

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

**Análise dos efeitos da modulação GLU cortical sobre a expressão da resposta eletrofisiológica eliciada em ratos tratados com KET e testados em um modelo de condicionamento contextual**

**ROBERTA MONTEIRO INCROCCI**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Psicobiologia.

**RIBEIRÃO PRETO**  
**2022**

**ROBERTA MONTEIRO INCROCCI**

**Análise dos efeitos da modulação GLU cortical sobre a expressão da resposta eletrofisiológica eliciada em ratos tratados com KET e testados em um modelo de condicionamento contextual**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Psicobiologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Manoel Jorge Nobre

**RIBEIRÃO PRETO  
2022**

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.

Incrocci, Roberta Monteiro

Análise dos efeitos da modulação GLU cortical sobre a expressão da resposta eletrofisiológica eliciada em ratos tratados com KET e testados em um modelo de condicionamento contextual

Ribeirão Preto, 2022.

p.: 108

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Nobre, Manoel Jorge.

1. Cetamina. 2. Córtex Auditivo Primário. 3. Condicionamento Contextual. 4. Potencial Evocado Auditivo.

Nome: INCROCCI, Roberta Monteiro

Título: Análise dos efeitos da modulação GLU cortical sobre a expressão da resposta eletrofisiológica eliciada em ratos tratados com KET e testados em um modelo de condicionamento contextual

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Psicobiologia.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### **Banca Examinadora**

---

**Manoel Jorge Nobre do Espírito Santo (Orientador)**

Titulação: Professor Doutor

Departamento: Departamento de Psicologia

Instituição/Unidade: Centro Universitário Municipal de Franca – Uni-FACEF.

---

Titulação:

Departamento:

Instituição/Unidade:

---

Titulação:

Departamento:

Instituição/Unidade:

---

Titulação:

Departamento:

Instituição/Unidade:

---

Titulação:

Departamento:

Instituição/Unidade:

*Dedico ao meu filho Nicolas,  
que deu força para continuar nos momentos mais difíceis*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe que desde sempre me incentivou sem questionamentos, e que sem este apoio esta jornada teria sido muito mais árdua do que foi. E por estar presente na vida do meu filho enquanto estava no laboratório.

Ao meu irmão Fábio por sempre enriquecer meus dias com conversas produtivas, por sempre me incentivar nos momentos mais difíceis, por acreditar em mim muito mais do que eu e simplesmente por ser quem é.

À minha irmã Luciana por sempre me incentivar profissionalmente e me apoiar a seguir meus objetivos.

Ao Snoopy, que esteve ao meu lado em muitas madrugadas que eu tinha que escrever e conseguia tirar um sorriso no meio do caos. Meu companheiro de trilha que muitas vezes salvava meu dia!

À Fran e à Renata, amigas feitas no laboratório, mas que foram para a vida! Esta parceria foi um alento neste processo, descobri que juntas somos mais fortes nos momentos difíceis e passamos de forma mais branda...e nos momentos bons a alegria é tripla! Sem o apoio direto de vocês nada disso teria sido possível, a amizade de vocês é um presente, sem palavras para agradecer!

Ao meu orientador Manoel Jorge por acreditar no meu potencial e me dar oportunidade de realizar esta pesquisa.

A secretária do Programa de Pós-graduação, Renata Vicentini, por me ajudar em todos os momentos com toda paciência do mundo!

À Flávia que foi essencial para a minha sanidade mental durante a pandemia, me trazendo momentos de apoio e descontração únicos, por ter toda paciência do mundo quando eu precisei, por todas as conversas, chás, cafés, trilhas e kms! Certamente fez toda diferença tanto nesta jornada quanto na minha vida!

À Andreia por estar sempre me ouvir de forma tão acolhedora e sempre trazendo uma alegria única de ver a vida! Por todas as conversas pela trilha que contribuíram para o meu conhecimento e maneira de observar o mundo, não tenho palavras para agradecer!

Ao Júlio pela amizade construída neste período, pelas risadas, pelos convites de escalada que foram essenciais para que eu continuasse neste processo! Obrigada por tudo!

Ao Bruno, pelas conversas filosóficas, reflexivas, sobre tudo, pelas escaladas e aventuras! Pelo apoio e incentivo!

À CAPES não somente pelo apoio financeiro, mas também por acreditar no meu trabalho e permitir que eu me dedique de forma exclusiva a ele.

## RESUMO

INCROCCI, RM. **Análise dos efeitos da modulação GLU cortical sobre a expressão da resposta eletrofisiológica eliciada em ratos tratados com KET e testados em um modelo de condicionamento contextual** 2022. 108f. Tese (Doutorado em Psicobiologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A cetamina (KET) é um antagonista não competitivo dos receptores de glutamato (GLU) do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Atua também com menor eficácia nos sistemas GABAérgico e dopaminérgico (DA), dentre outros. Daí resultam seus efeitos estimulantes, hipnóticos, analgésicos e sua capacidade de alterar os estados de consciência. Estes efeitos, que limitam sua utilidade clínica, a transformaram em droga recreativa. Seu uso crônico pode levar ao aparecimento de atividade encefálica anormal, acentuar estados psicóticos e alterar os potenciais eletrofisiológicos, incluindo os auditivos (PEAs). Seus efeitos dissociativos se originam possivelmente pela facilitação da sobrecarga sensorial resultante da redução do controle inibitório *top-down* cortical sobre os sistemas *bottom-up* subcorticais e mesencefálicos. Neste trabalho, visamos investigar a influência do contexto na expressão da resposta eletrofisiológica eliciada no córtex auditivo primário de animais tratados com diferentes doses de KET, assim como a possível modulação de mecanismos GLU dessa estrutura sobre esta resposta, utilizando um modelo de condicionamento ao contexto. Para isso foram utilizados o agonista de receptores de glutamato NMDA (*N-metil-D-Aspartato*), e o antagonista destes mesmos DL-AP7 (*dl-2-Amino-7-phosphonoheptanoic acid*), administrados diretamente no córtex auditivo primário. Os dados coletados mostram que os PEAs corticais são alterados em processos de condicionamento nos quais pistas ambientais são associadas aos efeitos de KET em dose anestésica. Esta potencialização, observada em indivíduos testados na ausência dos efeitos da droga, parece refletir uma quebra homeostática no padrão eletrofisiológico desta região, provavelmente relacionada à expressão de tolerância condicionada ao contexto. A esta alteração estão subjacentes mudanças na neurotransmissão glutamatérgica, já que a administração de NMDA restaura a amplitude dos potenciais de campo aos seus níveis basais. Esta proposição é reforçada pelos efeitos encontrados após a administração do antagonista de receptores NMDA AP7, que resulta num aumento pronunciado na resposta eletrofisiológica do CA, de forma similar aquela observada nos animais condicionados com KET na dose de 80 mg/kg e testados durante a abstinência.

Palavras-Chave: *Cetamina, Condicionamento contextual, Córtex auditivo primário, Glutamato, NMDA, Tolerância contextual.*

## ABSTRACT

INCROCCI, RM. **The effects of cortical GLU modulation on the expression of electrophysiological responses elicited in rats given KET assessed in a contextual conditioning model** 2022.108f. Tese (Doutorado em Psicobiologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Ketamine (KET) is a non-competitive antagonist at the N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptors (GLU), acting less effectively in the GABAergic and Dopaminergic (AD) systems, among others. This results in its stimulating, hypnotic, analgesic, and consciousness-altering properties. Because of these side effects, which limit its clinical utility, it has become a recreational drug. Chronic KET abuse can result in aberrant brain activity, aggravating psychotic episodes and altering electrophysiological parameters, particularly auditory potentials (APs). In fact, the facilitation of sensory overload caused by the decrease of cortical top-down inhibitory control over the subcortical and mesencephalic bottom-up systems may be the source of KET's dissociative effects. Using a contextual conditioning model, the current study aims to investigate the influence of environmental cues on the expression of auditory-evoked potentials elicited in the primary auditory cortex of animals treated with a low and a high dose of KET, as well as the possible modulation of glutamatergic mechanisms of this structure on this response. For this purpose, the NMDA glutamate receptor agonist (NMDA - N-methyl-D-Aspartate) and antagonist (DL-AP7 - dl-2-Amino-7-phosphonoheptanoic acid) were delivered directly to the primary auditory cortex. The results show that cortical AEPs are altered during conditioning in which environmental signals are associated with KET effects in anesthetic dosage. This potentiation, observed in subjects evaluated in the absence of drug effects, appears to reflect a homeostatic break in the electrophysiological pattern of this region, which is most likely related to the expression of context-conditioned tolerance. Changes in glutamatergic neurotransmission appear to be at the root of this alteration, as local CA NMDA administration restore field potential amplitudes to baseline values. This hypothesis is supported by the effects obtained after administration of the NMDA receptor antagonist AP7, which resulted in a significant increase in the electrophysiological response of CA neurons, similar to that observed in rats conditioned with a high dose of KET and assessed during drug withdrawal.

