UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

Pillar Campos Prado

**Alterações na dinâmica neural induzida pela preferência
condicionada ao lugar de ratos previamente tratados com o anestésico
dissociativo Ketamina**

RIBEIRÃO PRETO
2017

PILLAR CAMPOS PRADO

**Alterações na dinâmica neural induzida pela preferência
condicionada ao lugar de ratos previamente tratados com o anestésico
dissociativo Ketamina**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, como
parte das exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia

Orientação: Prof. Dr. Manoel Jorge Nobre do
Espírito Santo

RIBEIRÃO PRETO
2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Prado, Pillar Campos

Alterações na dinâmica neural induzida pela preferência condicionada ao lugar de ratos previamente tratados com o anestésico dissociativo Ketamina. Ribeirão Preto, 2017.

44p. : il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Santo, Manoel Jorge Nobre do Espírito.

1. Ketamina. 2. Glutamato. 3. Preferência condicionada ao lugar. 4. Labirinto circular elevado. 5. Proteína Fos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Pillar Campos Prado

Título: Alterações na dinâmica neural induzida pela preferência condicionada ao lugar de ratos previamente tratados com o anestésico dissociativo Ketamina

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Psicobiologia.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Manoel Jorge Nobre do Espírito Santo (Orientador)

Instituição: FFCL – USP

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico,

Aos meus pais Andréa e Cássio (in memorian). Vocês foram e sempre serão meu maior exemplo de força, dedicação, caráter e amor. Foi uma honra e um presente de Deus ter tido vocês na minha vida. Aos meus irmãos Wallace e Wesley, que unidos, seguimos em frente, levando os ensinamentos de nossos pais, além da Tia Salomé, que do seu jeitinho todo especial, com carinho e dedicação, sempre esteve preocupada com o meu bem estar. E também às minhas amigas de infância, Sandrine, Larissa e Mônia, que sempre me apoiaram e torcem por minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, que me deu a vida e um suporte através da fé, necessária para lutar e enfrentar todo os obstáculos, sem nunca desistir.

À minha família, que mesmo de longe sempre me deu suporte e apoio nos momentos que mais precisei em especial a Tia Arlete, Tio Palhão, a minha madrinha Leonina e padrinho Sandro Palhão e a prima Ana Maria, e todos os outros que de alguma forma contribuíram nessa caminhada.

Ao Prof. Manoel Jorge Nobre, meu orientador, que ofereceu suporte, parceria e companheirismo de uma forma divertida com suas piadas e todo ensinamento, que concretizou a elaboração e realização deste trabalho. Serei eternamente grata.

Às minhas companheiras e amigas de laboratório, Gleice Maria, Franciely Paliarin, pela amizade, colaboração ensinamentos e conselhos no dia-a-dia de trabalho. Vocês iluminaram meus dias com felicidade e carinho.

Às amigas Rebeca, Lígia, Roberta, e Alessandra, na qual começamos juntas essa caminhada, compartilhamos preocupações, aflições e muito trabalho, foram tantas descobertas e conquistas. Obrigada às amigas Renata, Juliana, Ana Luísa, Karina e Milene pelo apoio e amizade construída ao longo desse trabalho.

Ao meu amigo João Henrique pelo exemplo acadêmico, e pela cumplicidade, lealdade e amizade desde os tempos de cursinho.

Aos amigos do departamento de Pós-Graduação em Psicobiologia Brisa, Tamires, Rafael, Cazuya, Karim, Lívia em especial ao Gabriel, pela amizade, companheirismo e pelos momentos agradáveis que passamos juntos.

Às amizades que foram construídas em Ribeirão Preto, em especial a Rosana e a Liliane, pelos momentos inesquecíveis que passamos pelo ombro amigo e cumplicidade.

Aos amigos da escola de teatro TPC que inundaram meus dias com magia e arte.

Aos meus cachorros Nina e Zé Trindade amor que não se mede, amor em forma de pêlos.

Aos Professores da Banca, pelos conselhos, sugestões e interesse em contribuir para o desenvolvimento deste trabalho.

A Renata B. Vicentini, secretária do Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia da FFCLRP-USP, pelas orientações que foram essenciais.

E finalmente, à CNPQ, pelo auxílio financeiro.

Ninguém vence e vive sozinho... Obrigada a todos.

"O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente.... É coragem".

Guimarães Rosa

"Olhar para trás após uma longa caminhada pode fazer perder a noção da distância que percorremos, mas se nos detivermos em nossa imagem, quando a iniciamos e ao término, certamente nos lembraremos o quanto nos custou chegar até o ponto final, e hoje temos a impressão de que tudo começou ontem. Não somos os mesmos, mas sabemos mais uns dos outros. E é por esse motivo que dizer adeus se torna complicado! Digamos então que nada se perderá. Pelo menos dentro da gente".

Guimarães Rosa

Saber ver cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que a define como especial, um objeto singular. amigos e a família são fundamentais. Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e pessoas é mais preciso ainda.

Antoine de Sant-Exupéry

RESUMO

Prado, P. C. (2017). *Alterações na dinâmica neural induzida pela preferência condicionada ao lugar de ratos previamente tratados com o anestésico dissociativo Ketamina* (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

O anestésico dissociativo Ketamina pertence à classe farmacológica dos antagonistas não competitivos de receptores de glutamato do tipo NMDA. Esta substância é utilizada em situações diversas que envolvem alívio da dor, terapêutica dos quadros depressivos e anestesia parenteral segura. Apresenta a característica de intensificar as experiências sensoriais. Por esta razão, seu consumo entre a população jovem vem crescendo, quadro este que se agrava levando em consideração que boa parte dos indivíduos que fazem uso de Ketamina é de poli usuários. Apresenta também a propriedade de atuar em outros receptores no sistema nervoso central, como: no bloqueio dos receptores colinérgicos muscarínicos, na inibição tônica GABAérgica e na liberação de dopamina. Pouco se sabe sobre as áreas neurais ativadas por seu uso, diante de contextos específicos. Sabe-se, no entanto, que uma delas é o córtex pré-frontal. Supõe-se também sua importância nos transtornos de ansiedade, já que antagonistas de receptores NMDA reduzem sua intensidade, particularmente quando injetados em estruturas que notadamente estão relacionadas à expressão do medo e ansiedade incondicionados, como a substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo. Sendo assim, sugere-se que os efeitos da Ketamina se estendam desde sua influência sobre sistemas encefálicos vinculados à modulação de aspectos da personalidade, cognição e memória, até àqueles vinculados ao prazer, humor, medo e ansiedade. Este trabalho tentou preencher algumas dessas lacunas analisando os efeitos do tratamento crônico de Ketamina em diferentes doses. Grupos independentes de ratos *Wistar* foram submetidos aos procedimentos de condicionamento ao lugar (3 compartimentos) a caixa claro-escuro (2 compartimentos), para tentar estabelecer os efeitos reforçadores e aversivos da Ketamina. Para analisar alterações de cunho emocional geradas pelos tratamentos, foi utilizado o modelo labirinto circular elevado, associado à técnica de marcação imunohistoquímica da proteína Fos para identificar áreas neurais ativadas pela Ketamina no modelo de 3 compartimentos durante o teste. Sugerimos que a Ketamina em baixas doses apresenta a propriedade de induzir forte preferência condicionada ao contexto, este efeito parece depender do tipo de procedimento de escolhas não forçadas. Além disso, os efeitos reforçadores positivos da Ketamina apresentam um padrão dose-dependente, já que altas doses das substâncias produzem aversão e não preferência ao lugar de condicionamento. Em geral, uma mistura de efeitos reforçadores e aversivos foi notada neste trabalho.

Palavras-chave: Ketamina. Glutamato. Preferência condicionada ao lugar. Labirinto circular elevado. Proteína Fos.

ABSTRACT

Prado, P. C. (2017). *Changes in neural dynamics induced by the preference conditioned by the place of rats previously treated with the dissociative anesthetic Ketamine* (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

The dissociative anesthetic Ketamine belongs to the pharmacological class of non-competitive antagonists of glutamate receptors of the NMDA type. This substance is the chosen one for many situations involving the pain relief, depressive disorders treatment and safe parenteral anesthesia. It has the characteristic to intensify sensory experiences. Therefore, its consumption among young people is increasing; which will be worse considering that most of the individuals, who take ketamine, use other drugs as well. Ketamine also has the property of acting at other receptors in the central nervous system and the blockade of muscarinic cholinergic receptors of tonic GABAergic inhibition and release of dopamine. However, its influence on serotonergic mechanisms, action focus of most antidepressants, is not known. Nor certain neural areas activated by its use on specific contexts are clearly. It is known, however, that one of them is the prefrontal cortex. It is suspected its importance in anxiety disorders, since NMDA receptor antagonists reduce its intensity, particularly when injected into structures that are particularly related to the expression of unconditioned fear and anxiety, as the periaqueductal gray matter in the midbrain. Thus, this suggests that the effects of Ketamine extend from its influence on encephalic systems underlying the modulation aspects of personality and cognition and memory, to those linked to pleasure, humor, fear and anxiety. This project attempts to fill some of these gaps using independent groups of animals laboratory undergo a conditioned preference procedure by the place and a bright/dark test to try to establish the existence or not of reinforcing effects with the use of Ketamine. In order to identify the possible emotional nature of changes generated by the treatment, we will use the experimental model Preference Conditioned by the Place and the High Circular Labyrinth test, associated to immunostaining technique Fos protein. Our results suggest that, in low dosages, Ketamine presents the property of inducing a strong dependence conditioned to the context, this effect seems to depend on the type of procedure and not on the choices. Moreover, the positive reinforcing effects of Ketamine have a dose-dependent pattern, since high doses of the substances produce aversion and not preference to the place of conditioning. In general, a mixture of reinforcing and aversive effects was noted.

