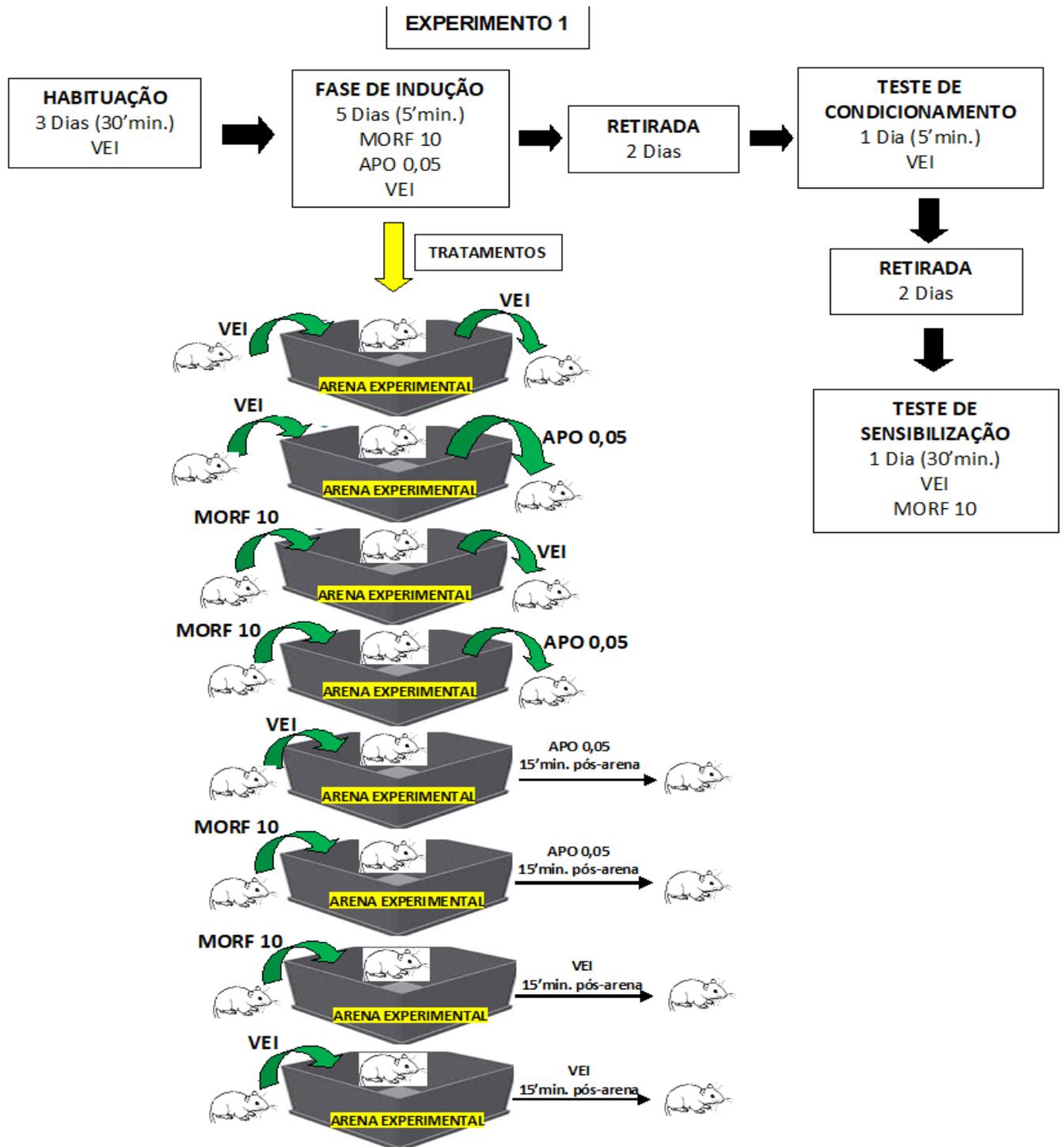


Fig. 1: Protocolo do experimento 1.

VEI=Veículo; APO 0,05=Apomorfina 0,05 mg/kg; APO 0,05-15'=Apomorfina 0,05 mg/kg 15 minutos pós-arena; MORF 10= Morfina 10,0 mg/kg.

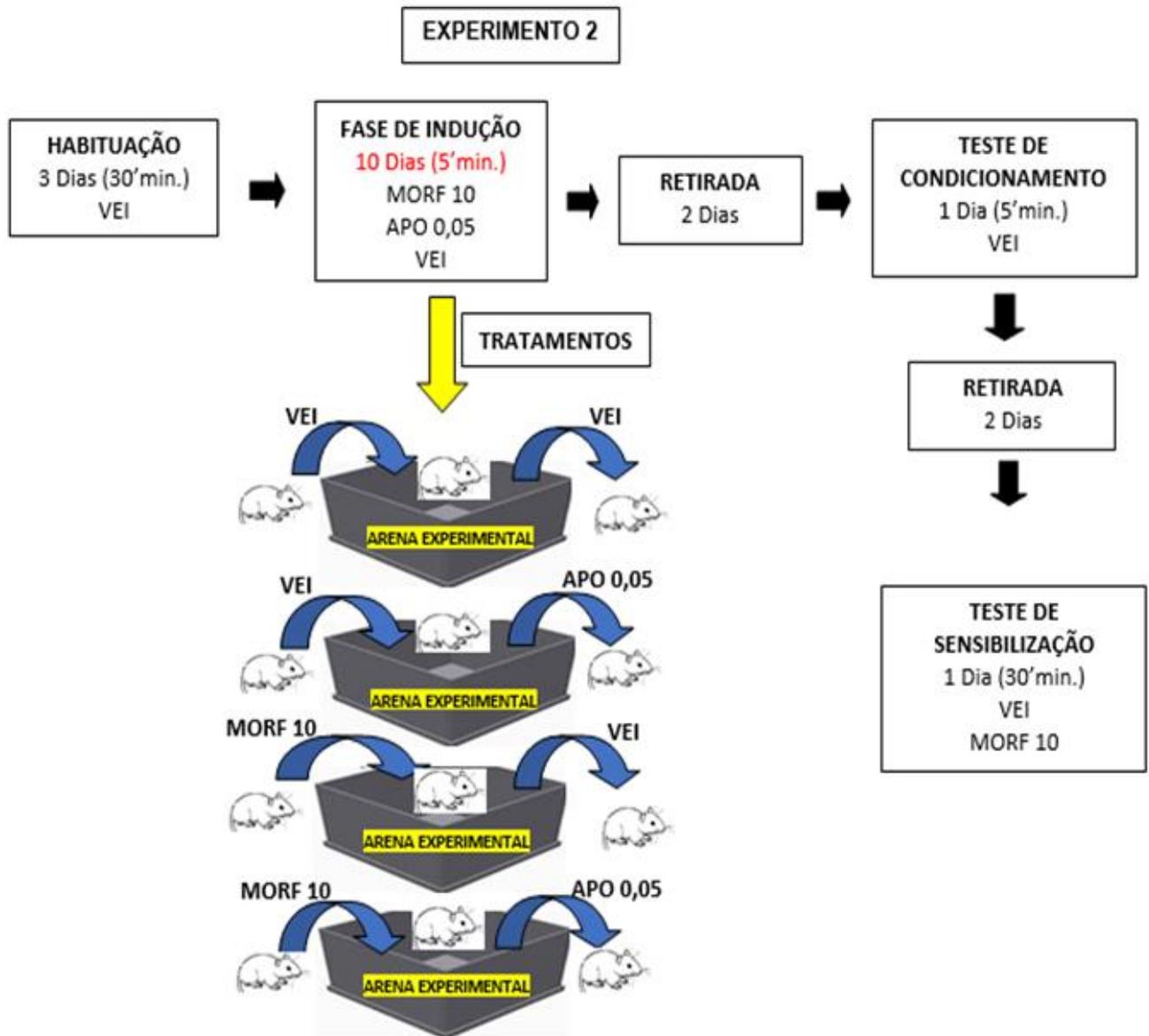


Fig. 2: Protocolo do experimento 2.

VEI=Veículo; APO 0,05=Apomorfina 0,05 mg/kg; MORF 10= Morfina 10,0 mg/kg.

6. ARTIGO

O artigo foi publicado com os dados desta tese e faz parte do manuscrito da tese, apresentado no capítulo 1.

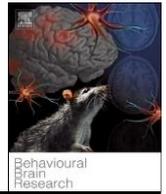
CAPÍTULO 1

Post-trial low dose apomorphine prevents the development of morphine Sensitization.
Revista "Behavioural Brain Research".



Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Behavioural Brain Research



Research report

Post-trial low dose apomorphine prevents the development of morphine sensitization

João Marcos de Mello Bastos^a, Joaquim Barbosa Leite Junior^a, Richard Ian Samuels^b, Robert J. Carey^c, Marinete Pinheiro Carrera^{a,*}

^a Behavioral Pharmacology Group, Laboratory of Animal Morphology and Pathology, State University of North Fluminense Darcy Ribeiro, Avenida Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes, 28013-602 RJ, Brazil

^b Department of Entomology and Plant Pathology, State University of North Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Morphine
Apomorphine
Behavioral sensitization
Conditioning
Consolidation
Addiction

ABSTRACT

The development of sensitization is one of the hallmarks of addictive drugs. Consistent with this relationship many studies have demonstrated that the highly addictive opioid agonist morphine induces sensitization effects. In this study, we administered morphine (10 mg/kg) (MOR) to induce sensitization. In that sensitization is considered to involve associative processes and that dopamine activity is an important contributor to learning and memory processes, we administered a dopamine inhibitory treatment using apomorphine (0.05 mg/kg) (APO) during memory consolidation following a morphine sensitization treatment protocol. Seemingly, a decrease in dopamine activity during consolidation would impair the salience of the association of the morphine response with the contextual cues during consolidation and interfere with the development of morphine sensitization. In two separate experiments, MOR or vehicle (VEH) were administered pre-trial and either VEH or APO were administered post-trial over 5 and 10 days of treatment, respectively. In both the 5 and 10 drug treatment sessions post-trial experiments, MOR groups given VEH immediately post-trial exhibited strong sensitization effects. These sensitization effects were substantially attenuated in the MOR groups given APO immediately post-trial but not in the MOR groups given APO after a 15 min. post-trial delay. In subsequent conditioning and sensitization challenge tests, the MOR groups that had been given APO immediately post-trial exhibited diminished sensitization and conditioned responses relative to MOR groups that had received VEH or APO delayed post-trial. This MOR-APO interaction effect was unique in that it occurred post-trial so that it was only expressed in a pre-trial test in which only MOR was administered. Seemingly, the inhibitory dopamine effect of APO was incorporated into memory during the post-trial consolidation process suggesting that drug/drug interactions can occur during consolidation.

