

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: NEUROCIÊNCIAS

REVERSÃO DE EFEITOS REFORÇADORES DA MORFINA ATRAVÉS DO PREJUÍZO DA RECONSOLIDAÇÃO
DA MEMÓRIA DO CONDICIONAMENTO DE PREFERÊNCIA POR LOCAL E DA SENSIBILIZAÇÃO
LOCOMOTORA

FLÁVIA ZACOUTEGUY BOOS

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre

2016

FLÁVIA ZACOUTEGUY BOOS

REVERSÃO DE EFEITOS REFORÇADORES DA MORFINA ATRAVÉS DO PREJUÍZO DA RECONSOLIDAÇÃO
DA MEMÓRIA DO CONDICIONAMENTO DE PREFERÊNCIA POR LOCAL E DA SENSIBILIZAÇÃO
LOCOMOTORA

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Jorge Alberto Quillfeldt
Coorientador: Prof. Lucas de Oliveira Alvares

Porto Alegre

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Jorge por me aceitar como parte do grupo, pela confiança, pela posição crítica e política na sua ação como professor, pelos questionamentos que me tiraram da zona de conforto, pelas conversas que me enriqueceram, por ter aceitado o desafio de um projeto com drogas de abuso e pelo empenho na construção do aparato de Condicionamento de Preferência por Local e nas contribuições científicas ao longo de todos esses anos.

Ao professor Lucas, agradeço por ter topado ser meu coorientador e o desafio de trabalhar com drogas, as contribuições em relação ao projeto e o suporte científico, as conversas arejadas em relação às drogas e sua disponibilidade. Obrigada por me estimular a continuar nesse percurso.

Agradeço imensamente ao Rodri e à Ana, que desde que eu dividi minha curiosidade e desejo em estudar drogas, apresentando o modelo que havia conhecido, me encorajaram a propor um projeto pro Jorge. Isso foi fundamental para eu iniciar minha caminhada nessa área!

Rodri, te agradeço imensamente por te ter como colega e amigo! Obrigada por todo teu empenho, atenção e dedicação nesse projeto; pelo suporte científico, afetivo e terapêutico!

Anita, obrigada pela amizade, disponibilidade, paciência, pela tua tranquilidade e amorosidade. Aprendo muito contigo e vou levar isso pra sempre.

Agradeço muito pelo apoio e empolgação da Rossana que topou, aos "45 do segundo tempo", levar adiante a ideia das análises de AMPA. Agradeço também ao professor Paulo Ivo, por permitir essas análises em seu laboratório, no Departamento de Fisiologia, e pelos empréstimos de reagentes. Sem vocês, essa parte não seria possível.

Dona Zelmita, sou enormemente grata por ter trabalhado com a senhora, pela sua dedicação ao nosso lab, pelo cuidado com respeito e carinho com os ratos, por ser essa mulher guerreira que admiro muito, um pouco colega, um pouco amiga, um pouco mãe.

Agradeço aos demais colegas do LPBNC e do LMN que de alguma forma também contribuíram para a realização do meu mestrado, principalmente Fabrício, Liz, Fernanda e Krislei. Agradeço ao meu pai por ajudar a pensar estratégias técnicas e organizacionais nas diferentes etapas dos experimentais. Obrigada Mig pela ajuda também.

Agradeço ao professor Diogo Losch, do Departamento de Bioquímica, por ter aberto o seu laboratório para fazer as análises de locomoção com o programa Any-Maze.

Agradeço aos professores e colegas do PPG Neuro pelas trocas durante as cadeiras.

São muitos "obrigada", mas, de verdade, este trabalho tem um mosaico de contribuições e só foi possível por conta desse trabalho coletivo. Jorge, Lucas e colegas que passaram ou ainda estão nos labs, aqui cresci como cientista, profissionalmente e também pessoalmente, muito devido à

convivência e discussões com vocês, agradeço muito por isso. Além disso, mais que colegas, aqui fiz amigos que espero, mesmo de longe, levar para toda a vida.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Circuito dopaminérgico mesocorticolímbico	14
Figura 2. Modelo da Sensibilização ao Incentivo	17
Figura 3. Aparato do Condicionamento de Preferência por Local	32
Figura 4. Protocolo genérico dos experimentos	34
Figura 5: Preferência pelos contextos A e B nas configurações 1, 2, 3 e 4	41
Figura 6. Experimento 2: Preferência por local	43
Figura 7. Experimento 2: Comparação entre o índice de preferência calculado para 15 min e para os 10 primeiros minutos	44
Figura 8. Experimento 3A: Preferência por local	46
Figura 9. Experimento 3B: Distância percorrida no desafio após CHX sistêmica após 10 min de reativação.	48
Figura 10. Experimento 3C: GluA1 fosforilado (S845) no Hipocampo dorsal após desafio	50
Figura 11. Experimento 3C: GluA1 total no Hipocampo dorsal após desafio	51
Figura 12. Experimento 3C: GluA2 total no Hipocampo dorsal após desafio	52
Figura 13. Experimento 3C: GluA1 fosforilado (S845) no Núcleo Accumbens após o desafio	53
Figura 14. Experimento 3C: GluA1 total no Núcleo Accumbens após desafio	54
Figura 15. Experimento 3C: GluA2 no Núcleo Accumbens após desafio	55
Figura 16. Experimento 4A: Preferência por local nos animais canulados HPCd	57
Figura 17. Experimento 4B: distância percorrida no desafio após CHX no HPCd depois de 10 min de reativação	58
Figura 18. Experimento 5A: Preferência por local nos animais canulados no cNAC	60
Figura 19. Experimento 5B: Distância percorrida no desafio após CHX sistêmica depois de 10 min de reativação	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condicionamentos com turnos alternados	34
Tabela 2. Descrição dos experimentos	38
Tabela 3. Resumo esquemático da análise das estruturas por <i>western blot</i> (experimento 3C)	68
Tabela 4. Tabela comparativa de alguns artigos com análises do sistema glutamatérgico em resposta à morfina.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

VTA: área tegmental ventral, do inglês *Ventral Tegmental Area*

CHX: cicloheximida

cNAc : centro do Núcleo *Accumbens*, do inglês *Nucleus Accumbens core*

PFC: córtex pré-frontal, do inglês *Prefrontal Cortex*

CP-AMPA: receptor AMPA permeável à cálcio, do inglês *calcium-permeable AMPA*

CPL: condicionamento de preferência por local

D1r: receptores dopaminérgicos do tipo 1

DMSO: dimetilsulóxido

EC: estímulo condicionado

EI: estímulo incondicionado

HPC: hipocampo

HPCd: hipocampo dorsal

i.c.: intracerebral

i.p.: intraperitoneal

LTD: depressão de longa duração, do inglês *long-term depression*

LTP: potenciação de longa duração, do inglês *long-term potentiation*

NAc: Núcleo *Accumbens*

PKA: proteína cinase dependente de AMPc, do inglês *protein kinase A*

s.c.: subcutâneo

RESUMO

A dependência de drogas é um transtorno multifatorial complexo que se desenvolve em uma minoria de indivíduos que fazem uso dessas substâncias. Memórias associativas entre a droga e o contexto funcionam como gatilho para disparar comportamentos não adaptativos de busca e consumo, além de recaídas após períodos de abstinência. Subjacentes a essas mudanças comportamentais, existem modificações nas subunidades de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA em estruturas envolvidas com memória (Hipocampo) e recompensa (Núcleo *Accumbens*). Por isso, estratégias que enfraqueçam a associação do contexto com a droga e que aprofundem o conhecimento dos circuitos envolvidos nesses comportamentos são de extrema relevância terapêutica. A memória quando evocada pode passar por dois processos pós-evocação: a extinção, em que uma nova memória é formada inibindo uma prévia associação, e a reconsolidação, em que a memória original entra em um estado lábil e suscetível a modificações, em que é possível enfraquecê-la através da inibição de sua reconsolidação. A reconsolidação da memória mostra-se uma estratégia mais eficaz e duradoura em relação à extinção, já que a memória original é modificada. Como modelo animal para o estudo da memória na dependência de drogas, o condicionamento de preferência por local (CPL) é bastante utilizado e sabe-se que é possível enfraquecer a preferência através do bloqueio da reconsolidação. Porém, são escassos os estudos que investigaram a existência da reconsolidação no modelo de sensibilização locomotora, que parece ocorrer, na maioria dos casos, em condição dependente do contexto de aquisição do comportamento, embora existam exemplos que demonstrem sua independência. As questões a serem respondidas neste trabalho são (a) se é possível reverter conjuntamente a preferência por local e a sensibilização locomotora à morfina (5 mg/kg) em ratos *Wistar* adultos machos, inibindo-se a síntese proteica com cicloheximida (CHX) i.p. logo após uma sessão de reativação contextual da memória no CPL, (b) se a reversão dos comportamentos reflete alterações (já descritas por outros autores) em GluA1, GluA1p (Ser845) e GluA2, no Hipocampo dorsal (HPCd) e no Núcleo *Accumbens* (NAc), e (c) se o mesmo tratamento em ambas estruturas reverte os dois parâmetros avaliados – comportamental e neuroquímico – de forma diferente ou igual. Nossos resultados mostraram ser possível reverter a preferência por local e a sensibilização locomotora por inibição sistêmica de síntese proteica, e que o condicionamento com exposição à morfina induz alterações nas subunidades analisadas de AMPA, conforme verificado no HPCd e NAc, embora a CHX não tenha produzido um efeito tão bem definido. Os animais que receberam infusões centrais no HPCd e NAc (central) não exibiram preferência por local, nem sensibilização. Em conjunto, nossos resultados mostraram, pela primeira vez em um mesmo desenho

experimental, que é possível reverter diferentes aspectos da memória de recompensa (preferência e sensibilização) por meio do bloqueio da reconsolidação.

Palavras-chave: morfina, condicionamento de preferência por local, sensibilização locomotora, memória, reconsolidação, hipocampo dorsal, núcleo *accumbens*, cicloheximida, GluA1, GluA2.

ABSTRACT

Drug addiction is a complex and multifactorial disorder that develops in a few people who use these substances. Associative memories between the drug and context of use act as a trigger for maladaptive behavior such as drug seeking and drug use, in addition to relapse after an extended period of withdrawal. Underlying these behavioral changes are modifications in glutamatergic reception (AMPA) in structures involved with memory (Hippocampus) and reward (Nucleus Accumbens). Therefore, strategies that weaken the drug and context association and deepen knowledge of circuits involved in these behaviors are extremely relevant therapeutically. When retrieved, a memory can undergo two distinct processes post-retrieval: extinction, in which a new memory inhibiting a previous association is generated, and reconsolidation, in which the original memory can enter a labile state and is susceptible to modifications, when it can be weakened by inhibition of its reconsolidation. Reconsolidation of memory has been shown to be a more effective and long lasting strategy in relation to extinction, since the original memory is modified. An animal model for studying drug addiction, conditioned place preference (CPP) is largely used and it is well known that it is possible to weaken preference by disrupting reconsolidation. However, there are few studies that investigate the existence of reconsolidation in a locomotor sensitization paradigm, which seems to occur in a condition dependent on context of acquisition, although some works report its independence. The questions answered in this work were (a) if it is possible to reverse both, context preference and locomotor sensitization to morphine (5mg/kg) by protein synthesis inhibition (CHX) after a contextual memory reactivation session in CPP, (b) if the disruption of behaviors reflects a reversal of changes of GluA1, GluA1p (Ser845) e GluA2 in dorsal Hippocampus (dHPC) and Nucleus Accumbens (NAc) and (c) if the same treatment in these structures differentially reverts the two parameters assessed. Our results indicate that it is possible to revert context preference and locomotor sensitization via systemic disruption of protein synthesis and that morphine conditioning induces changes in AMPA subunits in dHPC and NAc, although CHX did not have an evident effect on molecular reversal. Animals cannulated in dHPC and NAc core did not induce preference or sensitization. Taken together, our results demonstrated, for the first time, using the same experimental design that is possible to revert different aspects of reward memory (preference and sensitization) by disrupting the reconsolidation process.

Key-words: morphine, conditioned place preference, locomotor sensitization, memory, reconsolidation, dorsal hippocampus, nucleus accumbens, cycloheximide, GluA1, GluA2.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
1.1	Drogas e o sistema mesocorticolímbico de recompensa.....	12
1.2	Hipóteses da dependência	16
1.3	Modelos animais e algumas características neurobiológicas no estudo da dependência	18
1.3.1.	Autoadministração	18
1.3.2.	Condicionamento de Preferência por Local.....	19
1.3.3.	Sensibilização Comportamental	20
1.4	Reconsolidação da memória: oportunidade de reverter comportamentos relacionado à dependência.....	23
2.	OBJETIVOS.....	29
2.1	Objetivo geral	29
2.2	Objetivos específicos	29
3.	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Animais.....	30
3.2	Cirurgia estereotáxica, infusão do fármaco e verificação da posição das cânulas	30
3.3	Fármacos	31
3.4	Condicionamento de Preferência por Local (CPL).....	31
3.4.1	Padronização do aparato sem preferência prévia (<i>unbiased</i>).....	32
3.4.2	Protocolo de Condicionamento de Preferência por Local	33
3.6.	<i>Western blotting</i>	35
3.7.	Experimentos	37
3.8.	Análise estatística	39
3.9.	Considerações Bioéticas	39
4.	RESULTADOS	40
4.1	Experimento 1: Padronização dos contextos	40

4.2. Experimento 2: A reativação da memória por 15 min parece ser longa demais para o estudo de reconsolidação da memória no CPL	42
4.3. Experimento 3: A injeção sistêmica de CHX após a reativação por 10 min é capaz de inibir a preferência pelo compartimento associado à morfina e também a sensibilização locomotora.	45
4.4. Experimento 4: Participação específica do HPCd na mediação do efeito sistêmico da morfina - Animais com CHX infundido no HPCd não adquiriram preferência por local nem sensibilização locomotora induzida por morfina.....	56
3.6. Experimento 5: Participação específica do cNac na mediação do efeito sistêmico da morfina encontrado - Animais com CHX infundido no cNac não revertem a preferência por local nem exibem sensibilização locomotora induzida por morfina	59
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES.....	80
7. PERSPECTIVAS	81
8. REFERÊNCIAS.....	82

1. INTRODUÇÃO

O uso de drogas que alteram a percepção acompanha a história da humanidade. Há evidências do uso de substâncias psicotrópicas há milhares de anos (Sullivan & Hagen, 2002). O historiador brasileiro Henrique Carneiro busca justificar a busca atemporal dessas substâncias dizendo que "quase todas as drogas são parte indispensável dos ritos da sociabilidade, da cura, da devoção, do consolo e do prazer. Por isso as drogas foram divinizadas em inúmeras sociedades" (Carneiro, 2002 - pág. 3). Por outro lado, evidências de dependência são bem mais recente (Singer, 2012).

Por definição, drogas psicotrópicas ou de abuso são substâncias que agem no sistema nervoso central alterando processos mentais (WHO, 1981), incluindo mudanças na percepção, no humor, nos sentimentos, nos comportamentos e na cognição (DSM-5, 2013). Agem como reforçadoras e podem levar à dependência indivíduos predispostos ou vulneráveis (Le Moal, 2016; Volkow & Morales, 2015).

A dependência é um transtorno mental que se desenvolve gradualmente pelo uso repetido de determinada droga e caracteriza-se pelo forte desejo em consumi-la (fissura), pela busca compulsiva e pelo risco duradouro de recaídas, mesmo após longos períodos de abstinência (DSM-5, 2013; Wise & Koob, 2014). Após instalada a dependência, a droga passa a receber destaque na vida do indivíduo e os comportamentos de busca e consumo se dão mesmo na presença de consequências físicas, psíquicas e sociais adversas (Hyman & Malenka, 2001; Everitt & Robbins, 2005; Volkow & Morales, 2015).

A prevalência mundial do uso de drogas opioides, como heroína e morfina, é de 0,7% (*United Nations Office on Drugs and Crime*, 2015); para o Brasil esse índice estava em 1,3% para opiáceos e 0,09% para heroína em 2005 (Carlini *et al.*, 2006). São consideradas o tipo de droga que mais são injetadas e apresentam o maior índices de mortes relacionadas ao uso de substâncias, em parte pelos seus efeitos de depressão respiratória (*United Nations Office on Drugs and Crime*, 2012). Na Europa e Ásia, o maior registro de tratamentos em relação à dependência é de opióides (*United Nations Office on Drugs and Crime*, 2015), o que mostra a importância de se entender melhor a dependência dessas substâncias.

A dependência, de forma geral, leva a neuroadaptações moleculares e celulares, disfunção de circuitos neurais subjacentes e, conseqüentemente, comportamentos patológicos e não adaptativos (Hyman & Malenka, 2001; Everitt & Robbins, 2005; Volkow & Morales, 2015). Inicialmente os trabalhos que investigaram a dependência, abordaram hipóteses que envolviam tolerância (normalmente aos sintomas positivos, como a euforia) e a emergência de sintomas

negativos (Solomon & Corbit, 1974). Outros estudos enfocaram na hipótese do aprendizado aberrante, em que a dependência é vista como fortes associações entre os efeitos recompensadores das drogas e associações externas feitas a elas (Hyman, 2005; Kelley, 2004). Na década de 90, Robinson & Berridge (1993) lançaram a hipótese da sensibilização ao incentivo, que afirma que nem os reforços (positivo e negativo) nem as memórias em si associadas à recompensa são responsáveis pelos comportamentos patológicos da dependência. Eles defendem que existam dois componentes importantes dentro da dependência, o "gostar" e o "querer", e que o componente querer se sobressai no desenvolvimento da dependência e, assim, sustenta a busca/consumo da substância e as recaídas.

É consenso que as associações feitas com a droga, durante o desenvolvimento da dependência, tem papel chave na manutenção do uso, assim como nas recaídas. Uma parte considerável dos trabalhos na pesquisa básica e clínica tem focado seus esforços na atenuação desse componente associativo (Hyman, 2005; Torregrossa *et al.*, 2011). Nas últimas duas décadas muitos estudos demonstraram que as memórias associativas não são imutáveis, como se pensava, mas sim flexíveis e suscetíveis a modificações. A Reconsolidação da memória vem sendo amplamente estudada e mostra que memórias previamente consolidadas podem ser desestabilizadas (ou labilizadas) e precisam ser reconsolidadas para persistir. O bloqueio do processo de reconsolidação vem sendo utilizado como ferramenta para atenuar memórias associativas de caráter não adaptativo, como no caso do estresse pós-traumático e da dependência (Reichelt & Lee, 2013; Torregrossa & Taylor, 2013).

Muitos trabalhos que investigam a sensibilização comportamental (explicado adiante) mostram que sua expressão é dependente de contexto, o que indica também um componente associativo. Por isso, neste trabalho investigamos o papel da reconsolidação da memória em (a) uma memória predominantemente contextual e (b) na sensibilização locomotora. Além disso, buscamos entender o papel do Hipocampo dorsal e do centro do Núcleo *Accumbens* nesses dois componentes da dependência.

1.1 Drogas e o sistema mesocorticolímbico de recompensa

As substâncias psicotrópicas são vistas como reforçadoras, termo amplo utilizado na psicologia experimental que se refere a um estímulo que muda a probabilidade de determinado comportamento acontecer em diferentes contingências de aprendizado (reforço positivo e reforço

negativo¹). Além disso, as substâncias psicotrópicas funcionam como recompensas, que para esta dissertação assume-se que se referem a respostas subjetivas associadas à apresentação de um reforço - neste caso, a substância -, também podendo ser relacionado com estados emocionais positivos, como o gostar (Sanchis-Segura & Spanagel, 2006).

Apesar de diferentes efeitos farmacológicos, as drogas de abuso agem ativando o sistema de recompensa, no qual neurônios dopaminérgicos localizados na Área Tegmental Ventral (VTA, do inglês *Ventral Tegmental Area*), constituinte do mesencéfalo, disparam com maior frequência. O disparo fásico desses neurônios aumenta rapidamente a liberação de dopamina em diversas regiões (Volkow & Morales, 2015) e acredita-se que a sinalização da recompensa é feita principalmente pelo aumento desse neurotransmissor no Núcleo *Accumbens* (NAc), que faz parte do estriado ventral (Di Chiara & Imperato, 1988). Porém, existem hipóteses que defendem que esse aumento não está relacionado à recompensa, e sim a um sistema de predição de erro (Schultz, 1998) ou de atribuição de valor à droga e motivação pela busca e consumo (Berridge & Robinson, 1998).

A hiperestimulação de neurônios dopaminérgicos pode fortalecer ou enfraquecer sinapses em regiões corticais e límbicas (por isso é chamada de via mesocorticolímbica), que incluem o Córtex Pré-Frontal (PFC, do inglês *Prefrontal Cortex*), o Estriado dorsal, o NAc, o Hipocampo (HPC) e a Amígdala (fig. 1). Por outro lado, a VTA recebe aferências gabaérgicas do NAc e glutamatérgicas do PFC, do HPC e da Amígdala. Essa ativação sinérgica de aferentes dopaminérgicas e circuitos glutamatérgicos das estruturas funcionalmente diferentes codificam informações sobre o estado motivacional de um indivíduo em relação a informações sensoriais e registram respostas relevantes em relação a um objetivo (Hyman *et al.*, 2006).

¹ O reforço pode aumentar a probabilidade de um comportamento acontecer (a) por retirar um estado emocional negativo (por exemplo, ansiedade ou desânimo), e assim é chamado de *reforço negativo*, ou (b) por induzir um estado emocional positivo (por exemplo, euforia ou prazer), chamado de *reforço positivo* (Sanchis-Segura & Spanagel, 2006).

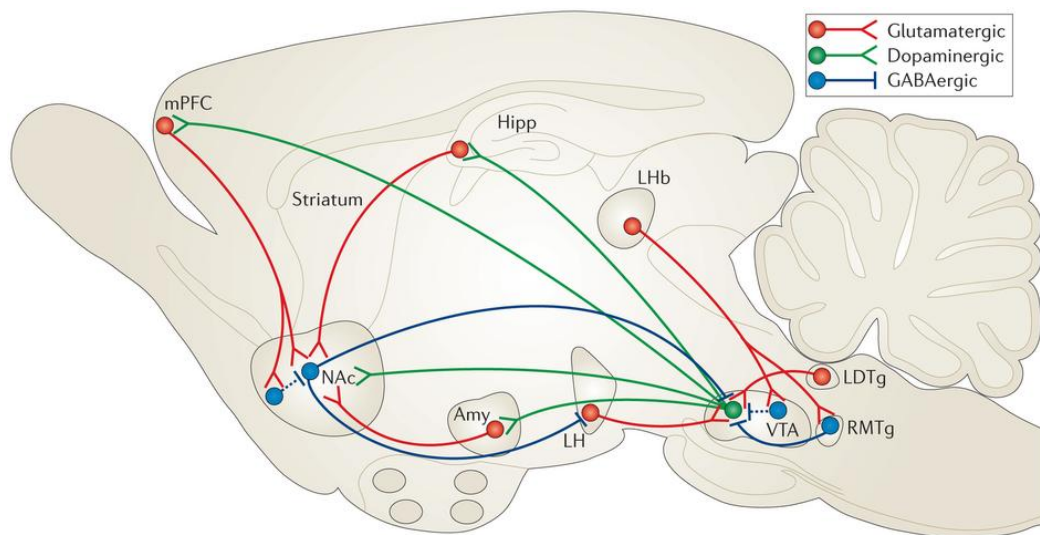


Figura 1. Circuito dopaminérgico mesocorticolímbico. Em verde projeções dopaminérgicas, em vermelho projeções glutamatérgicas e em azul projeções gabaérgicas. VTA: Área Tegmental Ventral; NAc: Núcleo *Accumbens*; mPFC: Córtex Pré-Frontal medial; Hipp: Hipocampo; Amy: Amígdala; Striatum: Estriado; LH: Hipotálamo Lateral; LDTg: Núcleo Tegmental Laterodorsal; RMTg: Tegmento Rostromedial. Adaptado de Russo & Nestler (2013).

O NAc tem importante papel no estabelecimento de comportamentos de busca voluntária pela droga. Essa estrutura é composta por duas regiões conhecidas como NAc *core* (que aqui chamaremos de centro do NAc) e o NAc *shell* (periferia do NAc), sendo uma estrutura integradora de projeções corticais e límbicas (Salgado & Kaplitt, 2015). Um aumento de dopamina é observado na periferia do NAc com a administração de drogas de abuso (Pontieri *et al.*, 1995) e, quando os receptores D1 são bloqueados, o aprendizado de tarefas que envolvem a associação de um local com a droga (Condicionamento de Preferência por Local, CPL) é prejudicado (Spina *et al.*, 2006; Fenu *et al.*, 2006; Di Chiaro & Bassareo, 2007). O centro do NAc parece ter maior relevância na associação da recompensa com pistas relacionadas a comportamentos de busca (Hyman *et al.*, 2006), pois quando os receptores D1 (Dalley *et al.*, 2005) ou os receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato, Di Ciano *et al.*, 2001) são bloqueados, esses comportamentos também são. Na tarefa de CPL, que permite estudar o componente associativo entre pistas contextuais e o reforço da droga², também foi visto que após a expressão da preferência por local no CPL, houve aumento de c-fos no centro mas não na periferia do NAc, indicando que na evocação dessa memória o centro do NAc está mais ativo e, portanto, tem maior participação nesse momento (Miller & Marshall, 2005a).

² Nesta tarefa a droga é administrada repetidamente em determinado contexto, criando uma forte associação entre contexto e a droga e conseqüente preferência por este local. Este modelo será explicado detalhadamente na sessão "Modelos animais e algumas características neurobiológicas no estudo da dependência".

No PFC, o Cingulado Anterior e o Córtex Orbitofrontal estão envolvidos no autocontrole e atribuição de saliência à droga (discutida adiante), assim como flexibilidade comportamental, e a disfunção desses circuitos está envolvida com comportamentos compulsivos e impulsivos (Volkow & Morales, 2015).

O HPC desempenha importante função na formação de memórias, nas associações (principalmente contextuais) feitas com a recompensa, de forma que na presença de estímulos condicionados a sua comunicação com a VTA aumenta a sinalização dopaminérgica e prediz a recompensa - embora a Amígdala também esteja envolvida com o reforço condicionado por meio de pistas associadas mais sutis (Everitt & Robbins, 2005). A estimulação *theta-burst*, um protocolo de estimulação magnética transcraniana, na porção ventral do Subículo (parte da formação hipocampal), reinstala comportamentos de busca que foram extinguidos em um modelo de autoadministração com cocaína, sugerindo que essa estimulação incentiva a iniciação da autoadministração (Vorel *et al.*, 2001).

Com o uso mais avançado da droga, os comportamentos de busca automáticos (estímulo-resposta) já estão estabelecidos na forma de hábitos e o Estriado dorsal exerce papel central, que antes era desempenhado pelo NAc, pois aquele codifica as ações bem sucedidas em relação à obtenção da substância (Everitt & Robbins, 2013).

A coexposição repetida de estímulos neutros com a droga permitem sua associação e estes estímulos passam a ser condicionados. Essa associação faz com que a presença do estímulo condicionado passe a predizer a recompensa, que por si só aumenta rapidamente a sinalização dopaminérgica no NAc por disparo fásico das células na VTA. Acredita-se que esse mecanismo esteja envolvido com a expectativa em relação à recompensa e que seja responsável por disparar comportamentos de busca (seja a recompensa natural ou não; Hyman *et al.*, 2006; Volkow & Morales, 2015).

Embora tenhamos acima visto alguns mecanismos neurobiológicos envolvidos com a sinalização da recompensa e com os comportamentos de busca, o fenômeno da dependência a drogas possui caráter multifatorial e natureza complexa, que não pode ser explicado de forma simplista. Em relação a isto, existem diferentes hipóteses neurobiológicas buscando explicar esse fenômeno.

1.2 Hipóteses da dependência

Vulnerabilidades biológicas, psicológicas e ambientais são relevantes para que alguns indivíduos desenvolvam dependência enquanto outros não (Le Moal, 2016; Volkow & Morales, 2015). Porém, não é consenso entre os pesquisadores quais fatores dentro da dependência que funcionam como gatilho para a transição do uso recreativo ou ocasional para o uso compulsivo e a manutenção dos comportamentos de busca e uso e, por isso, existem variadas hipóteses que buscam explicá-los.

A hipótese mais difundida popularmente parece ser a do Processo Inverso (*Opponent Processes Theory*) proposta na década de 70 (Solomon, 1974). Ela discute as ideias de tolerância aos efeitos recompensadores e abstinência como consequência de processos homeostáticos decorrentes do uso, duas ideias bem presentes quando se fala de dependência. A hipótese motivacional do processo inverso postula que existem dois processos na dependência. O *processo (a)*, que consiste em respostas intensas hedônicas que surgem logo após a apresentação do estímulo químico e o *processo (b)*, que inicia logo após o término do *processo (a)* e está associado com estados afetivos opostos ou negativos (desagradáveis). Ao longo do uso, o *processo (a)* sofre tolerância e o *(b)* incremento. Os defensores dessa hipótese explicam que os processos sofrem controle homeostático central, estabelecendo-se o processo inverso. Ou seja, nessa hipótese a tolerância e a síndrome de abstinência tem intrínseca relação e a manutenção da busca e consumo é dirigida por sintomas de abstinência (Koob & Le Moal, 2008).

