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

**Alterações comportamentais e neuroquímicas em sistemas subcorticais
subjacentes à expressão da tolerância condicionada ao contexto
induzida pelo anestésico dissociativo cetamina**

Gleice Kelli Ribeiro da Silva Cardoso

Ribeirão Preto

2017

Gleice Kelli Ribeiro da Silva Cardoso

Alterações comportamentais e neuroquímicas em sistemas subcorticais subjacentes à expressão da tolerância condicionada ao contexto induzida pelo anestésico dissociativo
cetamina

Dissertação de Mestrado 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

Orientador: Prof. Dr. Manoel Jorge Nobre do Espírito do 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

Cardoso, G. K.R.S.

Alterações comportamentais e neuroquímicas em sistemas subcorticais subjacentes à expressão da tolerância condicionada ao contexto induzida pelo anestésico dissociativo cetamina. 112 p.; 30 cm.

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

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

1. Cetamina 2. Tolerância 3. Neuroquímica 4. Contexto 5. Condicionamento 6. Abstinência

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gleice Kelli Ribeiro da Silva Cardoso

Alterações comportamentais e neuroquímicas em sistemas subcorticais subjacentes à expressão da tolerância condicionada ao contexto induzida pelo anestésico dissociativo cetamina

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Manoel Jorge Nobre do Espírito Santo

Instituição: FFCLRP – USP

Assinatura:

Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

Instituição: FMRP - USP

Assinatura:

Prof^a. Dra^a. Julia Maria dos Santos

Instituição: UFU

Assinatura:

Dra^a. Renata Ferreira Sgobbi

Pós doutorado

Assinatura:

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes”.

Isaac Newton

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Angelina e Luiz, por todo apoio e incentivo ao longo desses anos em cada jornada, pela dedicação e paciência, por aturar minha personalidade nada fácil e por tudo que me ensinaram e ensinam a cada dia.

Ao meu Irmão, Alan, por todo carinho, afeto e companheirismo, por estar ao meu lado mesmo com toda a distância geográfica que nos separa atualmente.

Ao meu bebê, Mustafá, por todo amor incondicional nesses anos, aos meus lindos Apolo, Caquinho, Laila (in memoriam) e Nikita (in memoriam) por serem meu raio de luz nos momentos ruins.

Aos meus amigos queridos de longa data, minha segunda família, Tairine, Abelzinho, Márcia, Cristiano, Ivanzinho e Adriana, por se manterem presentes mesmo nos piores momentos da minha vida e não permitirem que a distância diminuísse nossa amizade.

Às amigas que fiz nessa jornada acadêmica, Pillar e Fran, por aguentar meus choros e minhas paranoias, kkkk, pelas conversas e conselhos dados, pelas risadas no laboratório e fora dele.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Manoel Jorge Nobre, e também amigo, pela confiança nesses dois anos, pelas discussões, pelas “brigas”, por permitir e acompanhar meu amadurecimento profissional.

Aos amigos do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, pela convivência e troca de experiências.

Aos amigos e colegas do Programa de Pós-graduação de Psicobiologia, da USP e de Ribeirão Preto pelos bares e conversas divertidas.

À secretária e amiga do Programa de Pós-graduação, Renata Vicentini, por me ajudar nos momentos confusos e pelos conselhos ao longo desses anos.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto e ao Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, por abrirem as portas para que eu pudesse realizar meu mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), não só pelo financiamento da pesquisa, mais também por acreditar no meu projeto (nº de processo 2015/17568-5).

Obrigada a todos que diretamente ou indiretamente estiveram presente em todo este trabalho !!!

Dedico esta dissertação aos meu pais, meu irmão e a todos que participaram da minha formação acadêmica até os dias de hoje.

Resumo

Cardoso. G.K.R.S. **Alterações comportamentais e neuroquímicas em sistemas subcorticais subjacentes à expressão da tolerância condicionada ao contexto induzida pelo anestésico dissociativo cetamina**. 2017. 112 f. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, 2017.

O anestésico cetamina, amplamente consumido por jovens frequentadores de “clubs” e “raves”, apresenta forte efeito dissociativo, sendo essa uma das razões para sua utilização. Apesar disso, pouco ainda se sabe sobre seus efeitos reforçadores assim como sobre o resultado da interrupção de seu consumo, após ingestão crônica. Ingerido continuamente, apresenta tolerância ao efeito sedativo. Com base em estudos pré-clínicos e clínicos anteriores que descrevem a capacidade da cetamina para induzir o relaxamento e euforia, apesar do seu efeito sedativo bem conhecido, que a hipótese de que a tolerância de cetamina, mesmo em doses mais elevadas, vai emergir, e será notado efeito de reforço da droga. Este estudo procurou determinar se os efeitos sedativos da cetamina podem ser condicionados à sugestão ambiental, como outras drogas de abuso. Avaliamos os efeitos de doses escalonadas de administração crônica de cetamina na reatividade motora e emocional de ratos. E investigamos a existência de tolerância condicionada induzida pelo contexto em ratos previamente tratados. A análise dos efeitos de cetamina sobre o comportamento motor e emocional foi realizada com o uso de um campo aberto (Monitor de atividade eletrônico). Os animais receberam por 14 dias uma única injeção diária de cetamina ou placebo em diferentes doses (10, 20, 40 e 80 mg / kg). Para o protocolo de preferência condicionada ao lugar, os animais foram submetidos a um “baseline” de três sessões seguidas com livre acesso a uma caixa de dois contextos, e foram condicionados no contexto que apresentou menor tempo de permanência por 4 dias por 1 hora, recebendo uma injeção diária de placebo ou cetamina (10, 20, 40 e 80 mg/kg), o teste foi realizado após o tratamento com ausência de droga para avaliação de reforço/aversão da droga emparelhada as pistas contextuais. Para o protocolo de tolerância condicionada os animais foram submetidos, durante 4 dias, a dose de cetamina ou placebo (10 mg/kg, 1x dia) e posteriormente testados, foram utilizadas duas câmaras visuais e tatilmente diferenciadas, sendo A a câmara de condicionamento e B a câmara de teste. A análise sobre as alterações promovidas pela droga na reatividade comportamental dos animais foi realizada com a utilização de um campo aberto (monitor de atividade eletrônico) em diferentes contextos, após a administração de uma *overdose* (80 mg/kg). Portanto os grupos experimentais se dividiram em A x A ou A x B. As alterações induzidas pela administração da dose de 10 mg/kg de cetamina nos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico do córtex infra-límbico (IL) e núcleo “accumbens shell” (NAcSh), regiões encefálicas envolvidas nos aspectos motivacionais do uso e abuso de drogas, foram avaliadas com a utilização das técnicas de microdiálise *in vivo* e cromatografia de alta pressão. Todos os experimentos foram conduzidos com a anuência do CEUA (FFCLRP-USP, protocolo 16.5.736.59.1). Para análise dos dados foi utilizada a ANOVA de um ou dois fatores seguida, quando

necessário, pelo teste de Tukey-HSD, com p estabelecido em $<0,05$. Os resultados indicam que semelhante a outras drogas de abuso, encontramos tolerância aumentada aos efeitos sedativos para cetamina induzidos por pistas contextuais. Além disso, o uso prolongado de cetamina aumenta o tempo gasto no centro do monitor de forma dependente da dose, uma medida bem conhecida de comportamento de baixa reatividade em roedores. Este aumento parece não ser devido aos efeitos sedativos da cetamina, uma vez que a imobilidade (tempo) diminuiu à medida que as doses aumentam nos grupos pré-tratados com cetamina. Além disso, a velocidade, a distância percorrida e a ambulação não diferem em relação ao grupo de placebo. Os resultados indicam também a existência de tolerância condicionada aos efeitos sedativos da cetamina sem prejuízo da resposta motora, assim como alterações significativas no tônus de dopamina e serotonina que se diferenciam se os animais são testados durante o efeito ou com 24 horas de abstinência. Em conclusão, nosso estudo aponta os efeitos antiaversivos de doses mais elevadas de cetamina. Este efeito parece ser acompanhado de tolerância farmacológica aos efeitos sedativos da cetamina que pode ajudar a explicar o uso de doses mais elevadas deste medicamento para propósitos recreativos em seres humanos. E dessa forma, a cetamina partilha algumas características comuns com outras drogas de abuso, como a instalação de tolerância condicionada ao contexto e alterações neuroquímicas associadas (depressão acentuada nos níveis de DA e 5-HT no NAcSh) durante a exposição a um contexto previamente pareado com os efeitos da droga.

Palavras-chave: *Cetamina, Tolerância, Neuroquímica, Contexto, Condicionamento, Abstinência*

Abstract

Cardoso. G.K.R.S. **Behavioral and neurochemical changes in subcortical systems underlying the context-dependent tolerance expression induced by the dissociative anesthetic ketamine.** 2017. 112 f. Dissertation (master's degree). University of São Paulo, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, 2017.

The anesthetic ketamine, widely consumed by young club and rave people in, has a strong dissociative effect, which is one reason for its use. Despite this, little is known about its reinforcing effects as well as the result of discontinuation of its consumption after chronic ingestion. Ingested continuously shows tolerance to the sedative effect. Based on previous preclinical and clinical studies that describe the ability of ketamine to induce relaxation and euphoria, despite its well-known sedative effect, that the hypothesis that ketamine tolerance, even at higher doses, will emerge, and it will be noted strengthening effect of the drug. This study aimed to determine whether the sedative effects of ketamine can be conditioned to environmental cues such as other drugs of abuse. We evaluated the effects of staggered doses of chronic ketamine administration on the motor and emotional reactivity of rats. We also investigated the existence of context-induced conditioned tolerance in previously treated rats. The analysis of the effects of ketamine on motor and emotional behavior was performed with the use of an open field (e-activity monitor). The animals received a single daily injection of ketamine or placebo for 14 days at different doses (10, 20, 40 and 80 mg / kg). For the place-based preference protocol, the animals were submitted to a baseline of three consecutive sessions with free access to a box of two contexts, and were conditioned in the context that presented the shorter residence time for 4 days for 1 hour, receiving a Daily injection of placebo or ketamine (10, 20, 40, and 80 mg / kg), the test was performed after drug-free treatment for drug-boosted / aversion assessment paired with contextual clues. For the conditioned tolerance protocol the animals were submitted to a dose of ketamine or placebo (10 mg / kg, 1x day) for 4 days and then tested. Two visual and tactile differentiated chambers were used, the conditioning chamber and the test chamber. The analysis of the changes promoted by the drug in the behavioral reactivity of the animals was performed using an open field (electronic activity monitor) in different contexts, after the administration of an overdose (80 m / kg). Therefore the experimental groups were divided into A x A or A x B. The changes induced by administration of the 10 mg / kg ketamine dose in the infra-limbic (IL) and nucleus accumbens shell (NAcSh) serotonergic and dopaminergic systems, Encephalic regions involved in the motivational aspects of drug use and abuse were evaluated using in vivo microdialysis and high pressure chromatography techniques. All experiments were conducted with the consent of CEUA (FFCLRP-USP, protocol 16.5.736.59.1). For data analysis, one or two-factor ANOVA was used, followed when necessary by the Tukey-HSD test, with p established at <0.05. The results indicate that similar to other drugs of abuse, we found an increased tolerance to contextual clue-induced sedative effects for ketamine. In addition, prolonged use of ketamine increases the time spent in the center of the monitor in a dose-dependent manner, a well-known measure of low reactivity behavior in rodents. This increase does not appear to be due to the sedative effects of ketamine, since immobility (time) has decreased as doses increase in the ketamine pretreated groups. In addition, the speed, distance traveled and

ambulation did not differ in relation to the placebo group. The results also indicate the existence of conditioned tolerance to the sedative effects of ketamine without impairment of the motor response, as well as significant alterations in the dopamine and serotonin tonus that differ if the animals are tested during the effect or with 24 hours of abstinence. In conclusion, our study points to the anti-aversive effects of higher doses of ketamine. This effect appears to be accompanied by pharmacological tolerance to the sedative effects of ketamine which may help explain the use of higher doses of this drug for recreational purposes in humans. In this way, ketamine shares some common characteristics with other drugs of abuse, such as the installation of context-dependent tolerance and associated neurochemical changes (marked depression in AD and 5-HT levels in NAcSh) during exposure to a previously paired context. With the effects of the drug.

Key words: *Ketamine, Tolerance, Neurochemistry, Context, Conditioning,*

Lista de figuras

Figura 1. Fórmula estrutural da (R,S) cetamina.....	25
Figura 2. Representação anatômica das sub-regiões PrL (Prelimbic) e IL (Infralimbic) do CMPF do rato e áreas equivalentes no encéfalo humano.....	31
Figura 3. O esquema apresentado acima descreve as principais áreas relacionadas aos efeitos tanto reforçadores quanto aversivos das drogas de abuso.....	35
Figura 5. Monitor de atividade eletrônico, e representação do teste.....	43
Figura 6. Esquema do protocolo do Teste de atividade motora e reatividade emocional - monitor de atividade eletrônico (IR)	44
Figura 7. Caixa de condicionamento de dois compartimentos.....	45
Figura 8. Esquema do procedimento experimental de Preferência condicionado ao lugar.....	46
Figura 9. Monitor de atividade eletrônico.....	48
Figura 10. Esquema do procedimento experimental da Tolerância condicionada ao contexto.....	48
Figura 11 – Esquema representativo do protocolo de microdiálise in vivo, realizada na caixa de dois contextos em uma das áreas de estudo.....	51
Figura 12. Esquema representativo das etapas envolvidas no procedimento de perfusão transcardíaca e remoção do encéfalo.....	53
Figura 13. Média $\pm$ EPM da velocidade média (em centímetros por segundo) de movimentação de ratos submetidos à diferentes dosagens de cetamina. ANOVA de um fator seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$	58
Figura 14. Média $\pm$ EPM dos efeitos de doses escalonadas de cetamina sobre a distância total percorrida pelos animais (em centímetros por segundo) no Campo Aberto, ao longo de 20 minutos de teste. ANOVA <i>one-way</i> seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$	58

Figura 15. Média $\pm$ EPM dos efeitos de doses escalonadas de cetamina sobre o movimento ambulatorio (frequência de ocorrência) de animais testados no Campo Aberto, ao longo de 20 minutos de teste. ANOVA *one-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$59

Figura 16. Média $\pm$ EPM dos efeitos de doses escalonadas de cetamina sobre o tempo de imobilidade dos animais (em segundos) testados no Campo Aberto, ao longo de 20 minutos de teste. ANOVA *one-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$59

Figura 17. Média $\pm$ EPM dos efeitos de doses escalonadas de cetamina sobre o tempo de permanência na periferia do campo aberto (em segundos) ao longo de 20 minutos de teste. ANOVA *one-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$60

Figura 18. Média $\pm$ EPM dos efeitos de doses escalonadas de cetamina sobre o tempo de permanência no centro do campo aberto (em segundos) ao longo de 20 minutos de teste. ANOVA *one-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$60

Figura 19. Os gráficos apresentam a ação de doses escalonadas de cetamina (Média $\pm$ EPM) sobre a velocidade de movimentação (cm/s) de ratos testados em duas condições: durante os efeitos (coluna a esquerda), e na abstinência de 24 (1), 72 (2) ou 144 horas (3) de cetamina (coluna a direita). O teste teve a duração de 20 minutos. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$61

Figura 20. Os gráficos apresentam a ação de doses escalonadas de cetamina (Média $\pm$ EPM) sobre a distância total (cm) percorrida ao longo de 20 minutos de teste por ratos testados em duas condições: durante os efeitos (coluna a esquerda), e na abstinência de 24 (1), 72 (2) ou 144 horas (3) de cetamina (coluna a direita). O teste teve a duração de 20 minutos. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$62

Figura 21. Os gráficos apresentam a ação de doses escalonadas de cetamina (Média $\pm$ EPM) sobre o movimento ambulatorio (frequência) ao longo de 20 minutos de teste por ratos testados em duas condições: durante os efeitos (coluna a esquerda), e na abstinência de 24 (1), 72 (2) ou 144 horas (3) de cetamina (coluna a direita). O teste teve a duração de