**Keywords:** *Ketamine, Contextual conditioning, Primary auditory cortex, Glutamate, NMDA, Contextual Tolerance.*

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu$ l - microlitro  
 $\mu$ V - milivolts  
AMPA - Ácido-amino-3-hidroxi-5 metil-isoxazol  
ANOVA - Análise de variância  
CA - Córtex Auditivo primário  
CA3 - subdivisão do Hipocampo  
CA1 - subdivisão do Hipocampo  
CEUA - comissão de ética no uso de animais  
CGM - Corpo Geniculado Medial do Tálamo  
CI - Colículo Inferior  
cm - centímetros  
CONCEA - Conselho Nacional de controle de experimentação animal  
Crt - animal controle  
CS- -  
CS+  
DA - neurotransmissor dopaminérgico  
dB - decibéis  
DP - Desvio Padrão  
EEG -eletroencefalograma  
EPM - erro padrão da média  
FDA - Food Drug Administration  
GLU - Glutamato  
Hz - H hertz  
iGluR - receptores Glutamatérgicos ionotrópico  
IL - Córtex Infralímbico  
im - intramuscular  
KA - cainato  
KET - Cetamina  
KET10 - Cetamina 10 mg/kg  
KET80 - Cetamina 80 mg/kg  
Kg - quilogramas  
MEG - magnetoencefalografia  
mg - miligrama  
mGluR - receptores Glutamatérgicos Metabotrópicos  
ml - mililitros  
N1 - negativo 1  
NA - Noradrenérgica  
NMDA - N-metil-D-aspartato  
P1 - positivo 1  
PBS - cloreto de sódio  
PCP - Fenciclidina

PEA - Potencial Evocado Auditivo

PrL - Córtex Pré Límbico

sc - subcutânea

SNC - Sistema Nervoso Central

SPL - sound pressure level

TL - Tálamo

W - watts

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>9</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1. Cetamina .....	14
1.2. Utilização clínica .....	15
1.3. Cetamina: mecanismo de ação .....	16
1.4. Cetamina: efeitos psicomiméticos .....	17
1.5. O sistema auditivo.....	18
1.6. Córtex Auditivo Primário .....	20
1.7. Córtex auditivo primário e a memória auditiva .....	21
1.8. Neurotransmissão glutamatérgica .....	22
1.9. Potenciais Evocados Auditivos (PEAs).....	24
1.10. Justificativa .....	25
1.11. Hipótese do trabalho.....	26
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
2.1. Geral .....	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1. Cálculo da quantidade amostral .....	31
3.2. Sujeito experimental .....	31
3.3. Ética experimental.....	31
3.4. Cirurgia experimental.....	32
3.5 Drogas .....	33
3.6 Administração das drogas .....	33
3.7. Setup, geração de estímulos e registro dos PEAs corticais .....	33
3.8. Experimento 1 – <i>Análise das alterações induzidas nos PEAs em animais submetidos à administração sistêmica de duas doses de KET: influência do contexto.</i> .....	35
3.8.1. Sujeito experimental .....	35
3.8.2. Cirurgia .....	35
3.8.3. Aparato experimental .....	35
3.8.4. Registro dos potenciais evocados auditivos (PEAs) .....	35

3.8.5. Delineamento experimental .....	36
3.8.6. Perfusão e histologia .....	37
3.8.7. Análise estatística.....	37
3.8.8. Resultados .....	38
3.9. Experimento 2 – <i>Análise da influência do tratamento com KET sobre a capacidade de aprendizagem associativa utilizando como modelo de condicionamento a resposta de sobressalto potencializado pelo medo.</i> .....	43
3.9.1. Sujeito experimental .....	43
3.9.2. Drogas .....	43
3.9.3. Aparato experimental .....	43
3.9.4. Procedimento Experimental .....	45
3.9.5. Análise estatística.....	46
3.9.6. Resultados .....	46
3.10. Experimento 3 – <i>Análise dos efeitos da modulação GLU cortical sobre a resposta eletrofisiológica condicionada de animais submetidos à administração sistêmica de duas doses de KET.</i> .....	48
3.10.1. Sujeito experimental .....	48
3.10.2. Cirurgia .....	48
3.10.3. Administração de drogas.....	48
3.10.4. Setup, geração de estímulos e registro dos PEAs corticais. ....	48
3.10.5. Aparato experimental. ....	48
3.10.6. Delineamento experimental .....	48
3.10.7. Perfusão e histologia .....	50
3.10.8. Análise estatística.....	51
3.10.9. Resultados .....	52
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>65</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>
<b>6. ANEXOS .....</b>	<b>80</b>

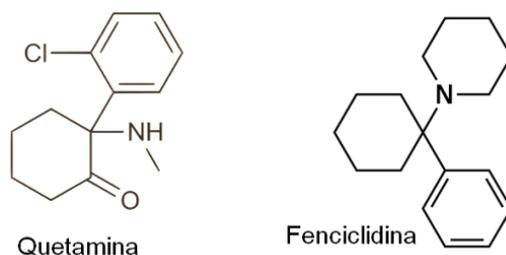
# 1. INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Cetamina

Nos anos 50, a busca de um anestésico ideal que causasse interrupção do estímulo doloroso e baixasse o nível da consciência de maneira eficaz fez com que a indústria farmacêutica desenvolvesse agentes como o CI-395 (N-1-fenil-ciclohexil-piperidina [PCP] cloridrato, ou fenciclidina) e o CI-400 (N-etil-1-fenil-ciclohexamina cloridrato) (Sassano *et al.* 2016). Embora apresentasse efeito analgésico, sem efeitos secundários sobre o sistema respiratório e cardiovascular, mostrando-se confiável para o uso em humanos (Greifenstein *et al.* 1958, Meyer *et al.* 1959), a fenciclidina (PCP) causou também efeitos claramente indesejáveis como, por exemplo, alucinações, delírios intensos e prolongados, quadros agudos de psicose, incluindo privação sensorial, durante a recuperação (Domino *et al.* 2012). Após diversos relatos sobre estes efeitos colaterais extremamente indesejáveis no contexto pós cirúrgico, o PCP tornou-se não qualificável para utilização clínica. Porém, foi justamente estes efeitos colaterais que fizeram que este composto fosse procurado e utilizado como droga recreativa por jovens, caracterizando um padrão de uso. Afim de conter seu uso indiscriminado, o PCP teve sua comercialização e produção proibida no final dos anos 70 (Lankenau & Clatts, 2005; Degenhardt & Dunn, 2008).

Na continuação da busca por um anestésico com propriedades ideais, as pesquisas foram então direcionadas a sintetização de uma substância análoga a fenciclidina que apresentasse o mesmo potencial anestésico, porém com efeitos psíquicos menores. Foi então que em 1962 o laboratório de Química Orgânica da Wayne State University - EUA, em colaboração com a companhia farmacêutica Parke Davis - sintetizou o composto CI-581 ou Cloridrato de Cetamina (KET) (Figura 1), pelo químico norte-americano Calvin Stevens (Domino, 2010). Sendo um análogo estrutural da fenciclidina e apresentando um décimo de sua potência, a KET foi selecionada para testes em humanos, sendo amplamente empregada como anestésico no campo de batalha pelo exército dos EUA durante a Guerra do Vietnã. Em 1965, foram publicados, pela Universidade de Michigan, os resultados dos primeiros estudos clínicos da KET, os quais demonstravam que a utilização deste composto em humanos era segura e eficaz, considerando suas propriedades anestésicas (Domino *et al.*, 1965). De fato, em comparação com a fenciclidina, os efeitos colaterais da KET mostraram-se menos intensos, além de não serem observados quadros de delírio severo (Corssen and Domino, 1966).



**Figura 1.** Fórmulas estruturais da KET e da fenciclidina (Corssen and Domino, 1966).

## 1.2. Utilização clínica

Atualmente a KET é o anestésico mais utilizado na medicina veterinária e um dos mais empregados na anestesia clínica, principalmente por promover sedação e analgesia eficazes, mantendo a estabilidade dos sistemas respiratórios e cardiovascular (Gao *et al.* 2016). As vias de administração intravenosa e intramuscular são comumente utilizadas para promover anestesia pediátrica, especialmente em pacientes com alguma limitação cardíaca ou respiratória (Gao *et al.* 2016). Em cirurgias a KET é normalmente associada com benzodiazepínicos, o que pode reduzir os efeitos adversos do anestésico (Orhurhu *et al.* 2021). Apesar do sucesso clínico e ampla utilização anestésica, sobretudo em campo de guerra do Vietnã, os efeitos psicomiméticos foram surgindo em relatos de pacientes pós cirúrgicos dentre os quais sonhos vívidos, experiência extracorpórea, alucinações, e alterações da percepção de tempo e espaço (Kelly, 1999). Assim como a PCP, a KET também começou a ser amplamente procurada para uso recreativo, na busca de efeitos como euforia, estado onírico de intoxicação, distorções sensoriais, leves alucinações, empatia e experiência extracorpórea. Entre os usuários recreativos a KET é referida como “*Special K*”, “*Vitamina K*” ou simplesmente “*K*” (Dillon *et al.*, 2003).

O seu uso como droga recreativa foi popularizado no ano de 1978 com a publicação do livro “*The Scientist*”, escrito por John Lilly, no qual o autor descreve de forma detalhada as experiências sensoriais vivenciadas com diferentes doses de KET (Kelly, 1999). Por conseguinte, as consequências de seu uso abusivo, particularmente em indivíduos que a utilizavam de forma crônica, foram intensificadas, ocasionando danos físicos e dependência (Morgan and Curran 2012). Devido ao aumento do uso recreativo, e da preocupação com as

consequências deste consumo, a KET foi incluída na categoria de droga de abuso pela DEA em 1999.

O uso continuado de KET pode resultar no surgimento de cistite ulcerativa (Shahani *et al.* 2007), dor abdominal intensa (Muetzelfeldt *et al.* 2008), depressão (Morgan and Muetzelfeldt, 2010) e psicose (Krystal *et al.* 2010), além de danos cognitivos (Morgan and Curran, 2006) e alterações neurológicas (Liao *et al.* 2011). Assim como qualquer outra droga de abuso, o uso continuado de KET pode levar à tolerância ou sensibilização. Enquanto a tolerância é a diminuição do efeito desejado pela administração repetida da droga, a sensibilização é o seu oposto, ou seja, o aumento do efeito da substância obtido pelo seu uso repetido. Como exemplo, a tolerância aos efeitos sedativos da KET já é conhecida (Tobias, 2000).