Keywords: Ketamine. Glutamate. Preference conditioned by the place. High circular labyrinth test. Fos protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Condicionamento Pavloviano empregado para estudar os mecanismos de aprendizagem	15
Figura 2 -	Esquema do protocolo experimental utilizado para o teste claro-Escuro	23
Figura 3 -	Esquema do protocolo experimental utilizado para o teste de Preferência Condicionada ao Lugar	24
Figura 4 -	Esquema do protocolo experimental utilizado para o teste Labirinto Circular Elevado.....	26
Figura 5 -	Gráficos dos efeitos da administração sub-crônica de doses escalonadas de Ketamina na preferência condicionada ao lugar de ratos condicionados no testeclaro-escuro.....	30
Figura 6 -	Gráficos dos efeitos promovidos pela administração subcrônica de doses de Ketamina na preferência condicionada ao lugar de ratos condicionados no compartimento de três câmaras.....	31
Figura 7 -	Gráficos dos efeitos promovidos sobre a reatividade comportamental de ratos testados no labirinto circular elevado a partir da administração subcrônica de 10mg/Kg de Ketamina.....	32
Figura 8 -	Média e EPM do número de células imunorreativos à proteína Fos.....	33
Figura 9 -	Fotomicrografias representativas de três regiões que apresentam ativação neural à preferência condicionada ao lugarinduzida pela dose de 10mg/Kg de Ketamina, como determinado pelo método imunohistoquímica de marcação da proteína da proteína Fos.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

AH	Hipotálamo Anterior
BLA	Núcleos Basolateral Amígdala
CeA	Núcleos Central da Amígdala
CPP	Preferência Condicionada ao Lugar
DA	Dopamina
DH	Hipocampo Dorsal
dPAG	Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal
dIPAG	Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsolateral
dmPAG	Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsomedial
DR	Núcleo Dorsal da Rafe
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
IC	Colículos Inferiores
IL	Infra-Límbico
LCE	Labirinto Circular Elevado
lpag	Substância Cinzenta Periaquedutal lateral
MnR	Núcleo Mediano da Rafe
NAc	Núcleo <i>Accumbens</i>
NAcC	Núcleo <i>Accumbens Core</i>
NACSh	Núcleo <i>Accumbens Shell</i>
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal
PrL	Córtices Pré-límbico
SC	Colículos Superiores
s.c.	Subcutaneamente
SNC	Sistema Nervoso Central
TCE	Teste claro-escuro
VH	Hipocampo Ventral
vIPAG	Substância Cinzenta Periaquedutal Ventrolateral
VMH	Hipotálamo Ventromedial
VTA	Área Tegmental Ventral

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
1.1.	Ketamina	12
1.2.	Condicionamento Clássico e Condicionamento Operante	14
1.3.	Preferência Condicionada ao Lugar (CPP).....	15
1.4.	Alterações emocionais decorrentes da retirada de Ketamina.....	16
1.5.	Alterações das estruturas encefálicas	17
2.	OBJETIVOS	20
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1.	Animais.....	21
3.2.	Droga, dose e regime de dosagem	21
3.3.	Aparelhos e procedimentos experimentais	21
3.3.1.	Caixa claro-escuro (2 compartimentos).....	21
3.3.2.	Preferência Condicionada ao Lugar (3 compartimentos)	23
3.3.3.	Labirinto Circular Elevado (LCE)	25
3.4.	Imunorreatividade da proteína Fos	26
3.4.1.	Quantificação de células Fos positivas	27
3.5.	Análise Estatística.....	29
4.	RESULTADOS	30
5.	DISCUSSÃO	34
6.	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ketamina

A Ketamina, um antagonista não competitivo de receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) que apresenta fortes efeitos psicomiméticos tanto em humanos quanto em animais de laboratório (Krystalet al., 1994) é uma substância com propriedades dissociativas originalmente utilizada como anestésico. Sua biodisponibilidade, quando ingerida por via oral, é de apenas 16%, devido ao acentuado metabolismo de primeira passagem, o que pode explicar o porquê desta droga não ser comumente utilizada por esta via de administração. Por outro lado, a biodisponibilidade por via intramuscular, sublingual, aérea (por aspiração, a mais comum), ou endovenosa, é claramente maior, alcançando nesta última até 99% (Potter&Choudhury, 2014). Originalmente denominado "CI581", ela é um derivado de fenciclidina utilizado como anestésico em medicina veterinária e humana (Liu et al., 2016; Xu&Lei, 2014). Embora os antagonistas de NMDA produzam alucinações, delírios e tenham a capacidade de exacerbar a psicose em pacientes estabilizados (Malhotra et al., 1997), a Ketamina tornou-se uma droga abusiva (Blachut et al., 2009; Lim, 2003; Liu et al., 2016; Vollenweiner, Vontobel, Oye, Hell, &Leenders, 2000), principalmente pela sua capacidade de intensificar as experiências sensoriais (Dillon, Copeland, &Jansen, 2003) e sexuais (Lim, 2003). Vem, portanto, se tornando popular entre os jovens, sobretudo entre aqueles frequentadores de *Clubs* e *Raves*, já desde os anos 80 (Jansen, 2004). Esta condição é agravada pelo fato de que um grande número de indivíduos que a usam são poliusuários (Lankenau et al., 2007a, 2007b).

São, precisamente, os efeitos que limitam seu uso clínico e que tornam a Ketamina uma droga muito atraente (Morgan&Curran, 2012). As propriedades psicomiméticas da Ketamina se assemelham às aquelas observadas na psicose e tendem a ocorrer em conjunto com seus efeitos dissociativos, psicodélicos, anestésicos e cognitivos (Krystalet al., 1994). Estes efeitos também podem ocorrer após sua retirada (Chatterjee, Ganguly, Srivastava, &Palit, 2011). Em geral, a retirada da Ketamina provoca sintomas físicos e emocionais (Critchlow, 2006; Garg, Sinha, Kumar, &Prakash, 2014; Lim, 2003).

Em roedores, doses subanestésicas de Ketamina produzem um amplo espectro de efeitos que incluem perturbações sensório-motoras (Mansbach&Geyer, 1991), déficits de memória (Imre, Fokkema, DenBoer, & Ter Horst, 2006; Koset al., 2006), hipermotilidade (Carlsson, 1993), estereotipia e ataxia (Tricklebank, Singh, Oles, Preston, & Iversen, 1989). A Ketamina apresenta também a característica de acentuar o estado psicótico de pacientes esquizofrênicos (Lahti, Koffel, LaPorte, & Tamminga, 1995), sendo utilizada rotineiramente como um modelo clínico e animal de esquizofrenia (Geyer, 1998).

Farmacologicamente, a Ketamina modula a neurotransmissão glutamatérgica, principalmente nos receptores NMDA pós-sinápticos (Bergman, 1999), atuando também nos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) (Irifune et al., 2000). Além disso, ela exibe uma forte afinidade com os receptores dopaminérgicos D2, mostrando que também atua sobre esse sistema. De fato, tal como outras drogas abusivas (Sulzer, 2011), a Ketamina aumenta os níveis de catecolamina encefálicas, particularmente aumentando a dopamina (DA) no sistema de recompensa (Lindfors, Barati, & O'Connor, 1997; Vollenweider et al., 2000), quer através de sua liberação ou através do bloqueio de sua reabsorção (Hancock & Stamford, 1999). Age também como fraco agonista dos receptores opióides do tipo Kappa (Oye, Paulsen, & Maurset, 1992). Em doses anestésicas, alucinações, sonhos vívidos, erros de percepção, e distorções do tempo, espaço e imagem corporal são os sintomas emergentes (Morgan & Curran, 2012), sendo a tolerância aos seus efeitos sedativos já conhecida (Tobias, 2000).

Seu uso continuado produz uma série de efeitos físicos e psicológicos, dentre os quais problemas gástricos (Shahani, Streutker, Dickson, & Stewart, 2007), dor abdominal (Muetzelfeldt et al., 2008), depressão (Morgan, Muetzelfeldt, & Curran, 2010) e psicose (Krystalet al., 1994), além de danos cognitivos (Morgan & Curran, 2006) e alterações neurológicas (Liao et al., 2011). Apesar disso, poucos estudos pré-clínicos foram conduzidos para tentar detectar potenciais efeitos físicos, psicofisiológicos e comportamentais decorrentes de sua abstinência após exposição crônica. Pouco se sabe também sobre o impacto de seu uso repetido sobre as estruturas encefálicas e seu funcionamento.

1.2. Condicionamento Clássico e Condicionamento Operante

As investigações a respeito dos diferentes modelos comportamentais usados em laboratórios nos estudos da neurobiologia do abuso de drogas enfatizam dois principais modelos de aprendizagem, conhecidos como Condicionamento Pavloviano, ou Clássico, e Condicionamento Operante, ou Instrumental (James & Tunney, 2017). O Condicionamento Clássico decorre basicamente da aprendizagem por associação entre estímulos sendo, portanto, reflexa. Já o Condicionamento Operante é uma forma de aprendizagem na qual a probabilidade de ocorrência de uma resposta aumenta quando seguida de um reforço.

Baseado no conhecimento dessas formas de condicionamento é possível estudar a fisiologia neural dos mecanismos de aprendizagem ativados no encéfalo do indivíduo, observando-se a estrutura do meio, a relação entre estímulos e o contexto.

É sabido que a frequência de respostas nestes dois modelos de condicionamentos (clássico e operante) está muito relacionada à ocorrência de recompensa e punição (Gazzaniga, 1995; Kandel & Schwartz, 1991). As drogas de abuso, como a Ketamina, ligam-se fortemente a receptores NMDA, que têm um papel fundamental no fenômeno da plasticidade sináptica na qual subjazem os processos de aprendizagem e memória (Morris, 2013).

A ação da Ketamina sobre os processos citados acima está vinculada ao tempo de exposição à droga. Por exemplo, em seres humanos, foram detectados prejuízos na memória episódica e de trabalho consequentes a uma única dose de Ketamina. Estes efeitos parecem, no entanto, se apresentar de forma perene em usuários crônicos (Morgan & Curran, 2012), muito embora haja uma completa falta de estudos que corroborem tais suposições.