Outra hipótese coloca como centro o componente mnemônico, a chamada Hipótese do Aprendizado Patológico (Hyman, 2005; Kelley, 2004; Nestler, 2005). A frequente exposição concomitante de estímulos ambientais juntamente com o uso de drogas (estímulo incondicionado) permite o aprendizado associativo (ou condicionamento pavloviano), de tal forma que estímulos antes neutros (pistas) passam a ter valor preditivo de recompensa (tornam-se estímulos condicionados). Isso quer dizer que uma pista que remeta à recompensa evoca memórias de estados emocionais positivos e é capaz de ativar o sistema de recompensa (Torregrossa *et al.*, 2011; Hyman, 2005). Além de aprendizados associativos, a formação de hábitos que envolvem relações automatizadas, do tipo estímulo-resposta, se estabelece e sugere-se que esse tipo de aprendizado contribua para a compulsão (Everitt & Robbins, 2013).

A dopamina durante o uso de drogas "sinaliza" ou "indica" estímulos a ganharem incentivo, produzindo mudanças plásticas em áreas responsáveis pela aprendizagem e coordenação das ações, como o HPC, o Estriado e o PFC (Hyman, SE et al., 2006). Essas mudanças são semelhantes às que ocorrem na formação de memórias, pois envolvem a LTP (potenciação de longa duração - com

fortalecimento das sinapses), assim como a LTD (depressão de longa duração - com enfraquecimento; Lüscher & Malenka, 2011; Volkow & Morales, 2015). Isso quer dizer que a dependência e a memória compartilham mecanismos moleculares, em que mudanças estruturais e funcionais de circuitos específicos armazenam a memória da recompensa da droga e suas associações, que contribuem para modificar comportamentos, por exemplo, de busca e consumo (Hyman, 2005; Kelley, 2004). Dessa forma, a hipótese do Aprendizado Patológico diz que as memórias associativas e a formação de hábitos ligadas aos efeitos reforçadores das drogas é fundamental no desenvolvimento e manutenção da dependência, contribuindo fortemente para recaídas, mesmo após longos períodos de abstinência.

Uma terceira hipótese enfoca o componente motivacional, a teoria da Sensibilização ao Incentivo (Robinson & Berridge, 1993). Nela Robinson e Berridge distinguem dois componentes psicológicos envolvidos no consumo de drogas: o *gostar* (*liking*), que refere-se às sensações subjetivas prazerosas (efeito hedônico), e o *querer* (*wanting*), que refere-se ao desejo de usar. Eles sugerem que esses componentes tem representações neurais distintas e que, no desenvolvimento da dependência, o *gostar* da droga diminui (ou se mantém igual), enquanto o *querer* se eleva, como mostra a fig. 2, de forma que ocorre sensibilização em estruturas que medeiam o valor de incentivo que a droga e suas pistas relacionadas representam. Eles defendem que a sensibilização no sistema dopaminérgico mesolímbico diz respeito à motivação do animal e não aos efeitos hedônicos. Aquela produz viés atencional direcionado à droga e às pistas associadas e diz-se que elas recebem saliência de incentivo. Com isso, a motivação para obtenção da substância sofre um grande incremento, atingindo estado não adaptativo, que passa a guiar os comportamentos de dependência na presença de estímulos específicos (Robinson & Berridge, 2000; Robinson & Berridge, 2008).

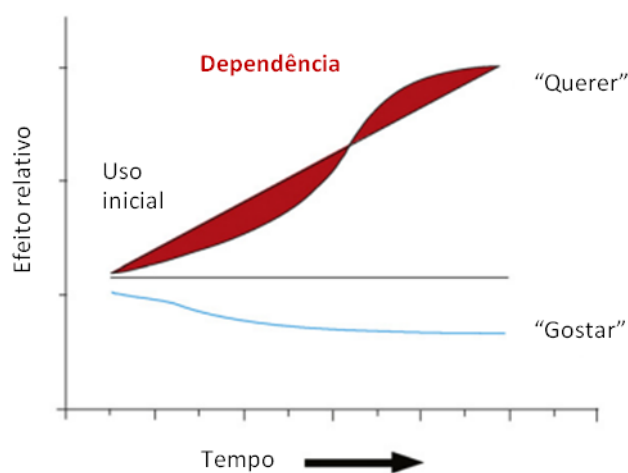


Figura 2. Modelo da Sensibilização ao Incentivo. O esquema mostra como o componente “querer a droga” incrementa-se ao longo do tempo independentemente do “gostar da droga” em um indivíduo que se torna dependente. Adaptado de Berridge *et al.*, 2009.

O aprendizado especifica o objeto de desejo, mas não produz comportamentos patológicos *per se*, por isso, nessa hipótese a memória exerce papel modulatório dos comportamentos de busca e não central na dependência. Pistas modulam a sensibilização comportamental dado que ela frequentemente se expressa na presença de estímulos ou contextos específicos e não de outros. A sensibilização pode durar de meses até mesmo anos (Kalivas & Duffy, 1987; Paulson, Camp & Robinson, 1991), e, dessa forma, os autores valorizam essa hipótese defendendo que este é o mecanismo mais plausível para explicar a alta incidência de recaídas em dependentes mesmo após anos de abstinência (Robinson & Berridge, 2000).

A fim de estudar características da dependência, a validade dessas hipóteses ou mesmo aspectos específicos relacionados à dependência, diferentes modelos animais foram estabelecidos.

1.3 Modelos animais e algumas características neurobiológicas no estudo da dependência

Embora as drogas possam ser estudadas como reforçadores negativos, na pesquisa básica a maioria dos trabalhos tratam-na como estímulo apetitivo e investigam mudanças no comportamento de animais, assim como mudanças associadas à plasticidade e à homeostasia, decorrentes de administrações da substância (Wise & Koob, 2014).

Existem diversos modelos para esse tipo de estudo, embora este trabalho introduzirá apenas três paradigmas: a Autoadministração, o Condicionamento de Preferência por Local e a Sensibilização Comportamental.

1.3.1. Autoadministração

A Autoadministração é um tipo de condicionamento operante (cunhado por Skinner em 1930), em que o comportamento é controlado pelas consequências. No estudo com roedores, normalmente, eles são expostos individualmente a uma caixa operante (muitas vezes isolados algumas horas por dia) em que ficam disponíveis duas barras (estímulos neutros). Uma das barras, quando pressionada (número de vezes pré-estabelecido) está associada à infusão de uma dose (intravenosa, intracerebral, etc.) de certa droga (estímulo incondicionado, EI), passando a ser estímulo condicionado (EC), e a outra barra não produz nenhum estímulo (mantém-se neutra). Dessa forma, a droga age reforçando o comportamento de pressionar a alavanca, de tal forma que, ao longo dos condicionamentos, os animais apresentam um aumento do número de vezes que

pressionam a barra associada com a droga (resposta condicionada) (Sanchis-segura & Spanagel, 2006).

O número de vezes que o animal precisa apertar a alavanca para obter a dose pode ser fixo (taxa fixa) ou progressivo (taxa progressiva). Normalmente, no início do aprendizado utiliza-se uma taxa fixa, quando pode-se avaliar o poder de reforço da droga em questão, e então segue-se com a taxa progressiva, que permite avaliar o estabelecimento temporal de comportamentos relacionados à dependência, como comportamentos compulsivos. De outra forma, estímulos discriminativos também podem ser associados à alavanca, como uma luz ou um som, de forma que a apresentação desse segundo estímulo também guie o comportamento - esse tipo de procedimento chama-se condicionamento de segunda ordem (Sanchis-segura & Spanagel, 2006).

Este é um modelo interessante porque parece simular, da forma mais próxima da realidade encontrada, até o momento, o consumo em humanos e o escalonamento do uso, oferecendo ao modelo validade de face (Sanchis-segura & Spanagel, 2006; Sorg, 2012).

Porém, nos dois paradigmas que seguem, os instrumentos necessários para seus desenvolvimentos são financeiramente mais acessíveis e com protocolos mais simples, além de oferecerem modelos importantes para se estudar o papel dos EC, assim como neuroadaptações no sistema de recompensa em resposta à administração de drogas. Por isso e por eles serem usados neste trabalho de mestrado, eles serão mais discutidos ao longo da introdução.

1.3.2. Condicionamento de Preferência por Local

O Condicionamento de Preferência por Local (CPL), brevemente explicado anteriormente, ocorre pela associação de uma droga (EI) com um estímulo neutro (EC) por repetidos pareamentos. Esse processo de natureza Pavloviana (condicionamento Pavloviano ou clássico³), permite que o EC induza atração (aproximação, CPL) ou aversão (evitação, condicionamento de aversão ao local) pelo local pareado com a droga, dependendo de sua propriedade apetitiva ou aversiva (Sanchis-segura & Spanagel, 2006).

Quando se estuda o poder reforçador de uma droga, observa-se que ela é capaz de induzir atração pelo contexto em que foi administrada e assim gerar preferência por aquele local. Várias drogas de abuso podem induzir preferência por local, como cocaína (Nygard *et al.*, 2015), anfetamina

³ O fisiologista Iván Pavlov em 1927 descreveu esse tipo de condicionamento em que um EI (estímulo que por si só gera uma resposta inata, a resposta incondicionada) é associado a um neutro, que por repetidas associações passa a provocar a mesma resposta estimulada pelo EI (chamada resposta condicionada), assim, sendo um EC. Os experimentos foram feitos em cães, com a presença de um pedaço de carne (EI) pareada com o barulho de um sino (EC), gerando salivação (resposta).

(Häggkvist *et al.*, 2009), etanol (Cunningham *et al.*, 2006), heroína (Ashby, *et al.*, 2003) e morfina (Popik *et al.*, 2006). Os aparatos são constituídos de 2 ou 3 contextos distintos, em que 2 são contextos de condicionamento e o terceiro é um compartimento pequeno que os conecta, tido como de partida (*start-box*) ou passagem, que não é associado a qualquer administração. Ao longo dos condicionamentos, a droga é pareada com um dos contextos (contexto droga) e o outro contexto de condicionamento é associado com uma solução veículo (contexto veículo), assim, depois da administração de cada substância o animal é confinado a um dos compartimentos por determinado tempo. A sessão de teste, em que o animal explora livremente o aparato, é capaz de verificar o efeito dos condicionamentos. O aumento do tempo de permanência no compartimento associado à droga indica uma preferência e interpreta-se que isso é devido aos seus efeitos hedônicos (Tzschentke, 1998 e 2007). Nessa abordagem do CPL, também verifica-se comportamentos de busca pela droga e é possível estudar fármacos que interferem nesse processo.

Existem dois tipos de configuração no CPL. Na configuração com preferência prévia (*biased*) o animal tem preferência não condicionada (*natural*), e, para avaliar o efeito reforçador de uma droga, pode-se pareá-la com o contexto de não preferência ou parear metade dos animais com o contexto de não preferência e a outra metade com o de preferência. Já na configuração sem preferência prévia (*unbiased*), os animais não tem preferência inicial por nenhum compartimento e, normalmente, randomiza-se o contexto a ser associado à droga entre os animais de cada grupo. No modelo com preferência prévia (*biased*) pode haver confusão na interpretação dos resultados, já que uma droga com efeito ansiolítico pode aumentar o tempo de permanência no contexto droga que previamente causou aversão por diminuir a ansiedade e permitir que o animal permaneça mais tempo lá, e não por seu efeito recompensador. Por isso, os pesquisadores parecem utilizar mais o modelo sem preferência prévia (*unbiased*, Tzschentke, 1998 e 2007).

Nesse modelo, assim como na sensibilização comportamental que será discutida na sequência, a droga é administrada pelo experimentador, independentemente da vontade ou comportamento do animal. Isso contribui para uma menor validade de face desses paradigmas (Sanchis-segura & Spanagel, 2006).

1.3.3. Sensibilização Comportamental

A hipótese de Sensibilização ao Incentivo prediz que ao longo de repetidas administrações de uma droga, esta, assim como seus EC, recebe maior valor de incentivo, o que configura maior motivação para buscar a droga. Apesar da dificuldade de identificar e quantificar esse incremento do

querer, dois parâmetros comportamentais evidenciam essa mudança: a ativação psicomotora e a predisposição à recompensa. Já foi amplamente demonstrado que a administração de várias drogas tem efeito agudo na ativação psicomotora assim como um aumento gradual e progressivo sob administrações intermitentes e repetidas da droga, que em roedores é observado por aumento da locomoção e de comportamentos repetitivos (estereotipados), como lambar, mastigar e farejar (Wise & Bozarth, 1987; Carlezon & Nestler, 2002). A sensibilização também foi demonstrada para diversas drogas de abuso, como cocaína (Li *et al.*, 2004), anfetamina (Mlewski *et al.*, 2016), álcool (Nona *et al.*, 2016) e morfina (Li *et al.*, 2010).

Também foi visto que a administração prévia de uma droga facilita a aquisição de preferência no CPL, mesmo com doses e número de condicionamentos insuficientes para gerar preferência em animais *naive* (Lett, 1989; Gaiardi *et al.*, 1991; Shippenberg & Heidbreder, 1995; Shippenberg *et al.*, 1998). No paradigma de autoadministração foi demonstrado que ratos pré-tratados com alguma droga mais facilmente se autoadministraram (Piazza *et al.*, 1986) e se esforçaram mais para obter uma dose em um protocolo com taxa progressiva (Mendrek *et al.*, 1998; Vezina *et al.*, 2002). Essa rápida aquisição de comportamentos de busca e de autoadministração indicam uma predisposição aos efeitos reforçadores da droga, que é defendido como um fator importante para o estabelecimento e manutenção de comportamentos de dependência, visto que a sensibilização pode se manter por muito tempo após interrupção do uso e contribuir para as repetidas recaídas (Robinson & Berridge, 1993).

Um dos correlatos bioquímicos bastante reconhecido pelos pesquisadores da área é a sensibilização da via dopaminérgica mesolímbica, que apresenta mudanças de longa duração. Em animais em que a droga não é mais novidade, há maior liberação de dopamina pela VTA no NAc, frente a um desafio (uma quantidade normalmente menor do que foi administrada previamente), se comparado com animais *naive* (Kalivas & Duffy, 1987; Vanderschuren & Kalivas, 2000; Vezina, P, 2004; Kalivas *et al.*, 2009). A estimulação de receptores D1 na VTA mostrou-se necessária no desenvolvimento da sensibilização comportamental com repetidas administrações sistêmicas de drogas estimulantes, assim como suficiente para a indução da sensibilização. Com o mesmo raciocínio, o bloqueio desses receptores previne a sensibilização comportamental (Carlezon & Nestler, 2002).

Outro sistema de neurotransmissão que interage com o dopaminérgico e está sendo foco de estudo é o glutamatérgico, que apresenta ampla distribuição no encéfalo e está diretamente envolvido na plasticidade de longa duração. Aferências excitatórias, provenientes do PFC, parecem ser fundamentais para uma plasticidade transitória em células dopaminérgicas na VTA, responsável pelo estabelecimento desses comportamentos, enquanto que em células espinhosas médias no NAc

parecem ser centrais para sua expressão e são mais duradouras (Vezina, 2004; Kalivas *et al.*, 2009; Carlezon & Nestler, 2002; Vélez-Hernández *et al.*, 2013). A aquisição desses comportamentos necessita da estimulação de receptores glutamatérgicos na VTA, que é associado ao aumento de glutamato e LTP transitória em células dopaminérgicas. Já a expressão da sensibilização ou comportamentos de busca induzem liberação do glutamato no centro do NAc.

Dessa forma, a plasticidade que ocorre no centro do NAc parece ser importante para resguardar informações relativas às pistas associadas à droga. É possível prevenir a reinstalação da busca induzida por pistas contextuais por meio do bloqueio de receptores AMPA no centro, mas não na periferia, do NAc. Animais sensibilizados a psicoestimulantes, após algum tempo sem a droga, apresentam níveis aumentados de AMPA em relação à NMDA (AMPA/NMDA) e da subunidade GluA1 (GluR1 ou GluRA) do receptor AMPA no NAc, assim como aumento de espinhos dendríticos, o que caracteriza plasticidade tipo LTP (Badiani *et al.*, 2011). Porém, 24 h após o desafio foi visto que existe uma redução da relação AMPA/NMDA e de GluA1, o que pode resultar da estimulação excitatória que induz plasticidade do tipo LTD (Wolf *et al.*, 2004; Wolf *et al.*, 2010a). Porém, a modulação na recepção glutamatérgica para drogas opioides, como a heroína e a morfina, é menos estudada e menos conhecida (Dacher & Nugent, 2011; Hearing *et al.*, 2016).

O mecanismo de recompensa da morfina se dá pela ativação de receptores μ -opioides em interneurônios gabaérgicos na VTA (Fields & Margolis, 2015). Os receptores μ -opioides são do tipo metabotrópicos, acoplados a proteína Gi/Go, e tem efeito inibitório pelo bloqueio da via do AMPc, de canais de cálcio e ativação de canais de potássio (Law, 2000). Então, a inibição de neurônios dopaminérgicos "desinibe" neurônios dopaminérgicos na VTA, induzindo mais disparos desses neurônios e, conseqüentemente, maior liberação desse neurotransmissor no NAc (Dacher & Nugent, 2011; Fields & Margolis, 2015). O desenvolvimento da sensibilização depende, da mesma forma, de ativação desses receptores na VTA, pois inibindo-os a sensibilização não se dá após repetidas administrações de morfina (Kalivas & Duffy, 1987). Já o NAc não está envolvido dessa forma na aquisição da sensibilização, pois o mesmo tratamento não tem efeito. Apesar de a estimulação de receptores μ -opioides diminuir a via do AMPc, sabe-se que com o uso continuado de morfina mecanismos compensatórios provocam hiperestimulação dessa via, o que reflete em aumento de sinalização intracelular por PKA (proteína cinase dependente de AMPc), importante em comportamentos relacionados à dependência (Nestler, 2015).

É comum experimentos demonstrarem que a sensibilização comportamental não ocorre se as administrações são feitas na caixa moradia e que a expressão da sensibilização comportamental é contexto dependente (Wang & Hsiao, 2003; Li *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2011). Dessa forma, a expressão do comportamento ocorre apenas quando o teste é realizado no mesmo contexto da aquisição.

Porém, outros trabalhos indicam que a sensibilização ocorre independente do contexto de teste e pode desenvolver-se na caixa moradia também, mesmo que sua expressão possa ser menos robusta (Kalivas & Duffy, 1987; Heidbreder *et al.*, 1996; Vekovischeva *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2015).

O aprendizado associativo contextual é altamente dependente de HPC e alguns trabalhos com sensibilização tem demonstrado plasticidade nessa estrutura. Xia *et al* (2011) verificaram que administrações repetidas de morfina induziram aumento da subunidade GluA1 fosforilada na serina 845 (GluA1 S845) pela PKA no homogenato total e diminuição de GluA2 total na densidade pós-sináptica do HPC dorsal, 7 dias após o desafio com morfina. Essa alteração só foi vista quando as administrações foram realizadas em um contexto que não a caixa moradia, o que também foi exclusivo para induzir sensibilização comportamental. Também foi demonstrado que a infusão no HPC de um vetor viral, que modifica o sítio de fosforilação na serina 845, preveniu a aquisição da sensibilização. Outro trabalho estudou repetidas administrações de cocaína e foi encontrado que 1 h após o desafio houve aumento do mRNA de GluA2 e da subunidade GluA1 fosforilada na serina 845 nos animais previamente tratados com cocaína, quando comparado com os animais que receberam veículo no pré-tratamento (Blanco *et al.*, 2016). Esses trabalhos ilustram a importância do HPC na sensibilização comportamental, assim como indicam que neuroadaptações no sistema de recepção glutamatérgica no HPC acontecem.

Apesar de vermos que existem importantes avanços no conhecimento de mecanismos que afetam o desenvolvimento e a expressão da sensibilização, assim como o comportamento de busca no CPL, a maior relevância na clínica seriam achados que conseguissem reverter de forma permanente os comportamentos já estabelecidos.

1.4 Reconsolidação da memória: oportunidade de reverter comportamentos relacionado à dependência

A memória é um fenômeno complexo, mas pode ser definida como a capacidade de um indivíduo registrar experiências ou informações do ambiente por meio do aprendizado, podendo posteriormente evocá-las e, assim, exibir comportamentos mais relevantes em resposta a mudanças ambientais e em relação a determinado objetivo. Ela não é formada instantaneamente. Após o aprendizado, uma memória passa por um período lábil e sua estabilização se dá ao longo do tempo, induzindo alterações moleculares e celulares em substratos neurais específicos para que persista - processo este conhecido como *consolidação* (Mcgaugh, 2000). Nessa perspectiva, intervenções

comportamentais ou farmacológicas nesse período são capazes de modificar a formação ou permanência de uma memória, sendo possível prejudicá-la.

Embora os processos mnemônicos sejam um fenótipo adaptativo, amplamente preservados em diferentes espécies, alguns indivíduos passam a apresentar disfunção desses mecanismos, desenvolvendo estados patológicos e comportamentos não adaptativos, como no caso do transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) e dependência. Esses transtornos são reconhecidos por envolver de forma excessiva mecanismos de memória, gerando memórias extremamente robustas, facilmente evocáveis e persistentes (Sorg, 2012; Tipps, *et al.*, 2014).

A possibilidade de atenuar essas memórias seria extremamente relevante porque permitiria acabar com o medo excessivo no TEPT e interromper o ciclo de recaídas na dependência (Sorg, 2012; Tipps *et al.*, 2014). São escassas as estratégias clínicas que apresentam efetividade em controlar os sintomas desses transtornos a longo prazo. A terapia de exposição é uma das mais utilizadas e baseia-se em expor o indivíduo ao EC ao trauma ou à droga, na ausência destes EI. A apresentação prolongada apenas do EC induz uma extinção, que ao contrário do que o nome sugere, não altera a memória original e induz um novo aprendizado (aprendizado inibitório), já que o EC não prediz o EI, e ambas as memórias (original e de extinção) coexistem e competem pela expressão do comportamento. Porém, esse procedimento de extinção é frágil e ineficaz em alguns aspectos, pois a memória de extinção pode ser restrita ao seu contexto de formação, ser sensível a ação do EI e do tempo, sofrendo renovação (*renewal*), reinstalação (*reinstatement*) e recuperação espontânea (*spontaneous recovery*), respectivamente. Dessa forma, há o retorno da dominância da memória original, e a memória de extinção deixa de suprimir os sintomas relacionados ao transtorno ao longo do tempo (Bouton, 2004; Myers & Davis, 2007).

Por muito tempo, por influência da teoria da consolidação (Mcgaugh, 1966), acreditou-se que uma memória, depois de formada, permaneceria resistente a intervenções amnésicas. Karim Nader *et al* em 2000 retomaram evidências das décadas de 60 e 70 (Misanin *et al.*, 1968; DeVietti & Kirkpatrick, 1976; Mactutus *et al.*, 1979) de que, mesmo depois de consolidada, uma memória poderia ser reativada e retornar a um estado lábil e suscetível a interferências, precisando ser *reconsolidada* para persistir. Dessa forma, a fase de reconsolidação é semelhante à consolidação no que tange a participação de neurotransmissão glutamatérgica e de cinases, expressão gênica e síntese de novas proteínas, embora existam diferenças moleculares importantes que distingam esses dois processos (Alberini, 2005; Lee *et al.*, 2004).

A reconsolidação da memória foi amplamente estudada principalmente para memórias aversivas. Porém, também é consistente para variados tipos de memória em diferentes modelos animais e espécies - de *Caenorhabditis elegans* a humanos -, o que caracteriza um processo

evolutivamente conservado e não isolado. A função biológica para a reconsolidação não é consenso, mas evidências suportam funções de fortalecimento (Lee, 2008) e manutenção da precisão da memória (de Oliveira Alvares *et al.*, 2013), assim como atualização de informações biologicamente relevantes (Lee, 2013).

Essa fase da memória é estudada principalmente por meio de instrumentos farmacológicos - como agonistas e antagonistas de receptores, bloqueio de cinases, inibidor de síntese proteica, etc. - administrados sistemicamente ou localmente em estruturas que participam do armazenamento das informações. Mais recentemente, tecnologias refinadas como a optogenética vem sendo empregadas na busca do engrama e sua manipulação. Acredita-se que as memórias são codificadas por fortalecimento de conexões sinápticas em uma subpopulação de neurônios, e essa rede de células é tida como o engrama, o substrato físico da memória no encéfalo (Josselyn *et al.*, 2015). Células que apresentam aumento de atividade, por expressão do gene de expressão imediata *c-fos* ou do fator de transcrição CREB em uma tarefa comportamental (Ramirez *et al.*, 2013; Hsiang *et al.*, 2014), são fortes candidatas para fazer parte do engrama. Animais submetidos ao CPL com cocaína tiveram neurônios na amígdala lateral (menos de 10%) com níveis aumentados de CREB e, quando esses neurônios foram inativados ou sofreram apoptose após o condicionamento, a expressão da memória não aconteceu, evidenciando que essa rede neural da Amígdala armazenava informações da memória (Hsiang *et al.*, 2014).

Na consolidação e na reconsolidação, a participação do sistema glutamatérgico é fundamental. Tanto a ativação de certos receptores é necessária, quanto a modulação nos níveis de receptores AMPA, que medeiam a rápida transmissão sináptica após esses processos (Johansen *et al.*, 2011). Este receptor AMPA é, geralmente, formado por 4 subunidades (GluA1-4) e sabe-se que elas contribuem diferentemente na modulação sináptica e em processos envolvidos com memórias e comportamentos relacionados à dependência (Wolf, 2010a; Anggono & Hugarir, 2012). Em relação a isso, alterações nos níveis das subunidades GluA1 e GluA2, altamente presentes no HPC e no NAc, ganham destaque no tráfego de AMPA (Wolf, *et al.*, 2004; Anggono & Hugarir, 2012). Por exemplo, a consolidação da memória de medo ao som está positivamente relacionada com aumento de GluA2 na Amígdala, e o prejuízo desta memória induz diminuição desta subunidade (Migues *et al.*, 2010). De forma semelhante, a aquisição do CPL com cocaína induz aumento da fosforilação na serina 845 de GluA1, induzida pela PKA (Hugarir & Nicoll, 2013), e, quando a reconsolidação dessa memória é prejudicada, verifica-se um decaimento desses níveis, tornando-se semelhantes ao grupo controle (Valjent *et al.*, 2006). Dessa forma, as quantidades dessas subunidades (fosforiladas e totais) parecem ser um importante correlato molecular de alterações comportamentais.

Em estudos de reconsolidação no CPL com cocaína e morfina, foi demonstrado que é possível inibir a preferência por local pelo prejuízo da reconsolidação mediante administração sistêmica de tratamentos amnésicos depois da sessão de reativação, que é quando a memória está sendo reestabilizada. Essa inibição pode ser feita por inibição de síntese de proteínas (Milekic *et al.*, 2006; Valjent *et al.*, 2006) ou evitando que a erk, uma cinase regulada por sinal extracelular, seja ativada (Valjent *et al.*, 2006).

Em estudos que investigaram estruturas envolvidas na reconsolidação do CPL, foi visto que é possível reverter a preferência por local inibindo-se a reconsolidação no centro do NAc por inibição da ativação de erk (CPL com cocaína, Miller & Marshall, 2005b) ou por inibição de síntese proteica (CPL com morfina, Milekic *et al.*, 2006) e que esse tratamento preveniu o aumento de proteínas envolvidas com a ativação da erk como CREB-p, Elk1-p, e fos (Miller & Marshall, 2005b). Também foi visto que inibindo-se a síntese proteica no HPC e na Amígdala basolateral após sessão de reativação, a preferência por local com morfina foi revertida 24 h e uma semana depois, embora a mesma inibição na VTA não tenha tido efeito (Milekic *et al.*, 2006). Este último trabalho mostrou que a diminuição da preferência não sofreu *recuperação espontânea* nem houve *reinstalação* da preferência mediante administração de uma dose da droga (*priming*), o que poderia suscitar dúvida se o efeito do tratamento foi sobre a inibição da reconsolidação ou se foi sobre a facilitação de uma memória de extinção.

Se tratando da sensibilização comportamental, existem poucos trabalhos que investigam a possibilidade de revertê-la por mecanismos similares à reconsolidação. Valjent *et al* (2006) não conseguiram reverter a sensibilização à cocaína com administração sistêmica de anisomicina, um inibidor de síntese proteica, após reativação. Já Bernardi *et al* (2007), com esse mesmo tratamento pós-reativação, conseguiram inibir a sensibilização locomotora à cocaína em um teste posterior. Os resultados opostos podem se dar porque Valjent usou uma reativação prolongada (20 min) com administração da droga, e sabe-se que exposições prolongadas ao EC são utilizadas mais para induzir extinção; já Bernardi utilizou uma reexposição curta (5 min), que mais comumente induz reconsolidação na ausência da droga, além de administrar uma dose 50% maior do que no trabalho de Valjent. Essas diferenças, além do protocolo e dose de indução, espécie e condições do laboratório podem ter influenciado os resultados conflitantes.

Wei e Li (2014) administraram propranolol sistemicamente, um antagonista β -adrenérgico, após sessão de reativação e não encontraram efeito sobre a sensibilização comportamental à morfina. O interessante deste trabalho é que eles avaliaram também a resposta condicionada (também referida como hiperlocomoção) ao contexto, na ausência do EI. Em relação a este parâmetro, o tratamento teve efeito, reduzindo a resposta frente ao EC. Dessa forma, o propranolol

foi capaz de reverter uma resposta ao contexto (resposta condicionada) mas não à droga (sensibilização) e, assim, os autores argumentam que há uma distinção entre um componente associativo e outro não associativo daquela memória de recompensa. Esse resultado é bastante interessante para se pensar que existem componentes dissociáveis envolvidos na dependência, porém, os experimentos carecem de evidências mais robustas para afirmar que a sensibilização é resultado de plasticidade não associativa, já que a sensibilização foi testada no mesmo contexto ao da aquisição. Pensando nisso, este trabalho em conjunto ao de Théberge *et al* (2010, explicado adiante) foram importantes para o estabelecimento da hipótese no presente trabalho.