20 minutos. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$63

Figura 22. Os gráficos apresentam a ação de doses escalonadas de cetamina (Média $\pm$ EPM) sobre o tempo de imobilidade dos animais durante os 20 minutos de teste em duas condições: durante os efeitos (coluna a esquerda), e na abstinência de 24 (1), 72 (2) ou 144 horas (3) de cetamina (coluna a direita). O teste teve a duração de 20 minutos. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$64

Figura 23. Os gráficos apresentam o efeito de doses escalonadas de cetamina (Média $\pm$ EPM) sobre o tempo de permanência (s) na periferia do teste do campo aberto ao longo de 20 minutos de teste por ratos testados em duas condições: durante os efeitos (coluna a esquerda), e na abstinência de 24 (1), 72 (2) ou 144 horas (3) de cetamina (coluna a direita). O teste teve a duração de 20 minutos. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$65

Figura 24. Os gráficos apresentam o efeito de doses escalonadas de cetamina (Média $\pm$ EPM) sobre o tempo de permanência (s) no centro do teste do campo aberto ao longo de 20 minutos de teste por ratos testados em duas condições: durante os efeitos (coluna a esquerda), e na abstinência de 24 (1), 72 (2) ou 144 horas (3) de cetamina (coluna a direita). O teste teve a duração de 20 minutos. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$66

Figura 25. O gráfico acima detalha a preferência condicionada ao lugar de animais testados sob o efeito de doses escalonadas de cetamina (Média $\pm$ EPM), como revelado pela diferença entre o tempo basal e tempo de permanência no compartimento menos preferido durante o teste. Abaixo está apresentada a frequência de entradas no mesmo compartimento. ANOVA *one-way* (acima), ou *two-way* (abaixo), seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$68

Figura 26. Média $\pm$ EPM da velocidade (acima) e distância percorrida (abaixo) por ratos testados durante uma overdose de 80 mg/kg de cetamina. CA x CA: animais condicionados no contexto A com cetamina (10 mg/kg), e testados no quinto dia com a overdose no mesmo contexto. CA x CB: animais condicionados no contexto A com cetamina (10 mg/kg), e testados no quinto dia com a overdose no contexto B. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$70

Figura 27. Média $\pm$ EPM da frequência de movimento ambulatorio (acima) e tempo de imobilidade (abaixo) de ratos testados durante uma overdose de 80 mg/kg de cetamina. CA x CA: animais condicionados no contexto A com cetamina (10 mg/kg), e testados no quinto dia com a overdose no mesmo com texto. CA x CB: animais condicionados no contexto A com cetamina (10 mg/kg), e testados no quinto dia com a overdose no contexto B. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$71

Figura 28. Média $\pm$ EPM da frequência do tempo de permanência na periferia (acima) e centro (abaixo) do Campo Aberto, de ratos testados durante uma overdose de 80 mg/kg de cetamina. CA x CA: animais condicionados no contexto A com cetamina (10 mg/kg), e testados no quinto dia com a overdose no mesmo com texto. CA x CB: animais condicionados no contexto A com cetamina (10 mg/kg), e testados no quinto dia com a overdose no contexto B. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$72

Figura 29. O gráfico apresenta a média ($\pm$ EPM – pmol/ 5 ml) da liberação de dopamina (DA) e serotonina (5-HT) no córtex infralímbico de ratos, como determinado pela técnica de microdiálise *in vivo*. As amostras foram coletadas durante os efeitos da cetamina (4º dia de condicionamento) ou após 24 horas de abstinência, durante a expressão da resposta de preferência condicionada ao lugar. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$74

Figura 30. O gráfico apresenta a média ($\pm$ EPM – pmol/ 5 ml) da liberação de dopamina (DA) e serotonina (5-HT) no núcleo accumbens *shell* de ratos, como determinado pela técnica de microdiálise *in vivo*. As amostras foram coletadas durante os efeitos da cetamina (4º dia de condicionamento) ou após 24 horas de abstinência, durante a expressão da resposta de preferência condicionada ao lugar. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$75

Figura 31. A figura ilustra os pontos de localização das cânulas no córtex infralímbico (acima), e núcleo accumbens *shell* (abaixo), segundo coordenadas extraídas do atlas de Paxinos & Watson (2008). fmi: forceps minor, PrL: córtex prélimbico, IL: córtex infralímbico, CPu: caudado-putâmen, NAcC: núcleo accumbens *core*, NAcSh: núcleo accumbens *shell*.....76

Lista de abreviaturas e siglas

5-HIAA	ácido 5-hidroxi-indol-acético	CPP	preferência condicionada ao lugar
5-HT	serotonina	CR	resposta condicionada
AcbSh	núcleo “accumbens” área de “shell”	CRF	fator liberador de corticotrofina
ACC	córtex cingulado anterior	DA	dopamina
AMPA	receptor de ácido a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico	DGP	globo pálido dorsal
ANOVA	análise de variância	DLO	córtex orbitobital
AP	anterior-Posterior	DOPAC	ácido dihidroxifenilacético
ATV	área tegmental ventral	DSM	“Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders”
Baseline	linha de base	DV	dorso ventral
BHE	barreira hematoencefálica	EPM	erro padrão da média
BLA	complexo amigdalóide basolateral	EPM	erro padrão médio
BNST	núcleo do leito da estria terminal	Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
BS	preferência basal	g	gramas
CeA	núcleo central da amígdala	GABA	aminoácido gama-aminobutírico
CEUA	comissão de ética no uso de animais	GLU	glutamatergico
CI-395	(N-1-fenil-ciclohexil-piperidina [PCP] cloridrato, ou fenciclidina)	HL	hipotálamo lateral
CI-400	(N-etil-1-fenil-ciclohexamina cloridrato)	HPLC	“High performance liquid chromatography”
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência	HVA	ácido homovanílico
cm	centímetro	i.m.	intramuscular
CO ₂	dióxido de carbono	i.p.	intraperitoneal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal	IL	infra-límbico
CPFM	córtex pré-frontal medial	IR	Monitor de atividade eletrônico
		kg	quilograma

LAT lateral

mg miligrama

ml mililitro mm-milímetro

mm milímetro

NA noradrenalina

NAc “núcleo accumbens”

NE noradrenalina;

NMDA N-Metil-D-Aspartato

n^omol nanomol

°C grau Celsius

OMS organização mundial de saúde

PBS tampão fosfato-salino

PFC córtex pré-frontal

PL pré-lobulocéfalo

PrC córtex pré-central

s.c. subcutânea

SNC sistema nervoso central

SNc substância negra parte compacta;

UR resposta incondicionada

US estímulo incondicionado

VGP globo pálido ventral

VO ventral orbital

VTa área tegmental ventral

μl microlitro

μm micrometro

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Abreviaturas e siglas	ix
1. Introdução	
1. Cetamina	24
2. Cetamina: ação neurofarmacológica e abuso	26
3. Cetamina: ação neurobiológica e abuso	28
3.1. Córtex pré-frontal medial (CPFm)	29
3.1.1. Córtex infralímbico (IL)	31
3.1.2. Núcleo accumbens.....	32
3.1.3. As relações entre o IL e NAcSh.....	33
3.1.4. As eferências do NAcSh.....	34
3.2. Justificativa	35
3.3. Hipótese do trabalho.....	37
2. Objetivos	
2.1. Objetivo Geral.....	39
2.2. Objetivos Específicos	39
3. Material e métodos	
3.1. Animais	41
3.2. Ética experimental.....	41
3.3. Drogas e doses.....	42
3.4. Procedimentos experimentais	42
3.4.1. Teste de atividade motora e reatividade emocional - monitor de atividade eletrônico – campo aberto (IR)	42
3.4.2. Teste de preferência condicionado ao lugar (CPP)	44
3.4.3. Tolerância condicionada ao contexto.....	47

3.4.4. <i>Análise das alterações neurofarmacológicas induzidas durante a expressão da reposta de preferência condicionada ao lugar.</i>	49
<i>Cirurgia</i>	49
<i>Microdiálise in vivo</i>	50
<i>Procedimento experimental</i>	52
<i>Eutanásia e perfusão</i>	52
<i>Análise histológica</i>	53
3.5. <i>Análise estatística</i>	53
4. Resultados	
4.1. <i>Experimento 1: Teste atividade motora e reatividade emocional</i>	56
4.2. <i>Experimento 2: Teste de preferência condicionado ao lugar (CPP)</i>	67
4.3. <i>Experimento 3: Tolerância condicionada ao contexto</i>	69
4.4. <i>Experimento 4: Efeitos da administração de cetamina sob os níveis de dopamina e serotonina das áreas IL e NAcSh</i>	73
5. Discussão	78
6. Conclusão	85
7. Referências Bibliográficas	86
8. Anexos	103

INTRODUÇÃO

1. Cetamina

Já desde os anos 1950 a indústria farmacêutica mundial procurava um agente anestésico “ideal” que, como tal, também apresentasse propriedades analgésicas. Como resultado, foram inicialmente desenvolvidas as substâncias CI-395 (cloridrato de N-1-fenil-ciclohexil-piperidina [PCP], ou fenciclidina) e o CI-400 (cloridrato de N-etil-1-fenil-ciclohexamina) (Johnstone, Evans, & Baigel, 1959, Maddox et al., 1965). Apesar da ausência de efeitos depressivos secundários sobre os sistemas respiratório e cardiovascular, estas substâncias, a fenciclidina, em particular, eram capazes de induzir efeitos similares à embriaguez em ratos, delírio em cães, estado cataléptico em pombos e anestesia em macacos (Domino and Luby, 2012). Embora demonstrasse ser um anestésico seguro e, portanto, confiável em humanos, a fenciclidina mostrou também induzir alucinações além de delírio intenso e prolongado; efeitos claramente indesejáveis e que a tornaram não qualificável para utilização clínica (Greifenstein et al., 1958; Johnstone et al., 1959; Domino and Luby, 2012). Entretanto, foram estes mesmo efeitos que levaram a sua utilização como droga recreativa, alcançando rapidamente entre os jovens um padrão de abuso. Por essa razão teve sua comercialização e produção proibida em 1978.

Posteriormente, as pesquisas foram direcionadas à tentativa de sintetizar um análogo da fenciclidina que apresentasse o mesmo potencial anestésico, mas com menores efeitos psíquicos. Foi quando surgiu a cetamina, identificada inicialmente como CI-581 (Domino, 1980 a). Sendo um análogo estrutural da fenciclidina e apresentando um décimo de sua potência, a cetamina foi rapidamente selecionada para os testes com seres humanos, sendo administrada em 3 de agosto de 1964 sob a supervisão dos pesquisadores da Universidade de Michigan, os doutores Edward

Domino e Guenter Corssen. Os resultados mostraram que a cetamina poderia ser utilizada como anestésico seguro e eficaz em seres humanos. Posteriormente, estudos clínicos reafirmaram sua eficácia em pacientes de 6 semanas a 86 anos de idade (Corssen and Domino, 1966). Seus achados indicaram que a cetamina produzia profunda analgesia associada a um peculiar estado alterado de consciência, como limitada duração do efeito; que poderia ser prolongado por administração repetida. Em comparação com a fenciclidina, os efeitos colaterais mostraram-se também menos intensos e ausência de delírio severo (Corssen and Domino, 1966). Dessa forma, Ketalar (1970) tornou-se a primeira preparação de cetamina aprovada para uso humano.

Hoje, a cetamina é o anestésico mais empregado na medicina veterinária e um dos mais utilizados na anestesia clínica, em grande parte devido a sua habilidade de manter a estabilidade dos sistemas respiratório e cardiovascular ao mesmo tempo em que induz sedação e analgesia eficazes. Além disso, pesquisas recentes apontam sua importância terapêutica no tratamento de depressão severa, no transtorno de estresse pós-traumático e no manejo da dor crônica (Costi, Van Dam, & Murrough, 2015; Kurdi, Theerth, & Deva, 2015).

Figura 1. Fórmula estrutural da (R,S) cetamina. (Tyler, Yourish, Ionescu, & Haggarty, 2017).

Apesar de desprovida dos potentes efeitos dislépticos da fenciclidina, a cetamina apresenta também a capacidade de alterar a consciência e induzir sintomas de psicose que se expressam como sintomas positivos e negativos, além de disfunção cognitiva,

características da esquizofrenia (Olney and Farber, 1995 b), o que levou a sua utilização como seu "modelo" farmacológico. Curiosamente, estes mesmos efeitos também contribuíram, assim como a fenciclidina no passado, para tornar a cetamina uma droga de abuso. Seu uso recreativo ('K', 'ket', 'Special K') aumentou mundialmente nos últimos anos aumentando a incidência de danos físicos e dependência (C. J. Morgan & Curran, 2012).

2. Cetamina: ação neurofarmacológica e abuso

A ação neurofarmacológica da cetamina é bastante complexa. Seu principal foco é a neurotransmissão mediada por glutamato, o principal neurotransmissor excitatório no encéfalo de mamíferos, no qual atua como um antagonista não competitivo de um de seus três receptores, o receptor N-metil- D- aspartato (NMDA). Embora de forma menos intensa, a cetamina também influencia outros sistemas de neurotransmissores, dentre os quais, bloqueando os receptores muscarínicos de acetilcolina e potencializando os efeitos da inibição sináptica mediada pelo ácido gama-aminobutírico (GABA). Atua também na liberação de dopamina (Rabiner, 2007a) além de agir como um agonista fraco dos receptores opioides μ (Oye, Paulsen, & Maurset, 1992). Apesar disso, o antagonismo dos receptores NMDA é o principal responsável pelas propriedades específicas da cetamina (efeitos amnésicos e psicossensoriais, analgesia e neuroproteção).

A biodisponibilidade de cetamina 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 como estímulo reforçador por esta via de administração. Por outro lado, a biodisponibilidade por via intramuscular, sublingual, aérea (por aspiração, a mais comum), ou endovenosa é francamente maior, alcançando

nesta última até 99% (Potter & Choudhury, 2014). Por sua capacidade de intensificar as experiências sensoriais (Dillon, Copeland, & Jansen, 2003), e também sexuais (Lim, 2003), vem se tornando incrivelmente popular entre os jovens, sobretudo entre aqueles frequentadores de “Clubs” e “Raves”, já desde os anos 80 (Arditti et al., 2002). Este quadro se agrava levando em consideração que boa parte dos indivíduos que fazem uso de cetamina são poliusuários (Lankenau & Sanders, 2007, Lankenau et al., 2007). Foi demonstrado que, em roedores, doses subanestésicas de cetamina produzem um amplo espectro de efeitos que incluem perturbações sensório-motoras (Mansbach & Geyer, 1991), déficits de memória (Imre, Fokkema, Den Boer, & Ter Horst, 2006, Kos et al., 2006), hipermotilidade (Carlsson, 1993), estereotipia e ataxia (Tricklebank, Singh, Oles, Preston, & Iversen, 1989). Em seres humanos, a cetamina acentua o estado psicótico de pacientes esquizofrênicos (Lahti, Koffel, LaPorte, & Tamminga, 1995), sendo utilizada rotineiramente como um modelo clínico e animal de esquizofrenia (Geyer, 1998). Sua ação intensificadora sobre a neurotransmissão dopaminérgica (Rabiner, 2007b) parece estar subjacente a sua capacidade de induzir abuso. Quando utilizada em doses anestésicas, alucinações, sonhos vívidos, erros de percepção, e distorções do tempo, espaço e imagem corporal são os sintomas emergentes (Morgan, Curran, 2012).

A tolerância aos efeitos sedativos da cetamina já é conhecida (Tobias, 2000). Seu uso continuado produz uma série de efeitos físicos e psicológicos, dentre os quais a cistite ulcerativa (Shahani, Streutker, Dickson, & Stewart, 2007), dor abdominal (Muetzelfeldt et al., 2008), depressão (Morgan, Muetzelfeldt, & Curran, 2010) e psicose (Krystal et 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.