1. Introduction

The use of drug-induced changes in spontaneous motor behavior as a dependent behavioral variable has been employed in numerous studies to assess conditioned stimulant behavior induced by several different stimulant drugs that have pro-dopamine effects such as amphetamine, cocaine, apomorphine and morphine [1,2,5,7,9,10,13,15–17, 22,23,25,35]. These studies have shown in rodents that drug induced locomotor hyperactivity effects undergo conditioning and sensitization with repeated drug/environment pairings. This Pavlovian drug conditioning is well recognized to be of substantial importance for understanding and treating drug abuse and addiction in that cues experienced

in association with drug taking can become capable of eliciting a drug-like effect and triggering craving and relapse [20].

The present investigation is focused on morphine induced conditioning and sensitization. Numerous studies have shown that in mice and rats, morphine induces locomotor stimulation effects that undergo sensitization and conditioning with repeated treatments [14,19,24,27–29,31–33]. Recently, we have also reported [12] locomotor conditioning and sensitization effects in rats following repeated morphine (10.0 mg/kg) treatments. After conditioned morphine effects had been induced, we demonstrated [12] that a low dose of apomorphine (0.05 mg/kg) could attenuate the morphine conditioned hyperactivity if it was administered immediately but not delayed by 15 min.

following a brief five minute conditioning test that elicited a morphine conditioned hyper-activity response. In contrast, the same immediate post-trial apomorphine treatment given to vehicle or unpaired morphine groups had no effects on behavior.

In the present report, we again administered morphine pre-trial to induce sensitization and conditioned morphine effects. Whereas in our previous morphine conditioning study [12] the post-trial low dose (0.05 mg/kg) apomorphine treatments were initiated after the induction of conditioning and sensitization effects. In the present study, we administered the low dose apomorphine treatments post-trial during the morphine induction phase to determine if the post-trial low dose apomorphine treatments would also prevent or attenuate the development of morphine sensitization and conditioning. In two separate experiments, morphine (10.0 mg/kg) pre-trial treatments were administered and the animals were tested for locomotor activity in an open-field arena. In the first experiment, post-trial apomorphine (0.05 mg/kg) treatments were administered either immediately post-trial in order to have the opportunity to occur during the post-trial consolidation period or after a 15 min. post-trial delay, as a control for the post-trial apomorphine effects. In contrast, to conventional drug-drug interaction paradigms the present studies employed a unique paradigm in which the drug-drug interaction was designed to occur during consolidation/ re-consolidation of the drug experience. The present report details the findings of these experiments.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Male Wistar albino rats provided by the State University of North Fluminense Darcy Ribeiro, initially weighing 200–300 g were housed in individual plastic cages (25 × 18 × 17 cm) until the end of the experiment. 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 occurred between 8:00 and 12:00 h. For 7 days prior to all experimental procedures, each animal was weighed and handled daily for 5 min. All experiments were performed in compliance with Brazilian Council for Animal Experimentation (CONCEA), which are based on the US National Institutes of Health guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

2.2. Drugs

Morphine sulfate (Cristalia, São Paulo, Brazil) was used from 10 mg ampoules (1 ml) and was injected subcutaneously in the nape of the neck at a dose of 10 mg/kg [12,21,30,32]. 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. 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 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 [18] and to enhance the contrast between the white subject and the dark background of the test chamber. 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

Two separate experiments were conducted following a modified protocol from Carrera and co-workers [6]. Prior to the start of each experiment, all animals received an acclimation protocol that entailed one week of extensive handling and saline injections. Next, all the animals were given three 30 min. vehicle (VEH) tests in the open-field arena to familiarize the animals to the test arena. Two separate experiments were conducted and in each experiment, the procedure consisted of three phases: An induction phase, a conditioning test phase and a sensitization challenge test phase. In the induction phase, the groups were injected with either VEH or MOR (morphine 10 mg/kg) immediately prior to a 5 min. placement in the test arena. In the first experiment, the induction phase entailed 5 daily five min. test sessions and in the second experiment the induction phase was extended to 10 daily five min. test sessions. In each experiment, the induction phase was followed two days later by a five min conditioning test in which all groups received VEH before testing but no injections post-trial. The conditioning test was followed two days later by a five min. MOR sensitization challenge test in which all groups received MOR prior to testing except for VEH groups that received VEH to control for possible changes in the behavioral baseline response level.

In the first experiment eight groups (n = 7 animals per group) were used and in the second experiment four groups (n = 5–6 animals per group) were used. In the first experiment, four groups received VEH and four groups received MOR immediately prior to the five min. placement in the test arena. Post-trial, the groups received either VEH or APO. The post-trial treatments were administered either immediately upon removal from the test arena or 15 min. after removal from the arena. The designation of groups based on the induction treatments is as follows: The two VEH groups that received VEH immediately or delayed 15 min. post-trial are (VEH/VEH-I) and (VEH/VEH-D), the remaining two VEH groups received APO either immediately post-trial (VEH/APO-I), or 15 min. post-trial (VEH/APO-D). The two MOR groups that received VEH post-trial are (MOR/VEH-I and MOR/VEH-D). The two MOR groups that received APO post-trial are (MOR/APO-I and MOR/VEH-D).

The second experiment was conducted as a replication and extension of the immediate post-trial experiment. The objective of the extension was to increase the number of induction sessions from 5 to 10 in an effort to achieve asymptotic performance levels. In this experiment four groups were used (n = 5–6 animals per group) and only the immediate post-trial treatment protocol was used. The group designations are as follows (VEH/VEH, VEH/APO, MOR/VEH and MOR/APO). In all other aspects, the test protocol was the same as that of the immediate post-trial five induction sessions experiment except there were ten induction sessions. In both experiments the induction phase, conditioning test and sensitization challenge test sessions lasted five minutes. This brief test session was used during induction to increase the likelihood that the subsequent immediate post-test treatments occurred during consolidation of the drug treatment/context association. In addition, the previous study [12], showed that the sensitization effects of morphine pre-trial treatments manifested in the initial five minutes of the induction session mirrored the sensitization effects observed for the thirty min. induction session. Thus, a five min. induction session was sufficient to generate sensitization effects.

2.5. Statistics

In the morphine induction protocol, a repeated two-factor analysis of variance (ANOVA) was used to determine the treatment, days, and interaction effects. When a significant effect of treatment group versus induction day interaction was obtained, data were further evaluated by

FIVE INDUCTION SESSIONS EXPERIMENT

FIVE INDUCTION SESSIONS EXPERIMENT

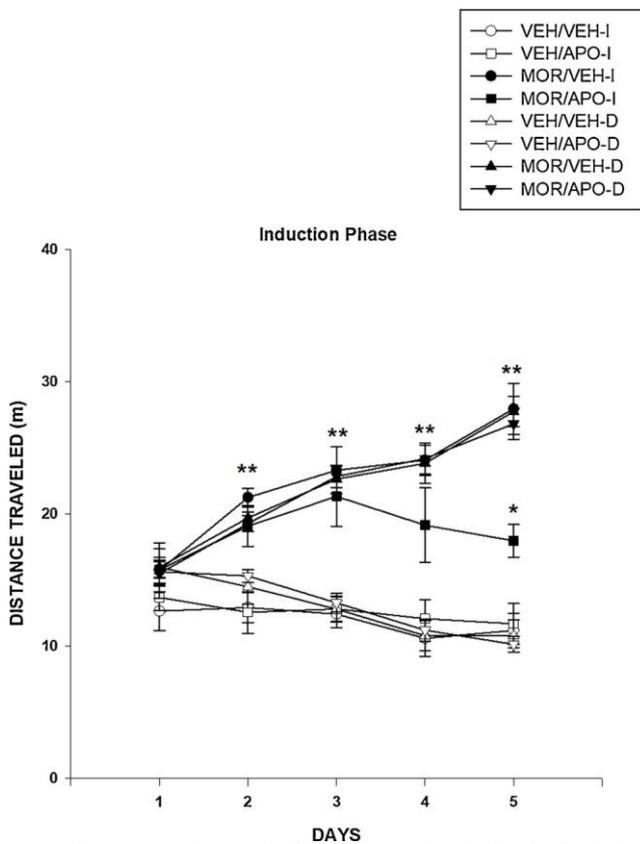


Fig. 1. The Means and SEMs for distance scores (m) during the five induction sessions in which the post-trial treatments of VEH or APO were administered immediately post-trial. ** $p < 0.05$ vs. all groups, * $p < 0.05$ vs. all vehicle groups.

one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc tests using $p < 0.05$ as the criterion for statistical significance. The behavioral data obtained from the conditioning and sensitization 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 using the Tukey test. Statistical analyses were performed using SPSS Statistics 21 (IBM).

3. Results

3.1. Five induction sessions experiment

Fig. 1 presents the locomotor activity over the course of induction days 1–5. A repeated two-factor treatment by day ANOVA showed a treatment group X day interaction effect [$F(28, 192) = 10.23$; $p < 0.01$], an effect of groups [$F(7, 48) = 23.45$; $p < 0.01$] and an effect of days of treatment [$F(4, 192) = 11.09$; $p < 0.01$]. One-way ANOVAs followed by Tukey test to further analyze the interaction of group X days showed that on day 1 there were no differences among the groups [$F(7, 48) = 1.02$; $p > 0.05$]. On day 2 [$F(7, 48) = 10.0$; $p < 0.01$], day 3 [$F(7, 48) = 16.20$; $p < 0.01$] and day 4 [$F(7, 48) = 17.62$; $p < 0.01$], however, there were differences among the experimental groups and the Tukey test showed that all MOR groups except the MOR/APO-I group had higher locomotion distance scores than all VEH groups ($p < 0.05$). On day 5 [$F(7, 48) = 39.0$; $p < 0.01$], the MOR/VEH-I, MOR/VEH-D and MOR/APO-D groups had higher locomotion than all groups ($p < 0.05$). The MOR/APO-I group had higher locomotion than all VEH groups ($p < 0.05$).

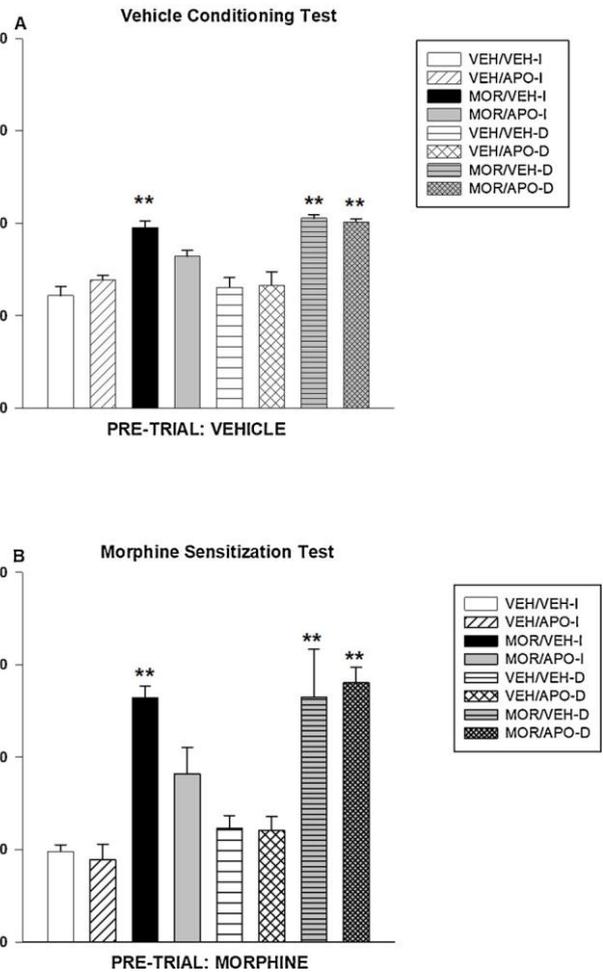


Fig. 2. A. The Means and SEMs for distance scores during the conditioning test in which all groups received vehicle before testing. B. The Means and SEMs for distance scores during the sensitization test in which groups received morphine 10 mg/kg before testing. ** $p < 0.05$ vs. all groups.