Um grupo norte americano, orientado pelo professor Bruce Hope, vem trabalhando com populações neuronais específicas envolvidas com comportamentos aditivos. Em um trabalho de 2008 (Mattson *et al.*, 2008) eles induziram a sensibilização à cocaína e, após sua expressão (no desafio), os animais foram sacrificados para verificar dupla marcação de c-fos e FosB. Essa dupla marcação indica que neurônios que foram ativados pelas repetidas administrações de cocaína (2% do NAc, indicado por FosB) foram também ativados no teste de sensibilização (87% daqueles, indicado por c-fos). No ano seguinte eles demonstraram, elegantemente, que inativando especificamente essas células 90 min após um desafio possível reverter a sensibilização em um teste posterior (Koya *et al.*, 2009). Esse resultado foi visto somente quando o desafio foi realizado no contexto de aquisição e não em um novo contexto, uma vez que naquele trabalho eles viram que a sensibilização foi dependente de contexto. A ideia de inativar uma subpopulação de neurônios recrutados durante a aquisição de determinado comportamento (nesse caso sensibilização), após uma sessão de reativação (desafio), e, assim, acabar com a expressão comportamental subsequente parece muito semelhante aos trabalhos clássicos de reconsolidação da memória, embora os autores acima citados não discutam claramente a reversão (ou não reversão) da sensibilização como um caso de reconsolidação. Além disso, a maioria dos trabalhos que estudam esse tipo de plasticidade mostram um componente associativo (EC-EI) para sua expressão, o que suporta assumir que a sensibilização locomotora é um tipo de memória de recompensa.

Por fim, um último artigo que envolve reconsolidação parece ser importante para suportar a hipótese do presente trabalho. Théberge *et al* (2010) mostraram, em um modelo de autoadministração com cocaína e posterior condicionamento de segunda ordem, que o centro do NAc e a Amígdala basolateral armazenam aspectos dissociáveis da memória em questão. Os autores discutem que enquanto essa subdivisão da Amígdala foi importante apenas na associação EC-EI, o cNAc foi importante também no condicionamento de segunda ordem, e, então, sugerem que essa última estrutura está mais envolvida com a motivação pela droga - por isso é importante para

estabelecer um condicionamento de segunda ordem -, do que com a simples associação do EC-EI (Théberge *et al.*, 2010).

Os trabalhos acima discutidos mostram que a memória de recompensa estudada no modelo de CPL claramente sofre reconsolidação e que o armazenamento das informações envolve estruturas responsáveis por memórias associativas, como o HPCd, assim como estruturas do sistema de recompensa, como o NAc. A sensibilização locomotora foi menos investigada e está menos clara a ocorrência de processos similares à reconsolidação. Claramente, o sistema de recompensa está envolvido no armazenamento da sensibilização, o NAc para sua expressão, embora mudanças plásticas tenham sido demonstradas em estruturas importantes em memórias associativas, como o HPCd, provavelmente pela sensibilização apresentar componente associativo (dependência de contexto) para sua expressão.

Dessa forma, é razoável pensar que existem subpopulações neuronais no HPCd e no NAc subjacentes à memória de recompensa de preferência por local e na sensibilização locomotora. Não se sabe se essas subpopulações são compartilhadas por esses dois parâmetros envolvidos na dependência. De qualquer forma, acreditamos que inibindo a reconsolidação a nível sistêmico, o que inclui ambas as estruturas, é possível inibir ambos componentes mnemônicos. Porém, é possível que essas estruturas armazenem diferentes aspectos da recompensa nos parâmetros acima citados, e que a inibição apenas do HPCd não seja suficiente para suprimir também a sensibilização, visto que alguns trabalhos reportam expressão independente de contexto (Kalivas & Duffy, 1987; Heidbreder *et al.*, 1996; Vekovischeva *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2015), o que poderia indicar que o NAc tem papel central na plasticidade da sensibilização.

Neste trabalho investigamos a inibição da reconsolidação (local e sistêmica) no Condicionamento de Preferência por Local como forma de atenuar (a) a preferência induzida pela morfina e (b) a sensibilização locomotora. Pretendemos estudar o papel do Hipocampo dorsal e do centro do Núcleo *Accumbens* nestes processos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito na inibição da reconsolidação por via sistêmica ou local (diretamente no Hipocampo dorsal ou no centro do Núcleo *Accumbens*) sobre a preferência por local e sobre a sensibilização locomotora induzidas por administração de morfina, procurando compreender, através de nosso desenho experimental, o papel dessas estruturas na mediação diferencial desses dois parâmetros.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1. Padronizar os contextos na tarefa de Condicionamento de Preferência por Local para obter uma configuração sem preferência prévia (*unbiased*), em que possamos induzir preferência *apenas* mediante a associação droga com o lugar.

2.2.2. Investigar os efeitos da injeção sistêmica de cicloheximida (CHX) após uma sessão de reativação da memória, com 15 minutos de duração, sobre a preferência por local induzida por morfina.

2.2.3. Investigar os efeitos da injeção sistêmica de CHX após uma sessão de reativação da memória por 10 minutos sobre a preferência por local e a sensibilização locomotora induzidas por morfina.

2.2.4. Investigar os efeitos das administrações de morfina e da CHX nos níveis de GluA1 fosforilado (serina 845), GluA1 total e GluA2 total no Hipocampo dorsal e no centro do Núcleo *Accumbens* 15 min e 48 h após o desafio.

2.2.5. Investigar os efeitos da infusão de CHX no Hipocampo dorsal após uma sessão de reativação da memória por 10 minutos sobre a preferência por local e a sensibilização locomotora induzidas por morfina.

2.2.6. Investigar os efeitos da infusão de CHX no centro do Núcleo *Accumbens* após uma sessão de reativação da memória por 10 minutos sobre a preferência por local e a sensibilização locomotora induzidas por morfina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Eram utilizados ratos *Wistar* machos adultos (60 a 90 dias), pesando entre 290 g e 380 g, fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). De uma semana antes do início dos experimentos até o término dos mesmos, os animais eram mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação (LPBNC, Departamento de Biofísica, UFRGS). Os animais foram mantidos em condições padrão de biotério, com temperatura e umidade controladas ($22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade de 55 %), as trocas de caixa moradia eram feitas de 3 em 3 dias e o ciclo de iluminação foi de 12 h claro / 12 h escuro (ciclo claro das 7 h às 19 h).

3.2 Cirurgia estereotáxica, infusão do fármaco e verificação da posição das cânulas

Os ratos eram anestesiados com injeção i.p. de Cetamina (70 mg/Kg - marca: Syntec®, Indústria Brasileira) e Xilazina (6 mg/Kg - marca: Syntec®, Indústria Brasileira) para implantação bilateral de cânulas (22 G) 1 mm acima das estruturas alvo: Hipocampo dorsal (coordenadas: AP = - 4,0 mm, LL = \pm 3,0 mm e DV = - 1,6 mm) e centro do Núcleo *Accumbens* (coordenadas: AP = + 1,3 mm, LL = \pm 1,8 mm e DV = - 5,3 mm). Essas coordenadas foram guiadas pelo Atlas de Paxinos e Watson (1998) e padronizadas no nosso laboratório.

Trinta minutos antes da cirurgia, 24 e 48 h após a mesma, infundiu-se s.c. o antibiótico Tilosina (10 mg/kg - marca: Ceva, Indústria Brasileira) e o anti-inflamatório Meloxicam (2 mg/kg - marca: Ourofino®, Indústria Brasileira). Os experimentos iniciavam-se de 6 a 7 dias após o procedimento cirúrgico.

Para infusão i.c de fármacos os animais eram gentilmente imobilizados com um pano e, posteriormente, uma agulha *mizzy* era introduzida através da cânula, penetrando o parênquima 1 mm além desta, até a estrutura de interesse. Um volume de 0,5 μl era lentamente infundido com auxílio de bomba de microinfusão que propulsionava controladamente uma microsseringa Hamilton contendo a droga (cicloheximida, CHX, ou seu veículo dimetilsulfóxido, DMSO) ao longo de 90 s, adicionado a 30 s antes da *mizzy* ser removida para que o volume se difundisse.

Após concluído o experimento, os ratos eram anestesiados com lidocaína (10 mg/kg) e tiopental (20 mg/kg), ambos i.p., para então sofrerem eutanásia por guilhotinamento. Os encéfalos dos animais utilizados nos experimentos eram dissecados e fixados em paraformaldeído 10 % para posterior seccionamento no vibrátomo e exame mesoscópico (mediante lupa binocular) para verificar a posição das cânulas. Apenas os animais que tiveram as cânulas bem posicionadas foram incluídos nas análises estatísticas.

3.3 Fármacos

Morfina: é alcaloide retirado da planta *Papaver somniferum* e agonista dos receptores μ -opioides. A administração da morfina ativa a via mesolímbica de recompensa, aumentando a frequência de disparos dos neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral e a liberação de dopamina no núcleo *accumbens*. Sua administração crônica causa neuroadaptações nessa via, dependência e sensibilização comportamental (Lu *et al.*, 2002; Taubensfeld *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011). A dose de escolha utilizada foi de 5 mg/kg (Valjent *et al.*, 2006; Robinson & Franklin, 2007; Sadeghi *et al.*, 2016) por ser capaz de induzir preferência por local e sensibilização comportamental em experimentos prévios no nosso laboratório. A morfina (marca: Dimorf®, Indústria Brasileira) foi diluída em solução salina 0,9 % (sal), administrada nos animais controle, ambas por via s.c.

Cicloheximida (CHX): é um inibidor de síntese proteica em organismos eucariotos, produzido pela bactéria *Streptomyces griseus*. A dose utilizada neste trabalho foi de 3 mg/ml/kg nas injeções intraperitoneais (i.p.); já nas infusões intracerebrais (i.c) foi utilizada a concentração de 20 μ g/ μ l/lado. A CHX (marca: Sigma®, Indústria Norte-americana) foi dissolvida em DMSO (marca: Merck®, Indústria Alemã) 1% em solução salina para administração sistêmica, ou em 0,8% em tampão fosfato salino, para administração i.c., sendo estes utilizados como *veículo* nos animais controle.

3.4 Condicionamento de Preferência por Local (CPL)

O Condicionamento de Preferência por Local (CPL) foi realizado em uma caixa de madeira, com paredes decoradas com padrões visuais removíveis / substituíveis. A caixa (fig. 3) é composta por três compartimentos, dois de condicionamento (A e B) e um, intermediário, de partida/passagem (C). A e B tinham as mesmas dimensões (24 x 40 x 50 cm), e C era menor, com dimensões 10 x 40 x

50 cm. Para esse estudo, o compartimento C tinha as paredes brancas e o chão era revestido por um piso liso. O compartimento A tinha o mesmo chão com as paredes brancas revestidas por listras pretas (4 cm de largura) e o compartimento B tinha as paredes brancas revestidas por círculos pretos (4 cm de diâmetro) e o chão de vidro com textura (padrão ártico). Os três compartimentos se comunicam por portas removíveis (10 x 14 cm). A iluminação era indireta e tênue (luzes apontadas para cima, 20 w de cada lado) e durante os experimentos era usado um barulho constante de fundo.

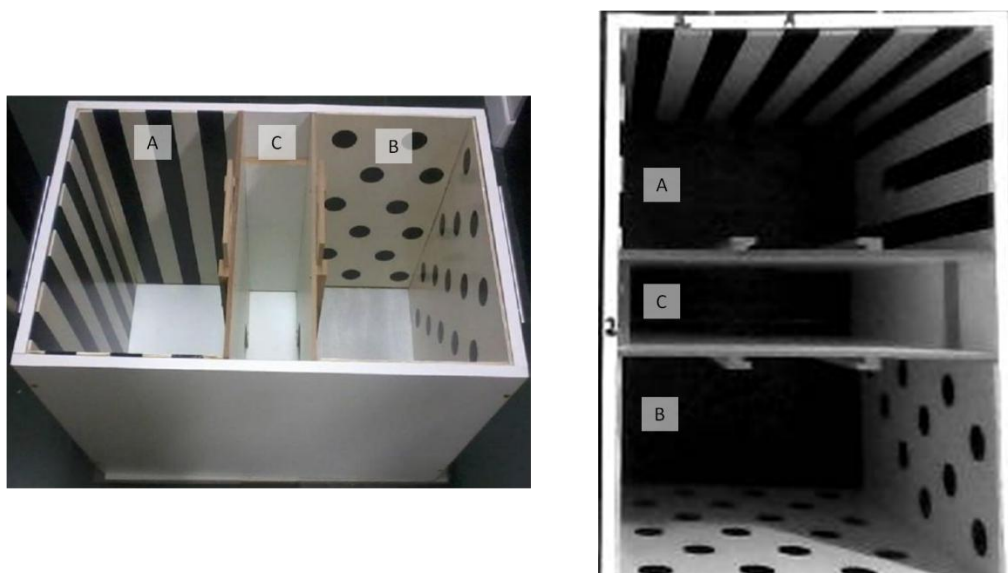


Figura 3. Aparato do Condicionamento de Preferência por Local. À esquerda, foto sem o fundo específico; à direita, imagem do vídeo durante o experimento, com fundo e iluminação utilizados.

Todos os experimentos foram realizados no ciclo claro, começando 1 h após seu início e terminando no máximo 1 h antes da fase escura. As sessões de pré-condicionamento, reativação, teste e sensibilização foram realizadas sempre no turno da manhã, já o condicionamento propriamente dito era realizado de manhã, entre 8 h e 12 h, e de tarde, entre 14 h e 18 h. Cada animal era condicionado sempre no mesmo horário, de manhã e de tarde, com um intervalo de 6 h entre as duas sessões diárias.

3.4.1 Padronização do aparato sem preferência prévia (*unbiased*)

Na tarefa de CPL existem dois tipos de configuração, com preferência prévia (*biased*) e sem preferência prévia (*unbiased*). Na primeira, os animais naturalmente preferem um dos compartimentos, sendo a droga pareada com o contexto de menor preferência; já na segunda, a

configuração é ajustada para que os animais não tenham preferência natural por nenhum lado, podendo a droga ser pareada aleatoriamente com qualquer dos dois contextos.

O objetivo desse experimento (experimento 1) foi validar uma configuração do aparato de CPL na qual os animais não tivessem preferência por nenhum dos contextos, testando 3 assoalhos diferentes a serem pareados com compartimentos com paredes decoradas com padrões visuais diferentes: o compartimento A, paredes listradas, e o compartimento B, parede com círculos. Para isso, foram avaliados três assoalhos distintos quanto à textura e sensação térmica: *fundo de vidro* com textura grossa - padrão ártico -, *fundo liso* de linóleo, e *fundo emborrachado* e levemente poroso. O ponto de largada era o compartimento C, abrindo as duas portas que permitiam aos animais alternar livremente entre os 2 compartimentos de condicionamento (utilizando o compartimento C como passagem), sendo registrado o tempo de permanência em cada um deles, para depois calcular o *índice de preferência*, dividindo-se o tempo (s) de permanência em um dos compartimentos (A ou B) pela soma do tempo nos compartimentos A e B, tal como indicado abaixo:

$$\text{Índice de preferência} = \text{tempo A (ou B)} / \text{tempo A} + \text{tempo B}$$

Para cada combinação de contextos era calculada a média do índice e avaliado se havia ou não diferença significativa entre os contextos A e B.

A escolha final dos contextos levava em conta não só (I) a combinação de contextos que não apresentou diferença significativa entre os índices A e B, mas também (II) aquela que resultou em índices mais próximos de 0,5 e (III) que tinha menos animais com índices (a) iguais ou maiores que 0,7 ou (b) iguais ou menores que 0,3.

3.4.2 Protocolo de Condicionamento de Preferência por Local

O protocolo de CPL foi adaptado de Théberge *et al* (2010). A fig. 4 mostra o desenho experimental utilizado em todos os experimentos, que será explicado em detalhe, logo abaixo.

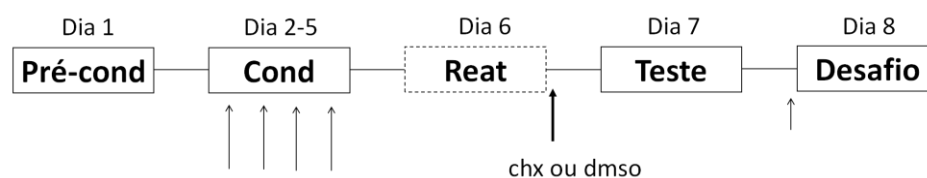


Figura 4. Protocolo genérico dos experimentos.

Pré-condicionamento: os ratos eram colocados individualmente no compartimento C com as aberturas livres para a exploração de toda a caixa. Durante 15 ou 10 minutos era registrado o tempo de permanência nos compartimentos e era calculado o índice de preferência.

Nos animais que recebiam apenas salina nas sessões de condicionamento, o contexto de referência para o cálculo do índice era aquele em que o animal estava no turno do condicionamento morfina.

O pré-condicionamento, assim como a reativação, o teste e o desafio eram realizados sempre no período da manhã. As sessões de reativação e teste eram idênticas ao pré-condicionamento em cada experimento.

Condicionamentos: cada rato passou por 4 dias de condicionamento, havendo 2 sessões por dia, uma com morfina e outra com salina (no grupo condicionado com morfina), cada qual com duração de 25 min. Os animais receberam injeção s.c. de morfina 15 min antes de serem confinados a um dos compartimentos de condicionamento (A ou B). Os contextos associados com a droga ou de referência para o índice nos grupos controle foram randomizados. O turno de administração de cada droga era alternado ao longo dos dias (como mostra a tabela 1) a fim de não favorecer nenhuma associação da droga administrada com o horário do dia; as duas sessões diárias eram separadas por 6 h.

Tabela 1. Condicionamentos com turnos alternados

	Cond 1	Cond 2	Cond 3	Cond 4
Manhã	salina	morfina	salina	Morfina
Tarde	morfina	salina	morfina	Salina

Reativação: o objetivo era confirmar o efeito do condicionamento e reativar a memória, deixando o traço novamente lábil e suscetível a interferências farmacológicas e/ou comportamentais. Por isso, dentre os protocolos de reativação encontrados na literatura (que serão abordados na discussão), optamos pela *reativação do tipo teste*, em que os animais ficavam livres

para explorar todo o aparato, sem administração da droga. Assim, seria possível (a) testar o efeito do condicionamento e (b) reativar a memória ao mesmo tempo.

Imediatamente após 15 min (experimento 2, tempo que pareceu não ser adequado para o estudo da reconsolidação) ou 10 min de sessão (experimentos 3, 4 e 5, tempo que induziu reconsolidação), os animais recebiam a infusão de CHX ou de seu veículo (DMSO), pelas vias i.p. (experimento 3), a fim de investigar o efeito sistêmico da inibição de síntese proteica, ou i.c. (experimentos 4 e 5), para investigar o papel do HPCd e do centro do NAc na reconsolidação do CPL e sensibilização locomotora.

Teste: a sessão durava 15 (experimento 2) ou 10 min (experimentos 3, 4 e 5) e visava verificar a possível influência do tratamento pós-reativação sobre a preferência por local.

3.5. Desafio ou Teste de Sensibilização

Todos os animais que passaram pelas etapas do CPL acima, seja aqueles previamente infundidos com morfina, seja com veículo, eram, então, injetados – 24h após o teste – com 2,5 mg/kg de morfina i.p. 15 min antes de nova reexposição, com duração de 25 min, ao compartimento pareado com droga nas sessões de condicionamento. A locomoção era registrada por uma câmera de vídeo (*webcam*) e os vídeos, posteriormente, analisados com programa *ANY-maze* (Stoelting, versão 4.99), e os dados expressos como distância percorrida em metros.

3.6. *Western blotting*

No experimento 3, metade dos animais de cada grupo era sacrificado aos 15 min e a outra metade, 48 h após o desafio. Os encéfalos eram rapidamente dissecados, manualmente, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em *ultrafreezer* a -80°C. Para separação das estruturas, os encéfalos eram cortados coronalmente na coordenada anteroposterior adequada (onde o NAc começa), então era feita uma fatia de 1,5 mm e os Núcleos *Accumbens* total (porção central e periférica) eram extraídos. Depois, no restante do encéfalo, os Hipocampos dorsais eram dissecados manualmente.

As estruturas eram armazenadas separadamente em microtubos plásticos onde se adicionava 100 µl (para NAc) ou 200 µl (para HPC) de SDS 0,1% (dodecil sulfato de sódio), além de inibidores de fosfatases (PMSF e TLCK) e um coquetel de proteases.

As amostras eram homogeneizadas mecanicamente e, então, centrifugadas em temperatura ambiente a 15.000 g por 20 min. O sobrenadante era transferido para outro microtubo e a concentração de proteínas verificada no espectrofotômetro *Nano Vue GE Healthcare Life Sciences*, calculando-se a média de triplicatas dos valores obtidos. Então, as amostras eram diluídas com SDS 0,1% até uma concentração de 4 µg/µl e depois usadas 4 partes da amostra para uma parte de tampão de análise de amostras (*sample buffer 5x, contendo* beta mercapto, glicerol e azul de bromofenol). Os microtubos eram mantidos a -80°C para posterior análise mediante eletroforese.

Para aplicação no gel, as amostras eram descongeladas a 4°C e incubadas durante 10 min a 95°C, para aplicação de 40 µg por poço (20 µl). Para a separação das proteínas no gel de poliacrilamida (1 mm a 12%) era aplicada uma diferença de potencial de 200 V durante 1,5 h. O gel era, então, transferido para uma membrana de nitrocelulose empregando-se uma tensão de 100 V durante 2 h.

Para confirmar se a transferência fora bem-sucedida, aplicava-se o corante vermelho ácido de *Ponceau*, e a seguir as membranas eram incubadas com tampão de bloqueio contendo leite desnatado 5% (diluídos em TBS-T - Tampão Tris, salina e *Tween 20*) por 30 min.

As membranas eram incubadas com os anticorpos primários monoclonais GAPDH (Sigma, produzido em coelho, concentração 1:500), GluA1 (Santa Cruz, produzido em camundongo, concentração 1:200), GluA1p (Santa Cruz, produzido em cabra, concentração 1:200) ou GluA2 (Santa Cruz, produzido em cabra, concentração 1:200) por 3 h em temperatura ambiente e leve agitação constante. Os anticorpos (primários e secundários) eram diluídos em solução de bloqueio contendo TBS-T e albumina a 1%. Depois da incubação eram feitas 3 lavagens com TBS-T durante 10 min sob agitação constante. A incubação com os anticorpos secundários (contra o animal em que o primário foi produzido) era feita por 1 h em temperatura ambiente seguida de mais três lavagens com TBS-T durante 10 min sob agitação constante. Os anticorpos secundários para GluA1, GluA1p e GluA2 eram biotinizados (Sigma, concentração 1:20.000), então seguia-se a incubação com estreptavidina marcada com peroxidase (Sigma, concentração 1:1000) por 1 h em temperatura ambiente e mais três lavagens de 10 min com TBS-T e agitação constante (o anticorpo secundário para GAPDH era marcado com peroxidase).

Para revelação utilizava-se luminol, fazendo-se o registro da quimiluminescência no fotodocumentador *GE Healthcare Life Sciences* por meio do *software Imagej*. Para normalização das

bandas utilizava-se a proteína GAPDH e os dados foram expressos em unidades arbitrárias (proteína de interesse/GAPDH).

3.7. Experimentos

No experimento 1, montamos a configuração dos contextos para que os animais não tivessem preferência prévia (unbiased) no CPL.

Foram testadas 4 configurações diferentes de contextos A e B, com diferentes tipos de assoalhos em relação à decoração das paredes dos compartimentos de condicionamento. As paredes do A sempre foram formadas por listras pretas verticais e as do contexto B, por círculos pretos. Para testar a preferência prévia, os animais exploraram a caixa durante 10 minutos e o índice de preferência era calculado.

Abaixo seguem as 4 configurações testadas:

Configuração 1: Contexto A1: paredes com listras e fundo escuro emborrachado.
Contexto B1: paredes com círculos e fundo de vidro.

Configuração 2: Contexto A2: parede com listras e fundo de vidro.
Contexto B2: parede com círculos e fundo escuro emborrachado.

Configuração 3: Contexto A3: parede com listras e fundo de vidro.
Contexto B3: parede com círculos e fundo liso.

Configuração 4: Contexto A4: parede com listras e fundo liso.
Contexto B4: parede com círculos e fundo de vidro.

No experimento 2, investigamos se um inibidor de síntese proteica (CHX) injetado sistemicamente logo após uma sessão de reativação de 15 min era capaz de prejudicar a preferência por local.

No experimento 3, investigamos se após uma reativação de 10 minutos a administração sistêmica de CHX era capaz de prejudicar a preferência por local e a sensibilização locomotora. Além disso, o Hipocampo dorsal e o Núcleo *Accumbens* total eram dissecados para análise de GluA1 total, GluA1 fosforilado (GluA1p, S845) e GluA2 total por *western blot*.

No experimento 4, investigamos o papel do Hipocampo dorsal e, no experimento 5, o do centro do Núcleo *Accumbens* na reconsolidação da preferência por local e da sensibilização locomotora.

A tabela 2 sintetiza todos os experimentos realizados.

Tabela 2. Descrição dos experimentos

Experimento	Grupos	Tempo de reativação	Dose/concentração de CHX	Cirurgia	Dissecação das estruturas	
1	configuração 1	-	-	-	-	-
	configuração 2					
	configuração 3					
	configuração 4					
2	sal	15 min	-	-	-	-
	morf					
3	sal-DMSO	10 min	3 mg/kg	-	15 min	cNAc
						HPCd
	48 h				cNAc	
					HPCd	
	15 min				cNAc	
					HPCd	
	48 h				cNAc	
					HPCd	
	15 min				cNAc	
					HPCd	
	48 h				cNAc	
					HPCd	
15 min	cNAc					
	HPCd					
48 h	cNAc					
	HPCd					
4	sal-DMSO	10 min	20 µg/µl/lado	cNAc	-	-
	sal-CHX					
	morf-DMSO					
	morf-CHX					
5	sal-DMSO	10 min	20 µg/µl/lado	HPCd	-	-
	sal-CHX					
	morf-DMSO					
	morf-CHX					

3.8. Análise estatística

Uma vez que todos os dados apresentaram homocedasticidade (Teste de Levene, $P > 0,05$) e estavam distribuídos normalmente (Teste de Kolmogorov-Smirnov, $P > 0,05$), os mesmos foram analisados com testes paramétricos. Em todas as análises o nível de significância foi de $P < 0,05$.

No experimento 1, os dados de cada configuração de compartimentos foram comparados com emprego do índice de preferência pelo compartimento A ou pelo B. Esses resultados foram analisados com o teste t pareado.

Os resultados de preferência por local foram analisados com o teste paramétrico de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, utilizando as variáveis tempo (preferência ao longo das sessões) e condicionamento (droga utilizada nos condicionamentos - salina ou morfina), e os resultados ordenados com o teste *post hoc* de Newman-Keuls (SNK), para identificar diferença estatística entre os grupos ou entre as sessões sempre que presentes. Os dados eram expressos como índice de preferência por local mais erro padrão da média.

Para análise dos resultados de locomoção no desafio, utilizou-se a ANOVA de duas vias para medidas independentes seguido de *post hoc* SNK quando necessário. Os dados eram expressos como distância percorrida em metros mais erro padrão da média.

Os dados deste trabalho foram analisados com o programa STATISTICA 7.0 (StatSoft) e os gráficos, produzidos empregando o programa Excel 2007 (Microsoft Office).

3.9. Considerações Bioéticas

Os experimentos foram realizados de acordo com os preceitos da diretriz legal brasileira sobre uso de animais de experimentação (Lei Nº 11.794/2008), além das Resoluções Normativas Nº 12 (Cuidados) e 13 (Eutanásia) do CONCEA (2013), envolvendo o amplo bem-estar geral dos animais, com o mínimo de desconforto ou sofrimento na maioria dos procedimentos. Cumpre, adicionalmente, as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) e da *International Brain Research Organization* (IBRO). Deste modo, o projeto que cobre este trabalho foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS) antes de iniciar-se, estando registrado como projeto Nº 27.665, intitulado "*Inibição do processo de reconsolidação de uma memória relacionada com a morfina na tarefa de condicionamento de preferência por lugar*".

4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1: Padronização dos contextos

No experimento 1 foram testadas 4 configurações diferentes de contextos A e B, com diferentes tipos de assoalhos em relação à decoração das paredes dos compartimentos de condicionamento, como indicado na sessão 3.7. As paredes do A sempre foram formadas por listras pretas verticais e as do contexto B, por círculos pretos.

O objetivo do experimento foi montar a configuração sem preferência prévia (*unbiased*). Para isso os animais exploraram a caixa durante 10 minutos e o índice de preferência era calculado.

A fig. 5 (a, b, c e d) indica a média de preferência para o contexto A e para o contexto B em cada configuração (A1/B1, A2/B2, A3/B3 e A4/B4). Na configuração 1 (fig. 5a), o teste t pareado demonstrou que os animais apresentaram índice de preferência ao B significativamente maior em relação ao A ($P < 0,05$, $N=8$), o que indica uma clara preferência ao contexto B ou aversão ao A. 75% dos animais apresentaram índices $\geq 0,7$ ou $\leq 0,3$.