São precisamente os efeitos psicodislépticos, que limitam sua utilização clínica, que tornam a cetamina o tipo de droga extremamente atraente para os usuários que a utilizam de forma recreativa (Morgan et al., 2012). Estes efeitos se assemelham àqueles observados durante surtos de psicose aguda e tendem a ocorrer em conjunto com os efeitos dissociativos, psicodélicos, anestésicos e cognitivos (Krystal et al., 1994); muito embora não existam evidências que apontem uma ligação entre o consumo de cetamina e o diagnóstico de transtornos psiquiátricos (Morgan et al., 2012). Estes efeitos podem aparecer também como consequência de sua abstinência (Poole & Brabbins, 1996), embora os aspectos neurobiológicos implicados nesse processo sejam bem pouco conhecidos; sabe-se, entretanto que, para este caso, o receptor NMDA cumpre papel preponderante. Este receptor tem papel fundamental no fenômeno da plasticidade sináptica, a qual subjaz os processos de aprendizagem e memória (Morris, 2013). A ação da cetamina sobre estes processos 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 cetamina. Estes efeitos parecem, no entanto, se apresentar de forma perene em usuários crônicos (Morgan et al., 2012), muito embora haja uma completa falta de estudos básicos que corroborem tais suposições.

3. Cetamina: ação neurobiológica e abuso

No campo neurobiológico, tem sido sugerido que aos efeitos da cetamina resultem de um desajuste promovido por sua ingestão crônica em mecanismos neurais de áreas corticais, particularmente os mecanismos dopaminérgicos (DA) e

glutamatérgicos (GLU). Por exemplo, em seres humanos, uma das áreas cerebrais afetadas pelo uso de cetamina é o córtex pré-frontal medial (CPFM), particularmente suas regiões central e ventromedial (Holcomb, Lahti, Medoff, Weiler, & Tamminga, 2001). Seus efeitos dissociativos se correlacionam significativamente com uma redução acentuada na atividade cortical ventromedial mediada por GLU (Deakin et al., 2008). As eferências oriundas dessas regiões exercem uma ação regulatória do tipo *top-down* sobre diversas regiões subcorticais, dentre as quais se destacam o hipocampo, o complexo amigdalóide e o núcleo *accumbens*, seja através de sua ação diretamente em projeções GLU e/ou indiretamente, através da modulação de eferências DA para essas regiões (Floresco, Zhang, & Enomoto, 2009). Essa ação pode ser, em primeira instância, a responsável por alguns dos efeitos cognitivos e reforçadores da cetamina, já que diversas evidências sugerem que o CPFM é uma região crítica na mediação dos efeitos de antagonistas de receptores NMDA (Homayoun & Moghaddam, 2007). Como exemplo, o núcleo *accumbens*, área encefálica cuja ativação está vinculada aos efeitos reforçadores das drogas de abuso (Carlezon Jr. & Thomas, 2009), e que constitui a maior parte do estriado ventral, recebe projeções GLU diretamente do CPFM, além do hipocampo, do núcleo basolateral do complexo amigdalóide, e densas projeções da área tegmental ventral (Sesack & Pickel, 1990, D. S. Zahm & Brog, 1992).

3.1. Córtex pré-frontal medial (CPFm)

Em ratos de laboratório, o CPFM é tipicamente referido como o conjunto de estruturas que se localizam ao longo da parede medial do CPF (Dalley, Cardinal, & Robbins, 2004); (Groenewegen, Wright, & Uylings, 1997, Heidbreder & Groenewegen, 2003, Kesner & Churchwell, 2011). Essas estruturas são frequentemente agrupadas em

uma sub-região dorsal, que inclui córtex précentral (PrC) e a parte anterior do giro do cíngulo (ACC) e uma sub-região ventral, que inclui os córtices pré - límbico (PL), infra-límbico (IL) e ventral orbital (VO). Apesar de sua localização lateral, os córtices orbitofrontal (DLO) interno e dorsal (DLO) são frequentemente incluídos como estruturas mPFC, dada a sua interconectividade tanto com PL quanto com IL (Kesner & Churchwell, 2011, Vertes, 2004).

O CPFM agrega uma série de estruturas cerebrais intimamente associadas à regulação de processos cognitivos, emocionais e motivacionais de alta complexidade. Entre essas funções, incluem-se aquelas relacionadas ao controle do comportamento: atenção, inibição da resposta, planejamento e tomada de decisão (Balleine & Dickinson, 1998, Dalley et al., 2004, Euston, Gruber, & McNaughton, 2012, E. K. Miller & Cohen, 2001). O CPFM é um elemento-chave do sistema límbico mesocortical envolvido no controle dos efeitos motivacionais das drogas de abuso (Kalivas, 2008, Kalivas, 2009). Esta região recebe fibras aferentes dopaminérgicas provenientes do grupo A10 dentro da área tegmental ventral (Swanson, 1982), bem como de várias outras regiões límbicas e sensoriais, incluindo o complexo amigdalóide e hipocampo (Hoover & Vertes, 2007). Juntas, essas projeções permitem que o CPFM avalie a relevância e o significado motivacional de estímulos e contextos associados à droga (Kalivas, 2009). A perturbação de seu funcionamento pode então prejudicar o controle executivo do comportamento motivado que está subjacente à busca e consumo de drogas de abuso, estando aí incluída, possivelmente, a cetamina. De particular importância para este trabalho são as alterações induzidas pela administração de cetamina nos circuitos neurais do córtex infralímbico e núcleo *accumbens shell* (NAcSh). Foi demonstrada a existência de uma conexão seletiva entre o NAcSh e o IL, e também com a ATV mesencefálica, a mais importante fonte de inervação

dopaminérgica para as áreas estriatais (Thompson & Swanson, 2010). Vale ressaltar que tanto o IL quanto o PrL apresentam conexões excitatórias glutamatérgicas para o NAcSh e NAcC, respectivamente. Estas conexões têm recebido ultimamente atenção substancial devido ao seu envolvimento na modulação dos efeitos reforçadores e aversivos relacionados ao abuso de drogas (Moorman, James, McGlinchey, & Aston-Jones, 2015; Peters, Kalivas, & Quirk, 2010; Richard & Berridge, 2013).

3.1.1. Cortéx infralimbico (IL)

A ativação do IL parece estar envolvida na supressão de comportamentos relacionados à busca e consumo de drogas (Peters, LaLumiere, & Kalivas, 2008). Por outro lado, lesões desta região facilitam tanto a recuperação quanto o reestabelecimento da resposta de preferência à droga num paradigma de condicionamento Pavloviano (Rhodes & Killcross, 2007; Sarah E. V. Rhodes & Killcross, 2004).

Figura 2. Representação anatômica das sub-regiões PrL (Prelimbic) e IL (Infralimbic) do CMPF do rato e áreas equivalentes no encéfalo humano. Extraído de Gass & Chandler (2013).

De fato, a despeito de alguns estudos demonstrarem o não envolvimento do IL na busca e consumo de drogas (Capriles, Rodaros, Sorge, & Stewart, 2003; Fuchs et al., 2005; McFarland & Kalivas, 2001; Pierce, Reeder, Hicks, Morgan, & Kalivas, 1998,

Pierce et al., 1998), outros achados sugerem que o IL tem um papel ativo na supressão destes comportamentos. Como exemplo, a inativação do IL leva a um aumento na frequência da resposta operante mantida pela autoadministração de cocaína (Peters, LaLumiere, et al., 2008), além de facilitar a recuperação espontânea desta resposta após 28 dias de abstinência (Peters, Vallone, Laurendi, & Kalivas, 2008). Importante para este trabalho, a administração do modulador alostérico de receptores AMPA de glutamato 2-[2,6-Difluoro-4-[[2-[(phenylsulfonyl)amino]ethyl]thio]phenoxy]acetamide (PEPA) prejudica a expressão do comportamento de busca e consumo de cocaína sinalizada por uma pista contextual (LaLumiere, Smith, & Kalivas, 2012).

3.1.2. Núcleo “accumbens”

Em termos farmacológicos, o núcleo “accumbens” (NAc) é geralmente caracterizado por apresentar intensas aferências dopaminérgicas mesencefálicas que a ele se direcionam, particularmente da área tegmental ventral (ATV) no mesencéfalo (Ferreira, Del-Fava, Hasue, & Shammah-Lagnado, 2008; Swanson, 1982). Recebe também aferências glutamatérgicas maciças de estruturas límbicas como o córtex pré-frontal (ou pré-comissural) (Berendse, Graaf, & Groenewegen, 1992; Brog, Salyapongse, Deutch, & Zahm, 1993), a amígdala (Wright & Groenewegen, 1996), e o hipocampo (Brog et al., 1993). Por sua vez, desta região saem projeções que se direcionam a núcleos que organizam o comportamento motor, principalmente o pálido ventral e o núcleo subtalâmico (Nauta, Smith, Faull, & Domesick, 1978). Dada esta configuração, os neurônios dessa região estão em uma posição privilegiada para coordenar a aprendizagem associativa incluindo aquela relacionada aos efeitos reforçadores das drogas de abuso.

O NAc é composto de duas importantes sub-regiões denominadas áreas *core* (NAcC) e *shell* (NAcSh) (Ikemoto, 2007). Além de se diferenciarem em suas características histoquímicas (Daniel S. Zahm, 2000), estas subregiões se diferem também em termos de suas projeções aferentes e eferentes (Brog et al., 1993). O NAcC recebe a maioria de suas aferências dos córtices PrL e agranular insular dorsal. O NAcSh, por sua vez, recebe em sua maioria as projeções oriundas dos córtices in IL e agranular insular ventral (Berendse et al., 1992; Brog et al., 1993, 1993; Wright & Groenewegen, 1996). De importância para nosso estudo estão as ligações entre o IL e o NAcSh já que, apesar de ter sido demonstrado que a inibição desta ligação mostrou-se impotente para reduzir a restauração da motivação para a autoadministração de cocaína (McFarland & Kalivas, 2001), mostrou-se, entretanto, eficaz em inibir a mesma resposta, desta feita evocada por pistas contextuais (Rocha & Kalivas, 2010). Estas diferenças sugerem que estas sub-regiões estão diferentemente relacionadas ao controle do comportamento motivado.

3.1.3. As relações entre o IL e NAcSh

Como dito anteriormente, Peters et al. (2008) examinaram a função das projeções do IL que se direcionavam para o NAcSh durante a expressão da extinção da resposta operante de busca a cocaína. Eles demonstraram que a inativação reversível de qualquer uma das regiões restaurava esta resposta previamente extinta. Isto implica na importância do IL no controle basal da resposta de extinção, fato amparado pelas já bem documentadas projeções neuroanatômica do IL para o NAcSh (Berendse et al., 1992). Isto sugere que estas projeções são recrutadas durante a expressão da resposta de extinção. Além do mais, na medida em que estas projeções são na sua grande maioria

glutamatérgicas elas se adequam a ideia de plasticidade glutamatérgica no NAcSh como consequência do treino de extinção (Sutton et al., 2003). Por outro lado, em outro estudo utilizando a técnica de marcação imuno-histoquímica, foi demonstrada a ativação do BLA durante a expressão da extinção (Hamlin, Clemens, Choi, & McNally, 2009). Isto sugere que as projeções do BLA para o NAcSh podem contribuir para o controle da resposta de extinção, projeções já são conhecidas por serem recrutadas durante a recuperação da resposta operante induzida pelo contexto.

3.1.4. As eferências do NAcSh

As projeções que partem do NAcSh são primariamente GABAérgicas. (Sano & Yokoi, 2007), e apresentam a função de inibir os neurônios localizados no hipotálamo lateral (HL). A inibição do NAcSh, portanto, leva a redução da inibição mediada por GABA no HL. De fato, a reversão da inibição do NAcSh leva a um aumento da resposta neural no HL, sendo esta uma condição crítica para a expressão da extinção da resposta de busca e consumo de álcool etílico (Millan, Furlong, & McNally, 2010). O NAcSh pode também exercer seu controle sobre a resposta de extinção via projeções inibitórias para o globo pálido ventral (Lu, Behnam Ghasemzadeh, & Kalivas, 1997), projeções estas importantes na mediação da reinstalação do comportamento de busca e consumo de drogas (McFarland & Kalivas, 2001).

Figura 3. O esquema apresentado acima descreve as principais áreas relacionadas aos efeitos tanto reforçadores quanto aversivos das drogas de abuso. Em nosso trabalho, atenção especial foi dada ao circuito pré-frontal córtex (medial), cuja influência sobre o controle executivo do comportamento motivado é conhecida. A figura também mostra que o NAcSh (*Acb shell*) recebe aferências de estruturas que notadamente regulam a aprendizagem associativa relacionada ao contexto (complexo amigdalóide basolateral (BLA) e hipocampo) (VTA: área tegmental ventral; SNc: substância negra parte compacta; VGP e DGP: pálido ventral e dorsal, respectivamente; DA: dopamina; NE: noradrenalina; CRF: fator liberador de corticotrofina; CeA: núcleo central da amígdala; BNST: núcleo do leito da estria terminal; “Brainstem”: tronco encefálico. Extraído de Tang et al. (2015).

3.2. Justificativa

Assim como a maioria das drogas de abuso, a cetamina apresenta a capacidade de alterar os sistemas de catecolaminas, particularmente acentuando a neurotransmissão DA (Vollenweider, Vontobel, Oye, Hell, & Leenders, 2000), seja através da mobilização dos estoques de DA e/ou pelo bloqueio de sua receptação (Hancock & Stamford, 1999). Esta pode ser então a razão de suas propriedades euforizantes, psicomiméticas e aditivas. Estes efeitos sofrem rápida tolerância no córtex pré-frontal após administrações repetidas enquanto que o metabolismo serotoninérgico mostra-se sensibilizado (Lindfors, Barati, & O'Connor, 1997). Em qualquer caso, a gama de seus efeitos psicofisiológicos parece ser fortemente controlada pelo contexto, de tal forma que sua ingestão voluntária é facilitada em contextos pouco familiares, mas reduzida em

contextos aos quais os indivíduos já estão habituados. Cumpre notar também que, para as doses de cetamina 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). Isto poderia corroborar a suposição acima de que alguns dos efeitos da cetamina, assim como o de outros estimulantes como a cocaína e a anfetamina (Caprioli, Paolone, et al., 2007, Caprioli, Celentano, Testa, Lucantonio, & Badiani, 2007), seriam mais bem experienciados em contextos para os 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 são conhecidos já há algum tempo (Siegel, 1975^a, Siegel, Hinson, Krank, & McCully, 1982a). 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, McLellan, & O'Brien, 1986, Childress, McLellan, & O'Brien, 1984). Da mesma forma, experiências adversas, abuso sexual, estresse ocupacional e outras formas de estresse físico ou emocional podem, além de facilitar o abuso de drogas, também desencadear o desejo por sua busca e consumo, mesmo após um período prolongado de abstinência (Childress et al., 1986, Childress et al., 1984). As alterações farmacológicas implicadas neste processo são muito pouco conhecidas. Sabe-se, entretanto, que assim como a quase totalidade das drogas de abuso (Di Chiara, 1987), a cetamina apresenta a característica de acentuar os níveis de DA no NAc (Hancock & Stamford, 1999).

3.3. Hipótese do trabalho

Tomando como base os relatos que descrevem a capacidade da cetamina de produzir intensos efeitos euforizantes, cognitivos e dissociativos é esperado que a droga apresente a capacidade de induzir preferência condicionada, possivelmente de forma dose-dependente. Seus efeitos sedativos, entretanto, sofrem tolerância farmacológica, como já demonstrado em alguns relatos clínicos. Estas características reforçadoras da cetamina estarão diretamente relacionadas a sua ação farmacológica sobre diversos sistemas neurais, além do glutamatérgico, para o qual a cetamina é um antagonista não competitivo de receptores NMDA, como os sistemas neurais DA e serotoninérgico do IL e NAcSh, áreas encefálicas relacionadas à extinção e manutenção do comportamento motivado, como já visto.

OBJETIVOS

2. Objetivo geral

Investigar a influência dos efeitos de doses escalonadas de cetamina sobre a resposta locomotora e preferência condicionada ao contexto, assim como a possível tolerância comportamental e farmacológica induzida pelo tratamento. As alterações farmacológicas subjacentes à expressão da tolerância ao contexto foram avaliadas através do registro dos níveis extracelulares e metabólitos de serotonina (5-HT) e dopamina (DA) de duas regiões encefálicas funcionalmente envolvidas na expressão dos aspectos reforçadores e motivacionais das drogas de abuso, assim como dos efeitos negativos consequentes a interrupção de seu uso, a saber: o córtex infralímbico (IL) e área *shell* do núcleo *accumbens* (AcbSh).