A gama dos efeitos psicofisiológicos da Ketamina parece ser fortemente controlada pelo contexto, de tal forma que sua ingestão voluntária é facilitada em contextos pouco familiares, mas reduzida em contextos nos quais os indivíduos já estão habituados. Nota-se também que, para as doses de Ketamina utilizadas com propósito recreativo, os efeitos fisiológicos, comportamentais e subjetivos subjacentes se assemelham àqueles produzidos por estimulantes do sistema nervoso central (taquicardia, aumento da pressão arterial, hiperexcitabilidade, agitação, etc). (Childress, McLellan, & O'Brien, 1984, 1986).

Isso poderia corroborar a suposição acima de que alguns dos efeitos da Ketamina, assim como o de outros estimulantes como a cocaína e a anfetamina (Caprioli, Celentano,

Paolone, &Badiani, 2007;Caprioli, Celentano, Testa, Lucantonio, &Badiani, 2007), seriam melhor experienciados em contextos nos quais o indivíduo tem pouca intimidade (non-home environment), fato demonstrado em um recente experimento (De Luca &Badiani, 2011).

A influência do contexto no qual uma droga é ingerida e sua capacidade de se somar aos seus efeitos farmacológicos já são conhecidas há algum tempo (Caprioli, Celentano, Paolone, &Badiani, 2007;Caprioliet al., 2008; Siegel, 1975; Siegel, Hinson, Krank&McCully, 1982). Desde então, sabe-se que o ambiente tem papel importante na modulação da resposta individual às drogas de abuso em geral, particularmente, levando em consideração que pistas contextuais associadas à droga podem induzir sua busca e consumo, seja por eliciar a fissura no indivíduo ou por nele induzir sintomas de abstinência, mesmo após interrupção prolongada no consumo (Childress et al., 1984, 1986).

Em suma, o estudo dos efeitos reforçadores ou aversivos das drogas de abuso tem utilizado modelos baseados na aprendizagem por condicionamento, e mecanismos cognitivos, associados a estímulos diversos, incluindo os contextuais, que se associam aos efeitos das drogas de abuso, incluindo os psicoestimulantes. A interrupção de seu consumo crônico pode eliciar no indivíduo um desejo incontrolável pela droga, meses ou anos após seu uso. Esta condição se associa fortemente a fatores diversos como a processos cognitivos, variabilidade genética e condição ambiental (Brandão &Graeff, 2014).

Figura 1 – Condicionamento Pavloviano, empregado para estudar os mecanismos de aprendizagem. Condicionamento que permite entender o comportamento do modelo de preferência condicionada ao lugar. (Adaptado Brandão&Graeff, 2014).

1.3. Preferência Condicionada ao Lugar (CPP)

O modelo comportamental de CPP é um dos principais modelos para analisar os efeitos reforçadores e aversivos das drogas de abuso. Geralmente, esses modelos envolvem a associação de um contexto específico aos efeitos de uma droga que produz efeitos gratificantes (Prus, James, & Rosecrans, 2009). O modelo de CPP se apresenta variado sendo mais comum o de três compartimentos. Normalmente, para se avaliar o possível efeito reforçador de uma droga qualquer o mais comum é se associa á este efeito com o compartimento que naturalmente o animal mais rejeita; um dos outros é associado com uma substância placebo. Dessa forma, diz-se que este tipo de modelo é de escolha não forçada; já que existe sempre uma terceira opção a qual não foi testada com qualquer tipo de substância.

Como já demonstrado na literatura, drogas de abuso em geral, como exemplo a cocaína, produzem robusta preferência ao lugar. Estes efeitos dependem de variabilidade individual, do contexto, assim como da via de administração, farmacodinâmica e farmacocinética da droga (James & Tunney, 2017). Este modelo conceitual experimental contribui muito para o aprendizado acerca dos efeitos das drogas com poder de abuso, facilitando o entendimento de como se estabelece a relação entre seus efeitos reforçadores e o contexto no qual, eles são produzidos (Tzschentke, 1998).

1.4. Alterações emocionais decorrentes da retirada de Ketamina

Entre as mudanças emocionais, o aumento na ansiedade parece estar envolvido na recaída após a retirada de Ketamina. Por exemplo, o estudo de Blachutet al.(2009) descreveu o aparecimento de distúrbios do sono e ansiedade em pacientes após a retirada de Ketamina. Estes sintomas foram reduzidos com o uso do ansiolítico Diazepam. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Lim (2003), com o uso do benzodiazepínico Lorazepam.

A busca e o consumo da droga, associados à ansiedade extrema, foram sintomas relatados por usuários crônicos de Ketamina após 4 a 8 horas de retirada, sendo esses sintomas também atenuados por agentes ansiolíticos (Critchlow, 2006). Além disso, foi demonstrado que, em mulheres, esses sintomas de retirada se assemelham aos observados em indivíduos abstinentes de álcool etílico (Chen, Huang, & Lin, 2014), nos quais, assim como verificado com outras drogas de abuso, o surgimento de ansiedade extrema cumpre um

importante papel reforçador negativo, influenciando e facilitando gravemente a recaída (Koob& Le Moal, 2008).

Resultados semelhantes foram encontrados em macacos (Walgren, Carfagna, Koger, Sgro, & Kallman, 2014), nos quais foi demonstrado que a abstinência de altas doses de Ketamina (150mg/Kg) produz aumentos significativos na atividade/reatividade desses animais, o que pode refletir aumentos também nos seus níveis de ansiedade. No entanto, estudos com roedores como sujeitos experimentais ainda são raros. Entre eles está o estudo de Amann et al. (2009), que demonstrou que 14 dias de administração de Ketamina levaram a um comprometimento na expressão de uma resposta contextual condicionada ao medo – mesmo 17 dias após a interrupção do tratamento – prejuízo este relacionado a um decréscimo no fortalecimento das conexões corticais envolvidas nos processos de memória e não especificamente a uma atenuação na resposta de medo. Não obstante, possíveis alterações sobre a ansiedade basal e níveis humorais, bem como o surgimento de uma síndrome de abstinência associada ao uso contínuo de Ketamina, e ainda o regime de tratamento necessário para produzi-la, são questões a serem definidas.

1.5. Alterações das estruturas encefálicas

O estudo dos efeitos produzidos por drogas como a Ketamina sobre os mecanismos de transmissão e modelação do sistema de recompensa, bem como as alterações nas estruturas encefálicas subjacentes, em animais expostos a esta classe de substâncias são de extrema importância para a identificação das áreas neurais e mecanismos fisiológicos envolvidos nos seus efeitos reforçadores.

Em humanos, sabe-se que estímulos ou substâncias que alteram a homeostasia dos mecanismos celulares no Sistema Nervoso Central (SNC) podem produzir variações de longa duração ou mesmo irreversíveis, influenciando comportamentos e a percepção de estímulos relacionados com o abuso de drogas como a adição, dependência, sensibilização central, assim como seus efeitos reforçadores e sua ligação com estímulos contextuais. Sendo assim, destaca-se a importância de compreender melhor esses sistemas assim como as disfunções neles geradas pelo uso recorrente de substâncias que induzem abuso (Ma& Woolf, 1996).

Dentre alguns marcadores endógenos existentes no SNC que são ativados por vários fatores, os genes da família c-Fos merecem atenção considerável. A c-Fos é considerada um gene de resposta tardia, a qual é comumente empregada como ferramenta que permite a avaliação da ativação neural induzida por estímulos específicos como, por exemplo, aquelas induzidas por drogas de abuso.

O termo Fos deriva da junção das primeiras letras das palavras FrankelOsteogene's Sarcoma, sendo primeiramente utilizado para descrever o gene codificado pelo retrovírus do sarcoma osteogênico (Herdegen&Leah, 1998). Este gene codifica a proteína c-Fos a qual é composta por 380 aminoácidos e apresenta peso molecular de 55-62 kDa (Morgan &Curran, 1989). Após sua síntese, esta proteína sofre heterodimerização sendo induzida em várias regiões específicas do encéfalo, ao fim de vários tipos de estimulação (Nestler, Kelz, & Chen,1998).

A transcrição do gene c-Fos é promovida rapidamente e transitoriamente após estimulação (Kovács, 1998; Morgan&Curran, 1989), ocorrendo como resposta à despolarização da membrana e entrada de cálcio nas células, induzindo rapidamente à expressão de c-Fos. Assim, os mRNAs destes genes acumulam-se transitoriamente por 1 a 2 horas e suas respectivas proteínas são traduzidas,validando o protocolo, no qual o animal fica retido em um local na ausência de estímulos ambientais pelo período de 2 horas, para só então ser perfundido e submetido a técnica de imunohistoquímica (Kovács, 1998).

Morgan e Curran (1989) descreveram que diversos resultados experimentais sugerem que a proteína c-Fos é induzida em diversas circunstâncias, ou seja, vários outros fatores como neurotransmissores, despolarização, aumento do influxo de cálcio, administração de drogas, entre outros, podem induzir a codificação desta proteína.

JUSTIFICATIVA

A utilização do modelo de CPP tem sido útil no estudo dos efeitos reforçadores positivos das drogas em geral (Bardo &Bevins, 2000; Tzschentke, 1998). Estudos utilizando este procedimento têm demonstrado que a Ketamina, em baixas doses, produz significante CPP (Suzuki et al., 2000; Xu et al., 2006). Em altas doses (31.6 mg/kg), a Ketamina ainda

induz preferência, mas de forma bem modesta, a despeito de que, estatisticamente, a diferença se apresenta significativa (Van Der Kam et al., 2009a).