Em animais de laboratório, a administração de KET, em dose subanestésica, induz o surgimento de sintomas diversos como perturbações sensório-motoras (Mansbach and Geyer, 1991), déficits de memória (Imre *et al.* 2006, Kos *et al.* 2006), hipermotilidade (Carlsson, 1993), e estereotipia e ataxia (Tricklebank *et al.* 1989). Apesar de destituída dos potentes efeitos dislépticos da PCP, a KET também é capaz de alterar a consciência e induzir sintomas de esquizofrenia, tanto positivos quanto negativos, como alucinações e redução da atividade motora. De fato, a KET apresenta a capacidade de acentuar o estado psicótico de pacientes esquizofrênicos e de provocar sintomas de esquizofrenia em indivíduos saudáveis (Lahti *et al.* 1995), por esta razão, a KET vem sendo utilizada, rotineiramente, como um modelo experimental de esquizofrenia (Geyer, 1998).

### 1.3. Cetamina: mecanismo de ação

O mecanismo de ação da KET é bastante complexo, atuando principalmente como um antagonista não competitivo dos receptores de glutamato (GLU) do tipo *N-metil-D-aspartato* (NMDA). Este antagonismo, associado à sua ação sobre a neurotransmissão GABAérgica (Morgan and Curran 2012), é o principal responsável por seus efeitos analgésico e amnésico, assim como suas por propriedades psicomiméticas (Lahti *et al.* 1995, Malhortra *et al.* 1997). A KET age ainda, embora com diferente eficácia, no bloqueio dos receptores muscarínicos e na liberação de dopamina (DA) (Rabiner 2007). Atua também como fraco agonista de receptores opioides  $\mu$  (Oye *et al.* 2007), efeito mais observado com a utilização de sua forma racêmica (S(+)-KET) do que com seu isômero R(-), e esta ação

parece não estar subjacente a seus efeitos analgésicos já que não é bloqueada por naloxona (Hustveit *et al.* 1995). Além disso, como outros agentes anestésicos, a KET aumenta a condutância de cloro mediada por GABA no complexo do receptor GABA<sub>A</sub> (Miler 2002). Já sua ação sobre os sistemas monoaminérgicos são mais intensos, pois além de acentuar a neurotransmissão noradrenérgica (NA), também inibe a recaptção de catecolaminas (Martin *et al.* 1982, Kohrs and Durieux 1998). Todas estas interações resultam nos seus efeitos estimulantes, hipnóticos e analgésicos, além de sua capacidade de alterar os estados de consciência.

A produção comercial da KET é realizada com a utilização de uma mistura racêmica de dois isômeros opticamente ativos (enantiômeros), o isômero S(+) (levogiro) e o isômero R(-) (dextrogiro), associada dois conservantes, o cloreto de benzetônio e clorbutanol (Kohrs & Durieux, 1988; Luft & Mendes, 2005). Estes isômeros possuem propriedades farmacológicas e intensidades diferentes (Hustveit *et al.* 1995), sendo o isômero S(+) três vezes mais potente como anestésico e como analgésico (White *et al.*, 1985, Jaksch *et al.*, 2002). Com relação a afinidade, este isômero é mais seletivo do que o isômero R(-), apresentando quase cinco vezes mais afinidade para os receptores do tipo NMDA (Hustveit *et al.* 1995). Quando há separação dos isômeros, a potência da KET é consideravelmente maior do que a mistura racêmica, porém o custo da separação é alto, por isso, a KET é comercializada desta forma (Kohrs & Durieux, 1988; Luft & Mendes, 2005).

A biodisponibilidade da KET 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 ou endovenosa é notavelmente maior, alcançando nesta última até 99% (Potter and Choudhury 2014).

#### 1.4. Cetamina: efeitos psicomiméticos

Dentre a gama dos efeitos resultantes da administração aguda de KET, assim como de outros alucinógenos, afiguram sintomas de psicose, alterações do humor, distorções na percepção do tempo, do *self* e do ambiente. A isto se associam experiências reforçadoras ou aversivas, e sentimentos de desrealização e despersonalização (Krystal *et al.* 1994, Breier *et al.* 1997, Malhortra *et al.* 1997, Vollenweider *et al.* 1997, Krystal *et al.* 2000, Micallef *et al.* 2002). Dessa forma, a KET tem sido proposta como uma ferramenta farmacológica para o

estudo clínico da função do receptor NMDA, o que pode fornecer uma maneira de entender o funcionamento deste receptor na modulação ou expressão da psicose em seres humanos (Garcia, 2007).

O uso de KET induz ou potencializa sintomas de psicose em pacientes previamente diagnosticados (Krystal *et al.* 1994, Moghaddam and Krystal, 2012) e, fisicamente, pode causar toxicidade neurológica e periférica (Gable 2004, Morgan *et al.* 2010). Além de alterar funções comportamentais e cognitivas (Malhotra *et al.* 1997, Umbricht *et al.* 2000, Micaleff *et al.* 2002), a KET apresenta a característica de alterar os potenciais evocados eletrofisiológicos, incluindo os auditivos (PEAs), de forma similar àqueles observados em pacientes esquizofrênicos (Maxwell *et al.* 2006). Todos estes fatores sugerem que a KET degenera a personalidade coerente por facilitar a sobrecarga sensorial a partir do descontrole homeostático de processos relacionados ao controle da filtragem de estímulos sensoriais relevantes (Mansbach and Geyer 1989, Sandner *et al.* 2002, Maxwell *et al.* 2006). De fato, a KET apresenta a propriedade de alterar a reatividade de diversas áreas encefálicas a uma série de estímulos sensoriais incluindo os auditivos e, a despeito de não produzir exatamente um bloqueio sensorial, este efeito é denominado de anestesia dissociativa (Domino *et al.* 1965).

### 1.5. O sistema auditivo

Apesar de extrema sua complexidade funcional, o sistema auditivo apresenta uma estruturação de fácil entendimento. Este se inicia a partir do oitavo par craniano, o nervo vestibulo-coclear, ou simplesmente nervo auditivo. A partir daí as fibras sensoriais auditivas ascendem e se ramificam em direção aos núcleos cocleares dorsal e ventral. Posteriormente, do núcleo coclear ventral, estas fibras decussam e se direcionam para o complexo olivar superior para depois ascender via lemnisco lateral (e seu núcleo) junto com as fibras que cruzam a partir do núcleo coclear dorsal, em direção ao colículo inferior (CI), ao corpo geniculado medial do tálamo (CGM) e ao córtex auditivo (CA) (Rubel and Fritsch, 2002; Pollak *et al.*, 2003; Friedland, 2006).

Didaticamente, o processamento da informação auditiva pode ser descrito a partir de três etapas de identificação, interpretação, e integração do estímulo sonoro. A primeira se inicia nos núcleos cocleares e se direciona até o CI, permitindo a percepção das diferentes dimensões da mensagem sonora, como por exemplo, intensidade, frequência, duração e

localização. Na etapa seguinte, que envolve principalmente o CI e o tálamo (TL), é adicionada à informação sonora a percepção mais complexa associando componentes de alerta, como por exemplo, o quanto este som é aversivo. Por último, ocorre a integração entre as áreas mesencefálicas e as corticais, que interpretam as informações recebidas de forma mais ampla e geral (Feng, 1992; Wu et al., 2011); nesta etapa o processo de memorização é facilitado (Grosso et al., 2015).

Das áreas mesencefálicas relacionadas ao processamento da informação auditiva, o CI é uma das estruturas importantes (Malmierca 2004), apresentando aferências e eferências excitatórias e inibitórias singulares (Malmierca 2004, Ito and Oliver, 2010, Ayala et al. 2016). No que diz respeito às aferências ao CI, estas são em sua maioria compostas de projeções excitatórias GLU (Parks 2000, Malmierca 2004, Ayala et al. 2016). A localização dos sons e a inibição pré-pulso (IPP) do reflexo de sobressalto, considerada como um modelo de filtro sensorio-motor (Braff and Geyer 1990, Fendt et al. 2002, Lie and Yue 2002), é fortemente modulada no CI (Lie and Yue, 2002), sendo detectada mesmo em ratos descerebrados (Li and Frost 2000). Alterações em potenciais de campo relacionados à percepção de estímulos atencionais (*mismatch negativity*) também dependem de mecanismos auditivos coliculares (Patel et al. 2012). Prejuízos no funcionamento desses mecanismos são frequentemente observados após a administração sistêmica ou local de antagonistas de receptores NMDA (Furuya et al. 1999, Impey et al. 2017), incluindo a KET (vanBerckel et al. 1998, Cilia et al. 2007, Rosburg and Kreitschamann-Andermahr, 2016). Isto sugere que processos atencionais relacionados à percepção inconsciente da informação auditiva são influenciados pela neurotransmissão GLU neste nível do mesencéfalo. Além disso, os níveis de *N-acetilaspártato*, um marcador da função e viabilidade neural (Ross and Sachdev 2004), em pacientes esquizofrênicos mostraram-se reduzidos no CI, particularmente no CI direito, e no TL (Martinez-Granados et al. 2008, Stone et al. 2014), o que pode indicar lesão ou disfunção neural (Martinez-Granados et al. 2014).

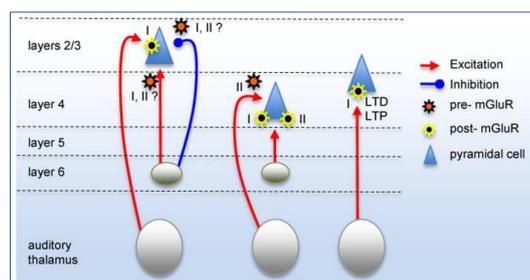
Um dos efeitos principais da KET é o aumento persistente nos níveis de glutamato cortical, o que torna as células mais excitáveis (Miller et al. 2016; Zhang et al. 2019). Esta desinibição cortical parece resultar da supressão de interneurônios GABAérgicos (Behrens et al. 2007; Homayoun & Moghaddam, 2007; Schobel et al. 2013; Miller et al. 2016). Curiosamente, em seres humanos, o processamento dos estímulos sensoriais auditivos no córtex auditivo primário (Au1) parece não ser influenciado pela KET, o que sugere que a

supressão do processamento dessas informações deve ocorrer num nível cortical mais elevado de forma dissociativa (Schwender et al., 1993).