2.1. Objetivos específicos

- Análise dos efeitos do tratamento crônico com cetamina sobre o comportamento de ratos testados em um monitor de atividade (teste do Campo Aberto).
- Análise dos efeitos do tratamento crônico com cetamina em ratos testados num procedimento de preferência condicionada ao lugar.
- Análise dos efeitos do tratamento crônico com cetamina como forma de indução do fenômeno da tolerância condicionada ao contexto em ratos testados num procedimento de preferência condicionada ao lugar.
- Análise das alterações farmacológicas subjacentes a expressão do fenômeno da tolerância condicionada ao contexto de ratos testados num procedimento de preferência condicionada ao lugar avaliada através do registro dos níveis extracelulares e metabólitos de serotonina (5-HT) e dopamina (DA) do IL e NAcSh.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 194 ratos *Wistar* de 6 semanas com ± 220 g (valores estipulados de peso/idade segundo Umeoka et. al, 2011) provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, “campus” de Ribeirão Preto. Em função da natureza dos tratamentos, os animais que foram destinados aos seguintes procedimentos: de preferência condicionada ao lugar (CPP), monitor de atividade eletrônico (IR), tolerância condicionada ao lugar e ao estudo neuroquímico ficaram alojados em grupo de quatro, em caixas de polipropileno de 35 x 19 x 25cm. Quando necessário, os animais ficaram separados por divisórias internas de malha de aço, com orifícios de 1x1 cm², que permitiram a interação dos animais mas impossibilitaram seu contato direto o que, frequentemente, resulta em danos nos implantes cirúrgicos. A essas caixas foi adicionada raspas de madeira e permitido aos animais acesso livre a água e à ração, dentro de uma estante ventilada com controle de temperatura ($23 \pm 1^\circ$ C), exaustão, luminosidade e umidade, em um ciclo claro-escuro de 12 horas, com as luzes acesas às 7 horas da manhã.

3.2. Ética experimental

Os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações do Manual de Utilização de Animais da FIOCRUZ (http://www.castelo.fiocruz.br/vpplr/comissoes_camarastecnicas/Manual_procedimentos.pdf), e do *U. S. National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Academic Press, Washington D.C. 8ª. Ed. 2011). Todo o cuidado foi tomado para reduzir ao mínimo o número de animais utilizados, assim como seu sofrimento, sem comprometer, no entanto, a viabilidade dos dados coletados. Este trabalho foi submetido à Comissão de

Ética no Uso de Animais (CEUA) da USP – “campus” Ribeirão Preto e aprovado para realização, conforme processo CEAU/USP-RP nº 16.5.736.59.1 (Anexo I).

3.3. Drogas e doses

Foi utilizado o antagonista não competitivo de receptores de glutamato do tipo *N-metil-D-aspartato* (NMDA) cetamina (cloridrato de cetamina a 10%, Cetamin, SP - Brasil), nas doses de 10, 20, 40 e 80 mg/kg. O cloreto de sódio (0,9%) foi utilizado como placebo.

3.4. Procedimentos experimentais

3.4.1 Teste de atividade motora e reatividade emocional - monitor de atividade eletrônico – campo aberto (IR)

O teste do campo aberto, ou monitor de atividades (50 x 50 x 50 cm) foi realizado em uma arena quadrada. Nas laterais do modelo foram instalados dois sistemas de LEDs infravermelhos (emissor-receptor), o que permitiu monitorar eletronicamente a atividade locomotora do animal, com base na perturbação dos sensores como resultado do movimento do animal (Figura 5). Os movimentos foram monitorados nos eixos x, y, e z, ou seja, altura, largura e profundidade sendo, a partir de aí, possível para o “software” e com iluminação de uma lâmpada de 60 W (iminência de 60 Lux) reconhecer os movimentos do animal (circulares, horário e anti-horário), bem como caminhadas, com a possibilidade de ser medido o espaço percorrido e o tempo. No monitor de atividade eletrônico (IR), os movimentos dos animais são detectados por 48 pares de sensores de infravermelhos distribuídos ao longo das paredes e registrado através de um software.

Este teste foi desenvolvido por Hall (1937), sugerindo que a defecação é a atividade neurovegetativa do animal, exposto ao campo aberto como indicadora de seu estado emocional. Alta defecação e baixa atividade locomotora indicariam a ansiedade do animal. Pode-se também utilizar a atividade locomotora do animal no centro do campo aberto como medida mais seletiva de ansiedade, enquanto a atividade locomotora na periferia do aparato como um indicador da atividade locomotora do animal. O efeito de drogas ansiolíticas tem sido amplamente demonstrado nesse modelo (Prut & Belzung, 2003).

Figura 5. Monitor de atividade eletrônico (esquerda), e representação do teste (direita). Aparelho utilizado para a realização dos testes de avaliação da reatividade emocional e a atividade motora dos ratos com aplicação de droga/placebo e nos testes de abstinência.

Para realizar essa tarefa, foram utilizados 70 ratos *Wistar*. Após a chegada, e habituação as condições do biotério por 3 dias, os experimentos foram iniciados. Os animais foram pesados e submetidos a 14 dias de uma única injeção diária de cetamina em doses diferentes (10, 20 e 40 e 80 mg / kg). Foram utilizados grupos independentes de animais. Os dados registrados foram divididos nos seus aspectos emocionais (tempo gasto ao longo da periferia (paredes) e no centro do monitor, ou motoras (velocidade, distância percorrida, ambulação, saltos, elevação, imobilidade). O teste foi dividido em 4 blocos de 5 minutos cada, totalizando 20 minutos no total. Os testes foram realizados 10 minutos após uma injeção subcutânea de cetamina ou placebo, ao longo dos 14 dias

de tratamento, com os registros sendo realizados no 1º, 3º, 5º, 7º, 9º, 11º e 14º dias, seguido então de 3 sessões pós abstinência (24, 72, e 144 horas).

Dessa forma ficaram estabelecidos os seguintes grupos experimentais (40 animais no total, com n= 8 animais por grupo): Salina, Cetamina na dose de 10 mg/kg, Cetamina na dose de 20 mg/kg, Cetamina na dose de 40 mg/kg e Cetamina na dose de 80 mg/kg e (30 animais no total, com n= 6 animais por grupo): Salina, Cetamina 10 mg/kg, Cetamina na dose de 20 mg/kg, Cetamina na dose de 40 mg/kg e Cetamina na dose de 80 mg/kg, para os testes de abstinência da droga.

Figura 6. Esquema do protocolo do Teste de atividade motora e reatividade emocional - monitor de atividade eletrônico (IR). O tratamento com cetamina/salina por quatorze dias com testes no 1º, 3º, 5º, 7º, 9º, 11º e 14º dia no monitor eletrônico 10 minutos após aplicação da cetamina/placebo. No período de abstinência foi realizado teste com 24 horas, 72 horas e 6 dias no monitor de atividade eletrônico.

3.4.2 Teste de preferência condicionado ao lugar (CPP)

Neste experimento, quisemos determinar em quais dosagens, a administração crônica de cetamina induz preferência condicionada ao lugar. O modelo de preferência condicionada ao lugar é um modelo experimental bastante utilizado na investigação das propriedades reforçadoras das drogas em geral (Tzschentke, 1998). É amplamente utilizado sobretudo para medir o efeito reforçador de algumas drogas sendo também utilizado para verificar suas propriedades aversivas. A utilização deste procedimento permite também avaliar os correlatos eletrofisiológicos subjacentes à preferência a um

ambiente específico ou durante a exposição do animal a pistas contextuais previamente associadas com os efeitos da droga. Este aparato experimental é composto por uma câmara retangular de acrílico (56, x 35 x 40 cm), dividida em dois compartimentos. Os compartimentos se diferem tátil e visualmente, da seguinte forma: compartimento A composto de paredes com faixas pretas e brancas verticais de 5 cm intercaladas e assoalho feito de uma chapa de aço inoxidável perfurados com quadrados de 1 cm de lado. O compartimento B apresenta paredes com círculos brancos e pretos e chão composto de barras de aço inoxidável de 5 mm espaçadas em 1 cm entre elas. Na parede de fundo de cada ambiente foi instalada uma lâmpada 60 W (luz branca, iminência de 60 Lux), que servira como estímulo condicionado, quando assim o procedimento exigir (Figura 7). Uma câmera filmadora localizada acima do caixa, ligada a um dispositivo de gravação, filmou o comportamento dos animais, sendo os registros analisados posteriormente. A preferência basal (BS) foi tomada de forma que 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. As sessões de condicionamento foram realizadas no compartimento menos preferido pelo animal (Brenhouse & Andersen, 2008, McCorvy, Harland, Maglathlin, & Nichols, 2011). O procedimento de testar o animal durante os efeitos da cetamina foi adotado na tentativa de controlar o fenômeno da *aprendizagem dependente de estado*, que emerge quando o animal é condicionado a partir da interação entre estímulos exteroceptivos e interoceptivos, mas testados apenas na presença do primeiro (estimulação presente no ambiente). A possível alteração induzida pelo tratamento na motricidade dos animais foi analisada observando o número de cruzamentos total durante a sessão teste 1.

Figura 7. Caixa de condicionamento de dois compartimentos (esquerda). Utilizada para induzir a preferência condicionada ao lugar através de dois contextos distintos. A imagem (direita) é a representação do animal em condicionamento com droga/placebo no contexto mais evitado pelo animal durante a tomada dos registros basais.

A atividade dos animais durante as sessões foi monitorada através de 2 mini câmeras localizadas 30 cm acima e no meio de cada um dos compartimentos. Estas foram ligadas a um sistema de gravação para registros das sessões.

Figura 8. Esquema do procedimento experimental de Preferência condicionado ao lugar. A: Registro basal: realizado por três dias consecutivos, através da média foi definido o compartimento mais evitado (menos preferido). B: condicionamento com injeção subcutânea de cetamina/salina durante quatro dias consecutivos no compartimento mais evitado. C: teste realizado 24 horas após o último condicionamento com ausência de aplicação de droga/placebo, e com os animais com livre acesso à ambos compartimentos.

Durante o registro da preferência basal dos animais, foi registrado o tempo em que cada animal permaneceu em cada um dos dois compartimentos (A e B), numa sessão de 10 minutos, de cada uma das 3 sessões, intercaladas pelo período de 24 horas (Figura 8). Tomada a média geral, foi registrado para cada animal a preferência por um dos compartimentos (maior tempo de exposição), assim como o número de entradas em cada compartimento. Para avaliação dos supostos efeitos reforçadores da cetamina, os animais foram condicionados sempre no contexto menos preferido (mais evitado) como observado nas sessões basais. A sessão teste foi realizada 24 horas após a última sessão de condicionamento. A possível alteração induzida pelo tratamento na motricidade dos animais foi analisada observando o número de cruzamentos total durante a sessão teste.

Para realizar essa tarefa, foram utilizados 60 ratos *Wistar*, pesando ± 220 g. Os animais foram habituados por 3 dias às condições do biotério. Ao final deste tempo, e por três dias consecutivos, foram iniciados os registros de linha de base. Finalizado isto, foram iniciadas as sessões de condicionamento de quatro dias com a utilização da administração subcutânea (sc.) de placebo ou cetamina nas doses de 10, 20, 40 e 80 mg/kg. Foram utilizados grupos independentes de animais. Dessa forma, foram estabelecidos 5 grupos experimentais (n=12 por grupo), como segue: Salina, Cetamina na dose de 10 mg/kg, Cetamina na dose de 20 mg/kg, Cetamina na dose 40 mg/kg e Cetamina na dose 80 mg/kg.

3.4.3. Tolerância condicionada ao contexto

O modelo baseia-se no fenômeno do condicionamento clássico, ou Pavloviano, e prediz que a tolerância aos efeitos farmacológicos de uma mesma dosagem de uma droga psicoativa se desenvolve em contextos nos quais ela é usualmente ingerida. Dito de outra forma, toda e qualquer pista contextual presente no momento do reforço se

soma ao efeito da droga levando à tolerância a estes mesmos efeitos. As respostas farmacológicas condicionadas reveladas desta maneira são, com frequência, opostas aos efeitos iniciais, ou agudos. Tais respostas antecipadas atenuam os efeitos da droga e contribuem para a tolerância. Consequentemente, os sinais ambientais de iminente estimulação farmacológica são importantes porque permitem que o organismo emita respostas condicionadas compensatórias em antecipação aos efeitos incondicionados. Com base neste modelo, deve ocorrer uma falha de tolerância se a droga for administrada em um ambiente que, no passado, não foi associado aos seus efeitos (Siegel, Hinson, Krank, & McCully, 1982b, Siegel, 1975b).

Os experimentos foram realizados com a utilização do teste do campo aberto, conforme descrito no experimento 1. Entretanto, para a constituição de 2 contextos diferenciados (A e B), um quadrado de acrílico com paredes listradas que se ajustou exatamente as medidas internas do campo aberto, foi inserido e nomeado contexto B (Figura 9, direita), sendo o campo aberto em si considerado como o contexto A (Figura 9, esquerda).

Figura 9. Monitor de atividade eletrônico (esquerda). Aparelho utilizado para a realização do condicionamento (Contexto A), aplicação de droga/placebo e no teste de *Overdose* (Contexto A). A imagem (direita) é a caixa de acrílico utilizada para os testes de *Overdose* (Contexto B).

Para realizar essa tarefa, foram utilizados 40 ratos *Wistar*. Após a chegada, e habituação as condições do biotério por 3 dias, os experimentos foram iniciados.

Figura 10. Esquema do procedimento experimental da tolerância condicionada ao contexto. 1: Condicionamento no contexto A por 4 dias com injeção de cetamina (10 mg/kg). 2: Teste com overdose de cetamina (80 mg/kg) nos contextos A ou B.

Durante os tratamentos, durante 4 dias cada animal recebeu uma injeção diária de cetamina (10 mg / kg), sendo imediatamente confinado no contexto A da caixa experimental. No quinto dia, cada animal foi, então, submetido a uma “overdose” de cetamina (80 mg / kg) e testados nos contextos A ou B. A análise dos efeitos de cetamina sobre o comportamento motor e a reatividade emocional dos animais e foi realizada, segundo o já descrito no experimento 1. Dessa forma, foram estabelecidos 4 grupos experimentais (n=10 por grupo), como segue: Salina x Contexto A, Salina x Contexto B, Cetamina x Contexto A e Cetamina x Contexto B.

3.4.4. Análise das alterações neurofarmacológicas induzidas durante a expressão da reposta de preferência condicionada ao lugar.

Este estudo foi realizado com a utilização da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC). O procedimento em si consiste num método analítico que tem por objetivo a separação de distintas espécies químicas presentes numa amostra. A separação processa-se por meio de um mecanismo de interação seletiva entre as moléculas do soluto (amostra) e duas fases, uma estacionária e outra móvel (J. M. Miller, 2005). O experimento foi realizado em

duas fases distintas: cirurgia estereotáxica, para implante de cânulas guia, teste: microdialise e coleta de amostras.

Cirurgia

Logo após a tomada dos limiares basais, cada animal foi anestesiado com um *mix* de diazepam/cetamina (5 e 75 mg/kg, respectivamente), sendo, posteriormente, colocados em um aparelho extereotáxico (David-Kopf, USA). A cabeça foi então fixada pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Cada animal recebeu unilateralmente o implante de 2 cânulas-guia siliconizadas (CMA Microdialysis, Sweden) direcionadas ao IL e NAcSh. As coordenadas utilizadas tomaram como base o atlas de Paxinos & Watson (2008), como a seguir: IL = - AP: 3,24 mm, LAT: $\pm 0,6$ mm, DV = -5,0 mm; NAcSh AP: 2,52 mm, LAT: $\pm 1,0$ mm, DV: -7,4 mm) (Figura 10). A temperatura corporal foi mantida a 37° C com a utilização de uma manta aquecedora (Harvard, USA). Ao término da cirurgia cada animal recebeu, por via intramuscular, uma injeção de pentabiótico (60.000 UI, 0,2 ml – Forte- Dodge, Brasil), e uma injeção intramuscular do analgésico e anti-inflamatório banamine (2,5 mg/kg).