Tomando como base as informações acima, este estudo teve como foco principal obter evidências adicionais sobre a preferência condicionada induzida por doses subanestésicas (10, 20 e 40 mg/kg) e uma dose reconhecidamente sedativa (80 mg/kg) de Ketamina. Para este propósito foram escolhidos dois modelos experimentais comumente utilizados no estudo do fenômeno da CPP, um modelo de duas câmaras, ou de escolha forçada (teste claro-escuro), e o prototípico modelo de três câmaras, ou de escolha não forçada. A técnica de marcação imunohistoquímica de imunorreatividade à proteína Fos foi utilizada como marcador da ativação neural induzida pela dose de Ketamina mais eficaz em induzir CPP em ambos os modelos de condicionamento. Com relação a este ponto, relatos a partir do uso recreacional (Dillon et al., 2003; Jansen, 2004) e clínico da Ketamina (Krystal et al., 1994) reportam frequentemente um conjunto de feitos que envolve, ao mesmo tempo, prazer e aversão. A isto se somam as descobertas obtidas em estudos pré-clínicos nos quais se pode destacar que o procedimento de CPP induzido por Ketamina mostra-se mais sensível na indução da expressão simultânea de recompensa e aversão, em oposição ao procedimento de autoadministração. Portanto, as áreas neurais utilizadas no estudo de marcação imunohistoquímica foram aquelas que mais comumente estão envolvidas nos efeitos reforçadores e aversivos das drogas de abuso. Alterações na reatividade do tipo emocional promovida pela dose mais reforçadora de Ketamina foram investigadas com a utilização do labirinto circular elevado (LCE).

2. OBJETIVOS

Em termos gerais, o presente estudo destina-se a analisar os efeitos de doses escalonadas de Ketamina sobre a expressão do comportamento motivado, utilizando dois modelos conhecidos de condicionamento. Serão também analisadas as alterações emocionais e neurais promovidas pela dose mais eficaz em induzir CPP.

Em termos específicos o presente trabalho tem como meta:

- a) Analisar os efeitos de três doses subanestésicas e uma dose sedativa sobre a CPP utilizando o teste padrão de CPP e o teste claro-escuro (TCE);
- b) Analisar as alterações de cunho emocional geradas pela administração da dose mais eficaz em promover CPP, utilizando o modelo comportamental do LCE;
- c) Analisar as alterações na marcação neural, promovidas pela dose mais eficaz em induzir CPP, em regiões encefálicas comumente associadas à modulação dos efeitos reforçadores ou aversivos das drogas de abuso.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 124 ratos machos *Wistar*, provenientes do Biotério Central da USP-RP, mantidos em número de quatro em caixas de polipropileno de 45 cm de largura x 65 cm de comprimento x 30 cm de altura nas quais foi adicionada maravalha e ração à vontade, em um ciclo claro-escuro de 12 horas com as luzes acesas às 7 horas da manhã. Foram aclimatados no biotério por pelo menos uma semana antes de todos os procedimentos. Os protocolos foram realizados de acordo com as Diretrizes de Recursos Animais do Laboratório Universitário e o Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais (nº 16.1.609.59.2).

3.2. Droga, dose e regime de dosagem

O cloridrato de Ketamina (Agener, Brasil) foi administrado subcutaneamente (s.c.) em grupos independentes de indivíduos nas doses de 10, 20, 40 e 80 mg/kg. A injeção de Ketamina foi realizada uma vez ao dia durante os 4 dias de condicionamento. As doses foram escolhidas de acordo com estudos anteriores (Chatterjee et al., 2011; Li et al., 2015; Nakao et al., 1993).

3.3. Aparelhos e procedimentos experimentais

3.3.1. Caixa claro-escuro (2 compartimentos)

O TCE se resumiu a uma caixa de acrílico preto opaco (82 x 42 x 22,5 cm), dividida em dois compartimentos. O primeiro compartimento (46 cm de largura) foi composto por paredes brancas e piso constituído por 28 barras de aço inox de 5 mm separadas 1 cm umas das outras. A tampa superior foi feita de acrílico transparente, o que permitiu a incidência da luz da sala experimental dentro da câmara. O segundo compartimento (36 cm de largura) foi composto por paredes pretas, opacas, com tampa superior também em acrílico preto opaco.

Uma abertura na parede central permitiu que o animal se movesse livremente entre os dois ambientes.

Foram tomados inicialmente os limiares basais. Os animais foram submetidos a três sessões diárias de 10 minutos. Nessa condição, os animais tiveram livre acesso a ambos os ambientes, permitindo ao animal habituar-se ao aparelho de teste, eliminando o viés da novidade. Durante as sessões, os animais foram colocados no compartimento claro. Os dados de linha de base foram determinados em sessões de 10 minutos, onde a frequência de transições e a porcentagem de tempo gasta em ambas as câmaras foram tabuladas. O comportamento animal foi gravado através de duas micro câmeras, colocadas 40 cm acima do topo de cada compartimento ligado a um monitor, e por um aparelho de sistema de gravação localizado fora da sala experimental. No final de cada sessão, urina e fezes foram removidas e o teste foi limpo com álcool (20%) seguido por um tecido seco.

O condicionamento começou 24 horas após o último teste de linha de base. Foram usados cinco grupos independentes de animais cada grupo com 12 animais, com um total $n=60$. Cada grupo foi submetido a quatro injeções s.c. diárias de salina ou Ketamina (10, 20, 40 e 80 mg/kg). A injeção de salina foi realizada da mesma forma que a Ketamina. As sessões duraram 60 minutos. Duas horas após a sessão de teste, os animais foram sacrificados. Parte dos encéfalos foi então tratada para análise imunohistoquímica (Figura 2).

Figura 2 - Esquema do protocolo experimental utilizado para o TCE.

3.3.2. Preferência Condicionada ao Lugar (3 compartimentos)

Neste experimento, a preferência condicionada aos efeitos da Ketamina foi examinada com a utilização de uma câmara experimental retangular de acrílico (56 x 35 x 40 cm), dividida em três compartimentos (dois compartimentos laterais medindo 21,5 cm e um compartimento central de 13 cm de largura). Os compartimentos eram diferentes tátil e visualmente, como segue: compartimento A (lateral) composto de paredes com faixas pretas e brancas verticais de 5 cm intercaladas e assoalho feito de uma chapa de aço inox perfurada com quadrados de 1 cm de lado, compartimento B (centro) com as paredes acinzentadas e o assoalho composto por uma chapa de aço inoxidável lisa, e compartimento C (lateral) com paredes feitas de círculos brancos e pretos e chão composto de barras de aço inoxidável de 5 mm espaçadas em 1 cm entre elas. A preferência basal foi tomada de forma semelhante ao TCE. No geral, foram realizadas três sessões de linha de base e o tempo gasto em cada compartimento durante as sessões foi calculado pela média das três sessões de 5 minutos cada bloco com um total de 15 minutos cada animal (Figura 3).

Figura 3 - Esquema do protocolo experimental utilizado para o teste de CPP.

Para o condicionamento, os compartimentos preferido e neutro foram evitados, e os ensaios foram realizados no compartimento menos preferido pelo animal. Semelhante ao TCE, cinco grupos foram utilizados, porém uma quantidade(n) menor de animais, cada grupo com 8 animais com um total $n=40$. Esta diferença dá-se graças ao aumento de compartimentos, quando comparados ao outro modelo experimental claro-escuro (2 compartimentos). Os tratamentos começaram 24 horas após o último teste de linha de base. Grupos independentes foram submetidos a quatro injeções s.c. de Ketamina (10, 20, 40 e 80 mg/kg). As injeções foram aplicadas e imediatamente após, cada animal foi colocado no compartimento devido. As sessões permaneceram por 60 minutos. A CPP foi inferida a partir do tempo de permanência no compartimento menos preferido nas sessões de linha de base, numa única sessão de 15 minutos. Duas horas após a sessão de teste, os animais foram sacrificados. Parte dos encéfalos foi então tratada para análise imunohistoquímica.

3.3.3. Labirinto Circular Elevado (LCE)

O LCE consistiu em uma estrutura circular de acrílico de 10 cm de largura (95 cm de diâmetro x 50 cm de altura), igualmente dividido em dois braços abertos (paredes de 1 cm) e dois fechados (paredes de 50 cm). Os testes duraram 5 minutos e foram conduzidos sob luminosidade de 100 lux, sendo cada um deles testado apenas uma vez. Os animais foram colocados individualmente num dos braços fechados e durante cinco minutos de exploração livre (Figura 4). O LCE é um teste comumente utilizado para avaliar a reatividade comportamental de roedores (comportamento assemelhado à ansiedade) que evita a ambiguidade na interpretação do tempo gasto no quadrado central do desenho tradicional elevado, já que permite a exploração ininterrupta (Kulkarni, Singh, & Bishnoi, 2007). Foram testados 8 animais por grupo, com um total de 24 animais nas doses de Ketamina (10, 20mg/kg) e o grupo controle. No entanto, a análise estatística foi realizada somente para a dose de 10mg/kg, uma vez que era a dose de maior efeito reforçador, observado nos modelos experimentais de 3 compartimentos e 2 compartimentos. Outro fator relevante foi a intensificação da agitação causada pela dose de Ketamina 20mg/kg nos animais, dificultando assim a análise comportamental dos animais. Os animais sob efeito das doses de 20mg/kg não permaneceram no modelo comportamental do labirinto circular elevado durante os 5 minutos necessários. Assim, esses dados foram descartados do trabalho.

Os animais foram testados 30 minutos após a última injeção de Ketamina. Este intervalo foi necessário, uma vez que a Ketamina é capaz de, inicialmente, intensificar o comportamento motor. Neste experimento, apenas a dose mais eficaz para induzir a CPP na caixa (TCE) e no teste (CPP) foi utilizada (8 por grupo). Os dados coletados do LCE foram introduzidos no disco rígido para posterior análise usando um sistema de câmera de vídeo digital. As sessões experimentais foram conduzidas entre 10 e 11 horas da manhã. O labirinto foi limpo com etanol 20% antes de cada ensaio. As variáveis registradas foram a frequência percentual e o tempo gasto nos braços abertos, bem como a frequência de entradas nos braços fechados. Após o teste os animais foram sacrificados.

Figura 4 - Procedimento experimental utilizado para o teste do LCE.