### 1.6. Córtex Auditivo Primário

A principal função do sistema auditivo é transformar os diversos estímulos acústicos em representações perceptuais que possam apresentar algum valor adaptativo aos indivíduos das diversas espécies (Griffiths and Warren, 2004; Bizley and Cohen, 2013). Em primatas, a percepção desses estímulos parece ser mediada por mecanismos neuronais localizados na região ventral do córtex auditivo (Romanski et al., 1999; Rauschecker and Tian, 2000; Romanski and Averbeck, 2009), área para a qual aferem informações provenientes do Au1 (Christison-Lagay and Cohen, 2018).

O Au1 área ocupa os dois terços mediais do giro temporal transversal – no giro de Heschl, fazendo fronteira com as áreas auditivas associativas e com o córtex auditivo secundário, correspondendo às áreas 41 e 42 de Brodmann (Morosan et al., 2001). As projeções auditivas tálamo-corticais, denominadas radiações auditivas, trafegam abaixo do núcleo lenticular por meio da cápsula interna. O córtex auditivo tem uma citoarquitetura formada por seis camadas (Miyashita, 2022). As projeções aferentes vindas do TL terminam nas camadas III e IV. As projeções corticocoliculares e corticotálâmicas iniciam-se nas camadas V e VI, e as camadas I e II estão envolvidas em conexões internas, tanto ipsilateral como contralateral, por intermédio do corpo caloso (Lu, 2014) (Figura 2).



**Figura 2.** Mediação cortical por receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) no córtex auditivo. Nas células piramidais na camada 2/3, os receptores mGluRs pré-sinápticos (possivelmente do grupo I e grupo II) causam inibição tanto nos inputs inibitórios quanto nos excitatórios provenientes da camada 6. Receptores mGluRs pós-sinápticos do tipo I são ativados por aferências provenientes do núcleo talâmico auditivo, mediando a despolarização dos neurônios moduladores, enquanto mGluRs do tipo 2 promovem a inibição (extraído de Lu, 2014)

## 1.7. Córtex auditivo primário e a memória auditiva

A capacidade de perceber estímulos requer o correto reconhecimento dos diversos estímulos sensoriais, e da extração de informações relevantes sobre esses estímulos para a memória. Processos de memória podem ser formados a partir da aprendizagem implícita da relação entre estímulos sensoriais e eventos correlatos através de repetições sucessivas, o que requer a participação ativa dos córtices sensoriais primários (Bao et al., 2004; Maruyama and Komai, 2018). Em um estudo no qual foram registradas as respostas neurais do córtex auditivo que se desenvolvem de forma passiva através da exposição repetida a um estímulo sonoro específico de ratos anestesiados (Kang et al., 2021), foi observado que sinais neurais distintos encontrados no CA desses animais são semelhantes aqueles identificados em estudo de neuroimagem com pacientes humanos durante a fase REM do sono (Andrillon et al., 2017). Corroborando estes achados, no intuito de compreender o envolvimento do CA na memória auditiva, Agus e colaboradores (2010) solicitaram aos participantes de um estudo que tentassem reconhecer uma determinada sequência de sons repetidos dentro da sequência de uma amostra aleatória de tal forma que um estímulo sonoro específico poderia ocorrer ocasionalmente. Apesar de desconhecido por eles, os participantes demonstraram rápida seleção no processo de percepção do estímulo, e conseqüentemente rápida e robusta memorização de características aleatórias de sons complexos. Tal percepção da recorrência de um som comparado em meio a sons aleatórios são confirmados em estudos que utilizaram EEG (eletroencefalograma) e MEG (magnetoencefalografia) para a medição da atividade cerebral (Luo et al., 2013; Andrillon et al., 2017). Curiosamente, o aumento da coerência neural foi observado quando os participantes estavam na fase REM do sono (rápido movimento dos olhos) ou no sono leve não REM durante a apresentação do som (Andrillon et al., 2017), sugerindo que o aprendizado de novos estímulos sonoros pode ocorrer mesmo quando a exposição é passiva.

Além disso, experimentos que utilizaram sons mais complexos e realísticos como estímulo evidenciaram o envolvimento ativo do CA no aprendizado e na adaptação a sons em curso ou na predição do estímulo, sugerindo que o CA exerce um papel da decodificação do som, mas também na percepção do contexto em que o estímulo acontece (Lu et al., 2018).

Os resultados acima ressaltam a importância do CA no aprendizado passivo e implícito. Este tipo de fenômeno toma alcance no campo do uso e abuso de substâncias na medida em que os sintomas de abstinência de uma droga resultam do desenvolvimento de

respostas reflexas aprendidas. Isto acontece quando os efeitos de determinada droga se associam às características do contexto no qual ela é ingerida como resultado de um condicionamento do tipo Pavloviano (Lynch et al., 1973; Siegel, 1999, 2005; Troisi, 2013; Heinz et al., 2019). Este tipo de fenômeno está subjacente aos efeitos de todas as drogas de abuso. Como exemplo, e de importância para o presente estudo, respostas condicionadas reflexas podem se desenvolver mesmo em animais anestesiados com KET, sendo observadas até sete dias pós-teste (Edeline and Neuenchwander-El Massioui, 1988).

A hipótese para uma base orgânica (física) dos processos de aprendizagem e estados de memória ressalta que tais fenômenos resultam de alterações neurais em sistemas e circuitos, de tal forma que quanto mais eficazes as alterações a nível sináptico mais robustos tais processos (Konorski, 1948; Hebb, 1949). A eficácia dessas alterações, medidas pela manutenção da resposta fisiológica após cessado o estímulo, ou pela evocação da resposta pela exposição à estímulos com propriedades semelhantes ao original, tem sido frequentemente chamada de potencialização à longo prazo, ou LTP. Ainda que complexa o bastante para abarcar uma série de outros circuitos, os mecanismos subjacentes a LTP, também envolvidos no armazenamento de informações, parecem depender da ativação de receptores NMDA de glutamato na medida em que seu antagonismo bloqueia a indução de LTP hipocampal, além de prejudicar a expressão de memória espacial (Davis et al., 1992). Este prejuízo parece resultar mais de danos na aquisição e codificação da informação do que na recuperação daquilo que está efetivamente armazenado (Buffalo et al., 1994).

## 1.8. Neurotransmissão glutamatérgica

O glutamato é o principal e mais abundante neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), exercendo um importante papel em mecanismos como a cognição, aprendizado e memória (McEntee and Crook, 1993; Riedel et al., 2003; Gécz, 2010; Peng et al., 2011). Os receptores glutamatérgicos são divididos em dois grandes grupos: os ionotrópicos (iGluRs) e os metabotrópicos (mGluRs). Os mGluRs são receptores acoplados à proteína G e estão localizados em ambos os terminais pré e pós-sinápticos. Os iGluRs são canais iônicos, cuja ativação leva à despolarização neuronal. Estes últimos podem ser divididos de acordo com suas propriedades farmacológicas e fisiológicas em três tipos: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido-amino 3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA) e cainato (KA) (Ozawa et al., 1998). Os receptores do subtipo AMPA são encontrados no

SNC, sendo predominantes nas regiões do hipocampo (áreas CA1 e CA3 do giro denteado) e estão envolvidos com o aumento da excitabilidade neuronal por meio de sua alta permeabilidade ao  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . A função dos receptores KA ainda não está claramente esclarecida, porém, sabe-se que, ao contrário dos AMPA, são altamente permeáveis aos íons  $\text{Ca}^{2+}$  (Ozawa *et al.* 1998). Os receptores NMDA, por sua vez, são encontrados em todo o SNC, possuem alta permeabilidade aos íons  $\text{Ca}^{2+}$ , estão envolvidos na modulação da neurotransmissão excitatória, e podem mobilizar uma grande quantidade desse íon para dentro das células, resultando na ativação de diversas vias intracelulares. Porém, a ocorrência de um grande influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  devido à ativação excessiva desse receptor, pode levar à morte celular pelo mecanismo de excitotoxicidade (Léveillé *et al.*, 2008), e ocasionar o surgimento de doenças neuropatológicas como, por exemplo, as doenças de Alzheimer (Hynd *et al.*, 2004), Huntington (Wong, 1985), e Parkinson (Zhang *et al.*, 2019), além da esquizofrenia (Uno and Coyle, 2019).

A utilização de antagonistas de receptores NMDA altera a atividade neuronal em diversas estruturas encefálicas, como na amígdala (Miserendino *et al.*, 1990), no hipocampo (Herron and Forsythe, 1989), e no córtex pré-frontal medial (Verma and Moghaddam, 1996), 1998). Os efeitos agudos do uso desses antagonistas sobre a atividade pré-frontal são comparáveis àqueles encontrados em pacientes esquizofrênicos (Neill *et al.*, 2010). Por isso mesmo, uma das áreas cerebrais mais afetadas pelo uso de KET é o córtex pré-frontal, particularmente suas regiões pré (PrL) e infralímbica (IL) (Amat *et al.*, 2016; Silva-Cardoso and Nobre, 2021). Ainda, vários estudos mostram que o desempenho em tarefas dependentes da atividade cortical destas regiões é profundamente afetado pela administração aguda de KET em seres humanos. Como exemplo, um estudo utilizando a técnica de imagem por ressonância magnética mostrou que os efeitos subjetivos (dissociativos) da KET se correlacionam significativamente com redução na atividade cortical ventromedial mediada por glutamato (Deakin *et al.*, 2008).

A KET apresenta a capacidade de induzir alterações espontâneas nos potenciais de campo eletroencefalográficos. Na verdade, em franco contraste com a ação de outros agentes hipnóticos, a utilização de KET não resulta numa supressão dose-dependente da atividade neural. De fato, a indução de anestesia com KET resulta num aumento nos potenciais de respostas somatossensoriais, o que pode refletir ou uma desinibição dose-dependente, ou um aumento na excitabilidade neural (Kochs and Bischoff, 1994). Esta alteração se estende, ainda que menos intensamente, também aos potenciais evocados auditivos mesencefálicos.