Na configuração 2 (fig. 5b), o teste t pareado demonstrou que não houve diferença significativa no índice de preferência de cada compartimento ($P > 0,05$, $N=8$), o que indica a não preferência ou aversão pelos contextos. 37,5% dos animais apresentou índices $\geq 0,7$ ou $\leq 0,3$.

Na configuração 3 (fig. 5c), o teste t pareado indicou que os animais apresentaram índice de preferência do compartimento A significativamente maior do que o B ($P < 0,05$, $n=7$), indicando preferência pelo A ou aversão ao B. 42,86% dos animais apresentou índices $\geq 0,7$ ou $\leq 0,3$.

Na configuração 4 (fig. 5d), o teste t pareado também demonstrou que não houve diferença significativa nos índices de preferência ($P > 0,05$, $n=8$), o que indica a não preferência ou aversão pelos contextos A e B. Além disso, apenas 25% dos animais apresentaram índices $\geq 0,7$ ou $\leq 0,3$.

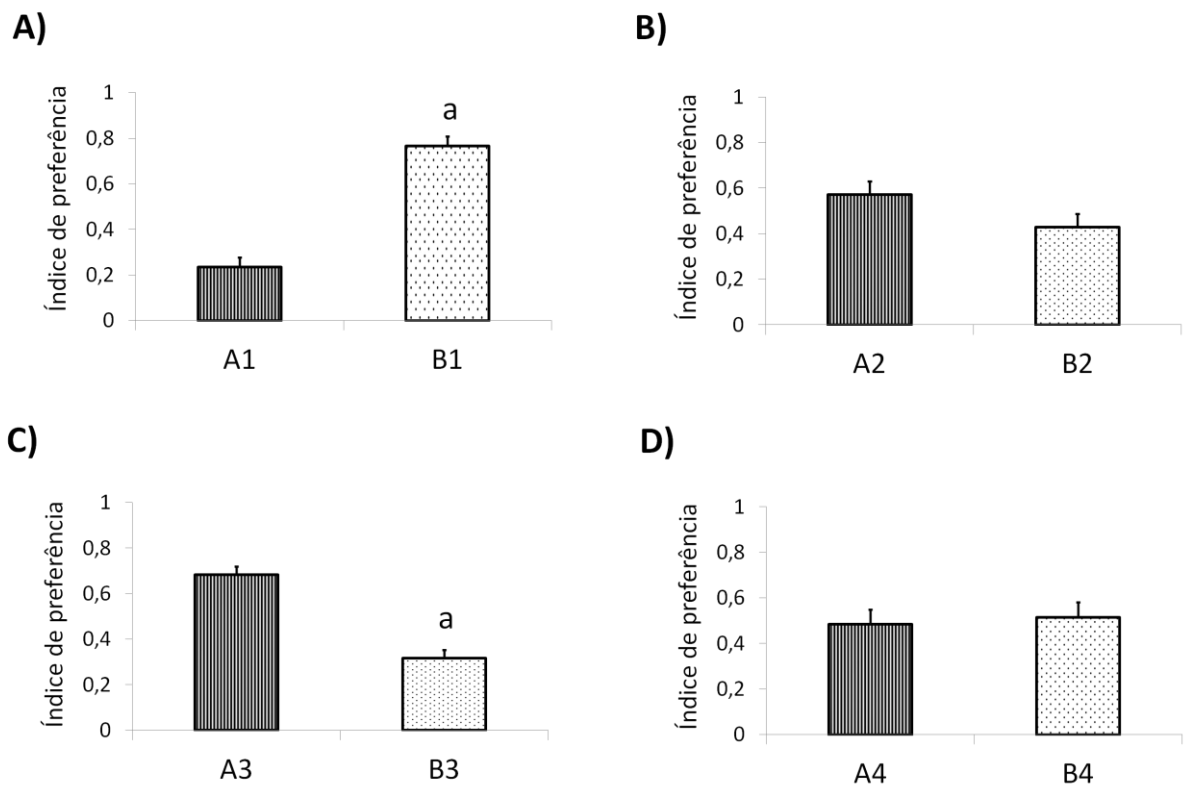


Figura 5: Preferência pelos contextos A e B nas configurações 1 (5a), 2 (5b), 3 (5c) e 4 (5d). Os dados estão expressos como média + erro padrão. a: significativamente diferente do outro compartimento (Teste t pareado, $p < 0,05$, $N = 7-8$).

A combinação dos contextos que melhor atendeu aos critérios estabelecidos na sessão material e métodos foi a 4, portanto, os experimentos que seguem foram realizados nessas condições.

4.2. Experimento 2: A reativação da memória por 15 min parece ser longa demais para o estudo de reconsolidação da memória no CPL

A preferência natural dos animais foi verificada no pré-condicionamento e 24 h depois foram iniciados os condicionamentos, como consta na parte superior da fig. 6. A sessão de reativação (24 h depois do último condicionamento) durou 15 min e teve função de testar o efeito do condicionamento e reativar a memória. Imediatamente após a reativação um inibidor de síntese proteica foi administrado i.p. e a sessão de teste (24 h depois) verificou o efeito do tratamento pós reativação sobre a preferência.

A fig. 6 (parte inferior) mostra o índice de preferência para cada grupo nas sessões de pré-condicionamento, reativação e teste. A ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito de tempo ($F_{(2, 20)} = 9,309, P=0,001$) e interação entre tempo x condicionamento ($F_{(2, 20)} = 5,406, P=0,013$). A diferença entre as sessões foi analisada com o pós-teste SNK, que mostrou que o grupo condicionado com salina não muda sua preferência ao longo das sessões (reativação $P=0,350$ e teste $P=0,547$ em relação ao pré-condicionamento). Já o grupo condicionado com morfina apresenta aumento da preferência pelo compartimento pareado com a droga após o condicionamento (sessão de reativação comparada com o pré-condicionamento, $P=0,000$), porém existe uma tendência em esse aumento de preferência diminuir na sessão de teste ($P=0,075$ em relação à sessão de reativação).

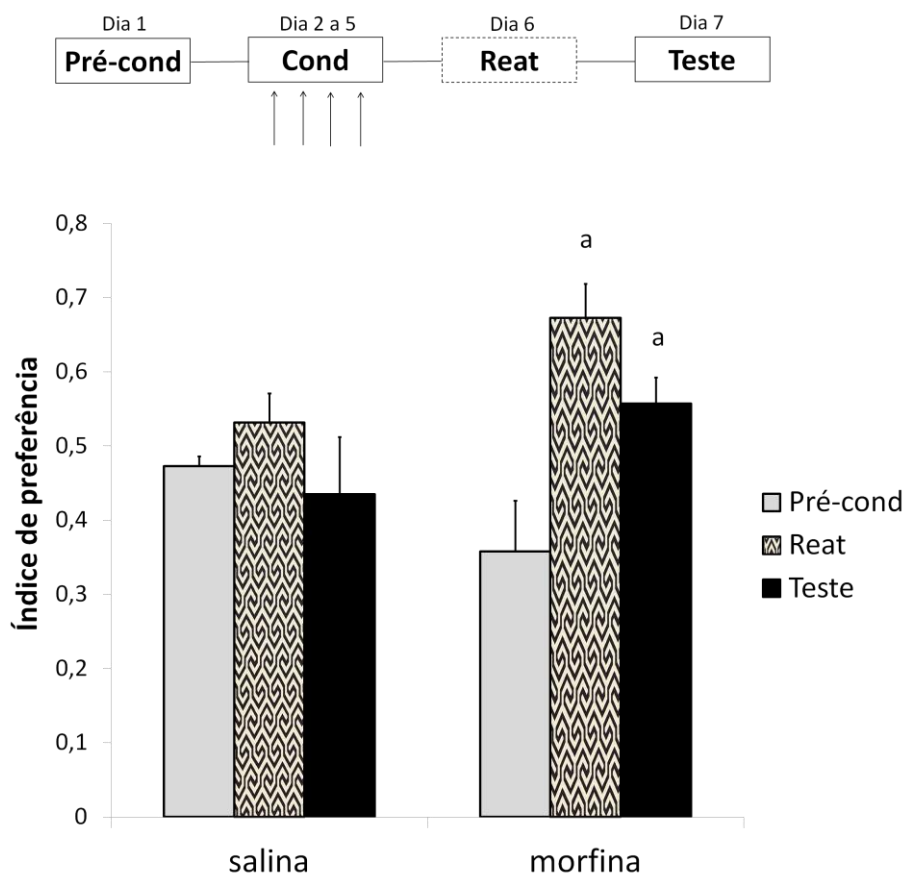


Figura 6. Experimento 2: Preferência por local. Após os condicionamentos, o grupo morfina aumentou o índice de preferência pelo o compartimento pareado com a droga, mas essa preferência tendeu a diminuir no teste. Os dados são expressos como média + erro padrão. a: Significativamente diferente das demais sessões do grupo (ANOVA de medidas repetidas seguido de *post hoc* SNK, $P < 0,05$, $N = 6$).

Esse experimento demonstra que (I) a dose de 5 mg/kg de morfina adotada é capaz de gerar preferência pelo compartimento pareado com a droga e indica que (II) a sessão com 15 minutos de reativação parece ser suficiente para diminuir a preferência no teste (embora não tenha sido visto diferença estatística), o que pode ser interpretado como uma sessão longa que induz uma leve extinção da memória de preferência.

Como neste trabalho o objetivo é estudar a reconsolidação da memória, decidimos diminuir a sessão de reativação para 10 minutos e testar se um inibidor de síntese proteica prejudica a preferência por local.

No experimento 2 todas as sessões que avaliaram a preferência foram de 15 min, para que o índice fosse calculado a partir do mesmo tempo de observação utilizado nas sessões e, assim, o fator tempo de observação pudesse ser excluído da análise. Como a reativação, nos experimentos seguintes será de apenas 10 minutos, aqui procuramos comparar o índice de preferência de 15

minutos com aquele calculado nos 10 primeiros minutos de cada sessão para cada grupo deste experimento, como mostra a fig. 7. A ANOVA de duas vias demonstrou que não há efeito do tempo (15 ou 10 min) para o índice de preferência dentro das sessões de pré-condicionamento ($F_{(2, 20)}= 0,0026$, $P=0,960$), reativação ($F_{(2, 20)}= 0,0024$, $P=0,961$) e teste ($F_{(2, 20)}= 0,2847$, $P=0,599$) ou interação condicionamento x tempo analisado (Pré-cond: $F_{(2, 20)}= 0,0475$, $P=0,829$; Reat: $F_{(2, 20)}= 0,1706$, $P=0,683$; Teste: $F_{(2, 20)}=0,0078$, $P=0,930$).

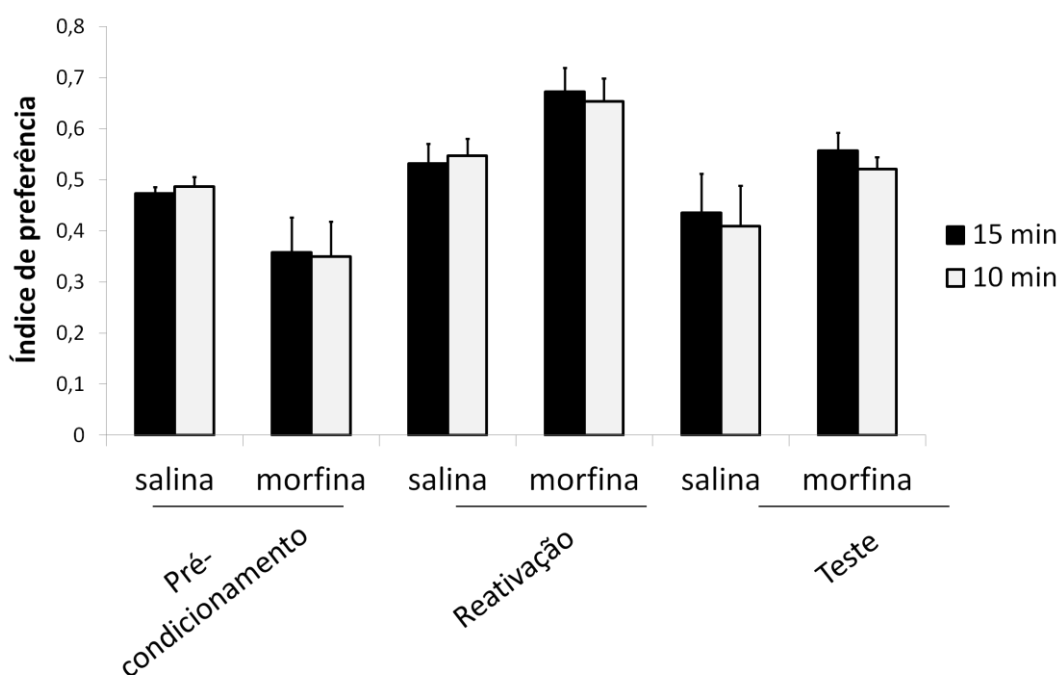


Figura 7. Experimento 2: Comparação entre o índice de preferência calculado para 15 min e para os 10 primeiros minutos. Os dados estão expressos como média + erro padrão. Em cada etapa / tratamento, não há diferença significativa do índice de preferência 15 min quando comparado com o de 10 min (ANOVA de duas vias seguida de *post hoc* SNK, $P>0,05$, $N=6$).

Como não houve diferença entre avaliar-se a preferência por 15 ou 10 minutos, nos próximos experimentos foi utilizado apenas 10 minutos tanto no pré-condicionamento quanto no teste e, assim, os resultados poderão ser discutidos todos conjuntamente.

4.3. Experimento 3: A injeção sistêmica de CHX após a reativação por 10 min é capaz de inibir a preferência pelo compartimento associado à morfina e também a sensibilização locomotora.

O experimento 3 foi subdividido em 3A (CPL), 3B (sensibilização locomotora) e 3C (quantificação de subunidades de AMPA por *western blot*). No experimento, a sessão de reativação diminuiu para 10 min e foi testado o efeito da administração da CHX i.p. imediatamente após a reativação sobre a preferência por local (experimento 3A) e sobre a sensibilização locomotora (experimento 3B). As sessões de pré-condicionamento e teste também foram de 10 min, como nos demais experimentos. Após 15 min ou 48 h do desafio, os encéfalos foram dissecados para análise por *western blotting* de GluA1 total, GluA1 fosforilado (S845) e GluA2 total no HPCd e no NAc (experimento 3C).

Experimento 3A: A injeção sistêmica de CHX após a reativação da memória por 10 min é capaz de inibir a preferência pelo compartimento morfina.

Os condicionamentos foram realizados durante 4 dias, iniciando-se 24 h após o pré-condicionamento, onde se confirmava que os animais não tinham preferência prévia. No 6º dia, realizava-se a sessão de reativação (24 h depois do último condicionamento) visando testar a retenção do condicionamento e reativar a memória. A sessão de teste, no 7º dia, verificou se houve algum efeito do tratamento pós-reativação sobre a preferência.

A fig. 8 mostra o índice de preferência para cada grupo nas sessões de pré-condicionamento, reativação e teste. A ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito significativo de tempo ($F_{(2, 92)} = 16,292, P=0,000$), condicionamento ($F_{(1, 46)} = 18,652, P=0,000$) e interação tempo x condicionamento ($F_{(2, 92)} = 3,766, P=0,022$). Não houve efeito significativo do tratamento pós-reativação ($F_{(1, 46)} = 0,571, P=0,454$), interação tempo x tratamento ($F_{(2, 92)} = 0,380, P=0,685$) e interação tempo x condicionamento x tratamento ($F_{(2, 92)} = 1,231, P=0,297$). O teste *post hoc* SNK demonstrou que os grupos controles sal-DMSO (reativação $P=0,745$ e teste $P=0,906$ em relação ao pré-condicionamento) e sal-CHX (reativação $P=0,633$ e teste $P=0,803$ em relação ao pré-condicionamento) não apresentaram mudanças na preferência entre sessões. O grupo morf-DMSO aumentou seu índice na reativação em relação ao pré-condicionamento ($P=0,013$) e apresentou uma tendência em manter esse índice no teste ($P=0,575$ na comparação reativação e teste), embora também não tenha sido diferente significativamente do pré-condicionamento ($P=0,053$). O grupo morf-CHX apresentou aumento no índice da reativação em relação ao pré-condicionamento ($P=0,000$), e o tratamento pós-reativação

foi capaz de reverter o efeito do condicionamento (teste $P=0,342$ em relação ao pré-condicionamento).

Analisando o desempenho dos grupos dentro das sessões, não houve diferença significativa entre os grupos no pré-condicionamento. Na sessão de reativação, o grupo morf-CHX diferiu estatisticamente do grupo sal-DMSO ($P=0,019$) e sal-CHX ($P=0,010$), mas não do grupo morf-DMSO ($P=0,244$). Já o grupo morf-DMSO apresentou uma preferência menos robusta, não sendo diferente dos grupos salina (sal-DMSO $P=0,0136$ e sal-CHX $P=0,187$). Na sessão teste, os grupos não diferiram entre si (sal-CHX $P=0,612$, morf-CHX=0,413 em relação ao sal-DMSO), embora a preferência do grupo morf-DMSO indique uma tendência em ser diferente do grupo sal-DMSO ($P=0,066$).

Embora nem todas as comparações importantes entre os grupos dentro de cada sessão tenham sido significativas, a análise da mudança de desempenho entre sessões para cada grupo indica que os animais morfina condicionaram e que a CHX reverteu a preferência produzida pelo condicionamento.

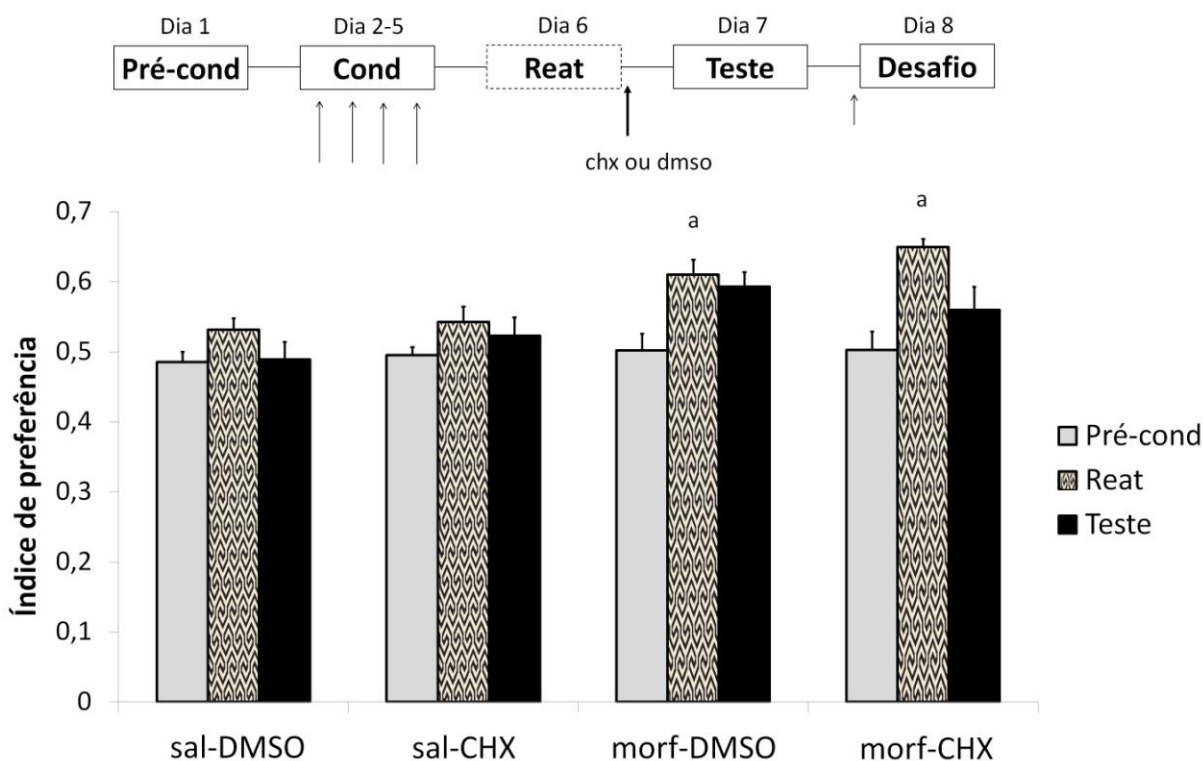


Figura 8. Experimento 3A: Preferência por local. Após os condicionamentos, os grupos morfina aumentaram o índice de preferência para o compartimento pareado com a droga e a CHX foi capaz de revertê-lo no teste. Os dados são expressos como média + erro padrão. a: Significativamente diferente das demais sessões dentro do grupo.(ANOVA de medidas repetidas seguido de teste *post hoc* SNK, $P<0,05$; N's: sal-DMSO=14, sal-CHX=11, morf-DMSO=12. morf-CHX=13).

Esses resultados indicam (I) que os animais condicionados com salina não alteram a preferência em relação aos contextos ao longo das sessões, (II) que a CHX por si só não tem efeito sobre a preferência no grupo salina, (III) que os grupos condicionados com morfina passaram a preferir o compartimento pareado com a droga na reativação e (IV) que a CHX prejudicou a reconsolidação da memória de preferência de lugar, revertendo o efeito do condicionamento no teste.

Experimento 3B: A injeção sistêmica de CHX após reativação por 10 min reverteu a sensibilização locomotora.

Todos os mesmos animais que passaram pelos procedimentos descritos no experimento 3A, 24 h após o teste foram desafiados ao receber metade da dose de morfina usada no condicionamento (2,5 mg/kg). A fig. 9 mostra a distância percorrida dos animais durante o desafio (25 min).

A ANOVA de duas vias revelou efeito do condicionamento ($F_{(1, 46)} = 4,575$, $P=0,038$) e do tratamento pós-reativação ($F_{(1, 46)} = 21,569$, $P=0,000$), mas não interação entre eles ($F_{(1, 46)} = 2,761$, $P=0,103$). O *post hoc* SNK mostrou que o grupo morf-DMSO apresentou significativa maior distância percorrida em relação aos controles do condicionamento ($P=0,010$ e $P=0,000$ em relação a sal-DMSO e sal-CHX, respectivamente) e que o grupo morf-CHX não diferiu estatisticamente em relação ao salina, evidenciando a reversão da sensibilização locomotora induzida pelas repetidas administrações de morfina. Embora não significativa, a perceptível menor distância percorrida dos grupos sal-CHX e morf-CHX em relação ao sal-DMSO pode nos alertar sobre um possível efeito da CHX *per se* ($P=0,099$ e $P=0,083$, respectivamente), não encontrada nesse trabalho.

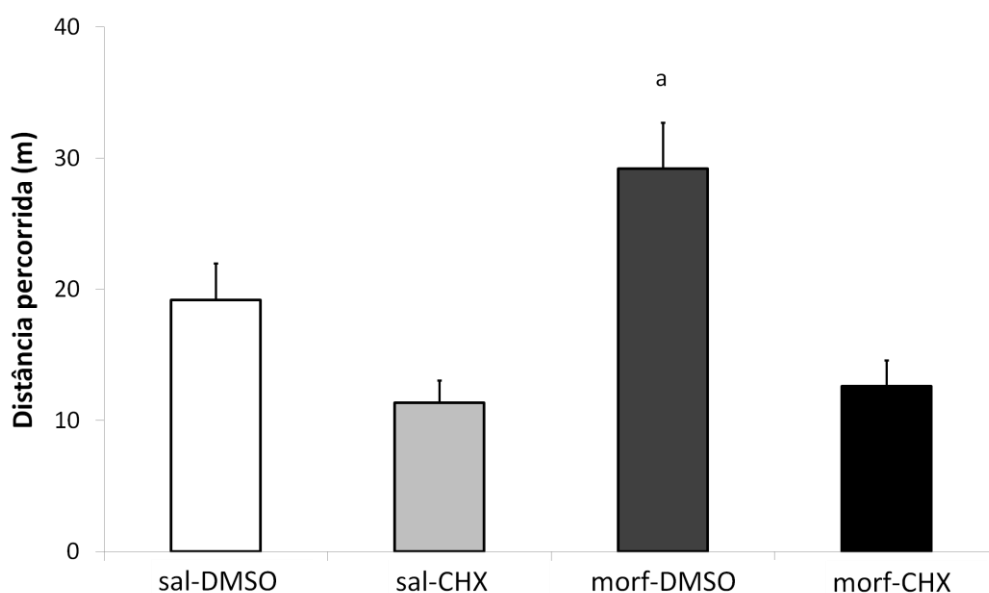


Figura 9. Experimento 3B: Distância percorrida no desafio após CHX sistêmica após 10 min de reativação. 24 h após o teste de preferência, todos os grupos foram desafiados com morfina (2,5 mg/kg) e a distância percorrida (m) foi analisada durante 25 min. Os dados são expressos como média + erro padrão. a: Significativamente diferente dos demais grupos (ANOVA de duas vias seguido de teste *post hoc* SNK, $P<0,05$, N's: sal-DMSO=14, sal-CHX=11, morf-DMSO=12, morf-CHX=13).

Esses resultados indicam que o condicionamento com morfina (I) induziu sensibilização locomotora e (II) que o tratamento com CHX foi capaz de reverter esse aumento de locomoção nos animais condicionados com morfina.

Experimento 3C: Avaliação de GluA1 (fosforilado e total) e GluA2 no Hipocampo dorsal e no Núcleo *Accumbens* 15 min ou 48 h após o desafio.

Os mesmos animais que passaram pelo *experimento 3B*, foram sacrificados 15 min ou 48 h depois do desafio, as estruturas foram dissecadas e congeladas imediatamente para posterior análise por *western blot*. Os dados serão apresentados a seguir por estrutura.

Hipocampo dorsal

A ANOVA de duas vias para *GluA1 fosforilado (S845) 15 min* (fig. 10A) após o desafio mostrou efeito de condicionamento ($F_{(1, 16)} = 10,0623$, $P = 0,006$), sem encontrar efeito de tratamento pós-reativação ($F_{(1, 16)} = 0,8664$, $P = 0,366$) ou interação condicionamento x tratamento ($F_{(1, 16)} = 0,7834$, $P = 0,389$). O teste *post hoc* SNK indicou que os grupos morfina apresentaram níveis maiores de GluA1 fosforilado (S845) em relação ao grupo sal-DMSO no Hipocampo dorsal (morf-DMSO $P = 0,028$ e morf-CHX $P = 0,046$). Em 48 h após o desafio (fig. 10B), houve efeito de tratamento pós-reativação ($F_{(1, 12)} = 8,7408$, $P = 0,012$), mas não de condicionamento ($F_{(1, 12)} = 0,0349$, $P = 0,855$), nem interação condicionamento x tratamento ($F_{(1, 12)} = 0,3542$, $P = 0,563$). O teste *post hoc* SNK não indicou diferença entre os grupos ($P > 0,05$).

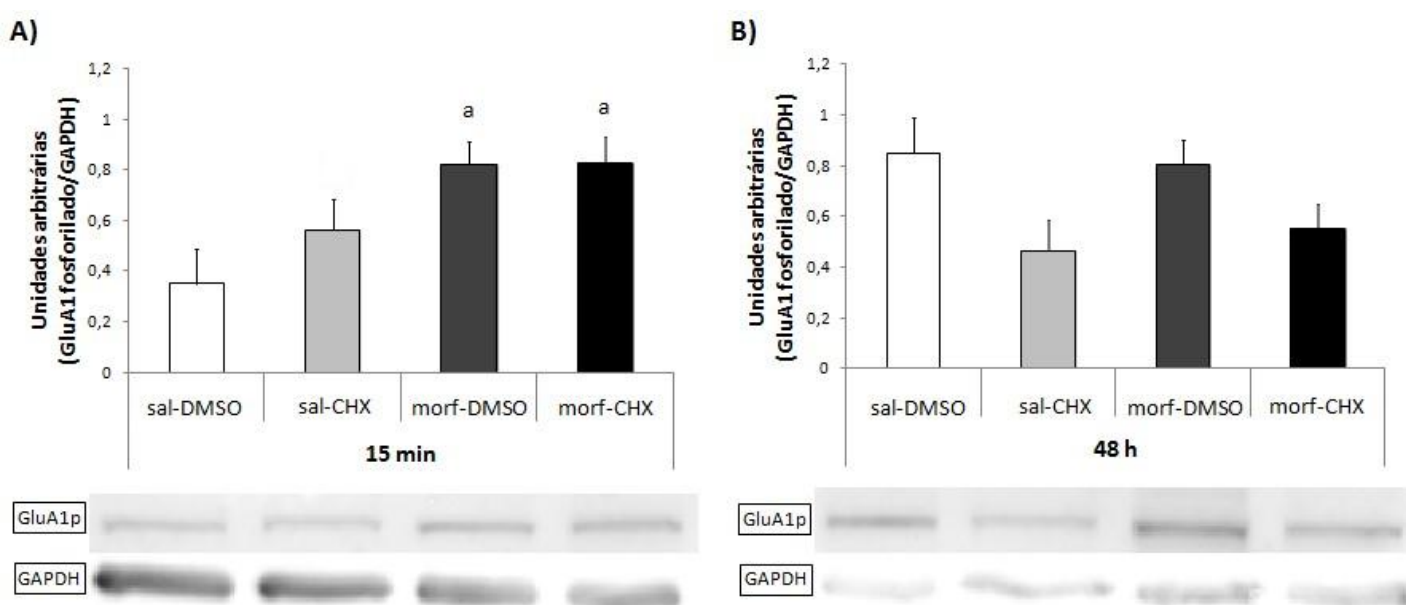


Figura 10. Experimento 3C: GluA1 fosforilado (S845, GluA1p) no Hipocampo dorsal após desafio. 15 min ou 48 h após o teste de sensibilização locomotora os animais foram sacrificados e a subunidade GluA1 dos receptores AMPA foi avaliada. (A) Os grupos morfina apresentaram níveis de GluA1 fosforilado aumentados em relação ao grupo controle sal-DMSO 15 min após o desafio, enquanto que (B) 48 h depois do teste não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. a: Significativamente diferente dos grupos (ANOVA de duas vias seguida de *post hoc* SNK, $P < 0,05$; (A) $N = 5$ por grupo, (B) $N = 4$ por grupo).