The results for the conditioning test are presented in Fig. 2A. A one-way ANOVA [$F(7, 48) = 17.41$; $p < 0.01$] indicated statistically significant differences among groups and specific group comparisons using the Tukey test showed that the MOR/VEH-I, MOR/VEH-D and MOR/APO-D groups had higher locomotion than all groups ($p < 0.05$). The results of morphine sensitization test are presented in Fig. 2B. The one-way ANOVA showed that there were differences among the experimental groups [$F(7, 48) = 22.60$; $p < 0.01$] and individual group comparisons using Tukey test showed that the MOR/VEH-I, MOR/VEH-D and MOR/APO-D groups had higher locomotion than all groups ($p < 0.05$).

3.2. Ten induction sessions experiment

Fig. 3 shows the locomotor activity over the course of days 1–10 for the 10 days of induction. A repeated two-factor treatment by day ANOVA showed a treatment group X day interaction effect [$F(27, 171) = 4.0$; $p < 0.01$], an effect of treatments [$F(3, 19) = 25.0$; $p < 0.01$] and an effect of days of treatment [$F(9, 171) = 6.0$; $p < 0.01$]. One-way ANOVAs with p values of $p < 0.05$ were followed by Tukey tests to identify specific group differences. The one-way ANOVAs showed that on day 1 there were no differences among the groups ($p > 0.05$). On day 2 through day 10, the one-way ANOVAs

TEN INDUCTION SESSIONS EXPERIMENT

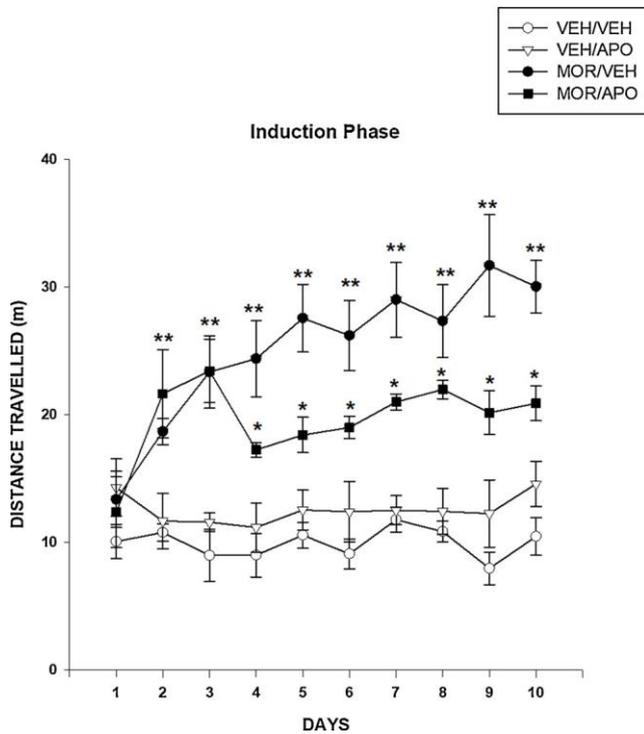


Fig. 3. The Means and SEMs for distance scores during the ten induction sessions in which the post-trial treatments of VEH or APO were administered immediately post-trial. ** $p < 0.05$ vs. all groups, * $p < 0.05$ vs. all VEH groups.

had p values < 0.01 . On day 2 and day 3 the Tukey test showed that both groups that received MOR regardless of post-trial treatment had higher locomotion distance scores than the groups that received VEH ($p < 0.05$). From day 4 until the end of induction phase, the MOR/VEH group had higher locomotion than all groups ($p < 0.05$). The MOR/APO had higher locomotion than the VEH groups ($p < 0.05$) and there were no differences between VEH groups ($p > 0.05$). As was observed in the 5 session induction experiment, in which a decline in activity level for the MOR/APO-I group on day 4 was suggested in this 10-treatment session experiment, the reduction in activity level on day 4 was more apparent and statistically significant.

The conditioning test results are presented in Fig. 4A. A one-way ANOVA [$F(4, 29) = 15.10$; $p < 0.01$] showed that there were statistically significant differences among groups. Specific group comparisons were made using the Tukey test and showed that the MOR/VEH and the MOR/APO groups had higher locomotion than the VEH groups ($p < 0.05$). The VEH groups did not differ from each other ($p > 0.05$). The results of the sensitization challenge test are shown in Fig. 4B. The one-way ANOVA indicated statistically significant differences among groups [$F(3, 15) = 15.7$; $p < 0.01$]. Individual group comparisons using Tukey test indicated that the MOR/VEH group had higher locomotion distance scores than all groups ($p < 0.05$) and that the MOR/APO group had distance scores greater than the VEH groups ($p < 0.05$) that did not differ from each other ($p > 0.05$).

4. Discussion

In both the 5 and 10 MOR induction experiments, a strong MOR sensitization effect was evident in the immediate MOR/VEH groups that were attenuated in the immediate MOR/APO groups. In both experiments the MOR/VEH-I and MOR/APO-I groups performances were indistinguishable over the first three test sessions but diverged on session

TEN INDUCTION SESSIONS EXPERIMENT

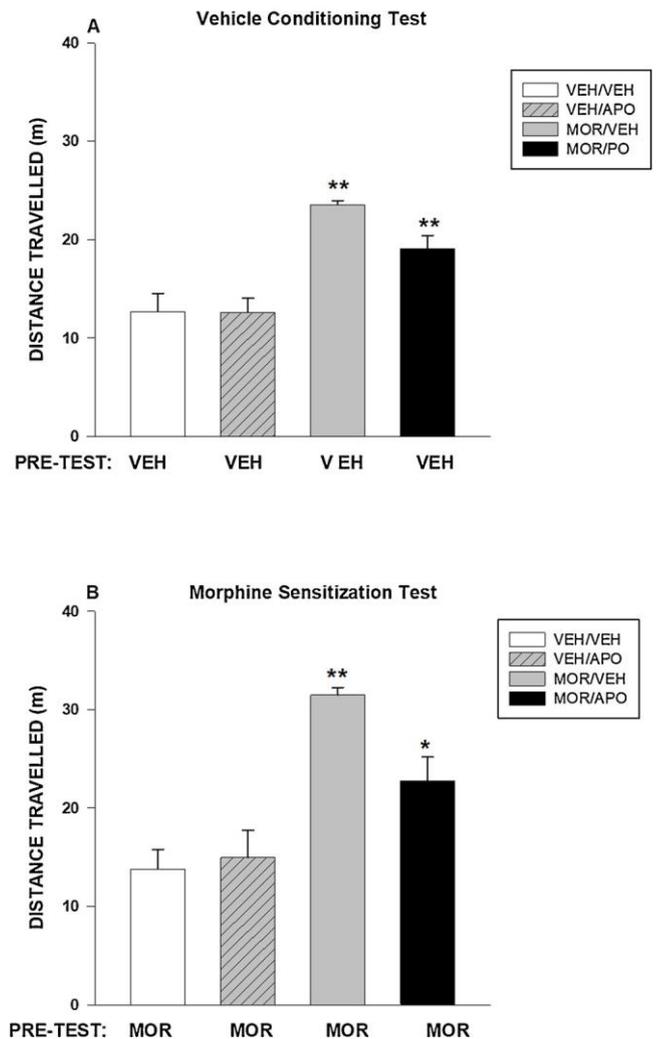


Fig. 4. A. The Means and SEMs for distance scores during the conditioning test in which all groups received vehicle before testing. ** $p < 0.05$ vs. all groups.

B. The Means and SEMs for distance scores during the sensitization test in which all groups received morphine 10 mg/kg before testing. ** $p < 0.05$ vs. all groups, * $p < 0.05$ vs. all vehicle groups.

four and by session 5 the sensitization effects in the MOR/APO-I groups in both experiments were substantially reduced. Furthermore, when APO treatments were delayed 15 min. post-trial in the MOR/APO-D group, robust sensitization was generated comparable to the MOR/VEH-I groups. This result affirmed the critical significance of the post-trial treatment interval for the post-test APO effect and is in line with an effect related to the consolidation process. It has been long established that post-trial events during consolidation can have major effects on the incorporation of an association into memory [11]. On the other hand, the same immediate post-test APO treatment did not modify the activity level for the VEH/APO-I groups in either the immediate 5 or the immediate 10 induction session experiments. We have previously reported similar null effects for VEH/APO immediate post-trial treatment groups [12]. The consistent element for the absence of an immediate post-trial APO inhibitory effect in VEH animals is that the animals were extensively habituated to the test environment prior to the low dose APO post-trial treatment protocol. However, the same immediate post-trial APO treatment administered following exposure to a novel environment