Isto indica que os efeitos analgésicos da KET e de outras drogas sobre o SNC, assim como as mudanças promovidas nos processos emocionais e motivacionais decorrentes de seu uso, podem ser estudados com a utilização de ferramentas de medidas eletrofisiológicas, como o registro dos potenciais evocados auditivos *in vivo* (Nobre et al., 2003; Nobre and Brandão, 2011; Nobre, 2013; Paliarin et al., 2018, 2018).

### 1.9. Potenciais Evocados Auditivos (PEAs)

A exposição a um estímulo acústico resulta numa resposta neural despolarizante que trafega desde o oitavo par craniano, o nervo auditivo, até o córtex cerebral. Esses sinais evocados podem ser registrados a partir de eletrodos implantados internamente (ex. colículo inferior) nas estruturas localizadas ao longo deste percurso (Biacabe et al., 2001; Nobre and Brandão, 2011). Portanto, os PEAs refletem mudanças na atividade elétrica cerebral produzidas por um estímulo auditivo. Estes potenciais consistem em deflexões positivas e negativas, também chamadas de ondas, que acompanham temporalmente o estímulo. Apesar de sua amplitude bastante reduzida, quando comparado com os sinais captados externamente pelo EEG, não sendo visíveis portanto com o uso desta técnica, os PEAs podem ser registrados pela promediação de cada um dos sinais registrados na medida em que a amplitude destes permanece constante para todos os estímulos (*time-locked*), enquanto que o ruído de fundo, que varia ao das sucessivas exposições é reduzido por esta promediação (Plourde, 2006). Eis porque a extração de sinais de baixa amplitude (PEAs) das altas amplitude geradas por ruídos requer a utilização desta técnica de registro. Para o registro dos PEAs, clicks sonoros são comumente utilizados. Estes clicks normalmente compreendem pulsos retangulares curtos (40 a 400 ms) dentro de um espectro de frequência de 1 a 10 kHz.

As aplicações práticas de medidas de PEAs têm sido frequentemente orientadas para propósitos clínicos. Como exemplo, Biacabe et al., (2001) propuseram sua aplicação para a identificação de neurinomas acústicos (tumores) ou lesões, para o diagnóstico precoce de problemas auditivos em crianças, e para pacientes que não respondem a testes audiométricos tradicionais. No contexto da pesquisa básica, o registro de PEAs tem sido frequentemente utilizado para a análise de padrões neurais subjacentes a respostas comportamentais. Brandão et al., (2001) demonstraram que a expressão da resposta de medo aprendido, utilizando como estímulos condicionados um estímulo luminoso ou estímulos ultrassônicos na frequência de 22 kHz, aumenta significativamente a amplitude dos PEAs registrados no

núcleo central do colículo inferior, da mesma forma que o faz a administração intracolicular de ácido glutâmico. De forma similar, a expressão do medo condicionado é acompanhada por um aumento duradouro na amplitude dos PEAs no núcleo basolateral da amígdala de animais testados em movimento livre (Tang et al., 2001). Ainda, em um estudo posterior, Tang et al., (2003) demonstraram que tanto na área CA1 do hipocampo, quanto no núcleo lateral da amígdala, os PEAs se apresentam potencializados em resposta a um estímulo condicionado, quando os animais são testados no próprio ambiente de condicionamento. Este aumento foi acompanhado da resposta de congelamento contextual. Os autores sugerem que esta potencialização, tanto no LA quanto no CA1, está provavelmente relacionada a memória contextual específica e que, portanto, registros eletrofisiológicos relacionados as mudanças induzidas por aprendizagem deveriam ser realizadas em um contexto neutro.

### 1.10. Justificativa

A despeito dos seus efeitos terapêuticos promissores nos quadros epiléticos refratários a outros medicamentos (Borsato et al., 2020), no tratamento da depressão unipolar (Zanos and Gould, 2018; Memon et al., 2020), e no tratamento da ansiedade (Banov et al., 2020), além de seu uso clínico no manejo da dor aguda e crônica (Gao et al., 2016), a KET também apresenta uma série de efeitos colaterais que limitam seu uso. Dentre estes se destacam náusea, êmese, estimulação cardiovascular, hepatotoxicidade, ansiedade, danos irreversíveis no trato urinário e, de forma mais comum, eventos psicomiméticos adversos associados incluindo delírios, sensação de flutuação, experiência de sonhos vívidos e alucinações, sendo este último o mais comum (Corssen and Domino, 1966; Niesters et al., 2014; Powers et al., 2015). Sabe-se também que a KET aumenta a concentração de dopamina (DA) em áreas relacionadas aos efeitos reforçadores das drogas de abuso, como o *núcleo accumbens* (Hancock and Stamford, 1999). Talvez por isso apresente a propriedade de ser autoadministrada em modelos experimentais que avaliam os efeitos reforçadores e motivacionais de drogas em diversas espécies (Risner, 1982; Broadbear et al., 2004; De Luca and Badiani, 2011; Huang et al., 2015; Venniro et al., 2015). A existência desta característica da KET é reforçada pelos estudos de condicionamento de preferência ao lugar (van der Kam et al., 2009; Du et al., 2017; Silva-Cardoso and Nobre, 2021).

Como toda e qualquer droga de abuso, A KET vem sendo amplamente utilizada de forma recreativa (Wood et al., 2011). Ainda que tenha como ação principal o antagonismo

da neurotransmissão excitatória, a administração de KET resulta num aumento dos níveis extracelulares de GLU, provavelmente devido ao bloqueio de receptores NMDA localizados em interneurônios GABAérgicos corticais (Moghaddam et al., 1997; Gerhard et al., 2020). Estudos prévios comprovaram que as pistas contextuais presente no ambiente de utilização de uma droga se apresentam como variáveis capazes de se somar aos efeitos farmacológicos de uma substância, funcionando então como estímulo condicionado (Siegel et al., 1982). Isto é importante na medida em que o contexto se torna capaz de modular a resposta a uma droga através de pistas contextuais que foram previamente a ela associadas, por pareamento de estímulos. Isto pode eliciar no indivíduo a fissura pela droga e, conseqüentemente, sua busca e consumo, já que a exposição a estes estímulos pode facilitar o surgimento de sintomas de abstinência.

Em um trabalho recente (Silva-Cardoso and Nobre, 2021), foi demonstrado que, assim como o álcool etílico (Birak et al., 2011), alguns agentes opioides (Siegel, 1975; Siegel et al., 1982), e psicoestimulantes (Diana et al., 1995; Parsons et al., 1996), a KET compartilha a capacidade de induzir tolerância comportamental e farmacológica condicionada. Em outro estudo, foi demonstrada a influência da administração crônica e abstinência de KET sobre o funcionamento basal dos neurônios CIC, uma das estruturas mais importantes das vias auditivas ascendentes (Driscoll and Tadi, 2022). Nesta região, de forma semelhante ao álcool etílico, a abstinência de KET induz um aumento pronunciado na amplitude dos potenciais de campo coliculares, o que reflete uma possível perturbação no fluxo de informações sensoriais auditivas ascendentes que passam por essa região (Paliarin et al., 2018). Portanto, estes estudos apontam para a forte influência da KET no processamento da informação auditiva e no comportamento. Nesse sentido, a elucidação dos mecanismos envolvidos nas alterações eletrofisiológicas a jusante das estruturas mesencefálicas, mais particularmente as estruturas corticais, pode ajudar na compreensão de alguns de seus efeitos indesejáveis, assim como da fisiopatologia dos sintomas de alguns transtornos mentais, incluindo os fenômenos alucinatorios auditivos.

### **1.11. Hipótese do trabalho**

Tendo em vista os mecanismos GLU e a ação farmacológica da KET, supomos que a droga apresente a capacidade de alterar a resposta eletrofisiológica eliciada em áreas

corticais, mais particularmente o CA, sobretudo quando sob influência de pistas contextuais relacionadas à droga e seus efeitos.

## **2.OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Investigar a influência do contexto na expressão da resposta eletrofisiológica eliciada no córtex auditivo primário de animais tratados com diferentes doses de KET, assim como a possível modulação de mecanismos GLU dessa estrutura sobre esta resposta.

### 2.2. Objetivos específicos

- Analisar as alterações induzidas na eletrofisiologia normal de animais submetidos à administração sistêmica de duas doses de KET, utilizando como modelo experimental o registro dos PEAs.
- Analisar os efeitos das pistas ambientais sobre as alterações induzidas na eletrofisiologia normal de animais submetidos à administração sistêmica de duas doses de KET, utilizando como modelo experimental o condicionamento ao contexto.
- Analisar os efeitos da modulação farmacológica GABAérgica e GLU sobre as alterações induzidas pelo condicionamento ao contexto em animais tratados com duas doses de KET.

## **3.MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Cálculo da quantidade amostral

Para cada experimento realizado neste trabalho foram realizadas estimativas para o cálculo do número aproximado de sujeitos experimentais necessários para garantir o bom andamento do trabalho. A ordem foi não inflacionar o N experimental, utilizando animais em excesso e aumentando os custos da pesquisa, tampouco o reduzindo a ponto de colocar em dúvida a qualidade dos resultados obtidos. Este cálculo foi realizado com o auxílio do programa G\*Power (<http://www.gpower.hhu.de/en.html>) com  $\eta^2$  estimado *a priori* em 0.30 (para este e os experimentos subsequentes), levando em consideração a quantidade de grupos experimentais para uma análise de variância (ANOVA) de 2 ou 3 fatores e 2 ou mais repetições, tivemos um F crítico de 1.93 e um total amostral de 180 animais ( $n= 8$ ) (poder = 0.97).