3.4. Imunorreatividade da proteína Fos

Duas horas após a exposição ao TCE e à CPP, quatro animais de cada grupo foram submetidos à perfusão intracardíaca com solução salina preparada em tampão fosfato 0,1M (PBS; pH=7,4) seguida por solução tamponada de paraformaldeído a 4%. Os encéfalos removidos e mantidos, a 4°C, em frascos contendo paraformaldeído 4% por 2 horas e, posteriormente, em solução de 30% de sacarose (em PBS 0,1M) durante aproximadamente 48 horas. Decorrido este tempo os encéfalos foram rapidamente congelados (−40°C; 30s) em isopentano (Sigma) e seccionados em um criostato (Cryocut 1800, Reichert-Jung) a −19°C. Para cada região em estudo estão sendo coletados dois cortes histológicos coronais, seriados, com espessura de 40 µm, tendo como referência ântero-posterior as seguintes coordenadas, a partir do bregma: +2.52 mm (Córtices Pré-límbico (PrL) e Infra-límbico (IL), Núcleo *Accumbens Core* (NAcC) e Núcleo *Accumbens Shell* (NAcSh)); -3.60 mm (Hipocampo Dorsal (DH) e Hipocampo Ventral (VH), Núcleo Central da Amígdala (CeA) e Núcleo Basolateral da Amígdala (BLA)); -1.92 mm (PA, Hipotálamo Anterior (AH) e Hipotálamo Ventromedial

(VMH)); -2.52 mm (Núcleo Hipotalâmico Dorsomedial (DM)); -6.60 mm (Colículos Superiores (SC), Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsomedial (dmPAG), Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsolateral (dlPAG), Substância Cinzenta Periaquedutal Lateral (lPAG) e Substância Cinzenta Periaquedutal Ventrolateral (vlPAG)); -8.16 mm (Colículos Inferiores (IC), Núcleo Dorsal da Rafe (DR) e Núcleo Mediano da Rafe (MnR)).

A escolha das coordenadas citadas tomou como base o Atlas de Paxinos e Watson (2008). Um dos cortes foi montado em lâminas posteriormente coradas com Nissl, para comparação neuroanatômica, o segundo foi coletado em cubeta com PBS 0,1M para o ensaio imunohistoquímico. Todas as reações foram realizadas em PBS 0,1M, em agitadora orbital, à temperatura aproximada de 25°C. Na intenção de reduzir a marcação não específica, os cortes foram incubados com 0,1% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por 10 minutos, e lavados quatro vezes com PBS 0,1M (5 minutos cada). Em seguida, incubados, por 12 horas, com anticorpo primário (anticorpo policlonal anti-Fos produzido em coelho; Santa Cruz, EUA, SC-52), na concentração de 1:2000, preparado em solução PBS acrescida de soro albumina bovina (BSA; 0,1%; Sigma) e detergente triton X-100 (0,2%; Sigma) (PBS+). As seções foram, novamente, lavadas três vezes e incubadas, por 1 hora, com o anticorpo policlonal secundário de coelho biotilado para Fos (Kit ABC Elite, Vectastain, Vector Laboratories), na concentração de 1:400, preparado em PBS. Depois de outra série de três lavagens com PBS 0,1M, os cortes foram incubados, por 1 hora, com o complexo avidina-biotina-peroxidase (soluções A e B; Kit ABC Elite, Vectastain) em PBS 0,1M, na concentração de 1:250, e novamente lavados por três vezes com PBS 0,1M.

Posteriormente, foram incubados, por 10 minutos, com tetracloreto de 3,3'-di-amino-benzidina (DAB; Sigma; 0,02%) acrescida de H_2O_2 (0,04%), para revelação da reação, e novamente lavados por duas vezes com PBS 0,1M. Todas as reações foram levadas a cabo como já descrito (Castilho, Borelli, Brandão, & Nobre, 2008; Fontanesi et al., 2007; Nobre, Cabral, & Brandão, 2010).

3.4.1. Quantificação de células Fospositivas

As seções teciduais foram montadas em lâminas revestidas com gelatina, desidratadas para observação e contagem celular no microscópio de campo claro. A

nomenclatura e os limites nucleares utilizados foram baseados no Atlas de Paxinos e Watson (2008). As células contendo um produto de reação nuclear marrom-negro, com áreas entre 10 e 80 μm^2 , foram identificadas e contadas automaticamente como neurônios Fos-positivos por um sistema de análise de imagem computadorizada (Image Pro Plus 4.0, Media Cybernetics, EUA). Foram coletadas seções de 10 regiões variadas em diferentes níveis no cérebro. Os tecidos foram observados utilizando um microscópio (Olympus BX-50) equipado com um módulo de câmara de vídeo (HamatsuPhotonics C2400) e acoplado a um sistema computadorizado de análise de imagem. A contagem de Fos foi realizada sob uma objetiva x10 com um aumento de x100 num campo por área. Foi utilizada uma área da mesma forma e tamanho por região do cérebro para cada rato. O sistema foi calibrado para ignorar a coloração de fundo. Todas as regiões cerebrais foram contadas bilateralmente para cada rato. As coordenadas das regiões encefálicas analisadas do bregma (Paxinos& Watson, 2008) foram as seguintes: PrL (AP: 3,24 mm a 2,76 mm);NAcC e NAcSh (AP: 2,76 mm a 2,28 Mm); VH (AP: -5,16 mm a -5,40 mm); DH, BLA e CeA (AP: -2,64 mm a -2,92 Mm); SC, Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal (dPAG), IPAG e vIPAG, MnR e DR (AP: -7,56 mm a -7,80 mm); IC (AP: -8,28 mm a -8,52 mm). Os núcleos foram contados individualmente e os valores foram expressos como média do número de células Fos-positivas por 0,1 mm^2 , como mostrado na Tabela 1. As regiões analisadas foram algumas daquelas comumente envolvidas na modulação dos componentes reforçadores e aversivos de drogas abusivas.

Média ($\pm$ EPM) do Número de Neurônios c-Fós/0.1 mm^2						
Estruturas	Salina		Ketamina		valor de <i>t</i>	<i>P</i>
	Média	($\pm$ EPM)	Média	($\pm$ EPM)		
PrL	13,44	1,95	1,97	0,33	5.80	0.0005
NAcC	3,34	1,36	14,38	1,94	-7,004	0.0001
NASH	1,53	0,84	14,48	2,23	-5.44	0.001
DH	4,03	0,60	3,56	0,72	0.55	0.62
VH	1,12	0,24	2,38	0,67	-1.76	0.11
BLA	16,60	2,52	17,06	3,14	-0,11	0.91
CeA	3,05	0,60	12,20	1,85	-4.70	0.005

Continua

Conclusão

SC	1,84	0,58	8,83	1,30	-4.91	0.005
IC	6,55	1,63	15,12	4,80	-1.69	0.13
dPAG	2,05	0,84	8,70	1,27	-3.93	0.005
IPAG	4,89	1,99	14,56	3,55	-2.37	0.05
vIPAG	6,37	1,26	6,55	1,33	-2.57	0.05
MnR	1,18	0,17	7,56	2,13	-2.98	0.05
DR	1,60	0,42	2,08	0,97	-0.45	0.66

Tabela 1 - Os números apresentados informam a média do número de neurônios imunomarcados para Fos, seguidos do erro padrão da média ($\pm$ EPM). Os valores em negrito informam a significância dos resultados para uma probabilidade igual ou menor que 5%, considerando o valor de t .

3.5. Análise Estatística

Os dados estão expressos como valores médios, seguidos do erro padrão da média ($\pm$ EPM). Em geral, as comparações estatísticas foram realizadas com a utilização da Análise de Variância (ANOVA).

No caso dos dados coletados no TCE, a frequência total de entradas foi submetida a uma ANOVA para medidas repetidas para dois fatores. Para a frequência de entradas e o tempo gasto no compartimento relacionado à droga, foi utilizada a ANOVA para um fator.

Em relação aos dados coletados no teste de CPP de três câmaras, utilizou-se uma ANOVA de duas vias para analisar o total de entradas (linha de base x teste), as alterações na preferência entre os compartimentos (teste menos linha de base - Δ) ao longo dos ensaios, e as alterações na preferência pelo compartimento relacionado à droga (linha de base x teste). A porcentagem de entradas e o tempo gasto no compartimento relacionado à droga foram analisados com a ANOVA para um fator.

A contagem de núcleos marcados para c-Fos e os dados do LCE (frequência de entradas nos braços fechados, porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos) foram analisados pelo teste t de Student. Quando apropriado, as comparações pos-hoc foram realizadas com o teste de Tukey-HSD. Os dados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas com o programa estatístico Statistica 8.0.

4. RESULTADOS

No TCE a análise estatística mostra que os efeitos da Ketamina foram incipientes, muito embora o número total de entradas tenha se apresentado significativamente abaixo da condição basal, $F(1,55) = 135,54; p < 0,0001$ (Figura 5a). Já o número de entradas no contexto pareado com a droga permaneceu similar entre os grupos, $F(4,55) = 0,82; p = 0,52$ (Figura 5b).

Efeito similar foi encontrado considerando o tempo de permanência no contexto pareado com a droga, $F(4,55) = 0,48; p = 0,75$ (Figura 5c). Por outro lado, os efeitos da Ketamina nos animais testados na câmara de três compartimentos foram claro, e dose-dependente. O número total de entradas entre as condições linha de base e teste não variou de forma significativa entre os grupos, $F(4,35) = 0,22; p = 0,93$ (Figura 6a). A frequência de entradas no compartimento relacionado à droga também permaneceu inalterada, $F(4,35) = 1,55; p = 0,21$ (Figura 6b). No entanto, no que diz respeito ao contexto pareado com a droga, a Ketamina induziu preferência condicionada significativa, $F(4,35) = 14,08; p < 0,0001$, a qual foi fortemente dependente da dose utilizada, $F(4,35) = 16,28; p < 0,0001$ (Figura 6c).

Figura 5 - Efeitos promovidos pela administração sub-crônica de salina (Sal) e de doses escalonadas de Ketamina (Ket) na preferência condicionada ao lugar de ratos condicionados no TCE.