produces a strong inhibitory effect [21]. We have suggested [12] for animals well acclimated to the test environment that the immediate post-trial interval is not a consolidation event and that familiarization with the test environment is analogous to a latent inhibition effect [26,34] whereas, the novel environment experience evokes a consolidation event. Although the MOR/APO groups were also habituated to the test environment prior to the start of the induction protocol, this was their first experience with the MOR plus test environment stimulus complex. In this regard, the test environment in the induction protocol can be considered a novel experience and therefore one more likely to initiate a consolidation process. In that the MOR/APO post-test drug effect seemingly occurs during consolidation, it creates the possibility that the APO effect can become incorporated into the MOR/test environment consolidation process. While this analysis overall is consistent with the present findings, the results are more complex and raise additional questions. First of all, the immediate MOR/APO-I and MOR/VEH-I treatment groups did not differ in their MOR response until test session 4. In terms of the APO treatments, session 4 represents the effect of the third APO post-test treatment that followed induction session 3. A possible clue as to why there was a delay in the efficacy of the low dose APO post-test treatment until the third post-test APO treatment is suggested by the MOR response shown in the induction results in Figs. 1 and 3. First of all, there was no apparent effect of the MOR versus VEH treatments on day 1 so, from the consolidation perspective stated above, there would be no expectation for a post-trial consolidation event after session 1 that could then impact session 2. This finding is not surprising in that test environment familiarization has been shown to prevent the acute locomotor stimulation effects induced by other indirect agonists such as cocaine [4,3]. By day 2 however, there was an effect of the MOR/VEH-I treatments. Seemingly, this MOR response represented the start of a sensitization effect and the initiation of a re-consolidation process following induction day 2. While a MOR effect was initiated on day 2 the influence of the post-trial APO-I treatments was not manifested until induction day 4. The day 4 effect represents the impact of the MOR/APO-I treatment following induction day 3. Whether the inhibitory post-trial APO treatment inhibitory effect required 2 post-trial treatments (post-trial session 2 and post-trial session 3) to be effective or whether the magnitude of the MOR sensitization effect needed to activate a re-consolidation process requires up to 3 treatments at this dose and in this testing protocol remains to be experimentally addressed. Seemingly if the latter is the case then a group that receives its first post-trial APO treatment after the third or fourth MOR treatment would have the same inhibitory effect on the fourth or fifth MOR induction treatment as a group that receives the same APO treatments after every MOR treatment as was the case in the present study. The conditioning and sensitization challenge test results are another interesting facet of the findings obtained in the present study. In the 5 day induction experiment, the post-trial MOR/APO-I conditioned and sensitization effects were reduced and did not reach statistical significance when compared to the VEH groups. In the 10 day experiment, a conditioned response was observed in the MOR/APO-I group but the sensitization response in the challenge test was diminished relative to the sensitization response in the MOR/VEH-I group. Seemingly, the partial sensitization response in the MOR/APO-I over the course of the 10 treatment sessions was sufficient to generate a conditioned response. The finding in the present report that a low dose APO treatment given immediately post-trial to MOR treated animals substantially attenuated the sensitization response induced by MOR is consistent with our earlier report [12] in which the same low dose APO treatment administered immediately post-trial during the re-consolidation of a MOR conditioned response markedly diminished the conditioned response. While the importance of dopamine in motor behavior has been long known, Beninger (1983) [8] demonstrated that dopaminergic stimulant drugs do not simply increase movement but also enhance the salience and incentive value of the environmental stimuli.

Consequently, a dopaminergic inhibitory treatment induced by the low dose of apomorphine used in the present study would seemingly decrease the salience and incentive value of the contextual cues present during consolidation. Guided by this framework, the dopamine inhibitory effect of the APO during consolidation on salience and incentive value would decrease the motivational significance of the association. The unusual feature of this algebraic summation in the present study is that it occurs post-trial and is incorporated in memory and that the algebraic summation is manifested in a subsequent MOR test without the APO treatment.

In conclusion, the present findings raise several important issues regarding the sensitization/conditioning relationship and suggest a number of new protocols pertinent to this issue. For example, how the post-trial MOR/APO interaction compares to the pre-trial MOR/APO interaction will be important to determine. That is, after the completion of an induction protocol, would the response of the pre versus post-trial MOR/APO groups differ in a VEH conditioning test, a MOR sensitization challenge test as well as a test in which APO is administered pre-trial. This assessment will allow for a determination as to whether the associative drug/drug interaction effect that occurs in the presence of contextual stimuli is different from when the drug-drug interaction occurs post-trial. Thus, the present study suggests several new methodological directions for the investigation of drug interactions relevant to drug conditioning and sensitization

Acknowledgements

This research was supported by UENF and FAPERJ (nº E-26/200.895/2017). J.M.M.B. and J.B.L.J. are recipient of a fellowship from CAPES-Brazil. R.I.S. is a CNPq research fellow.

References

- S.G. Anagnostaras, T.E. Robinson, Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: modulation by associative learning, *Behav. Neurosci.* 110 (1996) 1397–1414, <https://doi.org/10.1037//0735-7044.110.6.1397>.
- A.Y. Bespalov, E.E. Zvartau, Intraaccumbens administration of NMDA receptor antagonist (+/-)-CPP prevents locomotor activation conditioned by morphine and amphetamine in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 55 (1996) 203–207, [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(96\)00065-2](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(96)00065-2).
- R.J. Carey, E.N. Damianopoulos, Cocaine conditioning and sensitization: the habituation factor, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84 (2006) 128–133, <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.04.017>.
- R.J. Carey, G. DePalma, E. Damianopoulos, 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 (2005) 321–330, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.09.012>.
- R.J. Carey, J. Gui, Cocaine conditioning and cocaine sensitization: what is the relationship? *Behav. Brain Res.* 92 (1998) 67–76, [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(97\)00126-5](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(97)00126-5).
- M.P. Carrera, R.J. Carey, F.R. Cruz Dias, M. de F. dos Santos Sampaio, L.W. de Matos, Post-trial apomorphine at an autoreceptor dose level can eliminate apomorphine conditioning and sensitization: support for the critical role of dopamine in re-consolidation, *Behav. Brain Res.* 236 (2013) 244–250, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.06.025>.
- M. Chen, Y. Zhao, H. Yang, W. Luan, J. Song, D. Cui, Y. Dong, B. Lai, L. Ma, P. Zheng, Morphine disinhibits glutamatergic input to VTA dopamine neurons and promotes dopamine neuron excitation, *Elife.* 04 (2015) 01–25, <https://doi.org/10.7554/eLife.09275>.
- R.J. Beninger, The role of dopamine in locomotor activity and learning, *Brain Res. Rev.* 287 (1983) 173–196, [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(83\)90038-3](https://doi.org/10.1016/0165-0173(83)90038-3).
- E.N. Damianopoulos, R.J. Carey, Pavlovian conditioning of CNS drug effects: a critical review and new experimental design, *Rev. Neurosci.* 03 (1992) 65–77, <https://doi.org/10.1515/revneuro.1992.3.1.65>.
- G. Di Chiara, A. Imperato, Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 85 (1988) 5274–5278, <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5274>.
- Gasbarri, C. Tomaz, Memory and motivational/emotional processes, *Front. Behav. Neurosci.* 5 (2012) 05–06, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00071>.
- J.B. Leite Junior, J.M. de Mello Bastos, R.I. Samuels, R.J. Carey, M.P. Carrera, Reversal of morphine conditioned behavior by an anti-dopaminergic post-trial drug treatment during re-consolidation, *Behav. Brain Res.* 359 (2019) 771–782, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.08.009>.
- X.S. Liu, Y. Hou, T.L. Yan, Y.Y. Guo, W. Han, F.L. Guan, T. Chen, T. Li, Dopamine D

- receptor-regulated NR2B subunits of N-methyl-D-aspartate receptors in the nucleus accumbens involves in morphine-induced locomotor activity, *CNS Neurosci. Ther.* 20 (2014) 823–829, <https://doi.org/10.1111/cns.12276>.
- L. Lu, N.J. Xu, X. Ge, W. Yue, W.J. Su, G. Pei, L. Ma, Reactivation of morphine-conditioned place preference by drug priming: role of environmental cues and sensitization, *Psychopharmacology* 159 (2002) 125–132, <https://doi.org/10.1007/s002130100885>.
- B.A. Mattingly, J.E. Gotsick, K. Salamanca, Latent sensitization to apomorphine following repeated low doses, *Behav. Neurosci.* 102 (1988) 553–558, <https://doi.org/10.1037//0735-7044.102.4.553>.
- B.A. Mattingly, C. Koch, F.H. Osborne, J.E. Gotsick, Stimulus and response factors affecting the development of behavioral sensitization to apomorphine, *Psychopharmacology* 130 (1997) 109–116, <https://doi.org/10.1007/s002130050217>.
- T. Mori, Y. Iwase, T. Saeki, N. Iwata, A. Murata, D. Masukawa, T. Suzuki, Differential activation of dopaminergic systems in rat brain basal ganglia by morphine and methamphetamine, *Neuroscience* 322 (2016) 164–170, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.043>.
- A.G. Nasello, C. Machado, J.F. Bastos, L.F. Felicio, Sudden darkness induces a high activity-low anxiety state in male and female rats, *Physiol. Behav.* 63 (1998) 451–454, [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(97\)00462-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00462-9).
- J.L. Neisewander, M.T. Bardo, Expression of morphine-conditioned hyperactivity is attenuated by naloxone and pimozide, *Psychopharmacology (Berl.)* 93 (1987) 314–319, <https://doi.org/10.1007/bf00187249>.
- C.P. O'Brien, A.R. Childress, A.T. McLellan, R. Ehrman, Developing treatments that address classical conditioning, *NIDA Res. Monogr.* 135 (1993) 71–91.
- L.R. Oliveira, B.G.D. Santos, J.M. de Mello Bastos, R.I. Samuels, R.J. Carey, M.P. Carrera, Morphine administered post-trial can induce potent conditioned morphine effects, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 179 (2019) 134–141, <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2019.02.014>.
- R. Pickens, J.A. Dougherty, Conditioning of the activity effects of drugs, in: T. Thompson, R. Pickens (Eds.), *Stimulus Properties of Drugs*, Springer, Boston, MA, 1971, pp. 39–50, https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0788-5_3.
- R.M. Post, S.R. Weiss, D. Fontana, A. Pert, Conditioned sensitization to the psychomotor stimulant cocaine, *Annals N.Y. Academy of Sciences.* 654 (1992) 386–399, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb25983.x>.
- K.R. Powell, S.G. Holtzman, Parametric evaluation of the development of sensitization to the effects of morphine on locomotor activity, *Drug Alcohol Depend.* 62 (2001) 83–90.
- J.K. Rowlett, B.A. Mattingly, M.T. Bardo, Neurochemical and behavioral effects of acute and chronic treatment with apomorphine in rats, *Neuropharmacology* 30 (1991) 191–197.
- C. Ruob, I. Weiner, J. Feldon, Haloperidol-induced potentiation of latent inhibition: interaction with parameters of conditioning, *Behav. Pharmacol.* 09 (1998) 245–253.
- S. Scheggi, F. Masi, A. Tagliamonte, C. Gambarana, P. Tolu, M.G. De Montis, Rats sensitized to morphine are resistant to the behavioral effects of an unavoidable stress, *Brain Res.* 853 (2000) 290–298.
- R. Sharf, D.J. Guarnieri, J.R. Taylor, R.J. DiLeone, Orexin mediates morphine place preference, but not morphine-induced hyperactivity or sensitization, *Brain Res.* 1317 (2010) 24–32.
- T.M. Tzschentke, W.J. Schmidt, N-methyl-D-aspartic acid-receptor antagonists block morphine-induced conditioned place preference in rats, *Neurosci. Lett.* 193 (1995) 37–40, [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11662-G](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11662-G).
- L.J. Vanderschuren, T.J. De Vries, G. Wardeh, F.A. Hogenboom, A.N. Schoffmeier, A single exposure to morphine induces long-lasting behavioural and neurochemical sensitization in rats, *Eur. J. Neurosci.* 14 (2001) 1533–1538.
- L.J. Vanderschuren, A.N. Schoffmeier, A.H. Mulder, T.J. De Vries, Dopaminergic mechanisms mediating the long-term expression of locomotor sensitization following pre-exposure to morphine or amphetamine, *Psychopharmacology* 143 (1999) 244–253, <https://doi.org/10.1007/s002130050943>.
- L.J. Vanderschuren, G.H. Tjon, P. Nestby, A.H. Mulder, A.N. Schoffmeier, T.J. De Vries, Morphine-induced long-term sensitization to the locomotor effects of morphine and amphetamine depends on the temporal pattern of the pretreatment regimen, *Psychopharmacology* 131 (1997) 115–122.
- P. Vezina, J. Stewart, Conditioning and place-specific sensitization of increases in activity induced by morphine in the VTA, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 20 (1984) 925–934.
- Weiner, J. Feldon, Facilitation of latent inhibition by haloperidol in rats, *Psychopharmacology* 91 (1987) 248–253, <https://doi.org/10.1007/bf00217073>. S.P. Weisberg, G.B. Kaplan, Adenosine receptor antagonists inhibit the development

7. DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo verificar se a inibição da liberação dopaminérgica durante o período de consolidação da memória enfraqueceria uma resposta locomotora condicionada e sensibilizada produzida por morfina 10 mg/kg. Para isso, realizaram-se dois experimentos que tiveram as mesmas fases protocolares: habituação, fase de indução, período de retirada 1, teste de condicionamento, período de retirada 2 e teste de sensibilização. A diferença entre os dois experimentos foi na fase de indução, na qual o experimento 1 teve a duração de cinco dias consecutivos e o experimento 2 teve a duração de 10 dias consecutivos.