Cada animal foi testado por quatro vezes, conforme o esquema abaixo. Após a cirurgia os animais foram mantidos isolados, da forma descrita no item 3.1.

Grupos	Ketamina								Abstinência							
	A x A		A x B		A x A		A x B		A x A		A x B		A x A		A x B	
	IL	NAcSh	IL	NAcSh	IL	NAcSh	IL	NAcSh	IL	NAcSh	IL	NAcSh	IL	NAcSh	IL	NAcSh
Controle																
Controle																
Cetamina																
Cetamina																

Microdialise in vivo

A detecção de DA e 5-HA foi realizada em 15 μ l da amostra dialisada em uma janela temporal de 30 minutos, em animais se movimentando livremente, já que era de nosso interesse saber as alterações em ambos os sistemas durante a expressão da

resposta condicionada de preferência ao lugar, sendo, a seguir, analisada on-line pelo método de HPLC. Um interruptor ligado a detector amperométrico (Unijet) permitiu a detecção quase simultânea de DA e 5-HT. No dia dos experimentos, uma sonda de microdialise (CMA:12, 4 mm, 20000 Daltons) foi posicionada dentro da cânula-guia. A seguir, o cérebro foi perfundido com fluido cérebro-espinhal artificial ($0,83 \text{ mM Mg}^{+2}$, $1,0 \text{ mM Ca}^{+}$, 150 mM Na^{+} , $3,0 \text{ mM K}^{+}$, $132,54 \text{ mM Cl}^{-}$) através da sonda, a uma taxa de $0,5 \text{ } \mu\text{l}/\text{minuto}$, com a utilização de uma bomba de infusão (Harvard, modelo 22, MA, USA). Ao final dos experimentos, os animais foram sacrificados e perfundidos, tendo os encéfalos removidos para posterior exame microscópico. Este procedimento foi adaptado dos trabalhos de Parsons e Justice (Parsons & Justice, 1993; Perry & Fuller, 1992).

Figura 11 – Esquema representativo do protocolo de microdiálise in vivo, realizada na caixa de dois contextos em uma das áreas de estudo.

Procedimento experimental

Após a chegada, os animais foram habituados ao novo contexto biotério por 3 dias. Para realizar este experimento, foram utilizados 24 ratos machos (*Wistar*) pesando ± 220 g, a partir do biotério da Universidade de São Paulo, “Campus” Ribeirão Preto. 8 animais foram descartados em função de problemas com a cirurgia, infecção ou erros de localização das cânulas. O condicionamento foi realizado exatamente como descrito no item 3.4.2. As amostras foram tomadas durante os efeitos sistêmicos da cetamina (após a 4ª injeção) ou 24 horas após (abstinência), durante a expressão da preferência

condicionada ao lugar. A dose de cetamina utilizada foi aquela mais eficaz em produzir a resposta de preferência ao lugar no experimento 2 (10 mg/kg).

Eutanásia e perfusão

Ao final dos experimentos, os animais foram sacrificados, através de uma sobredosagem da associação do anestésico dissociativo cetamina com o agonista de adrenoreceptores tipo alfa-2 xilazina (30 e 120 mg/kg, respectivamente para procedimento de perfusão e 225 e 30 mg/kg respectivamente para o procedimento de eutanásia), administrado por via intramuscular. Este procedimento faz parte dos critérios estabelecidos no manual de diretrizes do CONCEA (2015) como medida recomendada para roedores e pequenos mamíferos. A confirmação de morte se deu por rompimento do diafragma. Os indicativos de morte do animal foram a ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos.

Figura 12. Esquema representativo das etapas envolvidas no procedimento de perfusão transcárdica e remoção do encéfalo. Imagem modificada de (Gage, Kipke, & Shain, 2012).

Análise histológica

Após o final da perfusão, os encéfalos foram mergulhados em uma solução de sacarose para crioproteção. Após 24 horas os encéfalos foram congelados por imersão em isopentana resfriada a -80°C (em gelo seco) para a realização dos cortes histológicos, em secções de $40\mu\text{m}$, em um criostato. Os cortes foram montados em lâminas para verificação dos sítios de injeções no microscópio. Foram levados em consideração na análise estatística apenas os animais que tiveram o sítio de coleta confirmados no IL ou AcbSh.

3.5. Análise estatística

Os dados foram apresentados Média + Erro Padrão da Média (EPM) e foram analisados utilizando o programa computacional software GraphPad Prism 7.02. As análises foram seguidas pelo teste “post-hoc” de Tukey, e em todas as comparações, $p < 0,05$ foi utilizado como critério para significância estatística.

Os dados referentes aos experimentos com o teste do Campo Aberto foram submetidos à teste de análise de variância (ANOVA). Para as variáveis velocidade, distância percorrida, movimento ambulatorio, tempo de imobilidade, e tempo de permanência na periferia ou centro do Campo Aberto foi utilizada uma análise de variância de um fator (one-way) para os dados do tratamento crônico e “two-way” ANOVA para os dados referentes a abstinência (drogas x condição).

Dos dados referentes aos experimentos com o teste de Preferência condicionado submeteram-se os à análise de variância (ANOVA). No que se refere à preferência condicionada ao lugar de animais testados sob o efeito de doses escalonadas de

cetamina (diferença entre o tempo basal e tempo de permanência no compartimento menos preferido durante o teste) foi utilizado “one-way” ANOVA e no que se refere à frequência de entradas no mesmo compartimento foi utilizado a “two-way” ANOVA.

Dos dados referentes aos experimentos com o teste de Tolerância condicionada ao contexto: estes foram submetidos à análise de variância a “two-way” ANOVA. Para as variáveis velocidade, distância percorrida, movimento ambulatorio, tempo de imobilidade, e tempo de permanência na periferia ou centro do Campo Aberto foi utilizada uma análise de variância de dois fatores (tratamento x condição).

Os dados referentes aos experimentos para avaliar os efeitos da administração crônica de cetamina sobre os níveis basais de DA e 5-HT de ratos durante a expressão da preferência condicionada ao contexto: foram submetidos à ANOVA de dois fatores (tratamento x condição) com medidas repetidas (condição: Cetamina x abstinência).

RESULTADOS

4.1 Experimento 1: Teste atividade motora e reatividade emocional

Os dados referentes aos experimentos com o teste do Campo Aberto foram analisados com o auxílio de uma análise de variância (ANOVA). Para as variáveis velocidade, distância percorrida, movimento ambulatorio, tempo de imobilidade, e tempo de permanência na periferia ou centro do Campo Aberto foi utilizada uma análise de variância de um fator (*one-way*). Os resultados obtidos mostraram o efeito dos tratamentos sobre a velocidade média dos animais ao longo dos 20 minutos de teste ($F_{4,35}=8,67$, $P<0,0001$) (Figura 13). A ANOVA aplicada às demais variáveis mostra um padrão similar de efeito sobre a distância percorrida ($F_{4,35}=8,77$, $P<0,0001$) (Figura 14), frequência de movimento ambulatorio ($F_{4,35}=16,51$, $P<0,0001$) (Figura 15) e tempo de imobilidade ($F_{4,35}=9,53$, $P<0,0001$) (Figura 16). O tempo de permanência na periferia do Campo Aberto também foi afetado pelo tratamento ($F_{4,35}=43,21$, $P<0,0001$) (Figura 17), assim como o tempo de permanência na parte centro do aparato ($F_{4,35}=6,50$, $P<0,005$) (Figura 18). A análise *a posteriori* mostrou que as diferenças se devem aos efeitos dose-dependentes da cetamina na sobre estas variáveis. De fato, a cetamina foi eficaz em reduzir a expressão dos comportamentos analisados, à exceção do tempo de permanência no centro do Campo Aberto, cujo aumento está inversamente relacionado à redução no tempo de permanência na periferia do teste.

A análise dos dados coletados no teste de abstinência foi conduzida com a utilização de uma ANOVA de dois fatores (drogas x condição), para cada variável em estudo, para cada período do teste (24, 72 ou 144 horas de abstinência). A análise mostra efeitos significativos do tratamento sobre todas as variáveis, quando comparado com os grupos nos quais os tratamentos foram mantidos. Os efeitos da cetamina sobre as variáveis em estudo se conservam ao longo dos três momentos do teste (24, 72 ou 144 hs). Por sua vez, os efeitos da abstinência se acentuam na mesma proporção, sendo

mais notados após 6 dias de abstinência (Figuras 19 a 24). Para a dose de 20 mg/kg, o período de 144 h de abstinência induz um aumento na locomoção (velocidade: $F_{4,60}=7,71$; $P<0,0001$, distância percorrida: $F_{4,60}=63,69$; $P<0,005$) (Figuras 19 e 20), que se relaciona de forma inversa com a redução no tempo de imobilidade ($F_{4,60}=8,99$; $P<0,0001$) (Figura 22). No que diz respeito aos efeitos do tratamento sobre as variáveis relacionadas à reatividade emocional do animal, o tempo no centro do Campo Aberto aumenta de forma dose-dependente ao tempo de tratamento (Figura 24), que se mantém particularmente alto no grupo pré-tratado com a dose de 80 mg/kg, mesmo após 144 h de abstinência ($F_{4,60}=16,49$; $P<0,0001$).

A. Velocidade

Figura 13. Média $\pm$ EPM da velocidade média (em centímetros por segundo) de movimentação de ratos submetidos à diferentes dosagens de cetamina. ANOVA de um fator seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$.

B. Distância

Figura 14. Média $\pm$ EPM dos efeitos de doses escalonadas de cetamina sobre a distância total percorrida pelos animais (em centímetros por segundo) no Campo Aberto, ao longo de 20 minutos de teste. ANOVA *one-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$.

C. Movimento ambulatorio

Figura 15. Média $\pm$ EPM dos efeitos de doses escalonadas de cetamina sobre o movimento ambulatorio (frequência de ocorrência) de animais testados no Campo Aberto, ao longo de 20 minutos de teste. ANOVA *one-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$.

D. Imobilidade

Figura 16. Média $\pm$ EPM dos efeitos de doses escalonadas de cetamina sobre o tempo de imobilidade dos animais (em segundos) testados no Campo Aberto, ao longo de 20 minutos de teste. ANOVA *one-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$.

E. Periferia

Figura 17. Média $\pm$ EPM dos efeitos de doses escalonadas de cetamina sobre o tempo de permanência na periferia do campo aberto (em segundos) ao longo de 20 minutos de teste. ANOVA *one-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$.

F. Centro

Figura 18. Média $\pm$ EPM dos efeitos de doses escalonadas de cetamina sobre o tempo de permanência no centro do campo aberto (em segundos) ao longo de 20 minutos de teste. ANOVA *one-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$.

Abstinente

Cetamina

Figura 19. Os gráficos apresentam a ação de doses escalonadas de cetamina (Média $\pm$ EPM) sobre a velocidade de movimentação (cm/s) de ratos testados em duas condições: durante os efeitos (coluna a direita), e na abstinência de 24 (1), 72 (2) ou 144 horas (3) de cetamina (coluna a esquerda). O teste teve a duração de 20 minutos. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$.

Abstinente**Cetamina**

Figura 20. Os gráficos apresentam a ação de doses escalonadas de cetamina (Média $\pm$ EPM) sobre a distância total (cm) percorrida ao longo de 20 minutos de teste por ratos testados em duas condições: durante os efeitos (coluna a direita), e na abstinência de 24 (1), 72 (2) ou 144 horas (3) de cetamina (coluna a esquerda). O teste teve a duração de 20 minutos. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$.

Abstinente**Cetamina**

Figura 21. Os gráficos apresentam a ação de doses escalonadas de cetamina (Média $\pm$ EPM) sobre o movimento ambulatorio (frequência) ao longo de 20 minutos de teste por ratos testados em duas condições: durante os efeitos (coluna a direita), e na abstinência de 24 (1), 72 (2) ou 144 horas (3) de cetamina (coluna a esquerda). O teste teve a duração de 20 minutos. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$.

Figura 22. Os gráficos apresentam a ação de doses escalonadas de cetamina (Média $\pm$ EPM) sobre o tempo de imobilidade dos animais durante os 20 minutos de teste em duas condições: durante os efeitos (coluna a direita), e na abstinência de 24 (1), 72 (2) ou 144 horas (3) de cetamina (coluna a esquerda). O teste teve a duração de 20 minutos. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$.

Figura 23. Os gráficos apresentam o efeito de doses escalonadas de cetamina (Média $\pm$ EPM) sobre o tempo de permanência (s) na periferia do teste do campo aberto ao longo de 20 minutos de teste por ratos testados em duas condições: durante os efeitos (coluna a direita), e na abstinência de 24 (1), 72 (2) ou 144 horas (3) de cetamina (coluna a esquerda). O teste teve a duração de 20 minutos. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$.

Figura 24. Os gráficos apresentam o efeito de doses escalonadas de cetamina (Média $\pm$ EPM) sobre o tempo de permanência (s) no centro do teste do campo aberto ao longo de 20 minutos de teste por ratos testados em duas condições: durante os efeitos (coluna a direita), e na abstinência de 24 (1), 72 (2) ou 144 horas (3) de cetamina (coluna a esquerda). O teste teve a duração de 20 minutos. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$.

4.2. Experimento 2: Teste de preferência condicionado ao lugar (CPP)

Os dados referentes aos experimentos com o teste de Preferência condicionado ao lugar foram analisados com o auxílio de uma análise de variância (ANOVA).

A ANOVA revelou que os grupos se diferem de forma significativa com relação aos tratamentos na variável preferência ($F_{4,55} = 13,38$; $P < 0,005$) mas não no número de entradas em cada compartimento ($P < 0.05$), que se mantém estável entre os grupos ao longo do teste. O teste *post-hoc* de Tukey mostrou que esta diferença se deve aos efeitos mais acentuados das doses de 10 e 20 mg/kg sobre a resposta de preferência condicionada, quando comparadas com as doses de 40 e 80 mg/kg (Figura 25).

Taxa de diferença de permanência no contexto pareado com a droga (Teste/Baseline)

N= 12/grupo

Total de entradas no compartimento pareado com a droga

N= 12/grupo

Figura 25. O gráfico acima detalha a preferência condicionada ao lugar de animais testados sob o efeito de doses escalonadas de cetamina (Média $\pm$ EPM), como revelado pela diferença entre o tempo basal e tempo de permanência no compartimento menos preferido durante o teste. Abaixo está apresentada a frequência de entradas no mesmo compartimento. ANOVA *one-way* (acima), ou *two-way* (abaixo), seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$.

4.3. Experimento 3: Tolerância condicionada ao contexto

Para o teste de tolerância condicionada ao contexto, foram analisadas as mesmas variáveis utilizadas no experimento 1. Velocidade e distância não foram afetadas pelo tratamento, a despeito de ser claramente notado um efeito mais acentuado da cetamina sobre a distância total de movimentação em ambos contextos A e B ($F_{3,36} = 2,44$; 96; $P=0,08$) (Figura 26), assim como o movimento ambulatorio (Figura 27, acima). Por outro lado, a ANOVA mostrou a presença de diferença significativa entre os grupos quando consideradas as variáveis imobilidade ($F_{3,36} = 24,12$; $P<0,005$) (Figura 27, abaixo), e tempo de permanência na periferia ($F_{3,36} = 13,84$; $P<0,05$) e no centro do Campo Aberto ($F_{3,36} = 44,69$; $P<0,0001$) (Figura 28). A análise *post-hoc* mostrou que estas diferenças se devem a um aumento no tempo de imobilidade e no tempo de permanência no centro do teste, em contraste com uma redução no tempo de permanência nas laterais da caixa experimental, nos animais que foram expostos ao contexto não previamente pareado com a droga.

Figura 26. Média $\pm$ EPM da velocidade (acima) e distância percorrida (abaixo) por ratos testados durante uma overdose de 80 mg/kg de cetamina. CA x CA: animais condicionados no contexto A com cetamina (10 m g/kg), e testados no quinto dia com a overdose no mesmo com texto. CA x CB: animais condicionados no contexto A com cetamina (10 m g/kg), e testados no quinto dia com a overdose no contexto B. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$.