#### 3.2. Sujeito experimental

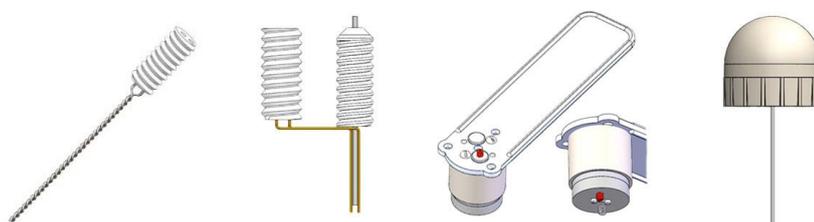
Foram utilizados ratos machos Hannover, com peso inicial de 220 g ( $\pm 10$  g). Os animais, provenientes do Biotério Central da USP-RP, foram mantidos em número de quatro em caixas de polipropileno de 45 cm de largura x 65 cm de comprimento x 30 cm de altura nas quais foi adicionada ração de madeira e ração, dentro de uma estante ventilada com controle de temperatura ( $23 \pm 1^\circ$  C), ventilação, exaustão, luminosidade e umidade, em um ciclo claro-escuro de 12 horas, com as luzes acesas às 7 horas da manhã no Biotério do Departamento de Psicologia, FFCLRP-USP.

#### 3.3. Ética experimental

Os experimentos foram realizados de acordo com os regulamentos e cuidados na utilização de animais de laboratório, conforme as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – Brasil (CONCEA), aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto USP/RP, número do [processo nº 18.5.300.59.0](#). Como estabelecido anteriormente, todo 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.

### 3.4. Cirurgia experimental

Para o registro dos PEAs, foram implantados eletrodos bipolares e/ou quimitrodos, medindo 13 mm (combo cânula/eletrodo – C313G-MS303/2/SPC, 22G, - Plastics One, Roanoke, VA – USA) (Figura 3), para registro dos potenciais de campo e administração local de drogas diretamente no córtex auditivo primário (CA). Para esse fim, os animais foram anestesiados com xilazina (10mg/kg) + cetamina (100mg/kg), adicionadas na mesma seringa, por via intramuscular e levados a um aparelho estereotáxico digital (Insight, Brasil), onde tiveram o crânio fixado pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Após tricotomia, uma injeção subcutânea de 0.2ml de lidocaína a 2% (Harvey, Brasil) foi aplicada na área de incisão. Logo após, o tecido subcutâneo foi removido, assim como o perióstio (por raspagem, com auxílio de pinça, algodão e hastes flexíveis com ponta de algodão). Já com a superfície craniana exposta e ajustada em posição horizontal, entre bregma e lambda, três orifícios foram feitos nos ossos parietais com uma broca elétrica (Freedom, EUA) para introdução e fixação da prótese, através de dois parafusos de aço inoxidável. As coordenadas utilizadas tiveram como base o atlas de Paxinos & Watson (2008), como a seguir, a partir do bregma: anteroposterior: -4,16mm; lateral:  $\pm 3,00$ mm; dorsoventral: -5,20mm; com angulação de 37°. Após, o crânio então foi revestido com acrílico dental (JET, Brasil) para ancoragem da prótese aos parafusos. Ao término da cirurgia cada animal recebeu por via intramuscular, uma injeção de benzilpenicilina benzatina (60.000UI, 0.2ml), seguida por uma injeção analgésico Banamine (2.5mg/Kg).



**Figura 3.** EA figura apresenta os materiais utilizados para o registro eletrofisiológico in vivo dos PEAs de animais não anestesiados. Da esquerda para a direita: eletrodo bipolar, quimitrodos, comutador bipolar, e mandril para cânula.

### 3.5 Drogas

Foram utilizados o antagonista não competitivo dos receptores de glutamato do tipo *N-metil-D-aspartato* (NMDA) cetamina (KET) (cloridato de cetamina 10% cetamin, SP – Brasil) nas doses 10 e 80 mg/kg, administrado por via subcutânea (s.c.), o agonista de receptores de glutamato do tipo NMDA (*N-Metil-D-aspartato* – NMDA, 1 nmol/0.2 µl – Tocris, USA), o antagonista de receptores de GLU do tipo NMDA DL-AP7 (dl-2-Amino-7-phosphonoheptanoic acid, 10 nmol/0.2 µl) o bloqueador de canais de  $Na^+$  dependentes de voltagem lidocaína (10 mg/kg - Lidostesim, Densply, Brasil), o agonista de receptores adrenérgicos  $\alpha 2$  xilazina (10 mg/kg – Calmiun, Agener, Brasil), o agente não esteroideal anti-inflamatório, antipirético e analgésico flunixinina meglumina (Banamine, 2.5 mg/kg, MSD, Brasil). Os animais do grupo controle receberam, cloreto de sódio (0.9%) ou PBS no mesmo volume e via de administração.

### 3.6 Administração das drogas

O tratamento sistêmico foi realizado com injeções s.c. de KET, nas doses informadas, ou salina 0.9% para os animais do grupo controle. Para a administração intracerebral de drogas, foram utilizadas agulhas odontológicas (30g), introduzidas 1 mm abaixo dos limites da cânula-guia. A agulha foi acoplada a uma seringa Hamilton (5 µL, EUA) por meio de um fino tubo de polietileno (PE-10; Becton & Dickinson, NJ, EUA). Um volume de 0,2 µL foi injetado com o auxílio de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, MA, EUA). O volume utilizado foi administrado no tempo de 1 minuto. Após isso, a agulha foi deixada no local por 1 minuto adicional, para evitar o refluxo da droga para a agulha de injeção ou cânula. O tempo de espera entre a administração das drogas e o teste foi de 5 minutos. Para controle do efeito intracerebral das drogas, os animais desse grupo receberam uma injeção local de PBS (phosphate-buffer saline 0.9%), no mesmo volume. Durante o procedimento de microinjeção, os animais permaneceram em uma caixa de polipropileno medindo 28 x 17 x 13 cm, forrada com papel toalha.

### 3.7. Setup, geração de estímulos e registro dos PEAs corticais.

O registro dos PEAs foi realizado individualmente, com cada animal sendo mantido em uma gaiola de contenção de acrílico (19 x 9 x 49 cm) com piso, tampa, frente e fundo

compostos de barras de aço inoxidável espaçadas 1,5 cm entre si, e laterais de acrílico com vazamento de 5 x 1 cm, para acomodação do focinho/cauda. Esta gaiola de contenção foi colocada dentro de uma caixa de isolamento acústico (64 x 60 x 40 cm) cujas partes internas (paredes, piso e teto) foram compostas por uma malha de metal (gaiola de Faraday) com aterramento para isolamento das interferências induzidas pelo ambiente externo, particularmente aquelas na faixa de frequência de 60 Hz, que possam adicionar ruído ao sinal registrado; vale ressaltar que este é um experimento realizado com animais não sedados. Os procedimentos utilizados neste estudo foram baseados em estudos prévios de outros laboratórios que utilizaram variações no contexto para investigar algumas características da associação efeito de drogas/ambiente sobre o comportamento (Crombag et al., 2008; George and Koob, 2011; Khoo et al., 2017).

Os estímulos sonoros (cliques) indutores dos PEAs foram produzidos por dois tweeters (12  $\Omega$ , 200 W, LeSon, Brasil) localizados nas laterais da caixa de isolamento acústico, 15 cm acima do piso. Estes estímulos foram mantidos na seguinte configuração: tom puro de 3000 Hz, com 50 ms de duração e 95 dB de intensidade (SPL). Dado o tamanho da gaiola, apesar de não totalmente contidos, os animais ficam impossibilitados de dar meia-volta ficando, no entanto, com uma pequena margem de espaço para movimentação da cabeça ( $\pm 5^\circ$  direita-esquerda-acima-abaixo). Esta variação pode induzir alterações de até 5 dB na intensidade sonora. Portanto, os animais foram submetidos à estimulação sonora com intensidade entre 92.5 e 97.5 dB.

A apresentação dos estímulos foi produzida e controlada por um sistema de aquisição e controle de dados (Sysdin, Lynx, São Paulo, Brasil). Os dados individuais foram coletados ao longo da sessão, sendo posteriormente promediados. Foram apresentados 50 estímulos auditivos, registrados individualmente como a diferença de potencial existente entre as partes não isoladas (pontas do eletrodo em contato com o tecido neural). A diferença de potencial existente entre estes dois polos foi registrada e amplificada, utilizando os filtros de passa-alta e passa-baixa em 20 e 200 Hz, respectivamente (Lynx, TX001), através de cabos condutores isolados por uma passagem no topo de uma gaiola de Faraday. A saída do amplificador de sinais foi conectada a um dos 4 canais de um conversor analógico/digital (CAD 12/36) ligado a um PC. Os PEAs foram amostrados a uma taxa de 0.33 Hz (1 a cada 3 seg.) e posteriormente filtrados (20-200 Hz), como sinalizado anteriormente. A aquisição de dados foi iniciada 10 ms antes do início da apresentação do estímulo sonoro, continuando até 200 ms após seu término. A primeira onda negativa (N1) assim como a primeira onda

positiva (P1) foram identificadas visualmente. As amplitudes de pico foram definidas como as amplitudes máximas medida entre N1 e P1, como em outros trabalhos (Brandao et al., 2001; J et al., 2003; Nobre et al., 2003; Plourde, 2006; Nobre and Brandão, 2011; Leon et al., 2017).

### **3.8. Experimento 1 – *Análise das alterações induzidas nos PEAs em animais submetidos à administração sistêmica de duas doses de KET: influência do contexto.***

#### *3.8.1. Sujeito experimental*

Para este experimento, foram utilizados 48 ratos machos Hannover, com peso inicial de 220 g ( $\pm 10$  g).

#### *3.8.2. Cirurgia*

Conforme descrito no item 3.4.