Na fase de indução dos dois experimentos, os grupos receberam os tratamentos com morfina 10 mg/kg, para a indução de uma resposta locomotora condicionada e sensibilizada, imediatamente antes da sessão na arena experimental, obedecendo um protocolo de condicionamento pavloviano de atraso (pré-arena) e receberam o tratamento antidopaminérgico imediatamente após o fim da sessão experimental na arena, obedecendo um protocolo pavloviano de traço (pós-arena). Como tratamento antidopaminérgico, utilizou-se apomorfina 0,05 mg/kg que atua nos receptores D2 pré-sinápticos, inibindo a liberação de dopamina (BASTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2015).

É importante ressaltar que antes do início dos tratamentos farmacológicos, todos os animais passaram por um período de habituação à arena experimental. A fase de habituação teve a duração de três dias consecutivos com sessão diária de 30 minutos na arena. Os resultados mostraram que houve uma diminuição da atividade locomotora ao longo dos três dias do período de habituação (dados não mostrados), refletindo uma familiarização dos animais com os procedimentos experimentais (COSTA et al., 2014). Além disso, esses resultados asseguram que antes do início dos tratamentos farmacológicos, os animais apresentaram um nível de atividade locomotora equivalente (CERBONE e SADILE, 1994).

O experimento 1 contou com oito grupos, sendo que quatro grupos receberam o tratamento pós-arena imediatamente após o fim da sessão experimental (grupos imediatos), ou seja, dentro da janela de consolidação da memória e os outros quatro grupos receberam o tratamento pós-arena 15 minutos após o fim da sessão

experimental (grupos “*delay*”), ou seja, fora da janela de consolidação da memória. Essa diferença no tempo de administração dos tratamentos pós-arena foi para assegurar que os resultados decorrentes do tratamento antidopaminérgico ocorreriam dentro da janela de consolidação da memória. A consolidação da memória leva provavelmente cerca de cinco a 10 minutos e a consolidação é concluída após cerca de uma hora ou mais (DHARANI, 2015). A consolidação da memória é o processo de conversão da memória de curta duração em memória de longo prazo. O mecanismo subjacente a este processo é a Potenciação de Longo Prazo (do inglês “*Long-Term Potentiation*”; LTP). O processo de potenciação de longo prazo requer algum tempo para ser eficaz - normalmente 5-10 minutos para consolidação mínima, uma hora para consolidação mais forte (CLOPATH, 2012). O experimento 2 contou com quatro grupos que receberam os tratamentos pós-arena imediatamente após o término da sessão experimental.

Os resultados mostraram que no experimento 1, os grupos MOR/VEI, MOR/VEI-15', MOR/APO-15' e no experimento 2, o grupo MOR/VEI, apresentaram um aumento da atividade locomotora, expressando o desenvolvimento da locomoção sensibilizada quando comparados com os grupos VEI/VEI, VEI/VEI-15' e MOR/APO-I. Esses resultados corroboram com os dados presentes na literatura científica que mostram que a morfina produz o desenvolvimento de uma resposta locomotora sensibilizada (VANDERSCHUREN et al., 2010; MORI et al., 2016; ZHANG e KONG, 2017). Leite et al. (2019) mostraram que o tratamento com morfina de forma associada produziu o desenvolvimento da sensibilização comportamental, que se traduz pelo aumento da atividade locomotora ao longo dos dias de administração e o aumento foi significativo após repetidos tratamentos, mais precisamente ao terceiro dia da fase de indução. Uma propriedade farmacológica bem interessante que a morfina possui é a capacidade de estimular tanto os neurônios dopaminérgicos quanto os neurônios glutamatérgicos, ocasionando o desenvolvimento da sensibilização comportamental. Segundo CHEN e colaboradores (2015) e YANG e colaboradores (2020), a morfina desinibe a entrada (*input*) glutamatérgica para os neurônios dopaminérgicos no VTA e promove a estimulação dos neurônios dopaminérgicos, e quando atua nos receptores μ localizados nos neurônios gabaérgicos promove a inibição desses neurônios, o que leva a desinibição da liberação do glutamato que é um neurotransmissor com característica excitatória (CHEN et al., 2015; YANG et al., 2020).

Por outro lado, os resultados mostraram que na fase de indução, ocorreu uma atenuação do desenvolvimento da sensibilização comportamental no grupo MOR/APO-I nos experimentos 1 e 2. Dados presentes na literatura mostram que a apomorfina administrada na dose de 0,05 mg/kg dentro da “janela de consolidação da memória” atua em receptores pré-sinápticos do tipo D₂ inibindo a liberação de dopamina para vias dopaminérgicas, tendo por consequência um efeito inibitório, atenuando ou inibindo os efeitos excitatórios produzidos por drogas de abusos (BASTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2015; FERREIRA et al., 2020). Já no grupo MOR/APO-15' do experimento 1, não ocorreu o efeito atenuante da APO, uma vez que sua administração ocorreu 15 minutos após os animais serem retirados da arena experimental, ou seja, tempo considerado fora da “janela de consolidação da memória”. Para que o tratamento farmacológico seja eficiente nesse modelo experimental, é necessário preservar o tempo da “janela de consolidação da memória”, pois é o período que as memórias estão sofrendo modificações e incorporações de novas experiências e aprendizagens (LEE et al., 2012; NADER et al., 2015; SANTOS et al., 2018).

Após dois dias de retirada, foi realizado o teste de condicionamento. O teste de condicionamento teve como objetivo verificar os efeitos condicionados da morfina. Os resultados mostraram que os grupos MOR/VEI, MOR/VEI-15', MOR/APO-15' do experimento 1 e no experimento 2 o grupo MOR/VEI, MOR/APO-I apresentaram o desenvolvimento de uma resposta locomotora condicionada quando comparado com o grupo VEI/VEI, VEI/VEI-15' e com o grupo MOR/APO-I (experimento 1). Esses achados corroboram com os dados presentes na literatura, mostrando que uma breve exposição à morfina repetidamente é capaz de promover uma resposta locomotora condicionada (OLIVEIRA et al., 2019; FERREIRA et al., 2020). A administração repetida da morfina é capaz de induzir aos estados emocionais positivos e aprendizado relacionado à recompensa e memória (HYMAN et al., 2006; EPP et al., 2013), sendo que as pistas contextuais presentes no momento da administração da droga pode fortalecer as memórias associadas à experiência anterior com a morfina, resultando em uma resposta condicionada (MUELLER et al. 2002; VASSOLER et al., 2014).

Um fato interessante é que o grupo MOR/APO-I do experimento 2, que apresentou uma atenuação do desenvolvimento da sensibilização locomotora durante a fase de indução, não apresentou uma atenuação da expressão da resposta

locomotora condicionada no teste de condicionamento, como ocorreu no grupo similar do experimento 1. Como a fase de indução do experimento 2 teve uma duração de 10 dias e como a inibição da liberação dopaminérgica produzida por APO foi, aparentemente, restrita aos neurônios dopaminérgicos, esse resultado pode ser devido a uma ação glutamatérgica, tendo em vista que a morfina também desinibe a transmissão glutamatérgica no VTA (CHEN et al., 2015; YANG et al., 2020). Dessa forma, a ação glutamatérgica sozinha pode ter contribuído para a expressão da locomoção condicionada. É sabido o envolvimento do sistema glutamatérgico nos processos relacionados à dependência química (TZSCHENTKE e SCHMIDT, 2003; D'SOUZA, 2015).

Trabalhos da literatura científica mostram que antagonistas glutamatérgicos bloqueiam o condicionamento produzido por substâncias de abuso (WELSCH-KUNZE e KUSCHINSKY, 1990; MALDONADO et al., 2007; BOYCE-RUSTAY e CUNNINGHAM, 2004), sugerindo uma contribuição do sistema glutamatérgico nesse processo de aprendizagem. Entretanto, essa discussão é puramente especulativa já que o presente trabalho não abordou essa questão diretamente. Como os resultados da fase de indução do experimento 1 mostraram uma atenuação do desenvolvimento da sensibilização locomotora produzida pelo tratamento com apomorfina 0,05 mg/kg imediatamente após a sessão experimental, pensou-se que o aumento do período da fase de indução provavelmente levaria a um bloqueio do desenvolvimento da sensibilização locomotora. Entretanto, essa hipótese não foi confirmada pelos resultados. O fato intrigante advindo do experimento 2 é que somente a expressão da resposta locomotora condicionada não foi afetada já que houve uma atenuação da expressão da resposta locomotora sensibilizada.

Após dois dias de retirada, foi realizado o teste de sensibilização comportamental que teve por objetivo verificar se a expressão de uma resposta sensibilizada à morfina poderia ser atenuada pelo tratamento antidopaminérgico pós-arena. Os resultados mostraram que os grupos MOR/VEI, MOR/VEI-15', MOR/APO-15' (experimento 1) e o grupo MOR/VEI do experimento 2, expressaram uma resposta locomotora sensibilizada quando comparado com os grupos VEI/VEI, VEI/VEI-15' e MOR/APO-I. Entretanto, o grupo MOR/APO-I, presente nos dois experimentos, apresentou uma atenuação da resposta locomotora sensibilizada. Estudos mostraram que a morfina possui características recompensadoras, que reforçam e provocam a sensibilização comportamental em animais (HALEEM, 2013; KOOB e VOLKOW,

2016; MITSI e ZACHRIOU, 2016). É importante ressaltar que a sensibilização é um processo de aprendizagem não associativo, mas é potencializada quando ocorre em conjunto com ambiente experimental (VANDERSCHUREN, 2001; MCKIN, 2013). Trabalhos mostraram que apomorfina quando administrada na dose de 0,05 mg/kg dentro da “janela de reconsolidação da memória”, exerce uma ação antidopaminérgica inibindo a liberação de dopamina em neurônios dopaminérgicos pré-sinápticos, resultando na atenuação de uma resposta locomotora sensibilizada (CARRERA et al., 2012; BASTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2018; LEITE et al., 2019).