C. Movimento ambulatorio

D. Imobilidade

Figura 27. Média $\pm$ EPM da frequência de movimento ambulatorio (acima) e tempo de imobilidade (abaixo) de ratos testados durante uma overdose de 80 mg/kg de cetamina. CA x CA: animais condicionados no contexto A com cetamina (10 m g/kg), e testados no quinto dia com a overdose no mesmo com texto. CA x CB: animais condicionados no contexto A com cetamina (10 m g/kg), e testados no quinto dia com a overdose no contexto B. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$.

Figura 28. Média $\pm$ EPM da frequência do tempo de permanência na periferia (acima) e centro (abaixo) do Campo Aberto, de ratos testados durante uma overdose de 80 mg/kg de cetamina. CA x CA: animais condicionados no contexto A com cetamina (10 m g/kg), e testados no quinto dia com a overdose no mesmo com texto. CA x CB: animais condicionados no contexto A com cetamina (10 m g/kg), e testados no quinto dia com a overdose no contexto B. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$.

4.4 Experimento 4: Efeitos da administração de cetamina sob os níveis de dopamina e serotonina das áreas IL e NAcSh

Este experimento foi delineado para avaliar os efeitos da administração crônica de cetamina sobre os níveis basais de DA e 5-HT de ratos durante a expressão da preferência condicionada ao contexto. Para este caso foi utilizada uma ANOVA de dois fatores (tratamento x condição) com medidas repetidas (condição: cetamina x abstinência). A análise das amostras para DA ou 5-HT foram feitas individualmente, para cada área em estudo (IL ou NAcSh). No que diz respeito a DA no IL, os resultados indicam ausência de efeitos dos tratamentos, mas efeito significativo no fator condição ($F_{1,7} = 8,99$; $P < 0,05$). Nesta mesma região, a ANOVA indica diferença significativa no fator tratamento para os dados relacionados aos níveis de 5-HT ($F_{1,7} = 16,01$; $P < 0,0001$) apenas (Figura 29). Considerando os dados coletados no NAcSh, a análise estatística mostrou efeito similar ao anterior, com efeito significativo no tratamento ($F_{1,7} = 29,54$; $P < 0,001$), mas não na condição ou mesmo interação entre os fatores. No que diz respeito a 5-HT, a ANOVA aponta diferença estatisticamente significativa no fator condição ($F_{1,7} = 10,02$; $P < 0,05$), assim como interação significativa entre os fatores ($F_{1,7} = 5,36$; $P < 0,05$). O teste *post-hoc* de Tukey mostrou que estas diferenças se devem a redução de DA e 5-HT no IL durante a abstinência de cetamina. No NAcSh, a DA se mantém alterada tanto durante os efeitos, quanto na abstinência. Os níveis basais de 5-HT também se mostram reduzidos na abstinência (Figura 30).

Figura 29. O gráfico apresenta a média ($\pm$ EPM – pmol/ 5 μ l) da liberação de dopamina (DA) e serotonina (5-HT) no córtex infralímbico de ratos, como determinado pela técnica de microdiálise *in vivo*. As amostras foram coletadas durante os efeitos da cetamina (4º dia de condicionamento) ou após 24 horas de abstinência, durante a expressão da resposta de preferência condicionada ao lugar. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$.

Figura 30. O gráfico apresenta a média ($\pm$ EPM – pmol/ 5 μ l) da liberação de dopamina (DA) e serotonina (5-HT) no núcleo accumbens *shell* de ratos, como determinado pela técnica de microdiálise *in vivo*. As amostras foram coletadas durante os efeitos da cetamina (4º dia de condicionamento) ou após 24 horas de abstinência, durante a expressão da resposta de preferência condicionada ao lugar. ANOVA *two-way* seguida pelo teste post-hoc de Tukey, com $P \leq 0,05$.

Figura 31. A figura ilustra os pontos de localização das cânulas no córtex infralímbico (acima), e núcleo accumbens *shell* (abaixo), segundo coordenadas extraídas do atlas de Paxinos & Watson (2008). fmi: forceps minor, PrL: córtex prélimbico, IL: córtex infralímbico, CPu: caudado-putâmen, NAcC: núcleo accumbens *core*, NAcSh: núcleo accumbens *shell*.

DISCUSSÃO

A cetamina, anestésico veterinário com excelente aceitação no meio clínico e hospitalar, apresenta também, como contrapartida de seus efeitos terapêuticos, potente ação psicoestimulante sendo, por esta mesma razão, fonte de abuso para muitos indivíduos (Bokor & Anderson, 2014; Jansen, 2000; Liu, Lin, Wu, & Zhou, 2016; Xu & Lei, 2014). Embora alguns estudos epidemiológicos tenham evidenciado um aumento no número de indivíduos que usam e abusam de cetamina, poucos estudos translacionais foram realizados para tentar entender a forma como se desenvolvem seus efeitos reforçadores e aversivos. Os efeitos da cetamina sobre o sistema nervoso central são de ampla ordem. Como exemplo, a cetamina acentua o metabolismo cerebral, aumentando a pressão intracranial (Gardner, Olson, & Lichter, 1971; Shaprio, Wyte, & Harris, 1972). Quando utilizada em combinação com outros agentes sedativos ou anestésicos seus efeitos se assemelham àqueles observados com opióides (Bourgoin et al., 2003; Wang et al., 2014). Em alguns casos, os efeitos da cetamina podem ser neuroprotetores e, conseqüentemente, potencialmente benéficos (Albanese et al., 1997; Bar-Joseph, Guilburd, Tamir, & Guilburd, 2009). Apesar de seus efeitos terapêuticos, a cetamina apresenta também uma gama de efeitos ações adversas que incluem hipersalivação, hiperreflexia, clônus transiente, e sintomas vestibulares, incluído náusea e vômito (Corssen & Domino, 1966.). No entanto, são suas propriedades psicoativas, justamente os efeitos que limitam sua utilidade clínica, que tornam a cetamina atraente para um outro grupo de usuários. Aqueles que a utilizam como droga recreativa. Dito de outra forma, quais as conseqüências neurofisiológicas e comportamentais relacionadas aos efeitos reforçadores da cetamina quando utilizada a longo-prazo? Em nosso trabalho, antes de avançar no entendimento de suas propriedades reforçadoras, procuramos estabelecer alguns padrões que pudessem nortear os ensaios subsequentes. Portanto, em nosso primeiro experimento procuramos determinar os efeitos da administração crônica

de doses baixas à altas de cetamina sobre o comportamento de ratos testados no modelo experimental do Campo Aberto. Para esta análise foram coletadas diversas variáveis, que se agruparam em duas classes: aquelas relacionadas aos aspectos motoras do animal (velocidade, distância percorrida, movimento ambulatorio e tempo de imobilidade), e aquelas relacionadas à dimensão emocional especificamente (tempo de permanência na periferia e centro). Os resultados mostram que os efeitos depressores da cetamina sobre os aspectos locomotores dos animais se apresentam de forma dose-dependente, com a dose de 80 mg/kg reduzindo acentuadamente todas essas variáveis. Estes dados estão em franca concordância com achados anteriores. Na verdade, de forma similar a outras drogas psicoativas, a cetamina pode sensibilizar a função locomotora (Trujillo, Zamora, & Warmoth, 2008; Wiley, Evans, Grainger, & Nicholson, 2008), ser autoadministrada por reforçamento operante (Marquis, Webb, & Moreton, 1989), e induzir preferência condicionada ao lugar (Suzuki et al., 2000). Portanto, apesar de seus efeitos dose dependentes no que diz respeito a sedação a cetamina, de forma similar a outras drogas, age também como potente estímulo reforçador. Os efeitos sedativos puderam ser claramente observados em nossos experimentos observando a influência da droga na velocidade, distância percorrida e movimento ambulatorio. Curiosamente, o tempo de imobilidade foi menor com a utilização de doses mais altas. O tempo no centro do Campo Aberto aumento na relação direta com as doses, sendo maior com a dose mais alta. Estas duas incongruências não encontram respaldo científico visto que, de nosso conhecimento, não existem referências anteriores na literatura. Entretanto, há que se considerar que os animais foram submetidos a duas semanas de administração crônica. Portanto, os efeitos observados, sobretudo aqueles relacionados as doses altas 40 e 80 mg/kg, podem estar sujeitos à tolerância. De fato, a observação direta dos animais mostra que a dose de 80 mg/kg apresenta efeito reduzido sobre a motricidade. Os dados

relacionados ao tempo de permanência no centro do Campo Aberto, portanto, parecem sugerir um possível efeito ansiolítico relacionado à administração crônica de cetamina. Este resultado se adequa as novas evidências que apontam para os potentes efeitos terapêuticos da cetamina sobre o humor e a emoção. Como exemplo, vários estudos sugerem os efeitos benéficos da cetamina no tratamento da depressão e ideação suicida (Coyle & Laws, 2015; Fond et al., 2014; Lee, Della Selva, Liu, & Himelhoch, 2015; Romeo, Choucha, Fossati, & Rotge, 2015; Winters, Hance, Cadd, & Lakin, 1986). Neste contexto, sabe-se que infusões repetidas alcançam resultados superiores comparado com a administração única (Cusin et al., 2017; Diamond et al., 2014; Murrough et al., 2013; Rasmussen et al., 2013; Shiroma et al., 2014). A ausência de efeitos de doses menores pode estar relacionada à atividade metabólica mais intensa do rato, quando comparado com o do ser humano.

Na segunda parte de nosso estudo, utilizamos grupos independentes de animais para acessar os efeitos da abstinência de cetamina sobre as mesmas variáveis analisadas anteriormente, após a interrupção da administração crônica. A abstinência de cetamina foi avaliada em três condições: 24, 72, ou 144 horas (6 dias) após a última injeção. Um grupo experimental recebeu a administração de cetamina durante o mesmo tempo, para efeitos comparativos. Foram, portanto, submetidos a 14 + 6 dias de uma injeção diária. Os efeitos obtidos neste último grupo se assemelharam aqueles que foram tratados por 14 dias, no experimento anterior. A abstinência de cetamina produziu poucas alterações nas medidas relacionadas à locomoção que, quando ocorreram, se relacionaram ao aumento proporcionado pela dose de 20 mg/kg na velocidade de movimentação dos animais 6 dias após a última injeção. As medidas que refletem a reatividade emocional dos animais também não foram afetadas. Estes dados sugerem que os efeitos da

cetamina se prolongam pelo menos até 6 dias depois da última injeção em animais testados no modelo experimental do Campo Aberto.

Dando sequência à investigação dos efeitos da cetamina sobre o comportamento, analisamos, então, a capacidade da substância de induzir preferência ou tolerância condicionada ao contexto. Como dito anteriormente, a influência do contexto no qual uma droga é ingerida e sua capacidade de se somar aos seus efeitos farmacológicos são conhecidos (Siegel, 1975^a, Siegel et al., 1982a). 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., 1986, Childress et al., 1984). As alterações farmacológicas implicadas neste processo são muito pouco conhecidas. Sabe-se, entretanto, que assim como a quase totalidade das drogas de abuso (Di Chiara, 1987), a cetamina apresenta a característica de acentuar os níveis de DA no NAc (Hancock & Stamford, 1999). Nossos resultados mostram que há condicionamento ao contexto de forma inversa à quantidade de droga utilizada com a dose de 10 mg /kg apresentando o maior efeito, como já descrito na literatura (Suzuki et al., 2000). O achado mais importante, entretanto, é o aparecimento de tolerância condicionada ao contexto aos efeitos da cetamina. Este resultado mostra que, de forma similar ao álcool etílico (Birak, Higgs, & Terry, 2011), às drogas opióides (Siegel, 1975^a, Siegel et al., 1982a), e psicoestimulantes (Childs & de Wit, 2013), a cetamina apresenta, também, a propriedade de induzir tolerância a um contexto ao qual foi previa e cronicamente administrada. Esta tolerância se reflete como aumento no tempo de imobilidade no contexto não pareado com a droga. As alterações neurofarmacológicas envolvidas tanto

na expressão de preferência quanto de tolerância condicionada não são conhecidas, mas sabe-se que a cetamina tem como foco principal a neurotransmissão mediada por receptores NMDA de glutamato, para o qual funciona como um antagonista não competitivo. Além disso, a cetamina atua influenciando outros sistemas de neurotransmissores. Neste trabalho, nosso foco foi direcionado à DA e a 5-HT por diversas razões. Os efeitos colaterais da cetamina apresentam grande similaridade com aqueles obtidos com psicoestimulantes. De fato, muitos dos efeitos comportamentais e neuroquímicos da cetamina são análogos aos da anfetamina como o aumento na atividade locomotora e estereotipia, efeitos estes que podem ser revertidos por antagonistas dopaminérgicos (Yamamoto et al., 1997). Assim como as anfetaminas, a cetamina também induz sintomas de psicose (Curran & Morgan, 2000), além de acentuar os níveis de DA em áreas límbicas (Vollenweider et al., 2000). A cetamina também apresenta, como dito anteriormente, potente ação terapêutica na depressão maior e alguns transtornos de ansiedade. Segundo Fuchikami (Fuchikami et al., 2015), estes efeitos são possivelmente modulados no IL. De interesse para o nosso estudo são as ligações entre o IL e o NAcSh já que esta conexão está vinculada ao controle do comportamento motivado por pistas contextuais (Rocha & Kalivas, 2010). Portanto, em nosso último experimento nós avaliamos os efeitos da administração de cetamina num esquema de condicionamento no qual a cromatografia de alta pressão associada à microdiálise in vivo foi utilizada para analisar os níveis de DA e 5-HT durante a expressão da resposta de preferência condicionada ao contexto. Os dados mostram que no IL ambos os grupos controle e experimental apresentam flutuações análogas nos níveis de DA, que se diferenciam igualmente durante a abstinência. Portanto, a interrupção do tratamento crônico com cetamina possivelmente leva a uma hipofunção dopaminérgica no IL.

Alguns estudos têm demonstrado que a cetamina estimula de forma particular certos neurônios, para liberar DA (Farber, Kim, Dikranian, Jiang, & Heinkel, 2002). Isto ocorre de forma indireta, já que a cetamina bloqueia receptores NMDA ligados a neurônios GABAérgicos, o que reduz a liberação de GABA com consequente desinibição de neurônios dopaminérgicos, o que leva à produção excessiva de DA (Irifune, Shimizu, & Nomoto, 1991). Dado que os experimentos de preferência por lugar foram realizados com apenas quatro dias e condicionamento, é possível que a tolerância farmacológica aos efeitos da cetamina sejam rápidos, o que poderia explicar a queda abrupta nos níveis desse neurotransmissor observado durante o teste de condicionamento, e consequentemente a tendência do animal a permanecer no contexto onde foi previamente reforçado, o que caracterizaria um modelo de busca e o consumo da droga. Os resultados obtidos com a 5-HT parecem convergir para o mesmo lado. Como exemplo, foi sugerida uma possível sobreposição interação entre axônios DA e 5-HT no NAc, estando os axônios de neurônios 5-HT mais restritos a porção caudal desta região, o NAcSh. Esta sobreposição indica que fibras DA e 5-HT podem interagir de tal forma que a 5-HT pode potencializar a liberação de DA, possivelmente através de mecanismos pré-sinápticos (Benloucif & Galloway, 1991; Deurwaerdère, Stinus, & Spampinato, 1998; Parsons & Justice, 1993). Portanto, os efeitos da cetamina sobre mecanismos 5-HT poderiam não se diferir tão dramaticamente sobre os mecanismos de controle motivacional controlados por DA e relacionados as vias de ligação do IL e NAcSh, daqueles relacionados aos efeitos de outras drogas de abuso. O efeito final seria a expressão da preferência condicionada, como perda do controle motivacional, e o aparecimento da tolerância condicionada ao contexto, como aberração fisiológica induzida pela exposição continuada aos efeitos da cetamina.

CONCLUSÃO

Concluímos que os efeitos depressores da cetamina sobre os aspectos locomotores dos animais se apresentam de forma dose-dependente. Ao mesmo que o tempo de permanência no centro do campo aberto, parece sugerir um possível efeito ansiolítico relacionado à administração crônica de cetamina.