Para *GluA1 total* não foi encontrado nenhum efeito na análise aos 15 min (condicionamento: $F_{(1, 20)} = 0,8303$, $P=0,373$; tratamento pós-reativação: $F_{(1, 20)} = 0,0004$, $P=0,984$; interação: $F_{(1, 20)} = 2,6487$, $P=0,119$) ou em 48 h (condicionamento: $F_{(1, 20)} = 0,2013$, $P= 0,658$; tratamento pós-reativação: $F_{(1, 20)} = 0,0837$, $P= 0,775$; interação: $F_{(1, 20)} = 0,0260$, $P= 0,873$), como mostra a fig. 11A e 11B.

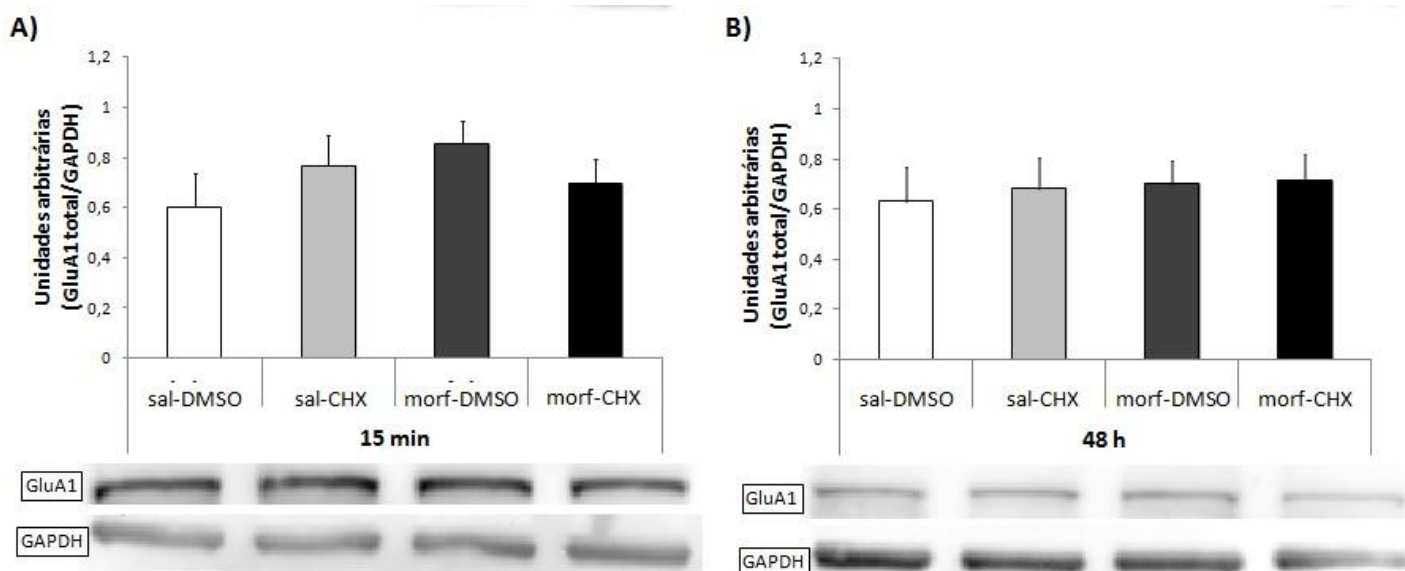


Figura 11. Experimento 3C: GluA1 total no Hipocampo dorsal após desafio. (A) 15 min ou (B) 48 h após o teste de sensibilização locomotora os animais foram sacrificados e a subunidade GluA1 (total) dos receptores AMPA foi quantificada. Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum momento (ANOVA de duas vias, $p>0,05$, (A) $N=6$ por grupo, (B) $N=5$ por grupo).

Em 15 min após o desafio, a ANOVA de duas vias para GluA2 total (fig. 11A) indicou efeito principal de condicionamento ($F_{(1, 16)} = 12,4172$, $P= 0,003$), uma tendência estatística para efeito no tratamento pós-reativação ($F_{(1, 16)} = 3,2609$, $P=0,090$) e nenhum efeito de interação ($F_{(1, 16)} = 1,1359$, $P=0,302$). O *post hoc* SNK indicou que o grupo sal-DMSO é diferente estatisticamente de morf-DMSO ($P=0,013$) e morf-CHX ($P=0,008$), além de uma tendência estatística entre sal-DMSO e sal-CHX ($P=0,059$; fig. 12A). Em 48 h não houve efeito significativo (condicionamento: $F_{(1, 12)} = 0,7418$, $P=0,406$; tratamento pós-reativação: $F_{(1, 12)} = 4,3565$, $P=0,059$; interação: $F_{(1, 12)} = 2,6055$, $P=0,132$; fig. 12B), apenas uma tendência no tratamento pós-reativação. O teste *post hoc* SNK indicou uma tendência em o grupo morf-CHX apresentar menores níveis de GluA2 em relação a morf-DMSO ($P=0,09$), embora ambos grupos morfina sejam estatisticamente iguais aos do grupo salina.

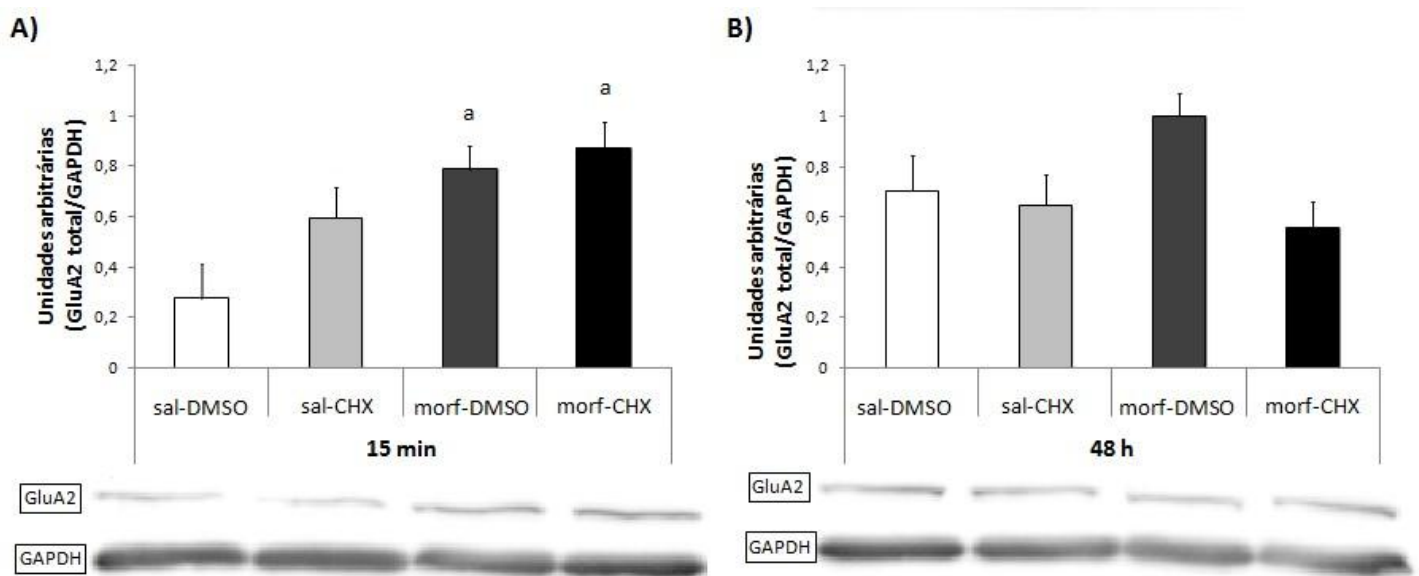


Figura 12. Experimento 3C: GluA2 total no Hipocampo dorsal após desafio. 15 min ou 48 h após o teste de sensibilização locomotora os animais foram sacrificados e a subunidade GluA2 (total) dos receptores AMPA foi quantificada. (A) Os grupos morfina apresentaram níveis aumentados de GluA2 em relação ao controle sal-DMSO, mas (B) 48 h após o desafio não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos a: Significativamente diferente dos grupos (ANOVA de duas vias, $p < 0,05$, (A) $N = 5$ por grupo, (B) $N = 4$ por grupo).

Em conjunto, as análises no HPCd indicam que o tratamento morfina aumentou temporariamente a fosforilação de GluA1p (S845), sem alterar os níveis totais da subunidade, e não modificou GluA2. Isso demonstra o desafio, após condicionamentos com morfina, induziu uma mudança transitória na recepção glutamatérgica no HPCd e a inibição dos comportamentos pela CHX não refletiu em alterações nessa estrutura.

Núcleo Accumbens

A ANOVA de duas vias demonstrou que 15 min após o desafio não há nenhum efeito para *GluA1 fosforilado* (S845, condicionamento: $F_{(1, 20)} = 0,04543$, $P = 0,833$; tratamento pós-reativação: $F_{(1, 20)} = 0,40911$, $P = 0,530$; interação $F_{(1, 20)} = 1,18610$, $P = 0,289$; fig. 13A). Já em 48 h o teste estatístico apontou efeito principal de condicionamento ($F_{(1, 12)} = 11,3174$, $P = 0,006$), mas não de tratamento pós-reativação ($F_{(1, 12)} = 2,5544$, $P = 0,136$) ou interação ($F_{(1, 12)} = 1,1283$, $P = 0,309$; fig. 13B). O *post hoc* SNK indicou que os grupos morf-DMSO e morf-CHX apresentaram níveis diminuídos de GluA1 fosforilado em relação ao controle sal-DMSO no NAc ($P = 0,022$ e $P = 0,19$, respectivamente), além de uma tendência estatística para a CHX no grupo salina ser diferente estatisticamente do grupo sal-DMSO ($P = 0,084$).

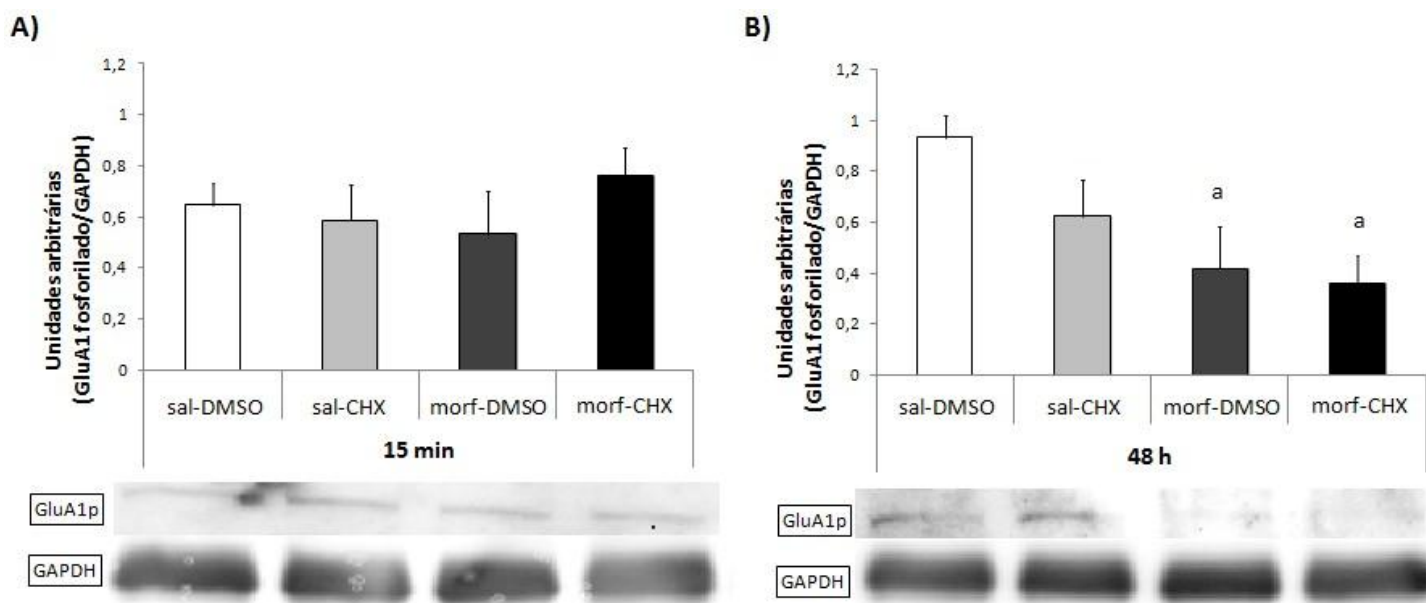


Figura 13. Experimento 3C: GluA1 fosforilado (S845, GluA1p) no Núcleo *Accumbens* após o desafio. 15 min ou 48 h após o teste de sensibilização locomotora os animais foram sacrificados e a subunidade GluA1 fosforilada dos receptores AMPA foi avaliada. (A) Aos 15 min após o desafio não há diferença entre os grupos, (B) mas em 48 h, os grupos morfina apresentam níveis diminuídos de GluA1p em relação ao controle sal-DMSO. a: Significativamente diferente dos grupos; b: não difere significativamente de nenhum grupo (ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* SNK, $P < 0,05$, (A) $N = 6$ por grupo, (B) $N = 6$ por grupo).

O *GluA1 total* não se alterou 15 min (efeito de condicionamento: $F_{(1, 16)} = 2,6868$, $P = 0,121$; tratamento pós-reativação: $F_{(1, 16)} = 0,3245$, $P = 0,577$; interação: $F_{(1, 16)} = 0,0966$, $P = 0,097$; fig. 14A) ou 48 h após o desafio (efeito de condicionamento: $F_{(1, 16)} = 0,0010$, $P = 0,975$; tratamento pós-reativação: $F_{(1, 16)} = 3,2478$, $P = 0,090$; interação: $F_{(1, 16)} = 0,0222$, $P = 0,883$; fig. 14B).

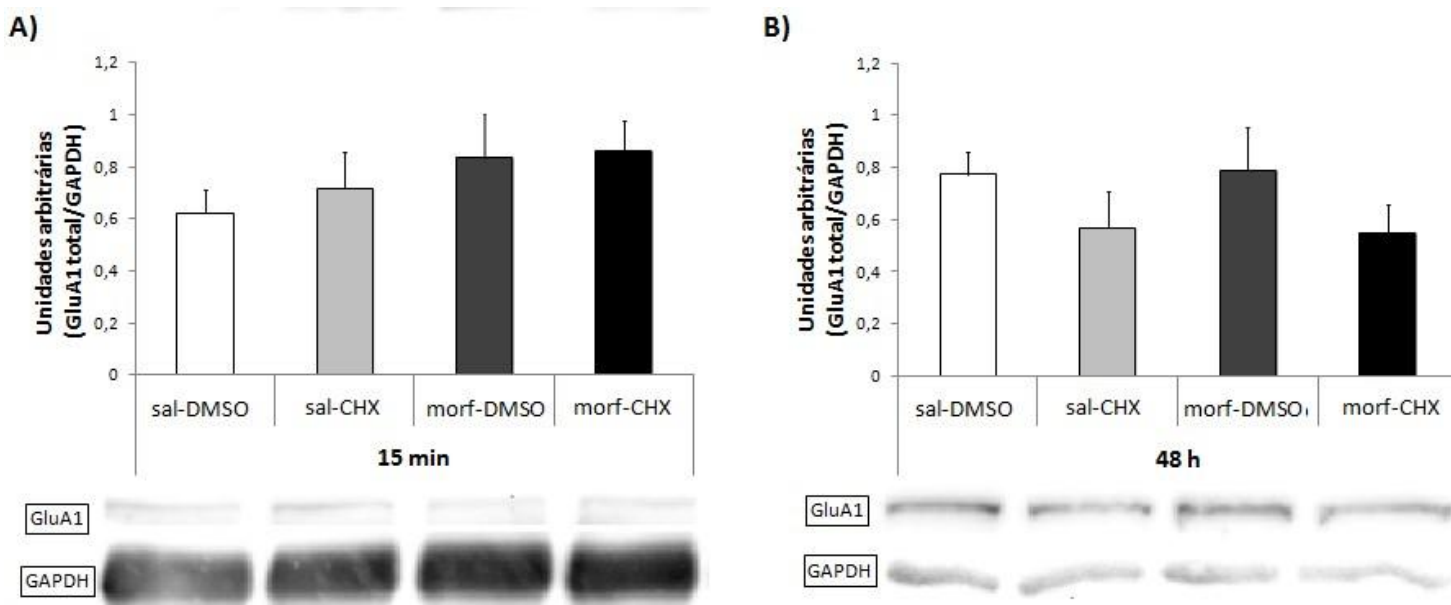


Figura 14. Experimento 3C: GluA1 total no Núcleo Accumbens após desafio. 15 min ou 48 após o teste de sensibilização locomotora os animais foram sacrificados e a subunidade GluA1 (total) dos receptores AMPA foi quantificada. Não há nenhum efeito (A) aos 15 min ou (B) em 48 h após o desafio (ANOVA de duas vias seguida de teste post hoc SNK, $P > 0,05$, (A) $N=6$ por grupo, (B) $N=6$ por grupo).

A análise de *GluA2 total* após 15 min do desafio indicou efeito principal de condicionamento ($F_{(1, 20)} = 15,2463$, $P=0,000$), mas não de tratamento pós-reativação ($F_{(1, 20)} = 1,3307$, $P=0,262$) ou interação ($F_{(1, 20)} = 1,2439$, $P=0,278$; fig. 15A). O *post hoc* SNK indicou que o grupo controle para morfina (morf-DMSO) apresenta níveis elevados de GluA2 total em relação aos grupos condicionados com salina (sal-DMSO e sal-CHX; $P=0,006$ e $P=0,009$), além de ter sido encontrado uma tendência entre sal-DMSO e morf-CHX ($P=0,066$). Em 48 h depois do teste de sensibilização, houve efeito principal de condicionamento ($F_{(1, 16)} = 15,1065$, $P= 0,001$) e tratamento pós-reativação ($F_{(1, 16)} = 1,3307$, $P=0,262$), mas sem interação condicionamento x tratamento ($F_{(1, 16)} = 0,4668$, $P= 0,504$; fig. 15B). O *post hoc* SNK indicou que o grupo morf-CHX é diferente significativamente de todos os outros (sal-DMSO, sal-CHX e morf-DMSO, $P=0,001$, $P=0,014$ e $P=0,027$, respectivamente) e houve uma tendência estatística em ter diferença entre sal-DMSO e morf-DMSO ($P= 0,090$).

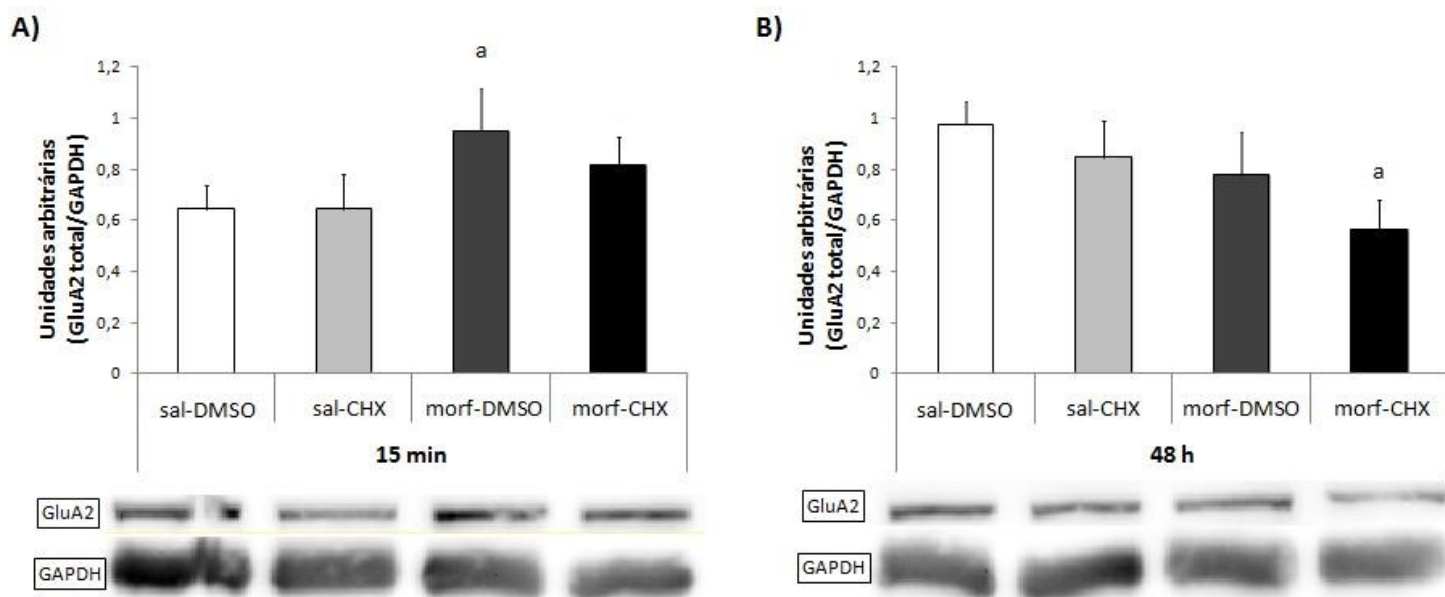


Figura 15. Experimento 3C: GluA2 no Núcleo *Accumbens* após desafio. 15 min ou 48 h após o teste de sensibilização locomotora os animais foram sacrificados e a subunidade GluA2 (total) dos receptores AMPA foi avaliada. (A) Aos 15 min depois do desafio o grupo morf-DMSO apresentou níveis elevados significativamente em relação a sal-DMSO e sal-CHX e (B) em 48 h o grupo morf-CHX níveis diminuídos de GluA2 (total) em relação aos demais grupos (B). a: Significativamente diferente dos grupos; b: não difere significativamente de nenhum grupo (ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* SNK, (A) N=6 por grupo, (B) N=5 por grupo).

Em conjunto, os dados do NAc indicam que existe uma diminuição tardia de GluA1p (S845), sem alterar as quantidades totais da subunidade. A morfina induz um acréscimo transitório de GluA2, que retorna aos níveis basais tardiamente, e a CHX tem uma pequena elevação rapidamente (sem ser diferente estatisticamente) e um decréscimo tardio. Isso demonstra que o desafio, após condicionamentos com morfina, induziu uma modulação na recepção glutamatérgica no NAc e a inibição dos comportamentos pela CHX não refletiu em alterações nessa estrutura.

4.4. Experimento 4: Participação específica do HPCd na mediação do efeito sistêmico da morfina

- Animais com CHX infundido no HPCd não adquiriram preferência por local nem sensibilização locomotora induzida por morfina.

O experimento 4 foi dividido em experimento 4A e 4B, investigando-se o efeito da CHX no HPCd imediatamente após a reativação (10 min) sobre a preferência por local (experimento 4A) e sobre a sensibilização locomotora (experimento 4B).

Experimento 4A: Animais com CHX infundido no HPCd não adquiriram preferência por local induzida por morfina.

Os condicionamentos foram realizados durante 4 dias, iniciando-se 24 h após o pré-condicionamento, onde se confirmava que os animais não tinham lado preferencial. No 6º dia, realizava-se a sessão de reativação (24 h depois do último condicionamento) visando testar a retenção do condicionamento e reativar a memória. A sessão de teste, no 7º dia, verificou se houve algum efeito do tratamento pós-reativação sobre a preferência.

Após a sessão de reativação, validada em 10 min no experimento 3A, foi realizada a infusão bilateral de 0,5 µl/lado de CHX (20 µg/µl) ou seu veículo (DMSO, 0,8%) no HPCd. A fig. 16 mostra o índice de preferência ao longo das sessões.

A ANOVA de medidas repetidas mostrou ausência de efeito do condicionamento ($F_{(1, 28)} = 1,865$, $P = 0,183$), do tratamento pós-reativação ($F_{(1, 28)} = 0,114$, $P = 0,738$), da interação entre eles ($F_{(1, 28)} = 2,218$, $P = 0,147$), efeito do tempo ($F_{(2, 56)} = 1,898$, $P = 0,159$) e das interações com essa variável [tempo x condicionamento ($F_{(2, 56)} = 1,461$, $P = 0,240$), tempo x tratamento ($F_{(2, 56)} = 1,153$, $P = 0,322$), tempo x condicionamento x tratamento ($F_{(2, 56)} = 0,356$, $P = 0,702$)].

O grupo morf-DMSO visualmente apresenta um aumento da preferência em relação ao compartimento droga na reativação que se mantém no teste, mas essa tendência não foi suficientemente robusta para indicar sequer uma tendência estatística, provavelmente devido às flutuações estatísticas fruto do N reduzido, que, nesses animais operados parece ser maior que nos animais apenas tratados sistemicamente (fig. 7). Isso se manifesta mais claramente no maior erro padrão da média observado na reativação e no teste do grupo morf-CHX, sugerindo a necessidade de aumentar o N para obtermos algo mais conclusivo, o que não foi possível com os animais disponíveis dentro do tempo hábil deste mestrado

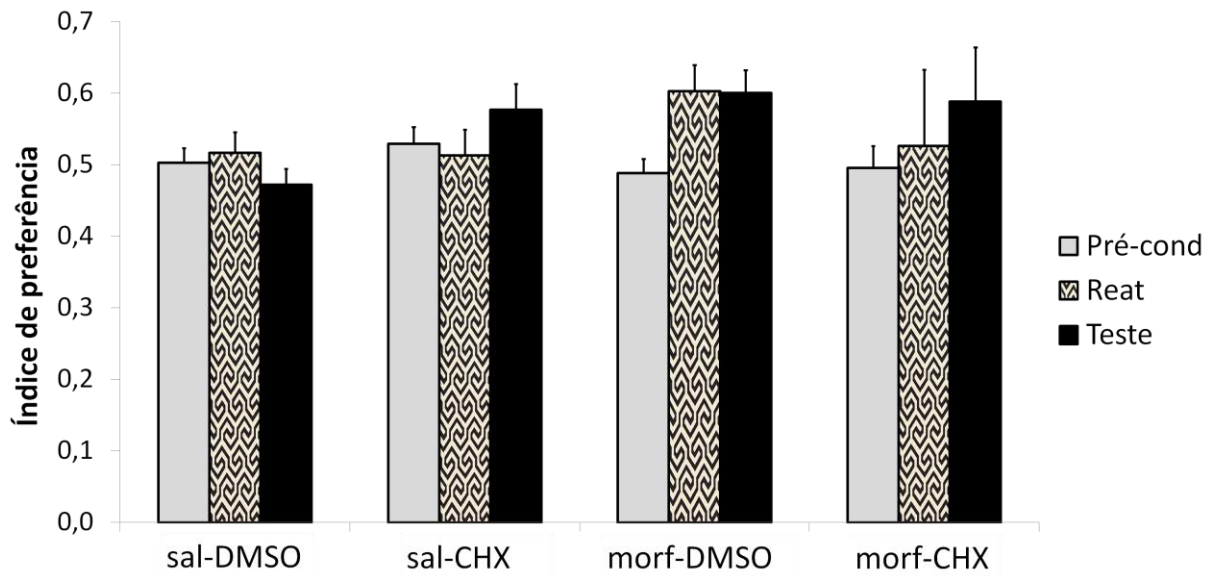


Figura 16. Experimento 4A: Preferência por local nos animais canulados HPCd. O condicionamento não foi capaz de alterar significativamente a preferência dos grupos tratados com morfina, nem a infusão de CHX no HPC teve qualquer efeito sobre a preferência. Os dados são expressos como média + erro padrão (ANOVA de medidas repetidas seguido de *post hoc* SNK, $P > 0,05$, N's: sal-DMSO=10, sal-CHX=6, morf-DMSO=10 e morf-CHX=6).

Experimento 4B: Animais com cirurgia no HPCd não exibem sensibilização locomotora induzida por morfina.

Todos os mesmos animais que passaram pelos procedimentos descritos no experimento 4A, 24 h após o teste foram desafiados ao receber a infusão s.c. da metade da dose de morfina usada no condicionamento (2,5 mg/kg). A fig. 17 mostra a distância percorrida dos animais durante o desafio (25 min).

A ANOVA de duas vias não revelou efeito do condicionamento ($F_{(1, 28)} = 0,5493$, $P=0,465$), do tratamento pós-reativação ($F_{(1, 28)} = 0,080$, $P=0,779$) ou interação entre eles ($F_{(1, 28)} = 0,790$, $P=0,382$).