A reconsolidação da memória se refere ao processo pelo qual as memórias de longo prazo, após a evocação, entram em um estado lábil no qual se tornam sujeitas às mudanças. No entanto, a labilidade não se limita à reconsolidação e há evidências consideráveis de que a consolidação, o processo que converte a memória de curto prazo em memórias de longo prazo, também está sujeita à plasticidade na evocação da memória (MARRA et al., 2013). Assim, parece plausível pensar que, pelo menos inicialmente, a inibição da liberação dopaminérgica pós-arena afetou o processo de consolidação da memória produzindo uma atenuação da resposta produzida por morfina. Essa resposta não foi observada nos animais que receberam morfina pré-arena e veículo imediatamente após-arena ou até mesmo nos animais que receberam apomorfina fora da janela de consolidação da memória, reforçando a consolidação da memória.

8. CONCLUSÃO

- A administração de morfina 10 mg/kg associada ao contexto ambiental produziu uma resposta locomotora condicionada e sensibilizada, independente da duração da fase de indução.
- A morfina 10 mg/kg produziu uma memória associativa, desenvolvida pela associação do contexto ambiental com os efeitos da droga.
- As administrações da morfina 10 mg/kg fortaleceram o processo de consolidação da memória, criando-se uma aprendizagem associada à utilização da droga.
- A apomorfina 0,05 mg/kg administrada durante a janela de consolidação da memória, atenuou o desenvolvimento de uma resposta locomotora condicionada e sensibilizada produzida por morfina 10 mg/kg.
- Tratamentos administrados fora do período da janela de consolidação da memória, ou seja, 15 minutos após o término da sessão experimental, não produziram alterações comportamentais.
- O entendimento do mecanismo da consolidação da memória pode abrir novos caminhos para o tratamento da dependência química.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERINI, C. M., LEDOUX, J.E. Memory reconsolidation. **Current Biology**. v. 23, p. 746–750, 2013.
- ANDERSON, R.I., BECKER., H.C. Role of the Dynorphin/Kappa Opioid Receptor System in the Motivational Effects of Ethanol. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v.41, n.8, p.1402-1418, 2017.
- ANSELME,P., NESLIHAN, E., SEPIDEH,T., ONUR, G. Long-term behavioral sensitization to apomorphine is independent of conditioning and increases conditioned pecking, but not preference, in pigeons. **Behavioural Brain Research**. v.336, p. 122–134, 2018.
- ASZTÉLY, F., GUSTAFSSON, B. Ionotropic glutamate receptors. Their possible role in the expression of hippocampal synaptic plasticity. **Mol. Neurobiol.** v. 12, n.1, p.1-11, 1996.
- BAO, G., KANG, L., LI, H., LI, Y., PU, L., XIA, P., MA, L., PEI, G. Morphine and heroin differentially modulate in vivo hippocampal LTP in opiate-dependent rat. **Neuropsychopharmacology**. v.32, n.8, p. 1738-1749, 2007.
- BALDERAS, I., RODRIGUEZ-ORTIZ, C. J., BERMUDEZ-RATTONI, F. Consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Behavioural Brain Research**. v. 285, p. 213–222, 2015.
- BARDO, MT. Neuropharmacological mechanisms of drug reward: beyond dopamine in the nucleus accumbens. **Crit. Rev. Neurobiol.** v. 12, p. 37-67, 1998.
- BASHIR, ZI., BORTOLOTTA, ZA., DAVIES, C.H., BERRETTA, N., IRVING, AJ., SEAL, A.J., HENLEY, JM., JANE, DE., WATKINS, J.C., COLLINGRIDGE, GL. Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. **Nature**. v.27, n. 363, p. 347-350, 1993.
- BASTOS, J.M., 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. 139–47, 2014.
- BEAULIEU, J.M., GAINETDINOV, R.R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. **Pharmacol Rev.** v. 63, p.182–21, 2012.
- BEKHIT, M. H. Opioid-induced hyperalgesia and tolerance. **American Journal of Therapeutics**. v. 175, p. 498–510, 2010.

BERKE, JD., HYMAN, SE. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. **Neuron**. v. 25, n. 3, p. 515-32, 2000.

BLAHA, C.D., YANG, CR., FLORESCO, SB., BARR, AM., PHILLIPS, A.G. Stimulation of the ventral subiculum of the hippocampus evokes glutamate receptor-mediated changes in dopamine efflux in the rat nucleus accumbens. **Eur J. Neurosci**. v. 9, n.5, p. 902-911, 1997.

BLISS, T.V., COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**. v. 361, n.6407, p.31-39, 1993.

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. Biochem. Behav.** v. 86, p 449–457, 2007.

BOYCE-RUSTAY, JM., CUNNINGHAM, C.L. The role of NMDA receptor binding sites in ethanol place conditioning. **Behav. Neurosci**. v.118, p. 822-834, 2004.

CARRARA-NASCIMENTO, P. F., OLIVE, M. F., CAMARINI, R. Ethanol pre-exposure during adolescence or adulthood increases ethanol intake but ethanol-induced conditioned place preference is enhanced only when pre-exposure occurs in adolescence. **Developmental Psychobiology**. v. 61, p. 36–48, 2014.

CERBONE, A., SADILE, AG. Behavioral habituation to spatial novelty: interference and noninterference studies. **Neurosci Biobehav Rev**. v. 18, n. 4, p. 497-518, 1994.

CHAO, J., NESTLER, E.J. Molecular neurobiology of drug addiction. **Annu Rev Med**. v.55, p.113-132, 2004.

CHARTOFF, E.H., CONNERY, H.S. It's MORE exciting than mu: crosstalk between mu opioid receptors and glutamatergic transmission in the mesolimbic dopamine system. **Front. Pharmacol**. v.5, p.116, 2014.

CHEN, M., ZHAO, Y., YANG, H., LUAN, W., SONG, J., CUI, D., DONG, Y., LAI, B, MA, L., ZHENG, P. Morphine disinhibits glutamatergic input to VTA dopamine neurons and promotes dopamine neuron excitation. **Elife**. v. 24, p.4, 2015.

CHRISTRUP, L.L. Morphine metabolites. **Acta Anaesthesiol. Scand**. v. 41, p. 116–122, 1997.

CLOPATH, C. Synaptic consolidation: an approach to long-term learning. **Cogn Neurodyn**. p. 6, n. 3, p. 251-257, 2012.

CONTET, C., KIEFFER, BL., BEFORT, K. Mu opioid receptor: a gateway to drug addiction. **Curr Opin Neurobiol**. v.3, p. 370-378, 2004.

COOKE, S.F., BLISS, T.V. Plasticity in the human central nervous system. **Brain**. v. 129, p.1659-1673, 2006.

COOPER, S., ROBISON, A.J, MAZEI-ROBISON, M.S. Reward Circuitry in Addiction. **Neurotherapeutics**. v.3, p. 687-697, 2017.

DEBANNE, D., DAOUDAL, G., SOURDET, V., RUSSIER, M. Brain plasticity and ion channels. **J. Physiol. Paris**. v. 97, p. 403-14, 2003.

DE, COSTA BR., ROTHMAN, R.B., BYKOV, V., JACOBSON, A.E., RICE, KC. Selective and enantiospecific acylation of kappa opioid receptors by (1S,2S)-trans-2-isothiocyanato-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidiny)cyclohexyl]benzeneacetamide. Demonstration of kappa receptor heterogeneity. **J Med Chem**. v. 32, n. 2, p. 281-291, 1989.

DHARANI, K. Memory, Intelligence and Molecular Grid. **The Biology of Thought**. p. 143–161, 2015.

Di Chiara, G., Imperato, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. v.14, p. 5274-8, 1988.

DINGLELINE, R., MCBAIN, C.J. THREE Classes of Ionotropic Glutamate Receptor. In: Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition. **Philadelphia: Lippincott-Raven**. v.11, p.1999.

DUDAI, Y. The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? **Annual Review of Psychology**. v. 55, p. 51–86, 2004.

D'SOUZA, MS. Glutamatergic transmission in drug reward: implications for drug addiction. **Front Neurosci**. v. 9, p. 404, 2015.

EDEROTH, P., TUNBLAD, K., BOUW, R., LUNDBERG, C.J., UNGERSTEDT, U., NORDSTROM, C.H., HAMMARLUND-UDENAES, M. Blood-brain barrier transport of morphine in patients with severe brain trauma. **Br. J. Clin. Pharmacol**. v. 57, p. 427–435, 2004.

EVERITT, B.J, MORRIS, K.A., O'BRIEN, A., ROBBINS, T.W. The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes. **Neuroscience**. v.42, p. 1-18, 1991.

EVERITT, BJ., PARKINSON, J.A., OLMSTEAD, M.C., ARROYO, M., ROBLEDO P, ROBBINS, T.W. Associative processes in addiction and reward. The role of amygdala-ventral striatal subsystems. **Ann. N. Y. Acad. Sci**. v. 29, p. 877- 912, 1999.

FENU, S., DI, CHIARA, G. Facilitation of conditioned taste aversion learning by systemic amphetamine: role of nucleus accumbens shell dopamine D1 receptors. **Eur. J. Neurosci**. v.18, n. 7, p. 2025-2030, 2003.

FLORESCO, S.B., YANG, C.R., PHILLIPS, A.G., BLAHA, C.D. Basolateral amygdala stimulation evokes glutamate receptor-dependent dopamine efflux in the nucleus accumbens of the anaesthetized rat. **Eur. J. Neurosci**. v. 10, p.1241-1251,1998.

FLORESCO, S.B., BLAHA, C.D., YANG, C.R., PHILLIPS, A.G. Modulation of hippocampal and amygdalar-evoked activity of nucleus accumbens neurons by dopamine: cellular mechanisms of input selection. **J. Neurosci**. v. 21, n. 8, p. 2851-2860, 2001.