O condicionamento ao contexto ocorre de forma inversa à quantidade da droga utilizada, sendo a dose de 10 mg/kg a que apresenta maior efeito, como já descrito na literatura. Apesar de seus efeitos dose-dependentes, no que diz respeito à sedação, a cetamina, de forma similar a outras drogas, age também como potente estímulo reforçador.

O achado mais importante foi o aparecimento de tolerância condicionada ao contexto aos efeitos da cetamina. E esta se reflete como aumento no tempo de imobilidade com contexto não pareado com a droga.

Os efeitos comportamentais e neuroquímicos são análogos aos da anfetamina, e que como foram realizados poucos dias de condicionamento é possível inferir que a tolerância farmacológica aos efeitos da cetamina sejam rápidos.

Sobre as ligações entre o IL e o NAcSh, conexão que está vinculada ao controle do comportamento motivado por pistas contextuais, inferimos que está é uma situação de interrupção do tratamento crônico com cetamina possivelmente sofre uma hipofunção dopaminérgica no IL.

Dessa forma, a cetamina partilha algumas características comuns com outras drogas de abuso, como a instalação de tolerância condicionada ao contexto e alterações neuroquímicas associadas, como a depressão acentuada nos níveis de DA e 5-HT no NAcSh durante a exposição a um contexto previamente pareado com os efeitos da droga.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albanese, J., Arnaud, S., Rey, M., Thomachot, L., Alliez, B., & Martin, C. (1997). Ketamine Decreases Intracranial Pressure and Electroencephalographic Activity in Traumatic Brain Injury Patients during Propofol Sedation. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 87(6), 1328–1334.
- Arditti, J., Spadari, M., de Haro, L., Brun, A., Bourdon, J. H., & Valli, M. (2002). [Ketamine--dreams and realities]. *Acta Clinica Belgica*, 57 Suppl 1, 31–33.
- Balleine, B. W., & Dickinson, A. (1998). Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates. *Neuropharmacology*, 37(4–5), 407–19.
- Bar-Joseph, G., Guilburd, Y., Tamir, A., & Guilburd, J. N. (2009). Effectiveness of ketamine in decreasing intracranial pressure in children with intracranial hypertension. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*, 4(1), 40–46. <https://doi.org/10.3171/2009.1.PEDS08319>
- Benloucif, S., & Galloway, M. P. (1991). Facilitation of dopamine release in vivo by serotonin agonists: studies with microdialysis. *European Journal of Pharmacology*, 200(1), 1–8.
- Berendse, H. W., Graaf, Y. G.-D., & Groenewegen, H. J. (1992). Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 316(3), 314–347. <https://doi.org/10.1002/cne.903160305>
- Birak, K. S., Higgs, S., & Terry, P. (2011). Conditioned Tolerance to the Effects of Alcohol on Inhibitory Control in Humans. *Alcohol and Alcoholism*, 46(6), 686–693. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agr084>
- Bokor, G., & Anderson, P. D. (2014). Ketamine: An Update on Its Abuse. *Journal of Pharmacy Practice*, 27(6), 582–586. <https://doi.org/10.1177/0897190014525754>
- Bourgoin, A., Albanèse, J., Wereszczynski, N., Charbit, M., Vialet, R., & Martin, C. (2003). Safety of sedation with ketamine in severe head injury patients: Comparison with sufentanil. *Critical Care Medicine*, 31(3), 711–717. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000044505.24727.16>
- Brenhouse, H. C., & Andersen, S. L. (2008). Delayed extinction and stronger reinstatement of cocaine conditioned place preference in adolescent rats,

- compared to adults. *Behavioral Neuroscience*, 122(2), 460–465.
<https://doi.org/10.1037/0735-7044.122.2.460>
- Brog, J. S., Salyapongse, A., Deutch, A. Y., & Zahm, D. S. (1993). The patterns of afferent innervation of the core and shell in the “Accumbens” part of the rat ventral striatum: Immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *The Journal of Comparative Neurology*, 338(2), 255–278.
<https://doi.org/10.1002/cne.903380209>
- Capriles, N., Rodaros, D., Sorge, R. E., & Stewart, J. (2003). A role for the prefrontal cortex in stress- and cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology*, 168(1–2), 66–74. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1283-z>
- Caprioli, D., Celentano, M., Testa, A., Lucantonio, F., & Badiani, A. (2007). Environmental modulation of amphetamine self-administration. *Behavioural Pharmacology*, 18, S85–S85.
- Caprioli, D., Paolone, G., Celentano, M., Testa, A., Nencini, P., & Badiani, A. (2007). Environmental modulation of cocaine self-administration in the rat. *Psychopharmacology*, 192(3), 397–406. <https://doi.org/10.1007/s00213-007-0717-z>
- Carlezon, W. A., Jr., & Thomas, M. J. (2009). Biological substrates of reward and aversion: a nucleus accumbens activity hypothesis. *Neuropharmacology*, 56 Suppl 1, 122–32.
- Carlezon, W. A., Mague, S. D., & Andersen, S. L. (2003). Enduring behavioral effects of early exposure to methylphenidate in rats. *Biological Psychiatry*, 54(12), 1330–1337.
- 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). *J Neural Transm Gen Sect*, 94(1), 1–10.
- Chandler, L. J., & Gass, J. T. (2013). The Plasticity of Extinction: Contribution of the Prefrontal Cortex in Treating Addiction through Inhibitory Learning. *Frontiers in Psychiatry*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2013.00046>
- 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. *NIDA Res Monogr*, 55, 202–10.

- 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. *Br J Addict*, 81(5), 655–60.
- Childs, E., & de Wit, H. (2013). Contextual conditioning enhances the psychostimulant and incentive properties of d-amphetamine in humans. *Addiction Biology*, 18(6), 985–992. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2011.00416.x>
- Churchwell, J. C., & Kesner, R. P. (2011). Hippocampal-prefrontal dynamics in spatial working memory: interactions and independent parallel processing. *Behavioural Brain Research*, 225(2), 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.07.045>
- Corssen, G., & Domino, E. F. (1966). Dissociative anesthesia: further pharmacologic studies and first clinical experience with the phencyclidine derivative Ci-581. *Anesthesia and Analgesia*, 45(1), 29–40.
- Costi, S., Van Dam, N. T., & Murrough, J. W. (2015). Current Status of Ketamine and Related Therapies for Mood and Anxiety Disorders. *Current Behavioral Neuroscience Reports*, 2(4), 216–225. <https://doi.org/10.1007/s40473-015-0052-3>
- Coyle, C. M., & Laws, K. R. (2015). The use of ketamine as an antidepressant: a systematic review and meta-analysis. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 30(3), 152–163. <https://doi.org/10.1002/hup.2475>
- Curran, H. V., & Morgan, C. (2000). Cognitive, dissociative and psychotogenic effects of ketamine in recreational users on the night of drug use and 3 days later. *Addiction*, 95(4), 575–590. <https://doi.org/10.1046/j.1360-0443.2000.9545759.x>
- Cusin, C., Ionescu, D. F., Pavone, K. J., Akeju, O., Cassano, P., Taylor, N., Fava, M. (2017). Ketamine augmentation for outpatients with treatment-resistant depression: Preliminary evidence for two-step intravenous dose escalation. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*, 51(1), 55–64. <https://doi.org/10.1177/0004867416631828>
- Dalley, J. W., Cardinal, R. N., & Robbins, T. W. (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28(7), 771–784. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.09.006>

- 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. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2062-x>
- Deakin, J. F., Lees, J., McKie, S., Hallak, J. E., Williams, S. R., & Dursun, S. M. (2008). Glutamate and the neural basis of the subjective effects of ketamine: a pharmaco-magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry*, 65(2), 154–64. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2007.37>
- Deurwaerdère, P. D., Stinus, L., & Spampinato, U. (1998). Opposite Change of In Vivo Dopamine Release in the Rat Nucleus Accumbens and Striatum That Follows Electrical Stimulation of Dorsal Raphe Nucleus: Role of 5-HT₃ Receptors. *Journal of Neuroscience*, 18(16), 6528–6538.
- Di Chiara, G., Imperato, A., & Mulas, A. (1987). Preferential stimulation of dopamine release in the mesolimbic system: a common feature of drugs of abuse. In M. Sandler (Ed.), *Neurotransmitter interactions in the basal ganglia* (pp. 171–182). New York: Raven Press.
- Diamond, P. R., Farmery, A. D., Atkinson, S., Haldar, J., Williams, N., Cowen, P. J., ... McShane, R. (2014). Ketamine infusions for treatment resistant depression: a series of 28 patients treated weekly or twice weekly in an ECT clinic. *Journal of Psychopharmacology*, 28(6), 536–544. <https://doi.org/10.1177/0269881114527361>
- Dillon, P., Copeland, J., & Jansen, K. (2003). Patterns of use and harms associated with non-medical ketamine use. *Drug Alcohol Depend*, 69(1), 23–8.
- Domino, E. F. (1980a). History and pharmacology of PCP and PCP-related analogs. *Journal of Psychedelic Drugs*, 12(3–4), 223–227.
- Domino, E. F. (1980b). Treatment of phencyclidine intoxication [proceedings]. *Psychopharmacology Bulletin*, 16(4), 83–85.
- Domino, E. F., & Luby, E. D. (2012). Phencyclidine/schizophrenia: one view toward the past, the other to the future. *Schizophrenia Bulletin*, 38(5), 914–919. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs011>
- Euston, D. R., Gruber, A. J., & McNaughton, B. L. (2012). The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron*, 76(6), 1057–1070. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.002>

- Farber, N. B., Kim, S. H., Dikranian, K., Jiang, X. P., & Heinkel, C. (2002). Receptor mechanisms and circuitry underlying NMDA antagonist neurotoxicity. *Molecular Psychiatry*, 7(1), 32–43. <https://doi.org/10.1038/sj/mp/4000912>
- Ferreira, J. G. P., Del-Fava, F., Hasue, R. H., & Shammah-Lagnado, S. J. (2008). Organization of ventral tegmental area projections to the ventral tegmental area–nigral complex in the rat. *Neuroscience*, 153(1), 196–213. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.02.003>
- Floresco, S. B., Zhang, Y., & Enomoto, T. (2009). Neural circuits subserving behavioral flexibility and their relevance to schizophrenia. *Behav Brain Res*, 204(2), 396–409. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.12.001>
- Fond, G., Loundou, A., Rabu, C., Macgregor, A., Lançon, C., Brittner, M., ... Boyer, L. (2014). Ketamine administration in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Psychopharmacology*, 231(18), 3663–3676. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3664-5>
- Fuchikami, M., Thomas, A., Liu, R., Wohleb, E. S., Land, B. B., DiLeone, R. J., ... Duman, R. S. (2015). Optogenetic stimulation of infralimbic PFC reproduces ketamine's rapid and sustained antidepressant actions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(26), 8106–8111. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414728112>
- Fuchs, R. A., Evans, K. A., Ledford, C. C., Parker, M. P., Case, J. M., Mehta, R. H., & See, R. E. (2005). The role of the dorsomedial prefrontal cortex, basolateral amygdala, and dorsal hippocampus in contextual reinstatement of cocaine seeking in rats. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 30(2), 296–309. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300579>
- Gage, G. J., Kipke, D. R., & Shain, W. (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (65). <https://doi.org/10.3791/3564>
- Gardner, A. E., Olson, B. E., & Lichter, M. (1971). Cerebrospinal-fluid Pressure during Dissociative Anesthesia with Ketamine. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 35(2), 226–228.

- Geyer, M. A. (1998). Behavioral studies of hallucinogenic drugs in animals: implications for schizophrenia research. *Pharmacopsychiatry*, 31 Suppl 2, 73–9. <https://doi.org/10.1055/s-2007-979350>
- Guilburd, Y., Tamir, A., & Guilburd, J. N. (2009). Effectiveness of ketamine in decreasing intracranial pressure in children with intracranial hypertension. *Journal of Neurosurgery. Pediatrics*, 4(1), 40–46. <https://doi.org/10.3171/2009.1.PEDS08319>
- Greifenstein, F. E., Devault, M., Yoshitake, J., & Gajewski, J. E. (1958). A study of a 1-aryl cyclo hexyl amine for anesthesia. *Anesthesia and Analgesia*, 37(5), 283–294.
- Groenewegen, H. J., Wright, C. I., & Uylings, H. B. (1997). The anatomical relationships of the prefrontal cortex with limbic structures and the basal ganglia. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 11(2), 99–106. <https://doi.org/10.1177/026988119701100202>
- Hall, C. S. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18(3), 385–403. <https://doi.org/10.1037/h0071444>
- Hamlin, A. S., Clemens, K. J., Choi, E. A., & McNally, G. P. (2009). Paraventricular thalamus mediates context-induced reinstatement (renewal) of extinguished reward seeking. *European Journal of Neuroscience*, 29(4), 802–812. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06623.x>
- Hancock, P. J., & Stamford, J. A. (1999). Stereospecific effects of ketamine on dopamine efflux and uptake in the rat nucleus accumbens. *British Journal of Anaesthesia*, 82(4), 603–608.
- Heidbreder, C. A., & Groenewegen, H. J. (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(6), 555–579.
- Holcomb, H. H., Lahti, A. C., Medoff, D. R., Weiler, M., & Tamminga, C. A. (2001). Sequential regional cerebral blood flow brain scans using PET with H₂(15)O demonstrate ketamine actions in CNS dynamically. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 25(2), 165–172. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00229-9](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00229-9)

- Homayoun, H., & Moghaddam, B. (2007). NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neurosci*, 27(43), 11496–500. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2213-07.2007>
- Hoover, W. B., & Vertes, R. P. (2007). Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct*, 212(2), 149–79. <https://doi.org/10.1007/s00429-007-0150-4>
- Ikemoto, S. (2007). Dopamine reward circuitry: Two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens–olfactory tubercle complex. *Brain Research Reviews*, 56(1), 27–78. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.05.004>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.01.010>
- Imre, G., Salomons, A., Jongsma, M., Fokkema, D. S., Den Boer, J. A., & Ter Horst, G. J. (2006). Effects of the mGluR2/3 agonist LY379268 on ketamine-evoked behaviours and neurochemical changes in the dentate gyrus of the rat. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 84(3), 392–399. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.05.021>
- Irifune, M., Shimizu, T., & Nomoto, M. (1991). Ketamine-induced hyperlocomotion associated with alteration of presynaptic components of dopamine neurons in the nucleus accumbens of mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 40(2), 399–407. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90571-I](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90571-I)
- Jansen, K. L. (2000). A review of the nonmedical use of ketamine: use, users and consequences. *Journal of Psychoactive Drugs*, 32(4), 419–433. <https://doi.org/10.1080/02791072.2000.10400244>
- Johnstone, M., Evans, V., & Baigel, S. (1959). Sernyl (CI-395) in clinical anaesthesia. *British Journal of Anaesthesia*, 31, 433–439.
- Kalivas, P. W. (2008). Addiction as a pathology in prefrontal cortical regulation of corticostriatal habit circuitry. *Neurotoxicity Research*, 14(2–3), 185–189. <https://doi.org/10.1007/BF03033809>