A análise a posteriori de Tukey mostrou que as diferenças obtidas se deveram ao aumento no tempo de permanência no contexto pareado com a droga causado pela dose de 10 mg/kg, assim como a consequente redução nesta variável promovida pela dose de 80 mg/kg de Ketamina. Estes efeitos são facilmente notados ao se observar a porcentagem geral de CPP, $F(4,35) = 6,41$; $p < 0,001$ (Figura 6d).

Figura 6 - Efeitos promovidos pela administração sub-crônica de salina (Sal) e de doses escalonadas de Ketamina (Ket) na CPP de ratos condicionados no modelo comportamental de três câmaras.

A aplicação do teste *t* de Student aos dados de imunohistoquímica revelou que a exposição ao contexto pareado com a droga altera significativamente a marcação neural na maioria das áreas em estudo (Figura7), como demonstrado na Tabela 1.

Figura 7 - Efeitos promovidos sobre a reatividade comportamental de ratos testados no LCE a partir da administração sub-crônica de 10 mg/kg de Ketamina.

Por fim, quando aplicado aos dados do LCE, o teste *t* de Student mostrou que a dose de 10 mg/kg de Ketamina reduz o tempo de permanência nos braços abertos, $t(5) = 3,37$; $p < 0,01$, assim como a frequência de entradas, $t(5) = 3,06$; $p < 0,005$ (Figura 8), sem, no entanto, alterar a frequência de entradas no braços fechados, $p = 0,22$.

Figura 8 - Média ($\pm$ EPM) do número de células imunoreativas à proteína Fos. Foram escolhidos aleatoriamente 5 encéfalos de cada grupo experimental para análise (Placebo e Ketamina 10 mg/kg).

Figura 9 -Fotomicrografias representativas de três das regiões que apresentaram maior ativação neural à CPP, induzida pela dose de 10 mg/kg de Ketamina, como determinado pelo método imunohistoquímico de marcação da proteína Fos. À esquerda grupo controle, à direita animais previamente testados com Ketamina. Acima PrL, ao centro núcleos da amígdala, abaixo substância cinzenta periaquedutal.

5. DISCUSSÃO

A Ketamina é um anestésico veterinário, também utilizado clinicamente, que apresenta potentes efeitos psicoestimulantes sendo, por esta razão, fonte de abuso para determinados indivíduos (Bokor& Anderson, 2014; Jansen, 2004; Liu et al., 2016; Xu& Lei, 2014). Entretanto, embora alguns estudos epidemiológicos clínicos tenham evidenciado um aumento no número de indivíduos que usam e abusam de Ketamina, poucos estudos pré-clínicos foram realizados para tentar entender a forma como se desenvolve seus efeitos reforçadores e aversivos. Em nosso estudo, tentamos avançar um pouco mais no tema investigando os efeitos de doses escalonadas de Ketamina em dois modelos experimentais comumente utilizados para acessar os efeitos reforçadores das drogas de abuso: o TCE, e o CPP de três contextos. Para nossos propósitos, quatro doses de Ketamina foram utilizadas. Estas oscilaram entre três doses sub-anestésicas e uma claramente sedativa.

Nossos achados sugerem que os efeitos da Ketamina dependem tanto da tarefa quanto da dose utilizada. No TCE, os efeitos da Ketamina, para todas as doses utilizadas, foram similares aos observados nos animais controle. De fato, tanto animais pré-tratados com Ketamina quanto aqueles tratados com placebo evitaram o contexto no qual eles foram previamente condicionados. Este resultado se difere notavelmente daquele obtido com os animais condicionados e testados na caixa de preferencia com três contextos. Neste caso, a Ketamina não alterou de forma significativa a frequência de entradas no contexto previamente pareado com a droga, a despeito de alterar de forma dose-dependente o tempo de permanência neste compartimento, particularmente com a dose de 10 mg/kg.

Com relação ao TCE, nossos resultados se diferem de um trabalho prévio que utilizou um modelo experimental com propriedades físicas similares àqueles que nós utilizamos (Botanaset al., 2015). As razões para esta discrepância certamente se devem a questões de cunho metodológico. Em nosso estudo, todos os animais foram pareados com o compartimento claro do teste (o lado menos preferido), já que todos os animais evitaram este lado de forma significativa durante a tomada dos tempos basais. Além disso, diferente do compartimento escuro, a tampa que cobriu o lado claro era de acrílico transparente, o que permitiu a entrada de luz do ambiente para o interior da caixa. O excesso de luminosidade neste compartimento torna-o naturalmente aversivo para roedores. Portanto, é possível que os

efeitos reforçadores da Ketamina não sejam suficientes para sobrepujar o estado aversivo gerado pela exposição à luz intensa, durante o condicionamento. Entretanto, a ausência de preferência condicionada induzida pelos efeitos da Ketamina não pode ser atribuída ao estabelecimento de aversão condicionada ao lugar induzida pela droga já que os resultados obtidos nos grupos tratados com Ketamina não se diferenciam do controle. De qualquer forma, na intenção de explorar a valência emocional da dose de Ketamina mais eficaz em promover CPP (10-mg/kg), dois grupos independentes de animais foram submetidos à tratamento similar e submetidos ao teste do LCE, trinta minutos após a última injeção. A Ketamina reduziu tanto o tempo quanto a frequência de entradas nos braços abertos do labirinto, sem, no entanto, alterar a atividade locomotora geral (número de entradas no braços fechados). Quando comparados com a literatura atual, nossos dados estão em concordância com alguns estudos e em franca desarmonia com outros que utilizaram dose e modelo experimental similar. Podemos argumentar neste caso que os efeitos reforçadores positivos da Ketamina no LCE parecem depender do nível de intensidade de luz presente no nível dos braços abertos, e estendemos esta suposição para o compartimento claro do teste claro-escuro com base na seguinte informação. Em um estudo anterior, Enginet al. (2009), utilizando baixa condição de luminosidade (<15 lux), mostraram que a atividade geral de ratos no labirinto em cruz elevado e teste do campo aberto permanece inalterada após uma administração aguda de 10 ou mesmo 50 mg/kg de Ketamina. Resultados comparáveis foram encontrados, com a utilização de camundongos como sujeitos experimentais, no estudo de Silva et al. (2010), tomando como base a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos.

Com relação ao LCE, o estudo de Refsgaard et al. (2017), até onde sabemos o único trabalho que acessa os efeitos de Ketamina racêmica na ansiedade de roedores utilizando este aparato, mostra que a dose de 10 mg/kg é ineficaz para alterar a resposta basal de animais testados em baixa condição de luminosidade. Por outro lado, em um estudo mais recente que utilizou o labirinto tradicional, Akillioglu et al. (2012) relatam que a Ketamina aumenta a aversão pelos braços abertos de camundongos C57BL/6 testados sob alta luminosidade (165 lux). Da mesma forma, e similar aos nossos resultados, Silvestre et al. (1997) mostraram que uma injeção sistêmica aguda de 7mg/kg de Ketamina produz efeitos ansiogênicos em ratos *Wistar* testados sob 40 lux de luminosidade no nível dos braços abertos.

A segunda parte de nossos estudos se destinou a determinar a habilidade de doses escalonadas de Ketamina em induzir CPP em ratos, utilizando uma câmara de condicionamento ao lugar de três compartimentos. O número total de entradas, assim como a frequência de entradas, no contexto previamente pareado com os efeitos da droga, não foi influenciado pelo tratamento, não importa a dose de Ketamina utilizada. Entretanto, as doses de Ketamina se correlacionaram negativamente com a preferência pelo contexto pareado com a droga, de tal forma que a menor dose utilizada (10 mg/kg) promoveu CPP significativa, sendo que a dose mais alta (80mg/kg) induziu aversão condicionada ao lugar. Apesar de diferenças metodológicas, nossos dados se adequam a outros relatos mostrando as propriedades reforçadoras positivas de baixas doses de Ketamina (Guo et al., 2016; Van Der Kam et al., 2009a).

De forma geral, nossos dados indicam que, dependendo do contexto onde os animais são condicionados, uma mesma dose pode assumir propriedades reforçadoras ou aversivas. Com relação a este ponto, relatos alegóricos informais de usuários e estudos clínicos destacam uma variedade de efeitos reforçadores e aversivos induzidos por doses subanestésicas de Ketamina (Dillon et al., 2003; Jansen, 2004; Krystal et al., 1994). Na tentativa de dar um passo a mais no tema, parte dos animais condicionados com a dose mais eficaz de Ketamina para induzir CPP (10 mg/kg) foram aleatoriamente selecionados para posterior análise imunohistoquímica de seus encéfalos, utilizando como index de ativação neural a marcação da expressão da proteína Fos, de forma a determinar o impacto do CPP no funcionamento neural de áreas encefálicas comumente envolvidas nos efeitos reforçadores e aversivos das drogas de abuso.

Em geral, o efeito agudo de uma droga de abuso é a facilitação da liberação de DA no PFC e NAc – particularmente através do aumento da taxa de disparo de neurônios da área tegmental ventral (VTA) (Cooper et al., 2017) –, aumentar a reatividade emocional relacionada ao prazer (Biala & Kruk, 2007), além de facilitar a expressão precoce de genes no PrL e NAcC durante o CPP (Miller & Marshall, 2005). No que diz respeito à Ketamina, alguns poucos estudos têm relatado um aumento transiente nos níveis de DA no PrL (Lindfors et al., 1997; Verma & Moghaddam, 1996).

Esta facilitação está negativamente correlacionada com uma hipofunção glutamatérgica (Carlsson et al., 1999; Grace, 1991), podendo ser bloqueada pelo

antagonista de receptores de glutamato NBQX (Witkin et al., 2016). Em nosso estudo, das quatorze áreas encefálicas analisadas, oito apresentaram flutuações significativas na contagem de proteína Fos. Nosso dados mostram um decréscimo na contagem de proteína Fos no PrL durante a expressão da CPP induzida por Ketamina, 24 horas após a última injeção sistêmica. Por outro lado, a exposição ao contexto previamente pareado com a droga induziu um aumento na contagem de Fos no NAcC e NAcSh, CeA, SC, dPAG e IPAG, e no MnR.