- GIULIANO, F., ALLARD, J. Dopamine and sexual function. **Int J Impot Res.** v. 3, p. 18-28, 2001.
- GORELOVA, N., YANG, C.R. The course of neural projection from the prefrontal cortex to the nucleus accumbens in the rat. **Neuroscience.** v. 76, p. 689-706, 1997.
- GUTSTEIN, H.B., AKIL, H. Opioid Analgesics. In: Goodman, L.S., Gilman, A., Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. (Eds.), Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. **McGraw-Hill, New York.** pp. 547–590, 2018.
- GRANGER, A.J., SHI, Y., LU, W., CERPAS, M., NICOLL, R.A. LTP requires a reserve pool of glutamate receptors independent of subunit type. **Nature.** v. 493, n. 7433, p. 495-500, 2013.
- HALEEM , DJ., NAWAZ, S. Inhibition of reinforcing, hyperalgesic, and motor effects of morphine by buspirone in Rats. **J. Pain.** v. 18, p. 19-28, 2017.
- HALEEM, DJ, FARHAN, M. Inhibition of apomorphine-induced behavioral sensitization in rats pretreated with fluoxetine. **Behav Pharmacol.** v. 26, p. 159-66, 2015.
- HARRIS, GC., WIMMER, M., RANDALL-THOMPSON, J.F. E., ASTON-JONES, G. Neurônios hipotalâmicos orexina laterais estão criticamente envolvidos no aprendizado de como associar um ambiente à recompensa por morfina. **Behav. Brain Res.** v. 183, p. 43–51, 2007.
- HASSELSTROM, J., SAWE, J. Morphine pharmacokinetics and metabolism in humans. Enterohepatic cycling and relative contribution of metabolites to active opioid concentrations. **Clin. Pharmacokinet.** v. 24, p. 344–354, 1993.
- HEDLUND., E., BELNOUE, L., THEOFILOPOULOS, S. Dopamine receptor antagonists enhance proliferation and neurogenesis of midbrain Lmx1a-expressing progenitors. **Sci. Rep.** v. 6, p. 26448, 2016.
- HSER, Y.I., HOFFMAN, V., GRELLA, C.E., ANGLIN, M.D. A 33-year follow-up of narcotics addicts. **Arch. Gen. Psychiatry.** v. 58, n. 5, p. 503-58, 2001.
- HYMAN, S.E., MALENKA, R.C., NESTLER, E.J. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. **Annu. Rev. Neurosci.** v. 29, p. 565-598, 2006.
- HYMAN, S.E., MALENKA, R.C. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. **Nat. Rev. Neurosci.** v. 10, p. 695-703, 2001.
- IKEMOTO S. Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. **Neurosci. Biobehav.** v. 35, p. 129-50, 2010.
- JOHNSON, S,W., NORTH, R.A. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. **J. Neurosci.** v. 12, p. 483-48,1992.
- KARKHANIS, A., HOLLERAN, K.M., JONES, S.R. Dynorphin/Kappa Opioid Receptor Signaling in Preclinical Models of Alcohol, Drug, and Food Addiction. **Int. Rev. Neurobiol.** v. 136, p. 53-88, 2017.

KELLEY, A.E. Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron*. v. 30, n. 44, p. 161-79, 2004.

KELLEY, A.E., DOMESICK, V.B., NAUTA, W.J. The amygdalostratial projection in the rat--an anatomical study by anterograde and retrograde tracing methods. *Neuroscience*. v. 3, p. 615-630, 1982.

KENDLER, K.S., PRESCOTT, C.A., MYERS, J., NEALE, MC. The structure of genetic and environmental risk factors for common psychiatric and substance use disorders in men and women. *Arch. Gen. Psychiatry*. v. 60, p. 929-937, 2003.

KHARASCH, E.D., HOFFER, C., WHITTINGTON, D., SHEFFELS, P. Role of P-glycoprotein in the intestinal absorption and clinical effects of morphine. *Clin. Pharmacol. Ther.* v. 74, p. 543-554, 2003.

KLITENICK, MA., DEWITTE, P., KALIVAS, P.W. Regulation of somatodendritic dopamine release in the ventral tegmental area by opioids and GABA: an in vivo microdialysis study. *J. Neurosci.* v. 12, p. 2623-2632, 1992.

KOOB, G.F., BLOOM, F.E. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science*. v. 242, p.15-23, 1988.

KOO, JW., MAZEI-ROBISON, M.S., CHAUDHURY, D., JUAREZ, B., LAPLANT, Q., FERGUSON, D. O BDNF é um modulador negativo da ação da morfina. *Science*. v. 338, p. 124-128, 2012.

LAMBERT, D.G. The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug. Discov.* v. 8, p. 694-710, 2008.

LEE, S.-H., KWAK, C., SHIM, J., KIM, J.E., CHOI, S.-L., KIM, H. F. KAANG, B.-K. A cellular model of memory reconsolidation involves reactivation-induced destabilization and restabilization at the sensorimotor synapse in Aplysia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. n.109, v.35, p. 14200-14205, 2012.

LEE, J., NADER, K., SCHILLER, D. An Update on Memory Reconsolidation Updating. *Trends in Cognitive Sciences*. n. 21, v.7, p. 531-545, 2017.

LEE, J.L.C. Reconsolidation: Maintaining memory relevance. *Trends Neurosci.* v. 32, p. 413-420, 2009.

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

LIU, MG., LI, HS., LI, WG., WU, Y.J, DENG, SN., HUANG, C., MAXIMYUK, O., SUKACH, V., KRISHTAL, O., ZHU, MX., XU, T.LAcid-sensing ion channel 1a contributes to hippocampal LTP inducibility through multiple mechanisms. *Scientific Reports*. v.27, p.6, 2016.

MAHMOUDI, J., FARHOUDI, M., TALEBI, M., SABERMAROUF, B., SADIGH-ETEGHAD, S. Anti- depressant-like effect of modafinil in mice: evidence for the involvement of the dopaminergic neurotransmission. *Pharmacol.* v.57, p.58, 2015.

MAJUMDAR, A., MANGAL, N. S. Hyperprolactinemia. InPrinciples and Practice of Controlled Ovarian Stimulation in ART. *Springer India*. P. 319-328, 2010.

MALDONADO, R. The neurobiology of addiction. **J. Neural. Transm. Suppl.** v. 66, p. 1-14, 2003.

MALDONADO, C., RODRÍGUEZ-ARIAS, M., CASTILLO, A., AGUILAR, MA., MIÑARRO, J. Effect of memantine and CNQX in the acquisition, expression and reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference. **Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry.** v. 31, p. 932-939, 2007.

MANNOURY, LA., COUR, C., SALLES, MJ., PASTEAU, V., MILLAN, MJ. Signaling pathways leading to phosphorylation of Akt and GSK-3 β by activation of cloned human and rat cerebral D2 and D3 receptors. **Mol Pharmacol.** v. 79, p. 91–105, 2011.

MAO, J., SUNG, B., JI, R.R., LIM, G. Chronic morphine induces downregulation of spinal glutamate transporters: implications in morphine tolerance and abnormal pain sensitivity. **J Neurosci.** v. 18, p. 8312-8323, 2002.

MARRA, V., O'SHEA, M., BENJAMIN, PR., KEMENES, I. Susceptibility of memory consolidation during lapses in recall. **Nat. Commun.** v. 4, 2013.

MAREN, S., TOCCO, G., STANDLEY, S., BAUDRY, M., THOMPSON, RF. Postsynaptic factors in the expression of long-term potentiation (LTP): increased glutamate receptor binding following LTP induction in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v. 90, n. 20, p. 9654-968, 1993.

MARINHO, E.A., OLIVEIRA-LIMA, A.J., SANTOS, R., HOLLAIS, A.W., BALDAIA, M.A., WUO-SILVA, R., YOKOYAMA, T.S., TAKATSU-COLEMAN, A.L., PATTI, C.L., LONGO, B.M., BERRO, L.F., FRUSSA-FILHO, R. Effects of rimonabant on the development of single dose-induced behavioral sensitization of ethanol, morphine and cocaine in mice. **Prog. Neuro- Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.** v. 58, p. 22–31, 2015.

MARTIN, G., AHMED, S.H., BLANK, T., SPIESS, J., KOOB, G.F., SIGGINS, G.R. Chronic morphine treatment alters NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the nucleus accumbens. **J. Neurosci.** v. 19, n. 20, p. 9081-909, 1999.

MATTHES, H.W., MALDONADO, R., SIMONIN, F., VALVERDE, O., SLOWE, S., KITCHEN, I., BEFORT, K., DIERICH, A., LE MEUR, M., DOLLÉ, P., TZAVARA, E., HANOUNE, J., ROQUES, B.P., KIEFFER, B.L. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. **Nature.** v. 383, p. 819-823, 1996.

MATTHEWS, R.T., GERMAN, D.C. Electrophysiological evidence for excitation of rat ventral tegmental area dopamine neurons by morphine. **Neuroscience.** v. 3, p. 617-625, 1984.

MCCLURE, S.M., DAW, N.D., MONTAGUE, P.R. A computational substrate for incentive salience. **Trends. Neurosci.** v. 8, p. 423-428, 2003.

MCDONALD, PHD., LAMBERT, D.G., FRCA, PHD. Opioid receptors. **BJA Education.** v. 15, n. 5, p. 219–224, 2015.

MCDOUGALL, AS., PIPKIN, JA., ER-GHAZARIAN, T., CORTEZ, A.M., GUTIERREZ, A., LEE, R.J, CARBAJAL, S., MOHD-YUSOF. Age-dependent differences in the strength and persistence of psychostimulant-induced conditioned activity in rats:

effects of a single environment-cocaine pairing. **Behav. Pharmacol.** v. 25, P. 695–704, 2014.

MCLELLAN, A.T., LEWIS, D.C., O'BRIEN, C.P., KLEBER, HD. Drug dependence, a chronic medical illness: implications for treatment, insurance, and outcomes evaluation. **JAMA.** v. 284, n.13, p. 1689-1695, 2000.

MEGAT, S., SHIERS, S., MOY, J.K., BARRAGAN-IGLESIAS, P., PRADHAN, G., SEAL, RP., DUSSOR, G., PRICE, T.J. A Critical Role for Dopamine D5 Receptors in Pain Chronicity in Male Mice. **J. Neurosci.** v. 38, p. 379-397, 2017.

MERIKANGAS, K.R., STOLAR, M., STEVENS, D.E., GOULET, J., PREISIG, M.A., FENTON, B., ZHANG, H., O'MALLEY, S.S., ROUNSAVILLE, B.J. Familial transmission of substance use disorders. **Arch. Gen. Psychiatry.** v. 11, p. 973-991, 998.

MOADDAB, M., HAGHPARAST, A. E., HASSANPOUR-EZATTI, M,. Efeitos da inativação reversível da área tegmental ventral na aquisição e expressão da preferência de lugar condicionada induzida por morfina em ratos. **Behav. Brain Res.** v. 198, p. 466–471, 2009.

MONTAGUE, P.R., HYMAN, S.E., COHEN, J.D. Computational roles for dopamine in behavioural control. **Nature.** v. 431, p. 760-777, 2004.

MUELLER, D., PERDIKARIS, D., STEWART, J. Persistence and druginduced reinstatement of a morphine-induced conditioned place preference. **Behav Brain Res.** v. 136 p. 389–397, 2002.

MÜLLER, CP., HOMBERG, J.R. The role of serotonin in drug use and addiction. **Behav Brain Res.** v. 277, p. 146-192, 2015.

NADER, K. Memory Traces Unbound. **Trends in Neurosciences,** v. 26, p. 65–72, 2003.