#### *3.8.3. Aparato experimental*

Os registros dos PEAs foram conduzidos com os animais mantidos dentro de uma gaiola de contenção, localizada dentro de gaiola de Faraday ajustada às paredes interiores de câmara de atenuação sonora ventilada ( $64 \times 60 \times 40$  cm). Este conjunto foi denominado de Contexto A. Para a transformação do contexto A em contexto B, foi inserida uma caixa de acrílico ( $45 \times 45 \times 45$  cm), constituída de paredes e teto com listras pretas e brancas, com um dos lados aberto, direcionado aos *tweeters*, além de um pequeno furo em seu teto (2 cm de diâmetro), necessário para a passagem do cabo de registro dos sinais para o exterior da caixa de isolamento. Os níveis de pressão sonora foram medidos no nível das orelhas dos animais com a utilização de um decibelímetro digital (Datalogger - HM-852). Os animais foram previamente habituados à restrição comportamental da gaiola experimental por três dias. Após isso, nenhum tipo de estresse induzido pelas condições de restrição foi verificado.

#### *3.8.4. Registro dos potenciais evocados auditivos (PEAs)*

Como definido em 3.7.

### 3.8.5. Delineamento experimental

Este experimento objetivou analisar o possível desenvolvimento de uma resposta eletrofisiológica condicionada ao contexto em animais tratados com duas doses de KET, sendo uma delas uma dose subanestésica, e testados durante a abstinência da droga. Grupos independentes de animais foram utilizados de forma a avaliar o impacto das variáveis independentes utilizadas sobre os PEAs registrados no CA. Ao final dos experimentos, os grupos experimentais foram constituídos da forma a seguir (para um N total de 48 animais, com 2 deles removidos dos experimentos em função de problemas na prótese, e outros 8 no registro dos sinais, totalizando 20% de descarte) (ver Tabela 1 abaixo):

1. Grupo controle AA (animais tratados e testados no contexto A): n=6
2. Grupo Controle AB (animais tratados no contexto A, e testados no contexto B): n=5
3. KET 10 mg/kg AA: n=6
4. KET 10 mg/kg AB: n=7
5. KET 80 mg/kg AA: n=8
6. KET 80 mg/kg AB: n=6

Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Grupos					Condicionamento				Teste
Crt (AxA)	Cirurgia	Habituação			Cxt A + Salina				PEA (A)
Crt (AxB)	Cirurgia	Habituação			Cxt A + Salina				PEA (B)
KET 10 (AxA)	Cirurgia	Habituação			Cxt A + KET 10				PEA (A)
KET 10 (AxB)	Cirurgia	Habituação			Cxt A + KET 10				PEA (B)
KET 80 (AxA)	Cirurgia	Habituação			Cxt A + KET 80				PEA (A)
KET 80 (AxB)	Cirurgia	Habituação			Cxt A + KET 80				PEA (B)

**Tabela 1.** Desenho experimental dos procedimentos, totalizando os 9 dias de experimentos: cirurgia, habituação (3 dias), condicionamento (4 dias) e por fim, teste.

A atribuição de grupos independentes para os testes nos contextos AA e AB foi necessária para evitar o desenvolvimento de aprendizagem aversiva induzida pela exposição contínua ao estímulo sonoro utilizado (clicks). Seguindo o padrão para este tipo de procedimento, este experimento foi desenvolvido em três etapas: habituação, condicionamento e teste.

1. *Habituação*: De forma a evitar a influência dos estímulos presentes na sala de teste sobre o registro dos PEAs, os animais foram submetidos, de forma individual, a três

sessões diárias de 60 minutos de habituação a este contexto, iniciadas 24h após a cirurgia para implante das próteses.

2. *Condicionamento*: esta etapa foi iniciada 24 horas após o término do período de habituação, com os animais sendo divididos entre os grupos controle e experimental. Os animais do grupo controle receberam uma injeção subcutânea de salina (0,9%), sendo colocados, logo em seguida, no contexto A (descrito no item 3.6.2.). Os grupos experimentais, por sua vez, receberam uma injeção subcutânea de KET na dosagem de 10 ou 80 mg/kg, sendo logo em seguida colocados também no contexto A. Desta forma, durante o condicionamento, todos os animais experienciaram os efeitos de placebo ou droga no mesmo contexto. Cada sessão de condicionamento teve duração diária de 60 minutos, sendo realizadas ao longo de quatro dias seguidos. Ao final de cada sessão, urina e fezes foram removidas e as caixas limpas com um pano umedecido com álcool 20%, seguido outro com água apenas.
3. *Teste*: O teste foi realizado 24h após as sessões de condicionamento. Nesta etapa os animais de cada grupo, controle, KET 10 e KET 80 mg/kg, foram divididos em outros dois, perfazendo então um total de seis grupos, metade deles testados no contexto A (o mesmo contexto em que foram condicionados), e a outra metade testada no contexto B (o ambiente novo).

### 3.8.6. *Perfusão e histologia*

Ao final dos experimentos, os animais foram anestesiados com uma sobredose de KET (225 mg/kg) + Xilazina (30 mg/kg). A confirmação de morte se deu pelo rompimento do diafragma. Os animais foram então perfundidos com uma solução de 150 ml de PBS seguido de 150 ml de paraformaldeído a 4% e decapitados para retirada dos encéfalos. Estes foram mantidos em uma solução de formalina por 2 horas e a seguir mergulhados em uma solução de sacarose (30%) a -4° C até seu processamento. Os encéfalos foram fatiados em cortes de 60 µm de espessura, coletados em tampão fosfato (0.1M, pH 7.4) de acordo com o atlas de Paxinos *and* Watson (2008), representados na [Figura 4](#), abaixo.

### 3.8.7. *Análise estatística*

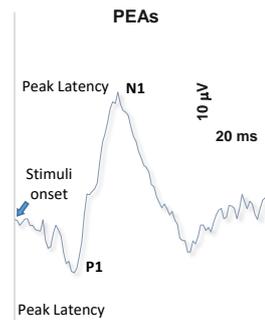
Os dados estão representados como a média  $\pm$  erro padrão. Devido a problemas com homogeneidade dos dados, estes foram normalizados com a aplicação da raiz quadrada dos valores brutos (Ghosh et al., 2021), e analisados posteriormente com uma Análise de Variância de dois fatores (*two-way* ANOVA), tratamentos (salina/KET10/KET80)  $\times$  contexto (AA/AB). A porcentagem de alterações induzidas pelo tratamento (controle x doses de KET) foi analisada através de uma Análise de Variância de um fator (*one-way* ANOVA). Na ausência de interação significativa entre os fatores, foram realizadas análises secundárias com a utilização de uma *two-way* ANOVA para cada contexto do teste (AA e AB). Em qualquer dos casos, em caso de significância estatística, análises *a posteriori* foram realizadas com a utilização do teste de Tukey-Kramer para N desiguais. Comparações por pares (AA x AB) foram realizadas com o Teste t, bicaudal, para amostras independentes, para cada dose de KET. Diferenças observadas entre as latências foram analisadas com uma *two-way* ANOVA seguida do teste de Tukey. Uma probabilidade de  $\leq 5\%$  para rejeição de H0 foi considerada estatisticamente significativa. A análise estatística foi realizada com o pacote estatístico *Statistica* (StatSoft, Inc., version 12.5, Palo Alto, CA, USA).



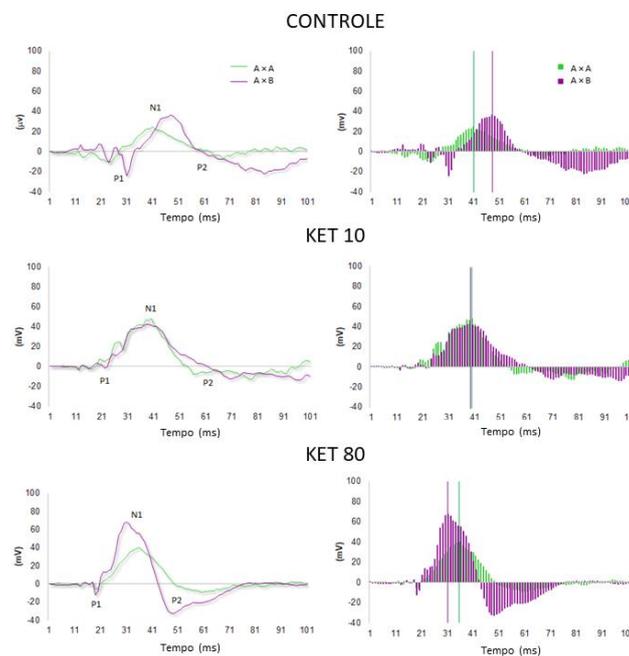
**Figura 4.** Representação esquemática das áreas de inserção dos eletrodos no CA, de acordo com o atlas Paxinos & Watson (2008). Foram utilizados seis grupos independentes, com duas doses de KET ou salina (grupo controle), testados em duas condições: AA – condicionados no contexto A e testados no contexto A, e AB - condicionados no contexto A e testados no contexto B.

### 3.8.8. Resultados

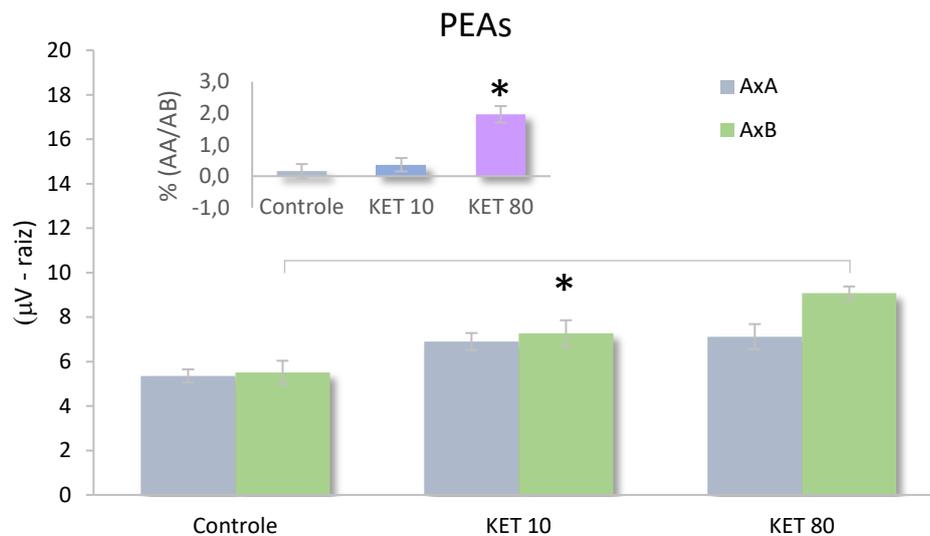
A [Figura 5](#) apresenta um típico PEA registrado no córtex auditivo de ratos. Os efeitos da KET sobre estes potenciais estão apresentados na [Figura 6](#). A análise de variância de dois fatores indicou uma diferença significativa entre os tratamentos ( $F_{2,1}=14,34$ ;  $p<0,0001$ ) e no fator condição do teste (contexto pareado x contexto não pareado com a droga:  $F_{1,2}=4,29$ ;  $p=0,057$ ). Não foi encontrada interação significativa entre esses fatores ( $F_{2,31}=2,03$ ;  $p=0,15$ ) ([Figura 7](#)).