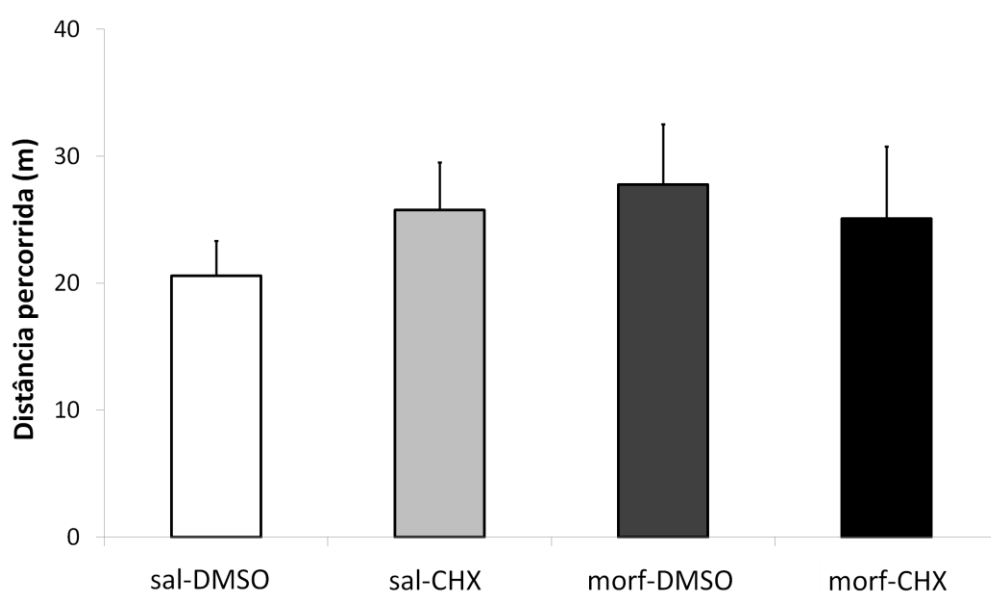


Figura 17. Experimento 4B: distância percorrida no desafio após CHX no HPCd depois de 10 min de reativação. 24 h após o teste de preferência, todos os grupos foram desafiados com morfina (2,5mg/kg) e a distância percorrida (m) foi analisada durante 25min. Os dados são expressos como média + erro padrão. Não houve diferença entre os grupos na sessão (ANOVA de duas vias, $P>0,05$, N's: sal-DMSO=10, sal-CHX=6, morf-DMSO=10 e morf-CHX=6).

Esses resultados indicam que as administrações repetidas de morfina nos animais canulados no HPCd não foram capazes de induzir sensibilização locomotora, nem a administração intracerebral de CHX alterou a distância percorrida nos animais condicionados com morfina, porém, considerando-se as flutuações verificadas no exp. 4A, o aumento do N poderia mudar esse quadro, por ora, inconclusivo.

3.6. Experimento 5: Participação específica do cNac na mediação do efeito sistêmico da morfina encontrado - Animais com CHX infundido no cNac não revertem a preferência por local nem exibem sensibilização locomotora induzida por morfina

Experimento 5A: Animais com CHX infundido no cNac não revertem preferência por local induzida por morfina

Os condicionamentos foram realizados durante 4 dias, iniciando-se 24 h após o pré-condicionamento, onde se confirmava que os animais não tinham lado preferencial. No 6º dia, realizava-se a sessão de reativação (24 h depois do último condicionamento) visando testar a retenção do condicionamento e reativar a memória. A sessão de teste, no 7º dia, verificou se houve algum efeito do tratamento pós-reativação sobre a preferência.

Após a sessão de reativação, validada em 10 min no experimento 3A, foi realizada a infusão bilateral de 0,5 µl/lado de CHX (20 µg/µl) ou seu veículo (DMSO, 0,8%) no cNac. A fig. 18 mostra o índice de referência ao longo das sessões.

A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito do condicionamento ($F_{(1, 28)} = 8,157$, $P = 0,008$), do tempo ($F_{(2, 56)} = 7,660$, $P = 0,001$), interação entre tempo x condicionamento ($F_{(2, 56)} = 3,883$, $P = 0,026$) e entre tempo x tratamento pós-reativação ($F_{(2, 56)} = 4,209$, $P = 0,020$). Não houve efeito do tratamento pós-reativação ($F_{(1, 28)} = 0,869$, $P = 0,359$), interação entre condicionamento x tratamento ($F_{(1, 28)} = 0,757$, $P = 0,391$) e entre tempo x condicionamento x tratamento ($F_{(2, 56)} = 1,226$, $P = 0,301$). O teste *post hoc* SNK revelou que o grupo morf-DMSO aumentou significativamente a preferência na reativação ($P = 0,007$), embora no teste essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa ($P = 0,148$ em relação ao pré-condicionamento), isto é, a preferência não durou. O grupo morf-CHX apresentou um pequeno aumento da preferência na reativação e teste, não significativo estatisticamente ($P = 0,1675$ e $P = 0,457$, respectivamente). Os grupos dentro das sessões não apresentaram diferença significativa entre si também ($P > 0,05$).

A ausência de interação entre condicionamento x tratamento pós-reativação e a não existência de aquisição de preferência no grupo morf-CHX sugere que os animais canulados no cNac também não condicionaram adequadamente, mesmo que no grupo morf-DMSO tenha sido encontrada diferença entre pré-condicionamento e reativação. Assim, esses dados indicam que não houve aquisição de preferência no CPL com morfina e nem a CHX infundida localmente teve

qualquer efeito sobre a preferência de lugar. Novamente, o baixo N que dispomos durante este trabalho pode ter influenciado os resultados.

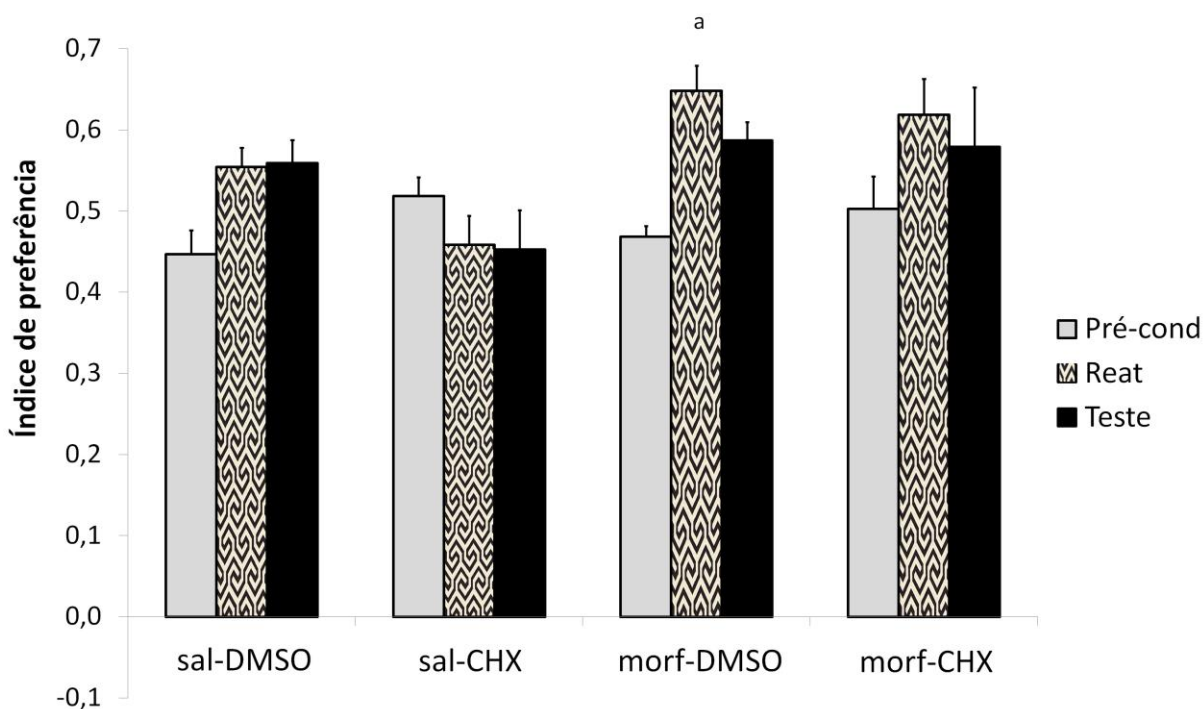


Figura 18. Experimento 5A: Preferência por local nos animais canulados no cNAc. O condicionamento induziu preferência pelo compartimento droga apenas na reativação do grupo morf-DMSO ($P < 0,05$), além disso, a infusão de CHX não teve qualquer efeito sobre a preferência. Não se encontrou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre sessões nos demais grupos ou dentro das sessões, a: Significativamente diferente das demais sessões no mesmo grupo; b: não difere significativamente de ambas sessões dentro do grupo (ANOVA de medidas repetidas seguido de *post hoc* SNK, $P > 0,05$, N's: sal-DMSO=9, sal-CHX=8, morf-DMSO=8 e morf-CHX=6)

Experimento 5B: Animais com cirurgia no cNAc não exibem sensibilização locomotora induzida por morfina.

Todos os mesmos animais que passaram pelos procedimentos descritos no experimento 5A, 24 h após o teste, foram desafiados ao receber a infusão s.c. da metade da dose de morfina no condicionamento (2,5 mg/kg). A fig. 19 mostra a distância percorrida dos animais durante o desafio (25 min).

A ANOVA de duas vias não revelou efeito do condicionamento ($F_{(1, 28)} = 0,967$, $P = 0,334$), do tratamento pós-reativação ($F_{(1, 28)} = 0,240$, $P = 0,628$) ou interação entre condicionamento x tratamento ($F_{(1, 28)} = 0,218$, $P = 0,644$).

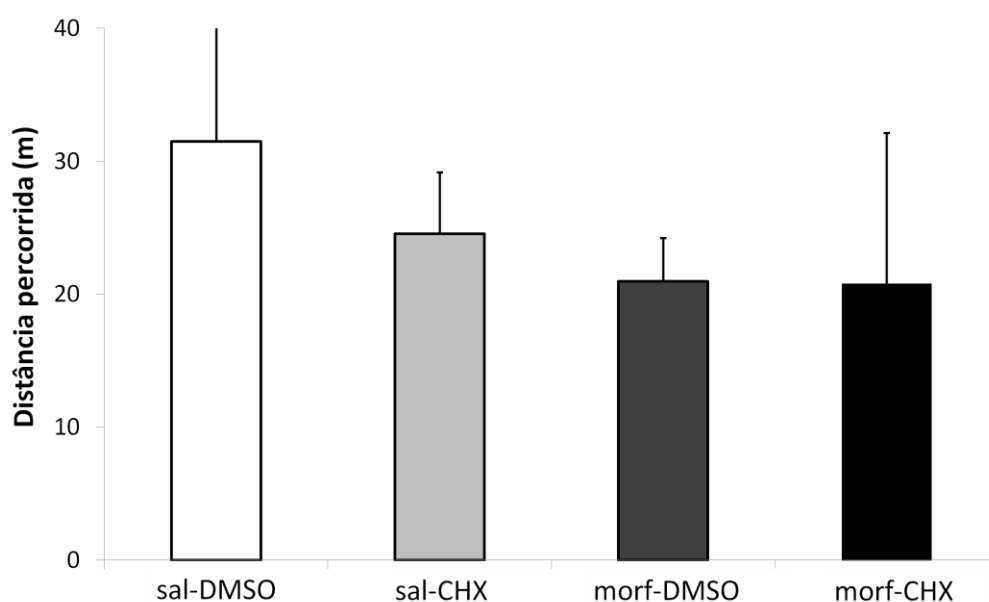


Figura 19. Experimento 5B: Distância percorrida no desafio após CHX sistêmica depois de 10 min de reativação. 24 h após o teste de preferência, todos os grupos foram desafiados com morfina (2,5 mg/kg) e a distância percorrida (m) foi analisada durante 25 min. Os dados são expressos como média + erro padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de duas vias seguido de *post hoc* SNK, $P > 0,05$, N's: sal-DMSO=9, sal-CHX=8, morf-DMSO=8 e morf-CHX=6).

Esses resultados indicam que as administrações repetidas de morfina nos animais canulados no cNAc não foram capazes de induzir sensibilização locomotora, nem a administração intracerebral de CHX alterou a distância percorrida nos animais condicionados com morfina, porém, considerando-se as flutuações verificadas no exp. 5A, o aumento do N talvez pudesse mudar esse quadro, por ora, inconclusivo.

5. DISCUSSÃO

Este estudo investigou a reconsolidação na tarefa de condicionamento de preferência por local (CPL) como janela temporal oportuna para reverter comportamentos adquiridos com administrações repetidas de morfina, como a preferência por local e a sensibilização locomotora. Também buscou quantificar possíveis adaptações plásticas (nas subunidades dos receptores AMPA) no Hipocampo dorsal (HPCd) e no centro do Núcleo *Accumbens* (cNAc) produzidas pelo condicionamento do contexto associado à infusão de morfina, com ou sem a inibição farmacológica da reconsolidação por um inibidor de síntese proteica (CHX). Os resultados deste trabalho replicaram dados da literatura em um aparato de CPL configurado para não ter preferência prévia por local (*unbiased, experimento 1*). A seguir, verificamos que sessões de reativação longas (15 min) tendem a induzir extinção (*experimento 2*), enquanto que sessões mais curtas (10 min) favorecem um processo de reconsolidação. Demonstramos, pela primeira vez em um mesmo desenho experimental, que o bloqueio da reconsolidação da memória do CPL, além de neutralizar a preferência por local promovida pela morfina (*experimento 3A*), também reverteu a sensibilização locomotora induzida no desafio (*experimento 3B*). Nas estruturas estudadas, confirmou-se que o condicionamento de associação com morfina induziu neuroadaptações no sistema de recepção glutamatérgica - mudanças nas subunidades dos receptores AMPA - que o tratamento pós-reativação não foi capaz de modificar (*experimento 3C*). Os experimentos que investigaram o papel do Hipocampo dorsal (*experimento 4A e 4B*) e do centro do Núcleo *Accumbens* (*experimento 5A e 5B*) foram menos conclusivos sobre um possível papel diferencial dessas estruturas nos parâmetros preferência por local e sensibilização locomotora, possivelmente devido ao menor número amostral.

O *experimento 1* buscou construir uma configuração do CPL sem preferência prévia (*unbiased*). A combinação 2 dos contextos não apresentou diferença estatística, porém, uma quantidade importante dos animais (37,5%) apresentou índices de preferência maior que 0,7 ou menor que 0,3, o que justificou continuar buscando outra combinação. A combinação dos contextos que melhor atendeu aos critérios estabelecidos na sessão material e métodos foi a 4, portanto, os experimentos que se seguiram foram realizados nessas condições. Neste experimento mostramos que modificando padrões visuais (nas paredes) ou tácteis (no assoalho) é possível modular a preferência por local inata dos ratos no paradigma condicionamento de preferência por local e, assim, montar uma configuração na qual, que na média, os animais não apresentam preferência por nenhum compartimento ou local (aparato sem preferência prévia por local; fig. 5). Nesse paradigma comportamental, pode-se observar mais claramente que a aquisição da preferência nos

experimentos subsequentes deveu-se apenas aos efeitos reforçadores da morfina e não a efeitos inespecíficos da droga, caso esta acabasse pareada com um compartimento naturalmente não preferido (um desenho experimental contrabalanceado) em um aparto com preferência prévia (*biased* - ver Tzschentke, 1998).

No experimento 2, condicionamos os animais utilizando a dose de morfina de 5 mg/kg (Valjent, *et al.*, 2006; Robinson, & Franklin, 2007; Sadeghi, *et al.*, 2016) e avaliamos se os animais manteriam a preferência em um teste, 24 h depois de uma sessão de reativação de 15 min, livre de droga, em que o animal poderia explorar todo o aparato (fig. 6). O protocolo induziu preferência por local com a dose de morfina utilizada na reativação, mas os animais tratados com morfina mostraram uma tendência aparente de menor preferência pelo compartimento associado à droga no teste. De forma geral, em termos de memória, parece que reexposições únicas e curtas ao EC tendem a reativá-la (labilizá-la/desestabilizá-la), induzindo, via mecanismos de reconsolidação, algum tipo de atualização, modificando-a (Miller, & Marshall, 2005b; Milekic *et al.*, 2006; Valjent, *et al.*, 2006). Por outro lado, sessões mais prolongadas e/ou repetidas tendem a promover a extinção do traço de memória (Lu, *et al.*, 2002; Raybuck, *et al.*, 2013; Sadeghi, *et al.*, 2016). O critério para considerar se uma sessão é curta ou longa parece depender do tipo de memória e da tarefa abordada. Nos experimentos com condicionamento de medo, as reexposições que induzem reconsolidação geralmente são bastante curtas, variando muitas vezes de 3 a 5 min (de Oliveira Alvares, *et al.*, 2013; Crestani, *et al.*, 2015), enquanto que, no caso de memórias apetitivas, essas reexposições normalmente são mais longas (10 a 30 min; Lee, *et al.*, 2005; Miller, & Marshall, 2005b; Milekic *et al.*, 2006; Valjent, *et al.*, 2006). Da mesma forma, protocolos de extinção para memórias de medo frequentemente envolvem sessões únicas, enquanto que aqueles de CPL geralmente tem sessões repetidas (Lu, *et al.*, 2002; Raybuck, *et al.*, 2013; Sadeghi, *et al.*, 2016). Possivelmente, tal diferença se deva ao fato de que no protocolo de tarefas aversivas normalmente o número de sessões durante o aprendizado é menor e estas são mais curtas, enquanto que em aprendizados apetitivos relacionados a drogas, são necessárias sessões sucessivas e mais longas para aquisição (Taubenfeld, *et al.*, 2010; Crestani, *et al.*, 2015). A intensidade de treino ou número de sessões de treino também influenciam a intensidade do traço de memória, de tal forma que uma maior quantidade de treinos ou maior intensidade dos mesmos (quanto à dose ou ao choque empregados) produz memórias mais robustas (Raybuck, *et al.*, 2013). Memórias com treinos mais intensos parecem exigir sessões mais longas ou em maior número para se verifique alguma atualização que envolva reconsolidação (Suzuki, *et al.*, 2004; Robinson & Franklin, 2010). Mesmo assim, Escosteguy-Neto *et al.* (2016) foram bem-sucedidos em promover a reconsolidação na tarefa de CPL com apenas 3 minutos de reativação, menos tempo do que a maioria dos trabalhos mostra.

Levando-se em conta que a reativação de 15 min aparentemente induziu uma leve extinção na preferência por local, julgamos que este protocolo de reativação não é o ideal para se investigar a hipótese da reconsolidação neste tipo particular de memória. Em muitos estudos com reconsolidação da memória o tratamento amnésico utilizado após a reativação são inibidores de síntese proteica, como anisomicina e cicloheximida (Nader, *et al.*, 2000; Valjent, *et al.*, 2006; Jarome & Helmstetter, 2014). No experimento 3, investigamos o efeito da *infusão sistêmica* de CHX após uma reativação de 10 min - idêntica a uma sessão de pré-condicionamento ou teste - sobre o teste de preferência por local (experimento 3A, fig. 8) e de sensibilização locomotora (desafio, experimento 3B, fig. 9). Os resultados mostram que a CHX, infundida após uma reativação curta (10 min), foi capaz de prejudicar a preferência por local induzida pela morfina, assim como reverteu a sensibilização locomotora observada nos animais condicionados com morfina que receberam veículo após a reativação. Flutuações no N do experimento ou a baixa dose de morfina utilizada neste trabalho podem ter contribuído para que o grupo morf-DMSO no teste não tenha sido significativamente diferente em relação ao pré-condicionamento, embora essa diferença seja visualmente mínima e o teste não tenha diferido - nem mesmo apresentado tendência - da reativação. Além disso, apesar de nem todas as comparações importantes entre os grupos dentro de cada sessão tenham sido significativas, a análise da mudança de desempenho entre sessões em cada grupo indica que os animais morfina condicionaram e que a CHX reverteu a preferência produzida pelo condicionamento. A memória de preferência por local é uma memória apetitiva dependente de contexto (Sanchis-Segura & Spanagel, 2006) que, como é de se esperar, utiliza estruturas importantes envolvidas no armazenamento de memórias contextuais (Milekic *et al.*, 2006) além, é claro, de estruturas do sistema de recompensa (Miller & Marshall, 2005a; Koya, *et al.*, 2009; Volkow & Morales, 2015). Nossos achados com CPL são consistentes com os de outros autores que também verificaram que a inibição de síntese proteica após a reativação prejudica a preferência por local (Milekic, *et al.*, 2006; Valjent, *et al.*, 2006; Robinson & Franklin, 2007; Fan, *et al.*, 2010; Escosteguy-Neto, *et al.*, 2016), bem como empregando outros tratamentos que também inibem a reconsolidação - agonistas gabaérgicos ou antagonistas beta-adrenérgicos, por exemplo (Bernardi, *et al.*, 2009; Robinson & Franklin, 2010; Robinson, *et al.*, 2011), ou mesmo com inibição da erkp (Valjent, *et al.*, 2006). Também mostraram-se eficazes tratamentos que inibem a reconsolidação no Núcleo *Accumbens* (Miller & Marshall, 2005b), no Hipocampo dorsal ou na Amígdala basolateral (Milekic, *et al.*, 2006), embora os protocolos de reativação da memória fossem bastante diferentes nesses trabalhos. Sendo assim, reativamos a memória mesmo na ausência da droga e o aparato estando livre para exploração (reativação do tipo teste), tal como Miller & Marshall (2005b), Bernardi *et al.* (2009) e Robinson & Franklin (2010). Outros pesquisadores, porém, conseguiram inibir a

reconsolidação apenas quando a reativação foi feita no contexto associado a droga (reativação ao contexto associado à droga), quando foi realizada uma sessão de condicionamento (reativação ao contexto + droga) ou até mesmo quando foi preciso fazer um ciclo de condicionamento, condicionamento droga + condicionamento veículo (reativação do tipo condicionamento). Millekic *et al.* (2006) não encontraram efeito da inibição de síntese proteica (anisomicina e CHX) após um teste de 10 min, foi necessária uma nova sessão de condicionamento (contexto + droga) para que o tratamento tivesse efeito, o que se manteve até 4 semanas depois da reativação, ou seja, algo que não se parece com recuperação espontânea e que seria característico de um processo de extinção. Essa diferença em relação ao presente trabalho pode estar relacionada ao fato de que Milekic utilizou o dobro da dose de morfina (10 mg/kg) e sessões de condicionamento um pouco mais longas (30 min) em relação ao nosso protocolo criando, dessa forma, podendo ter sido criada uma memória mais robusta e mais difícil de ser desestabilizada e, assim, sendo necessária administração da droga durante a reativação. De forma semelhante, Valjent *et al.* (2006) verificaram que o tratamento amnésico não teve efeito após a reativação na presença apenas do contexto associado à droga e Robinson & Franklin (2007), também não encontraram qualquer efeito quando a reativação era feita no contexto em que se infundiu veículo. O tratamento prejudicou o desempenho dos animais no teste apenas quando a reativação foi realizada no contexto associado à droga, com administração desta (reativação do tipo condicionamento). No primeiro trabalho, citado acima, verificou-se que o prejuízo na preferência não exibiu recuperação espontânea nem reinstalação da preferência na presença de um *priming* (dose menor da droga) 2 semanas depois da reativação, o que refuta a possibilidade do tratamento ter facilitado a extinção e indica que o processo efetivamente prejudicado foi a reconsolidação. Fan *et al.* (2010) conseguiram reverter a preferência administrando anisomicina ou CHX após teste de 15 min ou após ciclo de condicionamento (condicionamento veículo e condicionamento droga). Em ambos experimentos não houve reinstalação um mês e meio após a reativação. Estes trabalhos estão de acordo com nossos achados e são consistentes, com um importante corpo de estudos que demonstra que inibindo-se o processo de reconsolidação da memória pode-se enfraquecê-la ou apagá-la (Sorg, 2012; Reichelt & Lee, 2013; Torregrossa & Taylor, 2013).

Apesar dos diversos estudos que investigaram e conseguiram reverter a preferência por local através da reconsolidação, são escassos os trabalhos que investigaram isso para a sensibilização comportamental. Enquanto nós demonstramos que com uma sessão de 10 min de reativação do tipo teste foi suficiente para a CHX infundida sistemicamente prevenir a expressão da sensibilização (fig. 9), Valjent *et al.* (2006) não conseguiram demonstrar efeito da anisomicina após reativação sobre a sensibilização. A sessão neste último trabalho foi reativação do tipo condicionamento, em que os

animais foram reexpostos ao contexto sob efeito de cocaína por 20 min, o que pode ter sido demasiadamente longa já que o protocolo de aquisição utilizou uma única dose de cocaína. Além disso, a reexposição ao EC e EI pode ter sido uma sessão adicional de aquisição, e o tratamento estar atuando sobre a consolidação e não sobre a reconsolidação propriamente dita.

Já no estudo de Bernardi *et al.* (2007), o mesmo tratamento depois de uma sessão curta de reexposição (5 min) somente ao contexto (reativação ao contexto) foi capaz de prejudicar a sensibilização locomotora, o que não foi encontrado quando a sessão foi longa (30 min), quando não houve reativação ou quando a anisomicina foi injetada 25 min depois da sessão curta. Dessa forma, os autores baseiam seus achados na inibição da *reconsolidação* de uma memória relacionada à droga - os únicos autores que trazem explicitamente essa ideia, que nós também compartilhamos. O tempo eficaz em reativar a memória foi bem menor do que o que usamos, porém, neste trabalho a indução da sensibilização foi com uma única dose de cocaína, embora esta tenha sido alta, o que pode ter formado uma memória mais fraca e, assim, mais fácil de ser desestabilizada (Suzuki *et al.*, 2004; Reichelt, & Lee, 2013). Um último trabalho utilizou ratos transgênicos e empregou o método de inativação neuronal por Daun02, que é referida como uma "pró-droga" que atua inibindo seletivamente uma pequena população de neurônios (2 a 3%), neste caso, células possivelmente envolvidas com a plasticidade comportamental da sensibilização. Foi realizada uma sessão de reativação longa do tipo condicionamento, em que os animais permaneceram na caixa de aquisição sob efeito de cocaína e 90 min depois receberam uma infusão de Daun02 ou veículo no NAc (Koya *et al.*, 2009). Esse tratamento apresentou o mesmo efeito observado em Bernardi *et al.* (2007), isto é, a sessão de reativação foi bastante longa após administração de cocaína, provavelmente porque isso era necessário para que a população neuronal responsável pela expressão da sensibilização expressasse a enzima necessária para que, então, a Daun02 produzisse efeito inibitório sobre aqueles neurônios. Outra possível explicação diz respeito à força ou intensidade dessa memória, já que foram 7 sessões de aquisição longas, e, por isso, talvez fosse necessária uma maior reexposição para desestabilizar o traço a ponto de o tratamento ter efeito. Do nosso conhecimento, esses são os únicos 3 trabalhos que tentam reverter a sensibilização a partir de mecanismos semelhantes à reconsolidação da memória. Junto aos nossos achados, esses trabalhos expandem o conhecimento acerca da reconsolidação da memória e sustentam uma hipótese de elevada relevância clínica que sugere que interferir no processo de reconsolidação pode ser eficiente em atenuar comportamentos motivados mal adaptativos e suas problemáticas consequências.

É importante salientar que apesar de um corpo importante de evidências na literatura sobre sensibilização demonstrar que esta se restringe ao contexto, outros trabalhos indicam que ela pode ser expressa em contextos diferentes ao da aquisição (Kalivas & Duffy, 1987; Heidbreder, *et al.*, 1996;

Vekovischeva *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2015). Browmam *et al.* (1998) indicaram que a independência de contexto desenvolve-se apenas com doses mais altas de droga, enquanto que doses mais baixas dependem do contexto. No presente trabalho não chegamos a investigar essa dependência de contexto para expressão, portanto, nossos resultados demonstram reversão do comportamento no contexto de aquisição. Para esclarecer se nosso protocolo também induz o comportamento de forma mais generalizada, diferentes ao da aquisição, seria necessário verificar se a reversão da sensibilização fica restrita ou não apenas à caixa de aquisição.

Nossos resultados comportamentais do experimento 3 referem-se à memória recente da recompensa em teste de preferência e desafio. Importantes ferramentas poderiam ter sido utilizadas para suportar de forma mais clara que os achados foram devidos à inibição de reconsolidação, tais como teste remoto para avaliar se o efeito do tratamento é duradouro (o que também confirmaria não tratar-se de uma extinção, sujeita à recuperação espontânea), teste após um *priming* para avaliar a chamada “reinstalação” da preferência, ou ainda a utilização de fármacos que previnam a desestabilização da memória ou administração de CHX fora da janela de reconsolidação. Como não realizamos testes comportamentais complementares, não temos como refutar a possibilidade de que tenha havido algo como facilitação da extinção ou prejuízo da evocação, ao contrário dos trabalhos citados, que colheram mais evidências que nós.

Está bem estabelecido que drogas de abuso induzem mudanças de curto e de longo prazo na efetividade de sinapses glutamatérgicas em circuitos que controlam recompensa, motivação, aprendizado e memória (Kelley, 2004). As mudanças de longo prazo a nível celular são chamadas de plasticidade sináptica, sendo as mais estudadas, a LTP e a LTD (*potenciação* e *depressão* de longa duração, respectivamente). De forma geral, estas podem ser comumente induzidas pela ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), ativação de cinases ou fosfatases, fosforilação ou desfosforilação de substratos, inserção ou endocitose de receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico) na membrana, transcrição gênica e síntese de novas proteínas.