- Kalivas, P. W. (2009). The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(8), 561–572. <https://doi.org/10.1038/nrn2515>
- Kesner, R. P., & Churchwell, J. C. (2011). An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96(3), 417–431. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.07.002>
- 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. *Eur Neuropsychopharmacol*, 16(4), 297–310. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2005.10.001>
- 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. *Arch Gen Psychiatry*, 51(3), 199–214.
- Kurdi, M. S., Theerth, K. A., & Deva, R. S. (2014). Ketamine: Current applications in anesthesia, pain, and critical care. *Anesthesia, Essays and Researches*, 8(3), 283–290. <https://doi.org/10.4103/0259-1162.143110>
- Lahti, A. C., Koffel, B., LaPorte, D., & Tamminga, C. A. (1995). Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 13(1), 9–19. [https://doi.org/10.1016/0893-133X\(94\)00131-I](https://doi.org/10.1016/0893-133X(94)00131-I)
- LaLumiere, R. T., Smith, K. C., & Kalivas, P. W. (2012). Neural circuit competition in cocaine-seeking: Roles of the infralimbic cortex and nucleus accumbens shell. *The European Journal of Neuroscience*, 35(3–4), 614–622. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.07991.x>
- Lankenau, S. E., & Sanders, B. (2007). Patterns of ketamine use among young injection drug users. *Journal of Psychoactive Drugs*, 39(1), 21–29. <https://doi.org/10.1080/02791072.2007.10399861>
- Lankenau, S. E., Sanders, B., Bloom, J. J., Hathazi, D. S., Alarcon, E., Tortu, S., & Clatts, M. (2007). Prevalence and Patterns of Prescription Drug Misuse among Young Ketamine Injectors. *Journal of Drug Issues*, 37(3), 717–736.
- Lee, E. E., Della Selva, M. P., Liu, A., & Himelhoch, S. (2015). Ketamine as a novel treatment for major depressive disorder and bipolar depression: a systematic review and quantitative meta-analysis. *General Hospital Psychiatry*, 37(2), 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2015.01.003>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.08.030>
- Lim, D. K. (2003). Ketamine associated psychedelic effects and dependence. *Singapore Med J*, 44(1), 31–4.
- 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.
- Liu, Y., Lin, D., Wu, B., & Zhou, W. (2016). Ketamine abuse potential and use disorder. *Brain Research Bulletin*, 126, Part 1, 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.05.016>
- Lu, X.-Y., Behnam Ghasemzadeh, M., & Kalivas, P. W. (1997). Expression of D1 receptor, D2 receptor, substance P and enkephalin messenger RNAs in the neurons projecting from the nucleus accumbens. *Neuroscience*, 82(3), 767–780. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00327-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00327-8)
- Maddox, V. H., Godefroi, E. F., & Parcell, R. F. (1965). The synthesis of phencyclidine and other 1-arylcyclohexylamines. *Journal of Medicinal Chemistry*, 8, 230–235.
- Mansbach, R. S., & Geyer, M. A. (1991). Parametric determinants in pre-stimulus modification of acoustic startle: interaction with ketamine. *Psychopharmacology*, 105(2), 162–168.
- Marquis, K. L., Webb, M. G., & Moreton, J. E. (1989). Effects of fixed ratio size and dose on phencyclidine self-administration by rats. *Psychopharmacology*, 97(2), 179–182.
- McCorvy, J. D., Harland, A. A., Maglathlin, R., & Nichols, D. E. (2011). A 5-HT_{2C} receptor antagonist potentiates a low dose amphetamine-induced conditioned place preference. *Neuroscience Letters*, 505(1), 10–13. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.07.036>
- McFarland, K., & Kalivas, P. W. (2001). The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(21), 8655–8663.
- Millan, E. Z., Furlong, T. M., & McNally, G. P. (2010). Accumbens Shell–Hypothalamus Interactions Mediate Extinction of Alcohol Seeking. *Journal of*

- Neuroscience*, 30(13), 4626–4635. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4933-09.2010>
- Miller, E. K., & Cohen, J. D. (2001). An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 167–202. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.167>
- Miller, J. M. (2005). *Chromatography: Concepts and Contrasts*. John Wiley & Sons.
- Moorman, D. E., James, M. H., McGlinchey, E. M., & Aston-Jones, G. (2015). Differential roles of medial prefrontal subregions in the regulation of drug seeking. *Brain Research*, 1628(0 0), 130–146. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.024>
- Morgan, C. J. A., & Curran, H. V. (2006). Acute and chronic effects of ketamine upon human memory: a review. *Psychopharmacology*, 188(4), 408–424. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0572-3>
- Morgan, C. J. A., Curran, H. V., & Independent Scientific Committee on Drugs. (2012). Ketamine use: a review. *Addiction (Abingdon, England)*, 107(1), 27–38. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2011.03576.x>
- Morgan, C. J. A., Muetzelfeldt, L., & Curran, H. V. (2010). Consequences of chronic ketamine self-administration upon neurocognitive function and psychological wellbeing: a 1-year longitudinal study. *Addiction (Abingdon, England)*, 105(1), 121–133. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2009.02761.x>
- Morgan, C. J., & Curran, H. V. (2012). Ketamine use: a review. *Addiction*, 107(1), 27–38. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2011.03576.x>
- Morris, R. G. M. (2013). NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacology*, 74, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.014>
- Muetzelfeldt, L., Kamboj, S. K., Rees, H., Taylor, J., Morgan, C. J., & Curran, H. V. (2008). Journey through the K-hole: phenomenological aspects of ketamine use. *Drug Alcohol Depend*, 95(3), 219–29. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2008.01.024>
- Murrough, J. W., Perez, A. M., Pillemer, S., Stern, J., Parides, M. K., aan het Rot, M., ... Iosifescu, D. V. (2013). Rapid and Longer-Term Antidepressant Effects of Repeated Ketamine Infusions in Treatment-Resistant Major Depression. *Biological Psychiatry*, 74(4), 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.06.022>

- Nauta, W. J. H., Smith, G. P., Faull, R. L. M., & Domesick, V. B. (1978). Efferent connections and nigral afferents of the nucleus accumbens septi in the rat. *Neuroscience*, 3(4), 385–401. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(78\)90041-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(78)90041-6)
- Olney, J. W., & Farber, N. B. (1995a). Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 52(12), 998–1007.
- Olney, J. W., & Farber, N. B. (1995b). NMDA antagonists as neurotherapeutic drugs, psychotogens, neurotoxins, and research tools for studying schizophrenia. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 13(4), 335–345. [https://doi.org/10.1016/0893-133X\(95\)00079-S](https://doi.org/10.1016/0893-133X(95)00079-S)
- Oye, I., Paulsen, O., & Maurset, A. (1992). Effects of ketamine on sensory perception: evidence for a role of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 260(3), 1209–13.
- Parsons, L. H., & Justice, J. B. (1993). Perfusate serotonin increases extracellular dopamine in the nucleus accumbens as measured by in vivo microdialysis. *Brain Research*, 606(2), 195–199. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90984-U](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90984-U)
- Paxinos GW, C. (2008) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates(Academic Press, New York) 6th Ed.
- Perry, K. W., & Fuller, R. W. (1992). Effect of fluoxetine on serotonin and dopamine concentration in microdialysis fluid from rat striatum. *Life Sciences*, 50(22), 1683–1690.
- Peters, J., Kalivas, P., & Quirk, G. (2010). Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. *Learning & Memory*, 30, 279–288.
- Peters, J., LaLumiere, R. T., & Kalivas, P. W. (2008). Infralimbic prefrontal cortex is responsible for inhibiting cocaine seeking in extinguished rats. *J Neurosci*, 28(23), 6046–53.
- Peters, J., Vallone, J., Laurendi, K., & Kalivas, P. W. (2008). Opposing roles for the ventral prefrontal cortex and the basolateral amygdala on the spontaneous recovery of cocaine-seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 197(2), 319–26.
- Pierce, R. C., Reeder, D. C., Hicks, J., Morgan, Z. R., & Kalivas, P. W. (1998). Ibotenic acid lesions of the dorsal prefrontal cortex disrupt the expression of behavioral sensitization to cocaine. *Neuroscience*, 82(4), 1103–1114.

- Poole, R., & Brabbins, C. (1996). Drug induced psychosis. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science*, 168(2), 135–138.
- Potter, D. E., & Choudhury, M. (2014). Ketamine: repurposing and redefining a multifaceted drug. *Drug Discov Today*, 19(12), 1848–54. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.08.017>
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463(1), 3–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)
- Rabiner, E. A. (2007a). Imaging of striatal dopamine release elicited with NMDA antagonists: is there anything there to be seen? *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 21(3), 253–258. <https://doi.org/10.1177/0269881107077767>
- Rabiner, E. A. (2007b). Imaging of striatal dopamine release elicited with NMDA antagonists: is there anything there to be seen? *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 21(3), 253–258. <https://doi.org/10.1177/0269881107077767>
- Rasmussen, K. G., Lineberry, T. W., Galardy, C. W., Kung, S., Lapid, M. I., Palmer, B. A., ... Frye, M. A. (2013). Serial infusions of low-dose ketamine for major depression. *Journal of Psychopharmacology*, 27(5), 444–450. <https://doi.org/10.1177/0269881113478283>
- Rhodes, S. E. V., & Killcross, A. S. (2007). Lesions of rat infralimbic cortex enhance renewal of extinguished appetitive Pavlovian responding. *The European Journal of Neuroscience*, 25(8), 2498–2503. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05486.x>
- Rhodes, S. E. V., & Killcross, S. (2004). Lesions of rat infralimbic cortex enhance recovery and reinstatement of an appetitive Pavlovian response. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 11(5), 611–616. <https://doi.org/10.1101/lm.79704>
- Richard, J. M., & Berridge, K. C. (2013). Prefrontal cortex modulates desire and dread generated by nucleus accumbens glutamate disruption. *Biological Psychiatry*, 73(4), 360–370. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.08.009>
- Rocha, A., & Kalivas, P. W. (2010). Role of the prefrontal cortex and nucleus accumbens in reinstating methamphetamine seeking. *The European Journal of Neuroscience*, 31(5), 903–909. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07134.x>

- Romeo, B., Choucha, W., Fossati, P., & Rotge, J.-Y. (2015). Meta-analysis of short- and mid-term efficacy of ketamine in unipolar and bipolar depression. *Psychiatry Research*, 230(2), 682–688. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.10.032>
- Sano, H., & Yokoi, M. (2007). Striatal Medium Spiny Neurons Terminate in a Distinct Region in the Lateral Hypothalamic Area and Do Not Directly Innervate Orexin/Hypocretin- or Melanin-Concentrating Hormone-Containing Neurons. *Journal of Neuroscience*, 27(26), 6948–6955. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0514-07.2007>
- Sesack, S. R., & Pickel, V. M. (1990). In the rat medial nucleus accumbens, hippocampal and catecholaminergic terminals converge on spiny neurons and are in apposition to each other. *Brain Res*, 527(2), 266–79.
- Shahani, R., Streutker, C., Dickson, B., & Stewart, R. J. (2007). Ketamine-associated ulcerative cystitis: A new clinical entity. *Urology*, 69(5), 810–812. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2007.01.038>
- Shaprio, H. M., Wyte, S. R., & Harris, A. B. (1972). Ketamine anaesthesia in patients with intracranial pathology. *British Journal of Anaesthesia*, 44(11), 1200–1204.
- Shiroma, P. R., Johns, B., Kuskowski, M., Wels, J., Thuras, P., Albott, C. S., & Lim, K. O. (2014). Augmentation of response and remission to serial intravenous subanesthetic ketamine in treatment resistant depression. *Journal of Affective Disorders*, 155, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.10.036>
- Siegel, S. (1975a). Evidence from rats that morphine tolerance is a learned response. *J Comp Physiol Psychol*, 89(5), 498–506.
- Siegel, S. (1975b). Evidence from rats that morphine tolerance is a learned response. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 89(5), 498–506.
- Siegel, S., Hinson, R. E., Krank, M. D., & McCully, J. (1982a). Heroin “overdose” death: contribution of drug-associated environmental cues. *Science*, 216(4544), 436–7.
- Siegel, S., Hinson, R. E., Krank, M. D., & McCully, J. (1982b). Heroin “overdose” death: contribution of drug-associated environmental cues. *Science (New York, N.Y.)*, 216(4544), 436–437.
- Sutton, M. A., Schmidt, E. F., Choi, K.-H., Schad, C. A., Whisler, K., Simmons, D., ... Self, D. W. (2003). Extinction-induced upregulation in AMPA receptors reduces

- cocaine-seeking behaviour. *Nature*, 421(6918), 70–75.
<https://doi.org/10.1038/nature01249>
- Suzuki, T., Kato, H., Aoki, T., Tsuda, M., Narita, M., & Misawa, M. (2000). Effects of the non-competitive NMDA receptor antagonist ketamine on morphine-induced place preference in mice. *Life Sciences*, 67(4), 383–389.
[https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)00639-1](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)00639-1)
- Swanson, L. W. (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Research Bulletin*, 9(1–6), 321–353.
- Tang, Y.-Y., Posner, M. I., Rothbart, M. K., & Volkow, N. D. (2015). Circuitry of self-control and its role in reducing addiction. *Trends in Cognitive Sciences*, 19(8), 439–444. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2015.06.007>
- Thompson, R. H., & Swanson, L. W. (2010). Hypothesis-driven structural connectivity analysis supports network over hierarchical model of brain architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34), 15235–15239. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009112107>
- Tobias, J. D. (2000). Tolerance, withdrawal, and physical dependency after long-term sedation and analgesia of children in the pediatric intensive care unit. *Crit Care Med*, 28(6), 2122–32.
- 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. *Eur J Pharmacol*, 167(1), 127–35.
- Trujillo, K. A., Zamora, J. J., & Warmoth, K. P. (2008). Increased Response to Ketamine Following Treatment at Long Intervals: Implications for Intermittent Use. *Biological Psychiatry*, 63(2), 178–183.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.02.014>
- Tyler, M. W., Yourish, H. B., Ionescu, D. F., & Haggarty, S. J. (2017). Classics in Chemical Neuroscience: Ketamine. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(6), 1122–1134. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00074>
- Tzschentke, T. M. (1998). Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol*, 56(6), 613–72.

- Umeoka, E. H. L., Garcia, S. B., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L. L. K., & Garcia-Cairasco, N. (2011). Functional characterization of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis of the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain. *Brain Research*, *1381*, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.01.042>
- Vertes, R. P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*, *51*(1), 32–58.
- Vollenweider, F. X., Vontobel, P., Oye, 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. *J Psychiatr Res*, *34*(1), 35–43.
- Wang, X., Ding, X., Tong, Y., Zong, J., Zhao, X., Ren, H., & Li, Q. (2014). Ketamine does not increase intracranial pressure compared with opioids: meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Anesthesia*, *28*(6), 821–827. <https://doi.org/10.1007/s00540-014-1845-3>
- Wiley, J. L., Evans, R. L., Grainger, D. B., & Nicholson, K. L. (2008). Age-dependent differences in sensitivity and sensitization to cannabinoids and ‘club drugs’ in male adolescent and adult rats. *Addiction Biology*, *13*(3–4), 277–286. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2007.00077.x>
- Winters, W. D., Hance, A. J., Cadd, G. C., & Lakin, M. L. (1986). Seasonal and sex influences on ketamine-induced analgesia and catalepsy in the rat; a possible role for melatonin. *Neuropharmacology*, *25*(10), 1095–101.
- Wright, C. I., & Groenewegen, H. J. (1996). Patterns of overlap and segregation between insular cortical, intermediodorsal thalamic and basal amygdaloid afferents in the nucleus accumbens of the rat. *Neuroscience*, *73*(2), 359–373. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00592-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00592-7)
- Xu, J., & Lei, H. (2014). Ketamine-An Update on Its Clinical Uses and Abuses. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *20*(12), 1015–1020. <https://doi.org/10.1111/cns.12363>
- Yamamoto, M., Mizuki, Y., Suetsugi, M., Ozawa, Y., Ooyama, M., & Suzuki, M. (1997). Effects of Dopamine Antagonists on Changes in Spontaneous EEG and Locomotor Activity in Ketamine-Treated Rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *57*(1), 361–365. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(96\)00304-8](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(96)00304-8)

- Zahm, D. S. (2000). An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24(1), 85–105.
[https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00065-2)
- Zahm, D. S., & Brog, J. S. (1992). On the significance of subterritories in the “accumbens” part of the rat ventral striatum. *Neuroscience*, 50(4), 751–67.

ANEXOS

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

Campus de Ribeirão Preto

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada **“Alterações neuroquímicas em sistemas subcorticais subjacentes à expressão da tolerância condicionada ao contexto em ratos submetidos à administração crônica do anestésico dissociativo cetamina”**, registrada com o protocolado nº 16.5.736.59.1, sob a responsabilidade de **Gleice Kelli Ribeiro da Silva Cardoso** - que envolve manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos) para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - USP (CEUA FFCLRP) em reunião de 31/03/2017.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da autorização	05/04/2017 a 31/07/2018
Espécie/Linhagem	Wistar
Nº de animais	166
Peso/Idade	100g/35 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central

Ribeirão Preto, 05 de abril de 2017.

 Prof. Dr. Ademilson Panunto Castelo
 Presidente da CEUA FFCLRP

Avenida Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo
 Fone: (16) 3315 4811 – Fax: (16) 3315 4811