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

NADER, K. Reconsolidation and the Dynamic Nature of Memory. **Cold SpringHarb Perspect Biol,** v. 45, 2015.

NAKAGAWA, T., OZAWA, T., SHIGE, K., YAMAMOTO, R., MINAMI, M., SATOH, M. Inhibition of morphine tolerance and dependence by MS-153, a glutamate transporter activator. **Eur. J. Pharmacol.** v. 419, p. 39-45, 2001.

NESTLER, EJ. Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. **Neurobiol. Learn. Mem.** v. 78, p. 637-647, 2002.

NISWENDER, C.M., CONN, P.J. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 50, p. 295-322, 2010.

NOBRE MJ, CABRAL A, BRANDÃO ML GABAergic regulation of auditory sensory gating in low- and high-anxiety rats submitted to a fear conditioning procedure. **Neuroscience**. v.171, p.1152–1163, 2010.

NOBRE, MJ. Changes on auditory physiology in response to the inactivation of amygdala nuclei in high anxiety rats expressing learned fear. **Physiol Behav**. v. 118, p. 80–87, 2013.

O'BRIEN, CP., CHILDRESS, A.R., EHRMAN, R., ROBBINS, S.J. Conditioning factors in drug abuse: can they explain compulsion? **J. Psychopharmacol**. v. 12, p. 15-22, 1998.

PARK, J.H. Enikolopov G. Transient elevation of adult hippocampal neurogenesis after dopamine depletion. **Exp Neurol**. v. 222, p. 267–276, 2010.

PASTERNAK, GW., PAN, Y.X. Mu opioids and their receptors: evolution of a concept. **Pharmacol. Rev**. v. 65, p. 1257-1317, 2013.

PÉREZ-OTAÑO, I., EHLERS, M.D. Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. **Trends. Neurosci**. v. 28, p. 229-38, 2005.

PRINGSHEIM, T., JETTE, N., FROLKIS, A., STEEVES, TD. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Mov Disord**. v. 29, p. 1583–1590, 2014.

PU, L., BAO, G.B., XU, N.J., MA, L., PEI, G. Hippocampal long-term potentiation is reduced by chronic opiate treatment and can be restored by re-exposure to opiates. **J. Neurosci**. v. 22, p. 1914-1921, 2002.

PUOPOLO, M. The hypothalamic-spinal dopaminergic system: a target for pain modulation. **Neural. Regen. Res**. v. 6, p. 925-930, 2019.

RADA, P., MARK, G.P., POTHOS, E., HOEBEL, B.G. Systemic morphine simultaneously decreases extracellular acetylcholine and increases dopamine in the nucleus accumbens of freely moving rats. **Neuropharmacology**. v. 10, p. 1133-1136, 1991.

REDISH, A.D. Addiction as a computational process gone awry. **Science**. v. 306, p. 1944-1947, 2004.

RHEE, S.H., HEWITT, J.K., YOUNG, S.E., CORLEY, R.P., CROWLEY, T.J., STALLINGS, M.C. Genetic and environmental influences on substance initiation, use, and problem use in adolescents. **Arch. Gen. Psychiatry**. v. 12, p. 1256-1264, 2003.
ROBBINS, T.W., EVERITT, BJ. Drug addiction: bad habits add up. **Nature**. v. 398, p. 567-570, 1999.

ROBINSON, M.J.F., ANSELME, P., FISCHER, A.M., BERRIDGE, K.C. Initial uncertainty in Pavlovian reward prediction persistently elevates incentive salience and extends sign-tracking to normally unattractive cues. **Behav. Brain Res**. v. 266, p. 119–130, 2014.

ROBBINS, T.W., EVERITT, B.J. Limbic-striatal memory systems and drug addiction. **Neurobiol. Learn. Mem.** v. 78, p. 625-636, 2002.

ROSAS, M., PORRU, S., FENU, S., RUIU, S., PEANA, A.T, PAPALE, A., BRAMBILLA, R., G. DI CHIARA., E. Acquas, Role of nucleus accumbens mu opioid receptors in the effects of morphine on ERK1/2 phosphorylation, **Psychopharmacology (Berl)**. v. 233, p. 2943-2954, 2016.

ROTHMAN, R.B., FRANCE, C.P., BYKOV, V., DE, COSTA, B.R., JACOBSON, AE., WOODS, J.H., RICE, KC. Pharmacological activities of optically pure enantiomers of the kappa opioid agonist, U50,488, and its cis diastereomer: evidence for three kappa receptor subtypes. **Eur. J. Pharmacol.** v. 167, p. 345-53, 1989.

RUEDA, A.V., TEIXEIRA, A.M., YONAMINE, M., CAMARINI, R. Environmental enrichment blocks ethanol-induced locomotor sensitization and decreases BDNF levels in the prefrontal cortex in mice. **Addict Biol.** v. 17, p. 736–745, 2012.

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

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

SANTOS, B.G., CAREY, R.J., CARRERA, M.P. Repeated pre-trial and post-trial low and high dose apomorphine treatments induce comparable 84 inhibitory/excitatory sensitization and conditioned drug effects. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 175, p. 108–115, 2018.

SALAMONE, J. D., CORREA, M. The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. **Neuron.** v.76, p. 470–485, 2012.

SCHULTZ, W., DAYAN, P., MONTAGUE, P.R. A neural substrate of prediction and reward. **Science.** v. 275, p.1593-1599, 1997.

SCHULTZ, W., TREMBLAY, L., HOLLERMAN, J.R. Reward processing in primate orbitofrontal cortex and basal ganglia. **Cereb. Cortex.** v. 10, p. 272-284, 2000.

SEEMAN, P. Parkinson's Disease treatment may cause impulse–control disorder via dopamine D3 receptors. **Synapse.** v. 69, p.183–189, 2015.

SHOBLock, J.R. The pharmacology of Ro 64-6198, a systemically active, nonpeptide NOP receptor (opiate receptor-like 1, ORL-1) agonist with diverse preclinical therapeutic activity. **CNS. Drug Rev.** v. 13, p.107-36, 2007.

SITA, LV., ELIAS, C.F., BITTENCOURT, JC. Connectivity pattern suggests that incerto-hypothalamic area belongs to the medial hypothalamic system. **Neuroscience.** v. 148, p. 949-69, 2007.

SKAGERBERG, G., LINDVALL, O. Organization of diencephalic dopamine neurones projecting to the spinal cord in the rat. **Brain. Res.** v. 342, 340-51, 1985.

SPANAGEL, R., WEISS, F. The dopamine hypothesis of reward: past and current status. **Trends. Neurosci.** v. 11, p. 521-527, 1999.

STAAHL, C., UPTON, R., FOSTER, D.J., CHRISTRUP, L.L., KRISTENSEN, K., HANSEN, S.H., ARENDT-NIELSEN, L., DREWES, A.M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of morphine and oxycodone concentrations and analgesic effect in a multimodal experimental pain model. **J. Clin. Pharmacol.** v.48, p. 619–631, 2008.

STEIN, C. Opioid Receptors. **Annual Review of Medicine.** v. 67, n. 01, p. 433 – 451, 2015.

STEKETEE, J. D., KALIVAS, P. W. Drug wanting: Behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. **Pharmacological Reviews**, v.63, p. 348–365, 2011.

STOCCHI, F. Continuous dopaminergic stimulation and novel formulation of dopamine agonists. **J. Neurol.** v. 258, p. 316–322, 2011.

SUN, L., HU, L., LI, Y., CUI, C. Mesoaccumbens dopamine signaling alteration underlies behavioral transition from tolerance to sensitization to morphine rewarding properties during morphine withdrawal. **Brain Struct. Funct.** v.219, p. 1755–1771, 2014

TANGANELLI, S., ANTONELLI, T., MORARI, M., BIANCHI, C., BEANI L. Glutamate antagonists prevent morphine withdrawal in mice and guinea pigs. **Neurosci. Lett.** v. 122, p. 270-272, 1991.

TRUJILLO, KA., AKIL, H. Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. **Science.** v. 251, p. 85-87, 1991.

TZSCHENTKE, TM., SCHMIDT, W.J. Functional relationship among medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, and ventral tegmental area in locomotion and reward. **Crit. Rev. Neurobiol.** v. 14, p. 131-42. 2000.

TZSCHENTKE, TM., SCHMIDT, W.J. Glutamatergic mechanisms in addiction. **Mol. Psychiatry.** v. 8, p. 373-382, 2003.

VANDERSCHUREN, L.J., KALIVAS, P.W. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. **Psychopharmacology.** v.151, p. 99-120, 2000.

VANDERSCHUREN, L.J., PIERCE, R.C Sensitization processes in drug addiction. **Curr Top Behav Neurosci.** v.3, p. 179–195, 2010.

VOLKOW, N. D., MCLELLAN, A. T. Opioid abuse in chronic pain—misconceptions and mitigation strategies. **New England Journal of Medicine.** v. 374, p. 1253–1263, 2016.

VOLKOW, N.D., FOWLER, J.S., WANG, G.J., SWANSON, J.M. Dopamine in drug abuse and addiction: results from imaging studies and treatment implications. **Mol. Psychiatry**. v. 6, p. 557-569, 2004.

WEILER, I.J., GREENOUGH, W.T. Metabotropic glutamate receptors trigger postsynaptic protein synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. v. 90, p. 7168-7171, 1993.

WELSCH-KUNZE, S., KUSCHINSKY, K. On the possible involvement of glutamate receptors in conditioning of behavioural effects of apomorphine. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 3, p. 421-428, 1990.

WHITE, NM. Addictive drugs as reinforcers: multiple partial actions on memory systems. **Addiction**. v. 91, p.921-949, 1996.

WIKLER, A., PESCOR, F.T. Classical conditioning of a morphine abstinence phenomenon, reinforcement of opioid-drinking behavior and "relapse" in morphine-addicted rats. **Psychopharmacologia**. v. 10, p. 255-284, 1967.

XU, N.J., BAO, L., FAN, H.P., BAO, G.B., PU, L., LU, Y.J., WU, C.F., ZHANG, X., PEI, G. Morphine withdrawal increases glutamate uptake and surface expression of glutamate transporter GLT1 at hippocampal synapses. **J. Neurosci**. v. 23, p. 4775-4784, 2003.

YANG, L., CHEN, M., MA, Q., SHENG, H., CUI, D., SHAO, D., LAI, B., ZHENG, P. Morphine selectively disinhibits glutamatergic input from mPFC onto dopamine neurons of VTA, inducing reward. **Neuro**. v. 176, p.108-217, 2020.

ZHANG, Q., SCHAFFER, M., ELDE, R., STEIN, C., Effects of neurotoxins and hindpaw inflammation on opioid receptor immunoreactivities in dorsal root ganglia. **Neuroscience**. v. 85, p. 281–291, 1998.

ZINK, C.F., PAGNONI, G., MARTIN, ME., DHAMALA, M., BERNS, G.S. Human striatal response to salient nonrewarding stimuli. **J. Neurosci**. v. 22, p. 8092-8097, 2003.