Por regularem a efetividade sináptica glutamatérgica, o tráfego dos receptores AMPA é um componente fundamental na plasticidade e pode ajudar a compreender os comportamentos motivados e de busca de drogas, assim como estudar estratégias de intervenção nesse sistema para reversão de comportamentos problemáticos. Esses receptores são normalmente compostos por 4 subunidades, que variam de GluA1-4 (ou também GluR1-4 ou GluRA-D). O tráfego de AMPA parece depender de determinados arranjos de subunidades, já que heterômeros GluA1/2 são recrutados após LTP e GluA2/3 são inseridos de forma constitutiva. A inserção de GluA1 ocorre após LTP e sua desfosforilação e, conseqüente internalização, junto com GluA2, está envolvida com a indução da

LTD (Malenka, 2003; Anggono & Huganir, 2012; Huganir & Nicoll, 2013). Além disso, a fosforilação de GluA1 na serina 845 (S845) é induzida pela cinase dependente de AMPc (PKA), que é ativada após estimulação de receptores D1 no NAc (Wolf *et al.*, 2004; Wolf, 2010a), influenciando o tráfego de AMPA pela interação entre sua cauda C citoplasmática e proteínas intracelulares. Apesar de ainda ser motivo de discussão como exatamente se dá o controle do tráfego de AMPA (Anggono & Huganir, 2012), alterações dos níveis das subunidades e mudanças pós-traducionais, como sua fosforilação, parecem estar envolvidas nas mudanças plásticas decorrentes do uso de determinadas drogas psicotrópicas (Malenka, 2003; Kauer & Malenka, 2007).

No experimento 3C, os animais do experimento 3A e 3B tiveram o Hipocampo dorsal e o Núcleo *Accumbens* dissecados em dois tempos após o desafio, aos 15 min ou em 48 h, e as subunidades GluA1p (S845), GluA1 e GluA2 foram analisados por *western blot* (figs. 10-15). A tabela 3 faz uma síntese esquemática de nossos achados).

Tabela 3. Resumo esquemático da análise das estruturas por *western blot* (experimento 3C)

		15 min após desafio		48 h após desafio		
		morf-dms0	morf-chx	morf-dms0	morf-chx	
HPCd	GluA1p	Fig. 9	↑	0	0	
	GluA1	Fig. 10	0	0	0	
	GluA2	Fig. 11	↑	↑	0	0
NAc	GluA1p	Fig. 12	0	0	↓	↓
	GluA1	Fig. 13	0	0	0	0
	GluA2	Fig. 14	↑	0	0	↓

Fonte: produzida pela autora. A tabela indica as diferenças estatisticamente significativas encontradas com relação aos respectivos grupos-controle (sal-DMSO, sal-CHX). 0: sem efeito significativo, aumento e diminuição em relação ao grupo sal-DMSO.

A maior parte da literatura que investiga essas neuroadaptações utiliza drogas psicoestimulantes e não depressoras como a morfina, que é opioide (Wolf, *et al.*, 2004; Wolf, 2010a; Dacher & Nugent, 2011; Lüscher & Malenka, 2011). Apesar de ambas classes de fármacos compartilharem algumas características, como promoverem o aumento de dopamina no Núcleo *Accumbens* (Di Chiara & Imperato, 1988) e representarem um reforço positivo (Tzschentke, 2007; Fields & Margolis, 2015), elas apresentam importantes diferenças farmacológicas, comportamentais

e relacionadas à plasticidade (Badiani *et al.*, 2011; Russo *et al.*, 2010). Por isso, apenas alguns dados com psicoestimulantes serão discutidos aqui, sem o objetivo de comparar exaustivamente os dados entre essas drogas.

Nosso tratamento com morfina induziu um aumento nos níveis de GluA1p (S845) no HPCd em 15 min pós desafio, embora esse aumento não tenha se mantido na análise de 48 h (fig. 10). Nesta mesma estrutura, os níveis totais de GluA1 não se alteraram e a CHX não teve efeito (fig. 11). A morfina inicialmente diminui a via do AMPc (diminuindo a atividade de PKA), porém induz superestimulação com o uso crônico, promovendo aumento de PKA e fosforilação de GluA1 (S845), que está relacionado a comportamentos de dependência (Nestler, 2016). A tabela 4 compara resultados de alguns trabalhos selecionados com morfina que serão importantes nessa discussão. O aumento de fosforilação na serina 845 que encontramos está de acordo com o achado de Xia *et al.* (2011) de que a diminuição dessa fosforilação previne a expressão da sensibilização, além de que o aumento da fosforilação 90 min após o desafio não reflete nos níveis totais de GluA1. Também foi demonstrado que após o desafio ou tratamento que causa dependência, a indução da LTP está prejudicada (Fakira, *et al.*, 2014; Bao *et al.*, 2007), estando de acordo com um aumento da atividade da PKA (Bao, *et al.*, 2007), de GluA1 e de resposta basal aumentada em CA1, que indica uma possível saturação de receptores AMPA na sinapse (Ungless *et al.*, 2001, Wolf, 2010a; Xia *et al.*, 2011). Outros tratamentos com morfina, mas sem uma sessão de desafio, também indicam aumento de GluA1p (S845) e GluA1 total (Zhong *et al.*, 2006; Morón *et al.*, 2007; Billa *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2011), embora o tratamento crônico de morfina em fatia por 3 h a 6 d acabe reduzindo esses níveis (Kam, A Y L *et al.*, 2010). Em contraposição, camundongos transgênicos que não expressam GluA1 (GluA1 -/-) ainda conseguem induzir e expressar sensibilização à morfina, no entanto, a expressão é apenas dependente de contexto, diferente dos animais normais (*wildtype*) que também expressam independente de contexto (Vekovischeva *et al.*, 2001). Já em relação ao CPL, imediatamente após o teste não existe diferença em GluA1p (S845) ou GluA1 total no HPC (Billa *et al.*, 2009), GluA1p (S845) só aumenta após sessões de extinção ou quando a morfina é administrada na caixa moradia.

Tabela 4. Tabela comparativa de alguns artigos com análises do sistema glutamatérgico em resposta à morfina

Referência	Espécie	Dose	Tratamento	Abstinência a pré-desafio	Desafio	Morte	Estrutura	Analisado	Subunidade	Resultado
Vekovischeva, O Y et al., 2001	camundongo (transgênico GluA1 -/-)	10mg/kg	6 adm por 6 d	24 h ou 5d	sim	-	-	Locomoção no desafio	-	não afeta sensibilização dependente de contexto, mas sim a independente
Fakira, A K et al., 2014	camundongo	5-15mg/kg	escalonado, 4 adm de 12 em 12h	7 d	sim	após desafio	HPC	indução de LTP em fatia	-	não induz LTP
Zhong, W et al., 2006	rato	10mg/kg	12 adm por 12 d	-	não	0 h, 2 h, 18 h, 4 d, 7 d ou 20 d após tratamento	HPC	membrana e sinaptossoma	GluA1 e GluA2/3	aumento de GluA1 e GluA2/3 logo após o tratamento e um aumento ainda maior (comparado com salina e morfina 0 h) nos demais tempos de abstinência
Morón, J A et al., 2007	camundongo	5-15mg/kg	escalonado, 4 adm de 12 em 12h	-	não	12 h após tratamento	HPC	sinaptossoma	GluA1	aumenta
Billa, S K et al., 2009	rato	10mg/kg	4 adm por 4 d no CPL	-	não	imediatamente pós teste	HPC	homogenato, sinapse e PSD	GluA1p, GluA1 e GluA2	CPL sem efeito, extinção aumenta GluA1p na PSD
			4 adm por 4 d na HC			12 h após tratamento				aumenta GluA1p na sinapse
Billa, S K et al., 2010	camundongo	5-15mg/kg	escalonado, 4 adm de 12 em 12 h	-	não	12 h após tratamento	HPC	homogenato, sinaptossoma e PSD	GluA1	Aumenta
									GluA1p	Aumenta (menos na PSD)
									GluA2	sem efeito
								EPSC	-	Aumento de CP-AMPA

Referência	Espécie	Dose	Tratamento	Abstinência pré-desafio	Desafio	Morte	Estrutura	Analisado	Subunidade	Resultado	
Xia, Y et al., 2011	camundongo	5-15mg/kg	escalonado, 4 adm de 12 em 12h	-	não	12 h	HPC	homogenato, sinaptossoma, PSD	GluA1p, GluA1, GluA2p(Y876) e GluA2	HC 12 h: Aumenta GluA1p mas não altera número total; aumenta GluA2p mas GluA2 no membrana e M/I diminui	
				-	não	7 d				HC 7 d: sem diferenças	
					sim	90 min				sens no ctx: GluA1 aumenta no homogenato e GluAp também na PSD ; GluA2 diminui na PSD	
					sim	imediatamente após o desafio				EPSC e LTP	resposta basal aumentada e não induz LTP
				7 d	sim	imediatamente após o desafio				patch clamp (whole cell)	existe um aumento de CP-AMPA
					sim	-				-	Locomoção no desafio (GluA1 no HPC está menos fosforilado na S845 durante a aquisição)
Kam, A Y L et al., 2011	rato (cultura de HPC)	10 ou 1µg	3 h, 6 h, 1 ou 3 d	-	-	-	HPC	membrana homogenato	GluA1p e GluA1	a dose maior diminui GluA1 em todos os tratamentos, a menor em 1 e 3 d a dose maior diminui GluA1p em todos os tempos avaliados (até 1 d)	
Morón, J A et al., 2010	rato	10mg/kg	agudo: 1 adm	-	não	30 min ou 48 h	NAc e HPC	homogenato	GluA1p(S831)/GluA1	30 min e 48 h: sem efeito	
			CPL: 6 adm			imediatamente após teste				aumento no Nac e HPC	
			sensibilização + CPL: 7 adm*			24 h após tratamento				aumento no HPC	
Herrold, A A et al., 2013	rato	8mg/kg	agudo: 1 adm	-	não	24 h após tratamento	NAc	membrana, intracelular, total	GluA1 e GluA2	morf aguda: diminui GluA1 (M/I)	
			repetido: 3 adm por 3 d	-	não	14 d				morf repetida: GluA1 tendência a aumentar (p=0,081, M/I)	

Referência	Espécie	Dose	Tratamento	Abstinência pré-desafio	Desafio	Morte	Estrutura	Analisado	Subunidade	Resultado
Mickiewicz, A L & Napier, T C, 2011	rato	8 mg/kg	5 adm por 5 d	-	não	24 h após tratamento	NAc	membrana, intracelular	GluA1 e GluA2	sem efeito
Ding, X et al., 2013	rato	2- mg/kg	dose fixa (F): 21 d de 2 mg/kg ou dose crescente (C): 8 d de 2 mg/kg + 14 d dose variável	-	não	7 d	estriado ventral	homogenato	GluA1p(S845), GluA1p(S831) e GluA1	sem desafio: doses C - aumento de GluA1(S845)/GluA1
				7 d	sim	30 min após desafio				desafio: sem efeito
Glass, M J et al., 2008	rato	18,9-69mg/kg	3 doses diárias por 14 d	-	não	60 min pós-tratamento	NAc centro	localização nas células	GluA1	NAc centro: diminui GluA1 na membrana de neurônios D1 positivos
							NAc periferia			NAc periferia: diminui GluA1 na MP de neurônios D1 negativos

Fonte: produzida pela autora. A tabela acima mostra alguns resultados de uma seleção de trabalhos com morfina. adm: administrações da droga; EPSC: corrente excitatória pós-sináptica; M: membrana; I: intracelular; HC: administrações na caixa moradia; CP-AMPA: AMPA permeável à cálcio. * 5 d de administração na caixa moradia, 3 d de abstinência e 2 d de administração no CPL.

Não encontramos trabalhos que avaliassem o efeito da morfina após 48 h do desafio. O fato de a GluA1p (S845) no HPCd não persistir até 48 h após o desafio em nosso trabalho pode dever-se a existir um rápido aumento de fosforilação, seguida de um rápido retorno aos níveis basais. Como explicação alternativa, pode ser que a ausência de um período prolongado de abstinência após os condicionamentos, ou um período maior após o desafio, tenha sido importante para ausência de alteração, já que parece haver um aumento de GluA1 dependente do tempo de abstinência (Zhong *et al.*, 2006). Além disso, diferenças no protocolo utilizado neste trabalho e na análise do conteúdo total das células (e não especificamente das membranas ou em células espinhosas médias) podem ter influenciado nosso resultado.

Em relação a GluA2 total no HPCd, em 15 min a morfina induziu aumento, mas a inibição da reconsolidação pela CHX não teve efeito em relação aos grupos salina (fig. 12A). Em 48 h não houve alteração, embora tenha havido uma tendência na CHX diminuir GluA2 ($P=0,091$ em relação ao grupo morf-DMSO, fig. 12B). Zhong *et al.* (2006) observaram que imediatamente após a última injeção de morfina (sem desafio) houve um aumento de dímeros GluA2/3 nas membranas de células no HPC e esse aumento foi ainda maior em análises posteriores (de 2 h a 20 d), demonstrando que existe uma modulação de GluA2/3 dependente do tempo de retirada da droga. No entanto, após o desafio, GluA2 aparece diminuída (na densidade pós-sináptica, mas não no homogenato total), sem afetar os níveis de fosforilação da tirosina 876 (Xia *et al.*, 2011). As injeções de morfina na caixa moradia (e não em um contexto novo) por si só podem diminuir GluA2 (embora sua forma fosforilada aumente) em 12 h, o que não permanece em 7 d (mesmo trabalho). Isso indica que morfina por si só pode alterar a recepção glutamatérgica no HPC, apesar de que o mesmo tratamento em outro trabalho não teve efeito (Billa *et al.*, 2010).

Os receptores AMPA que contém GluA2 são impermeáveis a cálcio, o que confere maior estabilidade do receptor, e está aumentado após a consolidação da memória (Hong *et al.*, 2013). Por outro lado, a ausência de GluA2 nesses receptores permite condutância de cálcio via AMPA permeável à cálcio (CP-AMPA; Huganir & Nicoll, 2013), que está relacionado com fenômenos plásticos, como aqueles que ocorrem na fase inicial de reconsolidação (Hong *et al.*, 2013). Apesar de não termos avaliado especificamente o CP-AMPA, evidências indicam que há um aumento deste após o desafio (Xia *et al.*, 2011) ou 12 h após a última administração de morfina (Billa *et al.*, 2010), o que contradiz a possibilidade de que o aumento de GluA2 se expresse como diminuição de CP-AMPA. De forma alternativa, trabalhos com psicoestimulantes indicam que o desafio induz LTD no NAc 24 h depois, mas não aos 30 min, (Thomas *et al.*, 2001) e foi demonstrado que a LTD reduz os níveis de CP-AMPA (Clem & Huganir, 2010). Dessa forma, é possível que haja uma dinâmica diferente para

ação de opioides e a variação em GluA2 apareça logo após o desafio, como encontramos. Mais experimentos seriam necessários para investigar essa hipótese.

No NAc, a morfina induziu diminuição em GluA1p (S845) em 48 h (fig. 13B), embora não tenha tido efeito em 15 min (fig. 13A) nem tenha sido alterado os níveis totais de GluA1 (fig. 14). A inibição da reconsolidação também não teve efeito nessa quantificação. O único trabalho encontrado com uso de morfina comparável aos efeitos do desafio encontrou o mesmo resultado, isto é, que o desafio não altera GluA1p (nem S845, nem S831) nem mesmo GluA1 total pouco tempo após o desafio (30 min), embora não tenham sido feitas análises tardias (Ding *et al.*, 2013). Nesse mesmo trabalho o mesmo tratamento sem o desafio apresentou aumento de GluA1p (S845 apenas) em relação ao total de GluA1, demonstrando que o teste de sensibilização afeta a dinâmica de GluA1. Outros trabalhos com administrações repetidas não encontraram mudanças de GluA1 na membrana 24 h após o tratamento (Mickiewicz & Napier, 2011) ou mesmo após 14 d (aqui foi encontrada uma tendência em aumentar, $P=0,081$, Herrold *et al.*, 2013), embora tenha sido encontrado aumento de GluA1p na tirosina 831 após teste de CPL (Morón *et al.*, 2010). No CPL com cocaína, há um aumento de GluA1p (S845) imediatamente após o teste em relação a GluA1 total no NAc, revertido após a inibição da reconsolidação (Valijent *et al.*, 2006), que não foi visto no nosso trabalho possivelmente pelo número de animais que dispomos para análise, droga usada, teste de sensibilização e tratamento amnésico pós-reativação.

Esses resultados não distinguem sub-regiões do NAc ou diferentes tipos de células. O NAc é composto por uma região central (*core*) e outra periférica (*shell*) com diferentes aferências e eferências que as distinguem funcionalmente (Salgado & Kaplitt, 2015), além de que pode-se separar os neurônios espinhosos médios em D1 positivos e D2 positivos (uma minoria de células apresentam ambos receptores), que também apresentam funções distintas. Glass *et al.* (2008) também verificaram diminuição de GluA1 no NAc após tratamento com morfina, porém essa diminuição ocorre em diferentes neurônios em cada sub-região, demonstrando que a plasticidade no NAc é bastante complexa (Glass *et al.*, 2008). A diminuição de GluA1 está de acordo com a diminuição da arborização dendrítica e de espinhos nessa estrutura (revisão em Russo *et al.*, 2010 e Dacher & Nugent, 2011). Em contraposição, em outro trabalho foi visto fortalecimento sináptico (relação entre corrente de AMPA/NMDA) em neurônios D1 exclusivamente na periferia do NAc após 10-14 dias de abstinência (Hearing *et al.*, 20016), o que indica um aumento da atividade de receptores AMPA e um provável aumento de subunidades GluA. Em conjunto, os trabalhos apresentam divergências nos resultados que refletem a gama de variáveis envolvidas na plasticidade do NAc e a complexidade dos circuitos envolvidos no uso de drogas.

Em relação a GluA2 no NAc, em 15 min houve um aumento no grupo morf-DMSO e o morf-CHX apresentou níveis intermediários dessa subunidade, sem apresentar diferenças estatisticamente significativas entre este último e os demais grupos (fig. 15A). Já em 48 h, a CHX teve efeito de diminuir GluA2 no grupo morfina, enquanto que os animais morfina controle retornaram a níveis comparáveis aos grupos salina (fig. 15B). No NAc, são escassos os trabalhos que avaliam GluA2 com morfina e parece não haver dados sobre o efeito do desafio. Os trabalhos encontrados não indicam nenhuma mudança em 24 h (Mickiewicz & Napier, 2011) ou 14 d (Herrold *et al.*, 2013) após a última administração da droga. Isso pode ser explicado pelo momento da análise, em 15 min após o desafio há aumento transitório que não se mantém em 48 h, que possivelmente poderia já ser evidenciado em uma análise 24 h após a última administração de morfina. Porém, essa afirmação tem pouca sustentação, já que nestes trabalhos não existe teste de sensibilização. Além disso, a CHX no grupo morfina diminuiu os níveis de GluA2. Se considerarmos que o aumento de GluA2 está relacionado com a estabilidade do traço de memória (Hong *et al.*, 2013), como foi visto no teste em 15 min, a inibição da reconsolidação (experimentos 3A e 3B) pela CHX pode ter refletido na diminuição dessa subunidade, sendo um correlato molecular da reversão do comportamento. Em contrapartida, no grupo que manteve a memória da recompensa (morf-DMSO), não manteve quantidades elevadas de GluA2. A razão disso e de que os níveis de GluA2 para morf-CHX estão abaixo dos controles salinas permanece sem resposta conclusivas e mais experimentos seriam necessários para entendê-la.

Alguns trabalhos com sensibilização a psicoestimulantes também avaliaram modificações glutamatérgicas a nível de receptores e subunidades AMPA e parece ter sido mais investigado e melhor compreendida a função da dopamina nesses casos. Alguns trabalhos indicam que em tempo "remoto" após a aquisição - geralmente passadas algumas semanas - existe um aumento de GluA1 e GluA2 no NAc positivamente relacionado com o nível de sensibilização, embora 1 dia depois da aquisição não haja mudança nesses níveis (Boudreau & Wolf, 2005; Boudreau *et al.*, 2007; Ferrario *et al.*, 2009). Esses achados encaixam com a ideia de que a dopamina liberada com a droga facilita a plasticidade e formação de memórias (Wolf, 2010a) e que o NAc atua como uma estrutura integradora de informações límbicas e corticais (Salgado & Kaplitt, 2015). A estimulação de receptores D1 aumenta a fosforilação (Chartoff *et al.*, 2006) e induz inserção de GluA1 extrassináptico em neurônios espinhosos médios do NAc, o que diminui o limiar para indução de LTP por estimulação de neurônios corticais (Sun *et al.*, 2008; Wolf, 2010a). Também foi demonstrado que o Córtex Pré-Frontal (PFC) é importante para a aquisição, já que envia eferências excitatórias para a Área Tegmental Ventral (VTA) e, quando lesionado, previne a aquisição da sensibilização e previne recaídas, além de que a abstinência prolongada facilita comportamentos de busca e sensibilização mais robusta (Hyman *et al.*, 2006). Dessa forma, a comunicação entre o PFC e o NAc é imprescindível

para a expressão da sensibilização e comportamentos de busca, e a comunicação excitatória entre essas estruturas parece ser fortalecida ao longo da abstinência. Porém, quando os animais são desafiados, há uma redução nos níveis de GluA1 e GluA2/3 no NAc 24 h mais tarde, que retorna àquele nível aumentado uma semana após o teste (Ferrario *et al.*, 2009).

As mudanças na recepção glutamatérgica na literatura de drogas sustenta a hipótese de neuroadaptações subjacentes às mudanças comportamentais e que existe uma flutuação dessas alterações dependendo da fase após às administrações (poucos dias ou semanas após a aquisição ou após um desafio), que parecem modular a motivação e os comportamentos de busca. Porém, os resultados têm certa variabilidade e, apesar dos avanços na área, persistem lacunas na compreensão do que ocorre exatamente em cada estrutura e nos circuitos envolvidos, o que garante, atualmente, um vasto campo de pesquisa. Dessa forma, nossos experimentos permitem, em linhas gerais, concluir que há indícios de uma modulação dos receptores AMPA no HPC e NAc envolvidos na mediação de comportamentos de busca e sensibilização locomotora induzidos pela morfina, embora não tenhamos determinado conclusivamente o correlato molecular da reversão de comportamentos de dependência. Naturalmente, não apenas receptores AMPA estão envolvidos, podendo também implicar em receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA (Peters & Vries, 2012) e metabotrópicos (Herrold *et al.*, 2013), em propriedades intrínsecas da membrana e até mesmo de transportadores de glutamato-cistina em células gliais (Wolf, 2010b; Nestler, 2005), que não foram o foco deste trabalho, mas que não excluímos a possibilidade de estarem alterados.

Dando sequência às nossas perguntas, no experimento 4 e 5 queríamos explorar em maior profundidade a participação específica de duas estruturas-chave - uma envolvida na mediação de memórias associativas, o HPCd, e outra em comportamentos de dependência, o NAc - no efeito encontrado antes com infusão sistêmica de inibidor de síntese proteica. Queríamos, enfim, saber se inibindo a reconsolidação no cNAc ou no HPCd poderíamos reverter diferentes aspectos da memória de recompensa (preferência ou sensibilização). Porém, a morfina infundida sistemicamente nas não foi capaz de induzir preferência por local nem sensibilização locomotora (figs. 16-19), pelo menos com o número de animais disponíveis durante esses experimentos. Apenas no grupo morf-DMSO do experimento 5 (fig. 18) verificou-se aumento pouco duradouro da preferência, como se observa na sessão de reativação, mas que não se mantém na sessão de teste, o que sugere que a memória seja fraca e decaia facilmente. O pobre desempenho destes animais canulados intracerebralmente pode dever-se, em parte, ao fato de os mesmos terem sido operados estereotaxicamente entre 6 e 7 dias antes do início dos experimentos. Mesmo com o tratamento pós-operatório, utilizando-se antibiótico e anti-inflamatório com ação analgésica, a cirurgia estereotóxica é invasiva e induz processo inflamatório que pode ter efeitos diferentes em diferentes indivíduos, e assim, modificar a resposta à

morfina. Em particular, pode-se mencionar que a dor do tipo inflamatória induz ativação sustentada de receptores k-opioides, envolvidos no alívio da dor e na prevenção de reforço de drogas (Wang *et al.*, 2010), diminuição da ativação dopaminérgica e – especificamente - *inibição do efeito reforçador no CPL pela morfina* (Narita *et al.*, 2005), ou seja, pode afetar diretamente os animais neste modelo experimental. Por outro lado, no mesmo modelo, a morfina foi capaz de facilitar a aquisição do CPL por modulação gabaérgica na Amígdala central (Zhang, Z *et al.*, 2014). Em casos de dor do tipo neuropática, foi demonstrado que existe modulação nos receptores μ -opioides, responsáveis pelos efeitos reforçadores positivos da morfina, na VTA, diminuição da resposta dopaminérgica e supressão do efeito reforçador no CPL induzidos por morfina (Ozaki *et al.*, 2002) e no efeito reforçador da estimulação elétrica encefálica (Ewan *et al.*, 2011). Nossos animais não apresentaram sinais aparentes de dor, mas sim de inflamação branda visível na pele ao redor do capacete, embora não tenhamos avaliado dor ou inflamação. Por isso, é possível que essa inflamação tenha interferido na ativação de receptores opioidérgicos, ativação do sistema mesocorticolímbico e, conseqüentemente, tenha prevenido os efeitos da morfina nos experimentos 4 e 5. Porém, mais investigações seriam necessárias para definir o que está afetando os comportamentos aditivos em animais operados, o que vai além do escopo deste trabalho.

Dessa forma, nossa hipótese de que O HPCd e o NAc medeiam efetivamente diferentes comportamentos de dependência não pode ser demonstrada conclusivamente neste trabalho. Porém, a participação de um mecanismo dependente de síntese proteica (infundida sistemicamente) – a reconsolidação – na abolição de uma associação estabelecida entre contexto e morfina é um achado importante deste trabalho.

Estudos com morfina no CPL e na sensibilização em ratos submetidos a cirurgia estereotáxica verificaram efeito da morfina, portanto, parece que o efeito da cirurgia poderia ser controlado com modificações no protocolo (Robinson & Franklin, 2006; Taubensfeld *et al.*, 2010). Futuros experimentos que explorem condicionamentos mais robustos (doses mais altas, mais administrações ou sessões mais longas) poderão viabilizar a investigação dessa questão.

Este trabalho dá sustentação à ideia de que interferir na reconsolidação de memórias relacionadas a drogas de abuso pode ser uma importante estratégia na clínica para atenuar comportamentos patológicos motivados. Pela primeira vez, até onde sabemos, conseguimos demonstrar que, com *uma única e simples sessão de reativação* da memória de recompensa à morfina foi possível enfraquecer o comportamento de busca disparado pelo contexto e abolir a sensibilização locomotora dependente de contexto, devido à da inibição da reconsolidação dessa memória. Nosso trabalho também levantou indícios de que o HPCd e o NAc são estruturas importantes nesses comportamentos, uma vez que se observaram modificações plásticas nos

receptores glutamatérgicos do tipo AMPA. No entanto, futuros estudos serão necessários para avaliar se a inibição da reconsolidação nessas estruturas é suficiente para reverter aspectos dissociáveis da memória de recompensa à morfina, permitindo compreender o papel específico do HPCd e do cNAc.

6. CONCLUSÕES

Nosso estudo permite concluir que:

- I. é possível reverter diferentes parâmetros da memória de recompensa, a preferência por local e a sensibilização locomotora, inibindo-se farmacologicamente, com inibidor de síntese proteica, a reconsolidação da memória de contexto associada à morfina logo após uma única reexposição a esse contexto, livre de drogas - isto é, após a reativação da memória;
- II. a morfina, no Condicionamento de Preferência por Local e na Sensibilização Locomotora, induziu modificações plásticas nos receptores glutamatérgicos AMPA no Núcleo *Accumbens* e Hipocampo dorsal (em GluA1p na serina 845 em GluA2 total), mas apenas houve o bloqueio dos mecanismos desencadeados pela reconsolidação (com CHX) no Núcleo *Accumbens*, com diminuição de GluA2.

7. PERSPECTIVAS

- I. Verificar se a expressão da sensibilização locomotora é dependente do contexto de aquisição no protocolo utilizado no presente trabalho.
- II. Explorar as variáveis dose de morfina e tempo de condicionamento em animais canulados no Hipocampo dorsal e no Núcleo *Accumbens* com o objetivo de induzir preferência por local e sensibilização locomotora.
- III. Avaliar se o prejuízo local da reconsolidação da memória no Hipocampo dorsal e no Núcleo *Accumbens* reverte de forma diferencial a preferência por local e a sensibilização locomotora.

8. REFERÊNCIAS

- Alberini, C M. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *TRENDS in Neurosciences*, 28(1): 51-56, 2005.
- Anggono, V, & Huganir, R L. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(3), 461–469, 2012.
- Ashby, C R, Paul, M, Gardner, E L, Heidbreder, C A & Hagan, J J. Acute Administration of the Selective D3 Receptor Antagonist SB-277011A Blocks the Acquisition and Expression of the Conditioned Place Preference Response to Heroin in Male Rats. *Synapse*, 48:154–156, 2003.
- Badiani, A, Belin, D, Epstein, D, Calu, D & Shaham, Y. Opiate versus psychostimulant addiction: the differences do matter. *Nature Reviews Neuroscience* 12: 685-700, 2011.
- 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*, 32: 1738–1749, 2007.
- Bernardi, R E; Lattal K M & Berger S P. Anisomycin Disrupts a Contextual Memory Following Reactivation in a Cocaine-Induced Locomotor Activity Paradigm. *Behavioral Neuroscience*, 121: 156–163, 2007.
- Bernardi, R E, Ryabini, A E, Berger, S P & Lattal, K M. Post-retrieval disruption of a cocaine conditioned place preference by systemic and intrabasolateral amygdala β_2 - and α_1 -adrenergic antagonists. *Learn. Mem.*, 16: 777-789, 2009.
- Berridge, K C & Robinson, T E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact , reward learning or incentive salience? *Brain Research Reviews*, 28: 309–369,1998 .
- Billa, S K, Sinha, N, Rudrabhatla, S R & Morón, J A. Extinction of morphine-dependent conditioned behavior is associated with increased phosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors at hippocampal synapses. *The European Journal of Neuroscience*, 29(1), 55–64, 2009.
- Billa, S K, Liu, J, Bjorklund, N L, Sinha, N, Fu, Y, Shinnick-gallagher, P & Moro, J A. Increased Insertion of Glutamate Receptor 2-Lacking α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole Propionic Acid (AMPA) Receptors at Hippocampal Synapses upon Repeated Morphine Administration. *Mol Pharmacol*, 77(5), 874–883, 2010.