Estudos prévios enfatizam a importância do NAcSh nos efeitos emocionais das drogas de abuso, em oposição ao NAcC, mais relacionado ao controle motor (da Cunha et al., 2008; Zahm & Brog, 1992). Nossos resultados são corroborados por estes relatos já que o tempo de permanência no compartimento pareado com a droga (e a marcação imunohistoquímica relacionada) mostrou-se aumentado com a dose de 10/mg de Ketamina. A ativação neural dos neurônios do NAcC também mostrou-se aumentada, a despeito da droga não produzir alteração locomotora significativa. A CPP induzida por 10/mg de Ketamina também promoveu aumento significativo de Fos no CeA, mas não no BLA, além do que deprimiu esta marcação no PrL.

O CeA tem função importante na modulação da memória associativa (Russo & Nestler, 2013), com as oriundas de condicionamento Pavloviano. Esta estrutura está funcionalmente relacionada a algumas regiões que organizam a expressão do medo inato e condicionado, dentre elas a substância cinzenta periaquedutal (PAG) do mesencéfalo (Badrinarayan et al., 2012; Davis, 1997; Graeff et al., 1993). O CeA está também sob controle de aferências do BLA das quais aproximadamente 80% são glutamatérgicas; sendo as restantes constituídas, na sua maioria, de interneurônios GABAérgicos (Spampanato et al., 2011; Tovote et al., 2015). Aferências excitatórias oriundas do BLA que se direcionam ao CeA são conhecidas por modular circuitos GABAérgicos que se projetam principalmente para o hipotálamo e o mesencéfalo, de forma a inibir a expressão do medo. Portanto, supomos que o antagonismo sistêmico de receptores de glutamato do tipo NMDA reduza a influência excitatória do BLA sobre o CeA, levando, conseqüentemente, a uma redução também nos drives inibitórios do CeA sobre os neurônios da PAG o que poderia explicar o aumento na ativação neural desta região. Entretanto, em nossos experimentos os animais foram testados na ausência dos efeitos da Ketamina, 24 horas após a última injeção. A despeito da natureza desta discrepância ser no momento desconhecida, algumas suposições podem ser feitas. Considerando que um efeito do

tipo rebote existe para a interrupção do consumo sub-crônico e crônico de Ketamina, é possível que o aumento na ativação neural desta região seja devido a um aumento também na liberação de glutamato nesta região. De fato, foi demonstrado que o bloqueio de receptores NMDA pós-sinápticos leva a um aumento pronunciado na liberação pré-sináptica de glutamato. Entretanto, não existem estudos no momento que suportem tal afirmação no que diz respeito à PAG. Portanto, experimentos adicionais devem ser conduzidos para explorar esta questão.

Em nosso estudo, a contagem de proteína Fos mostrou-se aumentada no MnR, mas não no DR, nos animais tratados com Ketamina. Vale lembrar que este experimento foi conduzido com o encéfalo de animais que foram previamente tratados com Ketamina mas testados sem droga, em outras palavras, na ausência de seus efeitos.

Até o presente momento, diversos são os sistemas de recompensa sugeridos envolvidos na regulação dos processos motivacionais que regulam o comportamento de aproximação de estímulos com valência positiva (Bolles&Fanselow, 1982; Ikemoto, 2010). Entre as regiões corticais e subcorticais que se supõe pertencer a estes circuitos estão os núcleos mesencefálicos da rafe (Ikemoto, 2010). De fato, estudo prévios demonstraram que injeções locais do agonista GABAB baclofen no MnR ou DR – o qual quando administrado sistemicamente produz sedação – elicia efeitos reforçadores psicoestimulantes (Shin&Ikemoto, 2010; Vollrath-Smith et al., 2012). Importante citar que ratos aprendem rapidamente a auto-administração de antagonistas de receptores de glutamato AMPA e NMDA diretamente no MnR, cujo resultado é a inibição nos níveis de serotonina e consequente aproximação de estímulos com valor reforçador positivo (Webb et al., 2012). Este argumento se adequa a ideia de que as projeções do MnR têm um papel inibitório sobre os mecanismos subjacentes à expressão de alguns transtornos, como a esquizofrenia (Kusljic et al., 2005). Portanto, é possível que mecanismos opostos sejam ativados como resultado da interrupção de administrações sistêmicas de Ketamina.

6. CONCLUSÃO

Nosso estudo destaca diversos pontos importantes no que diz respeito aos efeitos da Ketamina sobre o sistema nervoso central e comportamento. Primeiro, e como demonstrado anteriormente, a Ketamina em baixas doses apresenta a propriedade de induzir forte preferência condicionada ao contexto. Este efeito parece depender do tipo de procedimento utilizado, sendo mais eficaz em procedimentos de escolha não forçada e particularmente dependente da intensidade de luminosidade presente no momento do teste. Além disso, os efeitos reforçadores positivos da Ketamina apresentam um padrão dose-dependente, já que altas doses da substância produzem aversão, e não preferência, ao lugar de condicionamento. Em geral, uma mistura de efeitos reforçadores e aversivos foi notada, como demonstrado pelos resultados nos testes do CPP e LCE. Esta suposição pode ser limitadamente inferida a partir dos dados coletados com o procedimento de imunohistoquímica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amann, L.C., Halene, T.B., Ehrlichman, R.S., Luminais, S.N., Ma, N., Abel, T., & Siegel, S.J. (2009). Chronic ketamine impairs fear conditioning and produces long-lasting reductions in auditory evoked potentials. *Neurobiology Disease*, 35(2), 311-317. doi:10.1016/j.nbd.2009.05.012.
- Bardo, M. T., & Bevins, R. A. (2000). Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward?. *Psychopharmacology*, 153(1), 31-43. doi: 10.1007/s002130000569.
- Biała, G., & Kruk, M. (2007). Amphetamine-induced anxiety-related behavior in animal models. *Pharmacological reports: PR*, 59(6), 636-644.
- Blachut, M., Solowiow, K., Janus, A., Ruman, J., Cekus, A., Matysiakiewicz, J., & Hese, R.T. (2009). A case of ketamine dependence. *Psychiatriapolska*, 43(5), 593-599.
- Bokor, G., & Anderson, P. D. (2014). Ketamine: an update on its abuse. *Journal of pharmacy practice*, 27(6), 582-586. doi: 10.1177/0897190014525754.
- Botanas, C. J., de la Peña, J. B., Dela Pena, I. J., Tampus, R., Yoon, R., Kim, H. J., ... & Cheong, J. H. (2015). Methoxetamine, a ketamine derivative, produced conditioned place preference and was self-administered by rats: evidence of its abuse potential. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 133, 31-36. doi: 10.1016/J.pbb.2015.03.007.
- Brandão, M.L., & Graeff, F.G. (2014). *Neurobiologia dos Transtornos Mentais. Abuso de Drogas* (3ª ed.) (pp. 85-209). São Paulo: Atheneu.
- Caprioli, D., Celentano, M., Paolone, G., & Badiani, A. (2007). Modeling the role of environment in addiction. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 31(8), 1639-1653. doi: 10.1016/j.pnpbp.2007.08.029.
- Caprioli, D., Celentano, M., Testa, A., Lucantonio, F., & Badiani, A. (2007). Environmental modulation of amphetamine self-administration. *Behavioural pharmacology*, 18, S85-S85.
- Caprioli, D., Celentano, M., Paolone, G., Lucantonio, F., Bari, A., Nencini, P., & Badiani, A. (2008). Opposite environmental regulation of heroin and amphetamine self-administration in the rat. *Psychopharmacology*, 198(3), 395-404. doi: 10.1007/s00213-008-1154-3.
- Carlsson, M. L. (1993). Are the disparate pharmacological profiles of competitive and un-competitive NMDA antagonists due to different baseline activities of distinct glutamatergic pathways? (Hypothesis). *Journal of neural transmission*, 94(1), 1-10.
- Castilho, V. M., Borelli, K. G., Brandao, M. L., & Nobre, M. J. (2008). Anxiety-like symptoms induced by morphine withdrawal may be due to the sensitization of the dorsal periaqueductal grey. *Physiology & behavior*, 94(4), 552-562. doi: 10.1016/j.physbeh.2008.03.014.
- Chatterjee, M., Ganguly, S., Srivastava, M., & Palit, G. (2011). Effect of 'chronic' versus 'acute' ketamine administration and its 'withdrawal' effect on behavioural alterations in mice: implications for experimental psychosis. *Behavioural brain research*, 216(1), 247-254. doi:10.1016/j.bbr.2010.08.001.

- Chen, W. Y., Huang, M. C., & Lin, S. K. (2014). Gender differences in subjective discontinuation symptoms associated with ketamine use. *Substance abuse treatment, prevention, and policy*, 9(1), 39. doi:10.1186/1747-597X-9-39.
- Childress, A. R., McLellan, A. T., & O'Brien, C. P. (1986). Abstinent opiate abusers exhibit conditioned craving, conditioned withdrawal and reductions in both through extinction. *British Journal of Addiction*, 81(5), 655-660. doi: 10.1111/j.1360-0443.1986.tb00385.x.
- Childress, A. R., McLellan, A. T., & O'Brien, C. P. (1984). Assessment and extinction of conditioned withdrawal-like responses in an integrated treatment for opiate dependence. *Problems of drug dependence*, 202-210.
- Critchlow, D. G. (2006). A case of ketamine dependence with discontinuation symptoms. *Addiction*, 101(8), 1212-1223. doi:10.1111/j.1360-0443.2006.01494.x.
- De Luca, M. T., & Badiani, A. (2011). Ketamine self-administration in the rat: evidence for a critical role of setting. *Psychopharmacology*, 214(2), 549-556. doi: 10.1007/s00213-010-2062-x.
- Dillon, P., Copeland, J., & Jansen, K. (2003). Patterns of use and harms associated with non-medical ketamine use. *Drug and Alcohol Dependence*, 69(1), 23-28.
- Fontanesi, L. B., Ferreira, R., Cabral, A., Castilho, V. M., Brandão, M. L., & Nobre, M. J. (2007). Brainstem areas activated by diazepam withdrawal as measured by Fos-protein immunoreactivity in rats. *Brain research*, 1166, 35-46. doi: 10.1016/j.brainres.2007.07.007
- Garg, A., Sinha, P., Kumar, P., & Prakash, O. (2014). Use of naltrexone in ketamine dependence. *Addictive Behaviors*, 39(8), 1215-1216. doi:10.1016/j.addbeh.2014.04.004.
- Geyer, M. A. (1998). Behavioral studies of hallucinogenic drugs in animals: implications for schizophrenia research. *Pharmacopsychiatry*, 31(Suppl2), 73-79. doi:10.1055/s-2007-979350.
- Herdegen, T., & Leah, J. D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Research Reviews*, 28(3), 370-490. doi: 10.1016/S0165-0173(98)00018-6
- Imre, G., Fokkema, D. S., Den Boer, J. A., & Ter Horst, G. J. (2006). Dose-response characteristics of ketamine effect on locomotion, cognitive function and central neuronal activity. *Brain research bulletin*, 69(3), 338-345. doi: 10.1016/j.brainresbull.2006.01.010.
- James, R. J. E., & Tunney, R. J. (2017). The need for a behavioural analysis of behavioural addictions. *Clinical Psychology Review*, 52, 69-76. doi:10.1016/j.cpr.2016.11.010.
- Jansen, K. (2004). *Ketamine: dreams and realities* (2nd ed.). Sarasota, USA: Multidisciplinary Association for Psychedelic Studies (MAPS).
- Koob, G. F., & Le Moal, M. (2008). Addiction and the brain antireward system. *Annual Review of Psychology*, 59, 29-53. doi: 10.1146/annurev.psych.59.103006.093548.

- Kos, T., Popik, P., Pietraszek, M., Schafer, D., Danysz, W., Dravolina, O., ...&Bespalov, A.Y., 2006. Effect of 5-HT₃ receptor antagonist MDL 72222 on behaviors induced by ketamine in rats and mice. *European Neuropsychopharmacology*, 16(4), 297-310. doi:10.1016/j.euroneuro.2005.10.001.
- Kovács, K. J. (1998). Invited review c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochemistry international*, 33(4), 287-297. doi: 10.1016/S0197-0186(98)00023-0
- Krystal, J. H., Karper, L. P., Seibyl, J. P., Freeman, G. K., Delaney, R., Bremner, J. D., ... &Charney, D. S. (1994). Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans: psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Archives of general psychiatry*, 51(3), 199-214. doi:10.1001/archpsyc.1994. 03950030035004.
- Kulkarni, S.K., Singh, K.,&Bishnoi, M.(2007). Elevated zero maze: a paradigm to evaluate antianxiety effects of drugs. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, 29(5), 343-348. doi:10.1358/mf.2007.29.5.1117557
- Lahti, A.C., Koffel, B., LaPorte, D., &Tamminga, C.A. (1995). Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 13, 9-19. doi:10.1016/0893-133X(94)00131-I.
- Lankenau, S.E., Sanders, B., Bloom, J.J., Hathazi, D., Alarcon, E., Tortu, S., &Clatts, M. C.(2007a).First injection of ketamine among young injection drug users (IDUs) in three U.S. cities.*Drug and alcohol dependence*, 87(2), 183-193. doi:10.1016/j.drugalcdep.2006.08.015.
- Lankenau, S. E., Sanders, B., Bloom, J. J., Hathazi, D. S., Alarcon, E., Tortu, S., &Clatts, M. (2007b). Prevalence and patterns of prescription drug misuse among young ketamine injectors. *Journal of drug issues*, 37(3), 717-735. doi: 10.1177/002204260703700311.
- Liao, Y., Tang, J., Corlett, P. R., Wang, X., Yang, M., Chen, H., ...& Fletcher, P. C. (2011). Reduced dorsal prefrontal gray matter after chronic ketamine use. *Biological psychiatry*, 69(1), 42-48. doi:10.1016/j.biopsych.2010.08.030.
- Li, B., Liu, M. L., Wu, X. P., Jia, J., Cao, J., Wei, Z. W., & Wang, Y. J. (2015). Effects of ketamine exposure on dopamine concentrations and dopamine type 2 receptor mRNA expression in rat brain tissue. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(7), 11181-11187.
- Lim, D.K. (2003). Ketamine associated psychedelic effects and dependence. *Singapore medical journal*, 44(1), 31-34.
- Lindfors, N., Barati, S., &O'Connor, W. T.(1997). Differential effects of single and repeated ketamine administration on dopamine, serotonin and GABA transmission in rat medial prefrontal cortex. *Brain research*, 759(2), 205-212. doi: 10.1016/S0006-8993(97)00255-2.
- Ma, Q. P., & Woolf, C. J. (1996). Basal and touch-evoked fos-like immunoreactivity during experimental inflammation in the rat. *Pain*, 67(2), 307-316. doi: 10.1016/0304-3959(96)03132-6.
- Mansbach, R. S., & Geyer, M. A. (1991). Parametric determinants in pre-stimulus modification of acoustic startle: interaction with ketamine. *Psychopharmacology*, 105(2), 162-168. doi: 10.1007/BF02244303.

- Miller, C. A., & Marshall, J. F. (2005). Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. *Neuron*, 47(6), 873-884. doi: 10.1016/j.neuron.2005.08.006.
- Morgan, J. I., & Curran, T. (1989). Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends in neurosciences*, 12(11), 459-462. doi: 10.1016/0166-2236(89)90096-9.
- Morgan, C.J., & Curran, H.V. (2006). Acute and chronic effects of ketamine upon human memory: a review. *Psychopharmacology*, 188(4), 408-424. doi: 10.1007/s00213-006-0572-3.
- Morgan, C. J., & Curran, H. V. (2012). Ketamine use: a review. *Addiction*, 107(1), 27-38. doi: 10.1111/j.1360-0443.2011.03576.x.
- Morgan, C.J., Muetzelfeldt, L., & Curran, H.V. (2010). Consequences of chronic ketamine self-administration upon neurocognitive function and psychological wellbeing: a 1-year longitudinal study. *Addiction*, 105(1), 121-133. doi: 10.1111/j.1360-0443.2009.02761.x.
- Morris, R.G. (2013). NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacology*, 74, 32-40. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.014.
- Muetzelfeldt, L., Kamboj, S. K., Rees, H., Taylor, J., Morgan, C. J. A., & Curran, H. V. (2008). Journey through the K-hole: phenomenological aspects of ketamine use. *Drug and alcohol dependence*, 95(3), 219-229. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2008.01.024.
- Nakao, S., Arai, T., Mori, K., Yasuhara, O., Tooyama, I., & Kimura, H., 1993. High-dose ketamine does not induce c-Fos protein expression in rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, 151(1), 33-36. doi:10.1016/0304-3940(93)90038-M.
- Nestler, E.J., Kelz, M.B., & Chen, J. (1998). FosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. *Brain Research*, 835(1), 10-17. doi: 10.1016/S0006-8993(98)01191-3.
- Nobre, M. J., Cabral, A., & Brandão, M. L. (2010). GABAergic regulation of auditory sensory gating in low- and high-anxiety rats submitted to a fear conditioning procedure. *Neuroscience*, 171(4), 1152-1163. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.10.011.
- Oye, I., Paulsen, O., & Maurset, A. (1992). Effects of ketamine on sensory perception: evidence for a role of N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 260(3), 1209-1213.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2008). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6^a ed.). New York: Academic Press.
- Potter, D.E., & Choudhury, M. (2014). Ketamine: repurposing and redefining a multifaceted drug. *Drug Discovery Today*, 19(12), 1848-1854. doi: 10.1016/j.drudis.2014.08.017.
- Prus, A.J., James, J.R., & Rosecrans, J.A. (2009). Conditioned Place Preference. In J. J. Buccafusco (Ed.), *Methods of behavioral analysis in neuroscience* (pp. 59-76). Boca Raton, FL, USA: CRC Press/Taylor & Francis.

- Shahani, R., Streutker, C., Dickson, B., & Stewart, R.J. (2007). Ketamine-associated ulcerative cystitis: a new clinical entity. *Urology*, 69(5), 810-812. doi: 10.1016/j.urology.2007.01.038.
- Siegel, S. (1975). Evidence from rats that morphine tolerance is a learned response. *Journal of comparative physiological psychology*, 89(5), 498-506. doi: 10.1037/h0077058.
- Siegel, S., Hinson, R.E., Krank, M.D., & McCully, J. (1982). Heroin "overdose" death: contribution of drug-associated environmental cues. *Science*, 216(4544), 436-437. doi: 10.1126/science.7200260.
- Tobias, J.D. (2000). Tolerance, withdrawal, and physical dependency after long-term sedation and analgesia of children in the pediatric intensive care unit. *Critical care medicine*, 28(6), 2122-2132.
- Tricklebank, M.D., Singh, L., Oles, R.J., Preston, C., & Iversen, S. D. (1989). The behavioural effects of MK-801: a comparison with antagonists acting non-competitively and competitively at the NMDA receptor. *European journal of pharmacology*, 167(1), 127-135. doi: 10.1016/0014-2999(89)90754-1.
- Tzschentke, T.M. (1998). Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Progress in Neurobiology*, 56(6), 613-672. doi:10.1016/S0301-0082(98)00060-4.
- Vollenweider, F. X., Vontobel, P., Øye, I., Hell, D., & Leenders, K. L. (2000). Effects of (S)-ketamine on striatal dopamine: a [¹¹C] raclopride PET study of a model psychosis in humans. *Journal of psychiatric research*, 34(1), 35-43. doi: 10.1016/S0022-3956(99)00031-X.
- Walgren, J.L., Carfagna, M.A., Koger, D., Sgro, M., Kallman, M.J. (2014). Withdrawal assessment following subchronic oral ketamine administration in Cynomolgus macaques. *Drug development research*, 75(3), 162-171. doi:10.1002/ddr.21168.