Blanco, E, Galeano, P, Palomino, A, Pavón, F J, Rivera, P, Serrano, A, Alen, F, Rubio, L, Vargas, A, Castilla-Ortega, A, Decara, J, Bilbao, A, Fonseca, F R, Suárez, J. Cocaine-induced behavioral sensitization decreases the expression of endocannabinoid signaling-related proteins in the mouse hippocampus. *European Neuropsychopharmacology*, 26(3), 477–492, 2016.

Boudreau, A C & Wolf, M E. Behavioral Sensitization to Cocaine Is Associated with Increased AMPA Receptor Surface Expression in the Nucleus Accumbens. *The Journal of Neuroscience*, 25(40), 9144–9151, 2005.

Boudreau, A C, Reimers, J M, Milovanovic, M & Wolf, M E. Cell Surface AMPA Receptors in the Rat Nucleus Accumbens Increase during Cocaine Withdrawal But Internalize after Cocaine Challenge in Association with Altered Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases. *The Journal of Neuroscience*, 27(39): 10621–10635, 2007.

Bouton, M E. Context and Behavioral Processes in Extinction. *Learn. Mem.*, 11: 485-494, 2004.

Braida, D, Iosue, S, Pegorini, S & Sala, M. D9 -Tetrahydrocannabinol-induced conditioned place preference and intracerebroventricular self-administration in rats. *European Journal of Pharmacology* 506: 63– 69, 2004.

Browman, K E, Badiani, A & Robinson, T E. Modulatory Effect of Environmental Stimuli on the Susceptibility to Amphetamine Sensitization: A Dose-Effect Study in Rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 287(3): 1007–101, 1998.

Carlezon, W A, Boundy, V A, Haile, C N, Lane, S B, Kalb, R.G, Neve, R L & Nestler, E J. Sensitization to Morphine Induced by Viral-Mediated Gene Transfer. *Science*, 277: 812–814, 1997.

Carlezon, W A & Nestler, E J. Elevated levels of GluR1 in the midbrain: a trigger for sensitization to drugs of abuse? *TRENDS in Neurosciences*, 25(12): 610–615, 2002.

Carlini, E A; Galduróz, J C; Noto, A R; Carlini, C M; Oliveira, L G; Nappo, S A; Moura, I G & Sanches, Z M. II levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país - 2005. São Paulo: Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, Universidade Federal de São Paulo; 2006.

Carneiro, H. As necessidades humanas e o proibicionismo das drogas no século. Outubro, IES, São Paulo, v 6, p 115–128, 2002.

Chartoff, E H, Mague, S D, Barhight, M F, Smith, A M, & Carlezon, W A. Behavioral and Molecular Effects of Dopamine D 1 Receptor Stimulation during Naloxone-Precipitated Morphine Withdrawal. *The Journal of Neuroscience* 26(24): 6450–6457, 2006.

Clem, R L & Huganir, R L. Calcium-Permeable AMPA Receptor Dynamics Mediate Fear Memory Erasure. *Science*, 330: 1108-1112, 2010.

Crestani, A P, Boos, F Z, Haubrich, J, Ordoñez, R O, Santana, F, Duran, J M, Cassini, L F, De Oliveira Alvares, L & Quillfeldt, J A. Memory reconsolidation may be disrupted by a distractor stimulus presented during reactivation. *Scientific Reports*, 5:1–9, 2015.

Cunningham, C L & Gremel, C M. Proximal ethanol pretreatment interferes with acquisition of ethanol-induced conditioned place preference. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 85: 612–619, 2006.

Dacher, M & Nugent, F S. Neuropharmacology Opiates and plasticity. *Neuropharmacology*, 61(7): 1088–1096, 2011.

Dalley, J W; Laane, J; Theobal, D E H; . Armstrong, H C; R. Corlett, P R; Chudasama, Y; Robbins, T W. Time-limited modulation of appetitive Pavlovian memory by D1 and NMDA receptors in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 6189–6194, 2005.

de Oliveira Alvares, L, Crestani, A P, Cassini, L F, Haubrich, J, Santana, F & Quillfeldt, J A. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*, 244: 42–48, 2013.

Devietti, T L, Kirkpatrick, B R. The amnesia gradient: inadequate as evidence for a memory consolidation process. *Science*, 194: 438-440, 1976.

Di Chiara, G & Bassareo, V. Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Current Opinion in Pharmacology*,7(1): 69–76, 2007.

Di Chiara, G & Imperato, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Neurobiology*, 85(14): 5274–5278, 1988.

Di Ciano, P, Cardinal, R N, Cowell, R A, Little, S J & Everitt, B J. Differential Involvement of NMDA , AMPA / Kainate , and Dopamine Receptors in the Nucleus Accumbens Core in the Acquisition and

Performance of Pavlovian Approach Behavior. *The Journal of Neuroscience*, 21(23), 9471–9477, 2001.

Ding, X, Liang, J, Zheng, X, Bai, Y, Liu, Z, Li, Y & Xing, X. Altered phosphorylation of GluA1 in the striatum is associated with locomotor sensitization induced by exposure to increasing doses of morphine. *European Journal of Pharmacology*, 702(1-3): 294–301, 2013.

Dong, Y, Saal, D, Thomas, M, Faust, R, Bonci, A, Robinson, T & Malenka, R C. Cocaine-induced potentiation of synaptic strength in dopamine neurons : Behavioral correlates in GluRA (-/-) mice. *PNAS*, 101(39): 14282–14287, 2004.

DSM-5. *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais*, 2013.

Escosteguy-Neto, J C, Varela, P, Correa-Neto, N F, Coelho, L S, Onaivi, E S & Santos-Junior, J G. Reconsolidation and update of morphine-associated contextual memory in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 130: 194–201, 2016.

Everitt, B J & Robbins, T W. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion, *Nature Neuroscience*, 8(11): 1481–1490, 2005.

Everitt, B J & Robbins, T W. From the ventral to the dorsal striatum : Devolving views of their roles in drug addiction. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(9): 1946–1954, 2013.

Ewan, E E & Martin, T J. Opioid Facilitation of Rewarding Electrical Brain Stimulation Is Suppressed in Rats with Neuropathic Pain. *Anesthesiology*, 114 (3): 624-632, 2011.

Fakira, A K, Portugal, G S, Carusillo, B, Melyan, Z & Morón, J A. Increased Small Conductance Calcium-Activated Potassium Type 2 Channel-Mediated Negative Feedback on N-methyl-D-aspartate Receptors Impairs Synaptic Plasticity Following Context-Dependent Sensitization to Morphine. *Biol Psychiatry*, 5: 105–114, 2014.

Fan, H, Cherg, C G, Yang, F, Cheng, L, Tsai, C, Lin, L & Yu, L. Systemic treatment with protein synthesis inhibitors attenuates the expression of cocaine memory. *Behavioural Brain Research*, 208(2): 522–527, 2010.

Fenu S, Spina L, Rivas E, Di Chiara G. Morphine-conditioned single-trial place preference: role of nucleus accumbens shell dopamine receptors in acquisition, but not expression. *Psychopharmacology*, 187: 143-153, 2006.

Ferrario, C R, Li, X, Wang, X, Reimers, J M, Uejima, J L & Wolf, M E. The Role of Glutamate Receptor Redistribution in Locomotor Sensitization to Cocaine. *Neuropsychopharmacology*, 35(3): 818–833, 2009.

Fields, H L & Margolis, E B. Understanding opioid reward. *Trends in Neurosciences*, 38(4): 217–225, 2015.

Gaiardi, M, Bartoletti, M, Bacchi, A, Gubellini, C, Costa, M & Babbini, M. Psychopharmacology Role of repeated exposure to morphine in determining its affective properties: place and taste conditioning studies in rats. *Psychopharmacology*, 103: 183–186, 1991.

Glass, M J, Lane, D A, Colago, E E O, Chan, J, Schlussman, S D, Zhou, Y, Kreek, M J & Pickel, V M. Chronic administration of morphine is associated with a decrease in surface AMPA GluR1 receptor subunit in dopamine D1 receptor expressing neurons in the shell and non-D1 receptor expressing neurons in the core of the rat nucleus accumbens. *Experimental Neurology*, 210: 750–761, 2008.

Häggkvist, J, Lindholm, S & Franck, J. The effect of naltrexone on amphetamine-induced conditioned place preference and locomotor behaviour in the rat. *Addiction Biology*, 14(3): 260–269, 2009.

Haubrich, J, Crestani, A P, Cassini, L F, Santana, F, Sierra, R O, de Oliveira Alvares, L & Quillfeldt, J A. Reconsolidation Allows Fear Memory to Be Updated to a Less Aversive Level through the Incorporation of Appetitive Information. *Neuropsychopharmacology*, 40(2): 315–326, 2014.

Hearing, M C, Jedynaka, J, Ebner, S R, Ingebreton, A, Aspa, A J, Fischera, R A, Schmidta, C, Larson, E B & Thomas, M J. Reversal of morphine-induced cell-type-specific synaptic plasticity in the nucleus accumbens shell blocks reinstatement, *PNAS*, 113(3): 757–762, 2016.

Heidbreder, C A, Thompson, A C & Shippenberg, S T. Role of Extracellular Dopamine in the Initiation and Long-term Expression of Behavioral Sensitization to Cocaine of cocaine. *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 278(2): 490–502, 1996.

Herrold, A A, Persons, A L & Napier, T C. Cellular distribution of AMPA receptor subunits and mGlu5 following acute and repeated administration of morphine or methamphetamine. *Journal of Neurochemistry*, 126(4): 503–517, 2013.

Hyman, S E & Malenka, R C. Addiction and the brain: The neurobiology of compulsion and its persistence. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(10): 695-703, 2001.

- Hyman, S E. Addiction: A Disease of Learning and Memory. *American Journal of Psychiatry*, 162(8): 1414-1422, 2005.
- Hyman, S E, Malenka, R C & Nestler, E J. Neural Mechanisms of Addiction: The Role of Reward-Related Learning and Memory. *Annu. Rev. Neurosci.*, 29(1): 565-598, 2006.
- Hong, I, Kim, J, Kim, J, Lee, S, Ko, H, Nader, K, Kaangam B, Tsien, R W & Choi, S. AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval. *PNAS*, 111(2): 875–876, 2014.
- Hsiang, H L, Epp, J R, Oever, M C, Yan, C, Rashid, A J, Insel, N, Ye, L, Niibori, Y, Deisseroth, C, Frankland, P W & Josselyn, S A. Manipulating a “ Cocaine Engram ” in Mice. *The Journal of Neuroscience*, 34(42): 14115–14127, 2014.
- Huganir, R L & Nicoll, R A. Perspective AMPARs and Synaptic Plasticity: The Last 25 Years. *Neuron*, 80(3): 704–717, 2013.
- Jarome, T J, & Helmstetter, F J. Protein degradation and protein synthesis in long-term memory formation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7: 1–12, 2014.
- Johansen, J P, Cain, C K, Ostroff, L E & LeDoux, J E. Molecular Mechanisms of Fear Learning and Memory. *Cell*, 147(3): 509–524, 2011.
- Josselyn, S A, Köhler, S & Frankland, P W. Finding the engram. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(9): 521–534, 2015.
- Kalivas, P W & Duffy, P (1987). Sensitization to Repeated Morphine Injection in the Rat: Possible Involvement of A10 Dopamine Neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 241(1): 204–212.
- Kalivas, P W, Lalumiere, R T, Knackstedt, L & Shen, H. Glutamate transmission in addiction. *Neuropharmacology*, 56: 169–173, 2009.
- Kam, A Y F, Liao, D, Loh, H H & Law, P. Morphine Induces AMPA Receptor Internalization in Primary Hippocampal Neurons via Calcineurin-Dependent Dephosphorylation of GluR1 Subunits. *The Journal of Neuroscience*, 30(45), 15304–15316, 2010.
- Kauer, J A & Malenka, R C. Synaptic plasticity and addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 8: 844-858, 2007.

Kelley, A E. Memory and Addiction: Shared Neural Circuitry and Molecular Mechanisms. *Neuron*, 44: 161–179, 2004.

Koob, G F & Le Moal, M. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 363: 3113–3123, 2008.

Koya, E, Golden, S A, Harvey, B K, Guez-barber, D H, Berkow, A, Simmons, D E, Bossert, J M, Nair, S G, Uejima, J L, Marin, M T, Mitchell, T B, Farquhar, D, Ghosh, S C, Mattson, B J & Hope, B T. Targeted disruption of cocaine-activated nucleus accumbens neurons prevents context-specific sensitization. *Nature Neuroscience*, 12(8): 1069–1073, 2009.

Law, P Y, Wong, Y H & Loh, H H. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40: 389–430, 2000.

Le Moal, M. Individual vulnerabilities relative for potential pathological conditions. *Brain Research*, 2016.

Lee, J L C, Everitt, B J & Thomas, K L. Independent Cellular Processes for Hippocampal Memory Consolidation and Reconsolidation. *Science*, 304: 839-843, 2004 .

Lee, J L C, Di Ciano, P, Thomas, K L & Everitt, B J. Disrupting Reconsolidation of Drug Memories Reduces Cocaine-Seeking Behavior. *Neuron*, 47: 795–801, 2005.

Lee, J L C. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nature Neuroscience*, 11(11): 1264–1266, 2008.

Lee, J L C. Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends in Neurosciences*, 32(8): 413–420, 2013.

Lett, B T. Psychopharmacology Repeated exposures intensify rather than diminish the rewarding effects of amphetamine, morphine and cocaine. *Psychopharmacology*, 98: 357-362, 1989.

Li, Y, Acerbo, M J & Robinson, T E. The induction of behavioural sensitization is associated with cocaine-induced structural plasticity in the core (but not shell) of the nucleus accumbens. *European Journal of Neuroscience*, 20: 1647–1654, 2004.

Li, X, Li, J, Zhu, X, Cui, R & Jiao, J. Effects of physostigmine on the conditioned hyperactivity and locomotor sensitization to morphine in rats. *Behavioral Brain Research*, 206(2): 223–228, 2010.

- Lu, L, Xin, N X & Wen, G. Reactivation of morphine conditioned place preference by drug priming: role of environmental cues and sensitization. *Psychopharmacology*, 159: 125–132, 2002.
- Lüscher, C & Malenka R C. Drug-Evoked Synaptic Plasticity in Addiction: From Molecular Changes to Circuit Remodeling. *Neuron*, 69: 650-663, 2011.
- Mcgaugh, J L. Memory — a Century of Consolidation. *Science*, 287: 249-251, 2000.
- Mcgaugh, J L. Time-dependent processes in memory storage. *Science*, 153:1351-1358, 1966.
- Malenka. R C. Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. *Annals New York Academy of Sciences*, 1003: 1-11, 2003.
- Mattson, B J, Koya, E, Simmons, D E, Mitchell, T B, Berkow, A, Crombag, H S & Hope, B T. Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. *European Journal of Neuroscience*, 27: 202–212, 2008.
- Mendrek, A, Blaha, C D & Phillips, A G. Pre-exposure of rats to amphetamine sensitizes self-administration of this drug under a progressive ratio schedule. *Psychopharmacology*, 135:416–422, 1998.
- Mickiewicz, A L & Napier, T C. Repeated exposure to morphine alters surface expression of AMPA receptors in the rat medial prefrontal cortex. *European Journal of Neuroscience*, 33: 259–265, 2011.
- Migues, P V, Hardt, O, Wu, D C, Gamache, K, Sacktor, T C, Wang, Y T & Nader, K. PKM maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. *Nature Neuroscience*, 13: 630-634, 2010.
- Milekic, M H, Brown, S D, Castellini, C & Alberini, C M. Persistent Disruption of an Established Morphine Conditioned Place Preference. *The Journal of Neuroscience*, 26(11): 3010 –3020, 2006.
- Miller, C A & Marshall, J F. Altered Fos expression in neural pathways underlying cue-elicited drug seeking in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 21: 1385–1393, 2005a.
- Miller, C A & Marshall, J F. Molecular Substrates for Retrieval and Reconsolidation of Cocaine-Associated Contextual Memory. *Neuron*, 47: 873–884, 2005b.
- Misanin, J R, Miller, R R & Lewis, D J. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science*, 160: 554-55, 1968.

Mlewski, E C, Arias, C & Paglini, G. Association Between the Expression of Amphetamine-Induced Behavioral Sensitization and Cdk5 / p35 Activity in Dorsal Striatum. *Behavioral Neuroscience*, 130(1): 114–122, 2016.

Morón , J A, Abul-Husn, N S, Rozenfeld, R, Dolios, G, Wang, R & Devi, L A. Morphine Administration Alters the Profile of Hippocampal Postsynaptic Density-associated Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, 29–42, 2007.

Morón, J A, Gullapalli, S, Taylor, C, Gupta, A, Gomes, O & Devi, L A. Modulation of Opiate-Related Signaling Molecules in Morphine-Dependent Conditioned Behavior : Conditioned Place Preference to Morphine Induces CREB Phosphorylation. *Neuropsychopharmacology*, 35: 955–966, 2010.

Myers, K M & Davis, M. Mechanisms of fear extinction. *Molecular Psychiatry*, 12: 120–150, 2007.

Nader, K, Schafe, G E & Le Doux, J E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406: 722-726, 2000.

Narita, M, Kishimoto, Y, Ise, Y, Yajima, Y, Misawa, K & Suzuki, T. Direct Evidence for the Involvement of the Mesolimbic κ -Opioid System in the Morphine-Induced Rewarding Effect Under an Inflammatory Pain-Like State. *Neuropsychopharmacology*, 30: 111–118, 2005.

Nestler, E J. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nature Neuroscience*, 8(11): 1445–1449, 2005.

Nestler, E J. Reflections on: "A general role for adaptations in G-Proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function". *Brain Research*, 1–5, 2016.

Nona, C N, Lam, M & Nobrega, J N. *Pharmacology , Biochemistry and Behavior* Localized brain differences in Arc expression between mice showing low vs . high propensity to ethanol sensitization. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 142: 15–22, 2016.

Nygaard, S K, Klambatsen, A, Balouch, B & Jenab, S. Region and context-specific intracellular responses associated with cocaine-induced conditioned place preference expression. *Neuroscience*, 287: 1–8, 2015.

O’Brien, C P, Volkow N & Li, T K. What’s in a word? Addiction versus dependence in DSM-V. *Amer J Psychiatry*, 163: 764–765, 2006.

O'Brien, C P. Addiction and dependence in DSM-V. *Addiction*, 106(5): 866–867, 2011.

Ozaki, S, Narita, M, Narita, M, Iino, M, Sugita, J & Matsumura, Y. Suppression of the morphine-induced rewarding effect in the rat with neuropathic pain: implication of the reduction in μ -opioid receptor functions in the ventral tegmental area. *Journal of Neurochemistry*, 42: 1192–1198, 2002.

Paulson, P E, Camp, D M, & Robinson, T E. Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. *Psychopharmacology*, 103(4): 480–492, 1991.

Pavlov, I P. *Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. London: Oxford University Press, 1927.

Paxinos, G & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press, 1998.

Peters, J & Vries, T J. Glutamate Mechanisms Underlying Opiate Memories. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1-14, 2012.

Piazza, P V, Deminiere, J, Le Moal, M & Simon, H. Factors That Predict Individual Vulnerability Amphetamine Self-Administration. *Science*, 245: 1511–1513, 1989.

Pontieri F E; Tanda G & Di Chiara G. Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the “shell” as compared with the “core” of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 12304-12308, 1995.

Popik, P, Wrobel, M & Bisaga, A. Reinstatement of Morphine-Conditioned Reward is Blocked by Memantine. *Neuropsychopharmacology*, 31: 160–170, 2006.

Ramirez, S, Liu, X, Lin, P, Suh, J, Pignatelli, M, Redondo, R G, Ryan, T J & Tonegawa, S. Creating a False Memory in the Hippocampus. *Science*, 341: 987-391, 2013.

Raybuck, J D, McCleery, E J, Cunningham, C L, Wood, M A & Lattal, K M. Pharmacology, Biochemistry and Behavior The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate modulates acquisition and extinction of cocaine-induced conditioned place preference. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 106: 109–116, 2013.

Reichelt, A C & Lee, J L C. Memory reconsolidation in aversive and appetitive settings. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7(118): 1-18, 2013.

Robinson, M J F & Franklin, K B J. Effects of anisomycin on consolidation and reconsolidation of a morphine-conditioned place preference. *Behavioral Brain Research*, 178(1): 146–153, 2007.

Robinson, M J F & Franklin, K B J. Reconsolidation of a morphine place preference: Impact of the strength and age of memory on disruption by propranolol and midazolam. *Behavioural Brain Research*, 213(2): 201–207, 2010.

Robinson, M J F, Armon, M & Franklin, K B J. The effect of propranolol and midazolam on the reconsolidation of a morphine place preference in chronically treated rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5(42): 1–10, 2011.

Robinson, T E & Berridge, K C. The neural basis of drug craving: an incentive sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews*, 8: 247–291, 1993.

Robinson, T E & Berridge, K C. The psychology and neurobiology of addiction: An incentive-sensitization view. *Addiction*, 95: S91-S117, 2000.

Robinson, T E & Berridge, K C. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 363: 3137–3146, 2008.

Russo, S J, Dietz, D M, Dumitriu, D, Morrison, J H, Malenka, R C & Nestler, E J. The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends in Neurosciences*, 33(6): 267–276, 2010.

Russo, S J & Nestler, E J. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 14: 609-625.

Sadeghi, B, Ezzatpanah, S & Haghparast, A. Effects of dorsal hippocampal orexin-2 receptor antagonism on the acquisition, expression and extinction of morphine-induced place preference in rats. *Psychopharmacology*, 1-13, 2016.

Salgado, S & Kaplitt, M G. The Nucleus Accumbens: A Comprehensive Review. *Stereotact Funct Neurosurg*, 93: 75–93, 2015.

Sanchis-segura, C & Spanagel, R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addiction Biology*, 11: 2–38, 2006.

Schultz, W. Predictive Reward Signal of Dopamine Neurons. *The American Physiological Society*, 1-26, 1998.

Shippenberg, T S & Heidbreder, C. Sensitization to the Conditioned Pharmacological and Temporal Rewarding Effects Characteristics of Cocaine: Pharmacological and Temporal Characteristics. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 273(2):808-815, 1995.

Shippenberg, T S, Lefevour, A & Thompson, A C. Sensitization to the conditioned rewarding morphine and cocaine: differential effects of the κ -opioid receptor agonist U69593. *European Journal of Pharmacology*, 345: 27–34., 1998.

Singer, M. Anthropology and addiction: an historical review. *Addiction*, 107: 1747–1755, 2012.

Solomon, R L & Corbit, J D. An Opponent-process theory of motivation: I. temporal dynamics of affect. *Psychological Review*, 81(2): 119–145, 1974

Sorg, B A. Reconsolidation of drug memories. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(5): 1400–1417, 2012.

Spina L, Fenu S, Rivas E, Di Chiara G. Nicotine-conditioned single-trial place preference: selective role of nucleus accumbens shell dopamine D1 receptors in acquisition. *Psychopharmacology*, 84: 447-455, 2006.

Sullivan, R J & Hagen, E H. Psychotropic substance-seeking: evolutionary pathology or adaptation? *Addiction*, 97: 389–400, 2002.

Sun, X, Milovanovic, M, Zhao, Y & Wolf, M E. Acute and Chronic Dopamine Receptor Stimulation Modulates AMPA Receptor Trafficking in Nucleus Accumbens Neurons Cocultured with Prefrontal Cortex Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 28(16): 4216–4230, 2008.

Suzuki, A, Josselyn, S A, Frankland, P W, Masushige, S, Silva, A J & Kida, S. Memory Reconsolidation and Extinction Have Distinct Temporal and Biochemical Signatures. *The Journal of Neuroscience*, 24(20): 4787–4795, 2004.

Taubenfeld, S M, Muravieva, E V, Garcia-osta, A & Alberini, C M. Disrupting the memory of places induced by drugs of abuse weakens motivational withdrawal in a context- dependent manner. *PNAS*, 107(27): 12345–12350, 2010.

Tipps, M E, Raybuck, J D & Lattal, K M. Substance abuse, memory, and post-traumatic stress disorder. *Neurobiology of Learning and Memory*, 112: 87–100, 2014.

Théberge, F R M, Milton, A L, Belin, D, Lee, J L C & Everitt, B J. The basolateral amygdala and nucleus accumbens core mediate dissociable aspects of drug memory reconsolidation. *Learning & Memory*, 17: 444-453, 2010.

Thomas, M J, Beurrier, C, Bonci, A, Malenka, R C. Long term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine. *Nature Neuroscience*, 4(12): 1217–1223, 2001.

Torregrossa, M M, Corlett, P R & Taylor, J R. Aberrant learning and memory in addiction. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96: 609–623, 2011.

Torregrossa, M M & Taylor, J R. Learning to forget: manipulating extinction and reconsolidation processes to treat addiction. *Psychopharmacology*, 226: 659–672, 2013.

Tzschentke, T M. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drugs effects, recent progress and new issues. *Progress in Neurobiology*, 56(98): 613-672, 1998.

Tzschentke, T M. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addiction Biology*, 12: 227–462, 2007.

United Nations Office on Drugs and Crime, World Drug Report, 2012. United Nations publication, Sales No. E.12.XI.1.

United Nations Office on Drugs and Crime, World Drug Report, 2015. United Nations publication, Sales N°. E.15.XI.6.

Ungless, M A, Whistler, J L & Malenka, R C. Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature*, 411: 583–587, 2001.

Valjent, E, Corbille, A G, Bertran-Gonzalez, J, Herve, D & Girault, J A. Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference. *PNAS*, 103(8): 2933-2937, 2006.

Vanderschuren, L J M 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*, 151: 99–120, 2000.

Vekovischeva, I Y, Zamanillo, D, Echenko, O, Seppa, T, Uusi-Oukari, M, Honkanen, A, Seeburg, P H, Sprengel, H & Korpi, E R. Morphine-Induced Dependence and Sensitization Are Altered in Mice

Deficient in AMPA-Type Glutamate Receptor-A Subunits. *The Journal of Neuroscience*, 21(12): 4451–4459, 2001.

Vélez-Hernández, M E, Vazquez-Torres, R, Velasquez-Martinez, M C, Jimenez, L, Baez, F, Sacktor, T C, Jimenez-Rivera, C A. Inhibition of Protein Kinase Mzeta (PKM ζ) in the Mesolimbic System Alters Cocaine Sensitization in Rats. *J Drug Alcohol Res*, 2013.

Vezina, P, Lorrain, D S, Arnold, G M, Austin, J D & Suto, N. Sensitization of Midbrain Dopamine Neuron Reactivity Promotes the Pursuit of Amphetamine. *The Journal of Neuroscience*, 22(11), 4654–4662, 2002.

Vezina, P. Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27: 827–839, 2004.

Vezina, P, & Leyton, M. Conditioned cues and the expression of stimulant sensitization in animals and humans. *Neuropharmacology*, 56: 160–168, 2009.

Volkow, N D & Morales, M. The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell*, 162(4): 712–725, 2015.

Xia, Y, Fakira, A K, Melyan, Z, Neve, R, Lee, H T, Russo, S J, Liu, J & Morón, J. A. Hippocampal GluA1-Containing AMPA Receptors Mediate Context-Dependent Sensitization to Morphine. *The Journal of Neuroscience*, November, 31(45), 16279–16291, 2011.

Zhang, Z, Tao, W, Hou, Y, Wang, W, Lu, Y, & Pan, Z Z. Persistent Pain Facilitates Response to Morphine Reward by Downregulation of Central Amygdala GABAergic Function. *Neuropsychopharmacology*, 39(9), 2263–2271, 2014.

Wang, Y & Hsiao, S. Amphetamine Sensitization: Nonassociative and Associative Components. *Behavioral Neuroscience*, 117(5), 961–969, 2003.

Wang, Y, Sun, J, Tao, Y, Chi, Z & Liu, J. The role of κ -opioid receptor activation in mediating antinociception and addiction. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(9), 1065–1070, 2010.

Wei, S & Li, X. Differential effects of propranolol on conditioned hyperactivity and locomotor sensitization induced by morphine in rats. *Scientific Reports*, 4: 1–7, 2014.

Wise, R A & Koob, G F. The Development and Maintenance of Drug Addiction. *Neuropsychopharmacology*, 39(2): 254-262, 2014.

Wise, R A & Bozarth, M A. A Psychomotor Stimulant Theory of Addiction. *Psychological Review*, 94(4), 469–492, 1987.

Wolf, M E, Sun, X, Mangiavacchi, S & Chao, S Z. Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology*, 47: 61–79, 2004.

Wolf, M E. Regulation of AMPA Receptor Trafficking in the Nucleus Accumbens by Dopamine and Cocaine. *Neurotox Res*, 18: 393–409, 2010a.

Wolf, M E. The Bermuda Triangle of cocaine-induced neuroadaptations. *Trends in Neurosciences*, 33(9), 391–398, 2010b.

Zhu, X, Sun, W, Li, X, Tan, S & Zhang, X. Effects of spatial memory on morphine CPP and locomotor sensitization in mice. *Physiology & Behavior*, 149: 187–191, 2015.