**Figura 5.** Representação esquemática de um potencial de campo registrado no CA como resultado da aplicação de um estímulo sonoro. Apesar da aplicação de promediação dos sinais, nota-se ainda a presença de ruídos, provavelmente devido a captação de potentes potenciais neuromusculares, já que os animais foram testados na ausência de sedação.

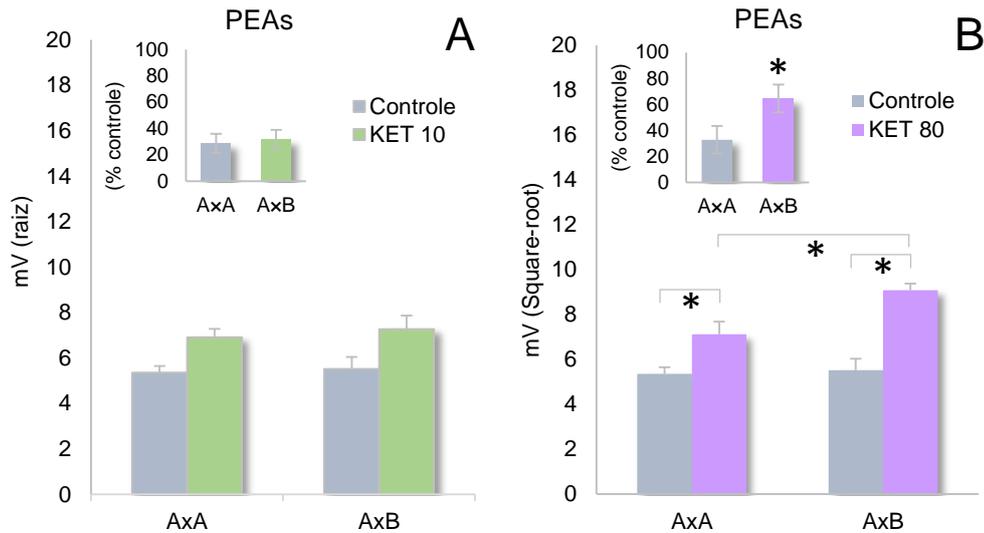


**Figura 6.** A amplitude dos PEAs em animais pré tratados com KET registrados em animais acordados e testados na abstinência dos efeitos da droga em dois contextos AA x AB. As amplitudes estão representadas pela média dos 50 estímulos sonoros apresentados (3 kHz, 50 ms). Foram tomadas para comparação as as medidas pico a pico entre P1 e N1. Os dados brutos registrados no córtex auditivo primário estão apresentados a esquerda, e os dados sobrepostos a direita.



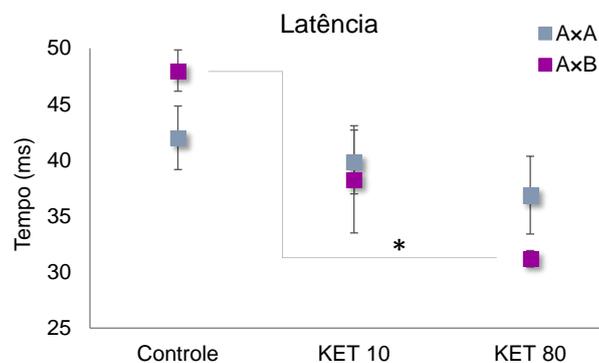
**Figura 7.** A exposição a um contexto não pareado com os efeitos da droga aumenta a resposta eletrofisiológica em ratos previamente condicionados com KET em um contexto pareado com efeito da droga. Os dados foram normalizados antes de serem submetidos ao teste *two-way* ANOVA e foram representados pela média  $\pm$  DVP. Gráfico acima: porcentagem das alterações dos potenciais evocados auditivos induzidos por duas dosagens de KET. Neste caso, *one-way* ANOVA foi utilizada, foi utilizada o *post hoc* por comparação com o teste HSD *Tukey* – Kramer para N diferente com probabilidade estabelecida de 5%.

A ANOVA de um fator mostrou que a KET aumenta significativamente a amplitude dos PEAs corticais ( $F_{2,14}=3,09$ ;  $p=0,47$ ) (Figura 7, % AA/AB). A análise pós-hoc revelou que a este efeito se relaciona à dose de 80 mg/kg. Em comparações posteriores, a ANOVA de dois fatores destacou a diferença significativa entre os tratamentos, considerando a dose de 10 mg/kg de KET ( $F_{1,1}=12,72$ ;  $p<0,005$ ) (Figura 8A). Não foram encontradas alterações na condição ( $F_{1,1}=0,33$ ;  $p=0,57$ ), tampouco interação significativa entre fatores ( $F_{1,20}=0,05$ ;  $p=0,82$ ). O teste t bicaudal mostrou que a porcentagem média de PEAs corticais entre o grupo controle e KET 10mg/kg foi semelhante ( $t_{11}=0,22$ ;  $p=0,87$ ) (Figura 8A, *inset*). Considerando a dose de 80 mg/kg, A ANOVA de dois fatores revelou diferenças significativas no fator de tratamento ( $F_{1,1}=32,14$ ;  $p<0,0001$ ) e na condição ( $F_{1,1}=5,10$ ;  $p=0,035$ ), na ausência de interação significativa entre estes fatores ( $F_{1,20}=3,69$ ;  $p=0,069$ ) (Figura 8B). O teste t bicaudal mostrou que a porcentagem de PEAs cortical é aumentada pela KET na dose de 80 mg/kg, na condição AB, comparando com os dados encontrados na condição AA ( $t_{11}=2,25$ ;  $p=0,046$ ) (Figure 8B, *inset*).



**Figura 8.** A exposição a um contexto não pareado com os efeitos da droga aumenta a resposta eletrofisiológica em ratos previamente condicionados com uma dose anestésica de KET e testados durante a abstinência da droga. Em A estão apresentadas as alterações nas respostas eletrofisiológicas do CA induzidas pelo tratamento subcrônico com KET na dose de 10mg/kg. Em B estão apresentadas as alterações nas respostas eletrofisiológicas do CA induzidas pelo tratamento subcrônico com KET na dose de 80mg/kg. AA significa que condicionamento e teste foram realizados no mesmo contexto. AB significa que o condicionamento foi realizado em A, mas o teste de abstinência em B. Os dados, normalizados, estão representados com a média  $\pm$  EPM. Two-way ANOVA seguida pelo teste HSD Tukey-Kramer, para grupos com N diferentes. Os gráficos menores (*insets*) mostram a porcentagem das alterações nos PEAs registrados no CA para cada grupo utilizado ( $x = AB \times 10 / AA - 100$ ). Foi utilizada estatística comparativa e teste *t* não pareado. O nível de probabilidade de rejeição de  $H_0$  foi estabelecido em 5%.

A ANOVA de dois fatores aplicada aos dados da latência apontou diferenças significativas entre os grupos ( $F_{2,1}=6,76$ ;  $p<0,005$ ) mas não na condição de teste ( $F_{1,1}=0,029$ ;  $p=0,87$ ) ou mesmo na interação entre fatores ( $F_{2,31}=1,95$ ;  $p=0,16$ ). O teste *post-hoc* de Tukey-Kramer mostrou que a exposição a um novo ambiente (B) diminui a latência dos potenciais do grupo tratado com KET 80 mg/kg, em comparação com dados do grupo controle (Figura 9).



**Figura 9.** A exposição a um contexto não pareado com os efeitos da droga reduz a latência dos PEAs de ratos previamente condicionados com uma dose anestésica de KET e testados durante a abstinência da droga. AA significa que condicionamento e teste foram realizados no mesmo contexto. AB significa que o condicionamento foi realizado em A, mas o teste de abstinência em B. Os dados brutos das medidas de latência foram submetidos ao teste *two-way* ANOVA e estão representados pela média  $\pm$  EPM, seguidos pelo teste HSD Tukey – Kramer para N diferentes, com *P* estabelecido de 5%.

### **3.9. Experimento 2 – Análise da influência do tratamento com KET sobre a capacidade de aprendizagem associativa utilizando como modelo de condicionamento a resposta de sobressalto potencializado pelo medo.**

Os resultados anteriores chamaram a atenção pelo fato de que mesmo utilizando uma dose francamente anestésica (KET 80 mg/kg), os animais testados no procedimento de condicionamento contextual da resposta eletrofisiológica registrada no CA apresentaram amplitudes significativamente diferentes daquelas observadas tanto no grupo controle quanto no grupo de KET 10 mg/kg. Para esclarecer se os dados coletados não se devem a algum viés metodológico introduzido nos experimentos, três grupos de animais foram testados, durante a abstinência de KET, no procedimento de potencialização da resposta de sobressalto. Dessa forma, os animais foram condicionados durante os efeitos das diferentes doses utilizadas, e testados 24 horas depois, na ausência de seus efeitos.

#### *3.9.1. Sujeito experimental*

Para este experimento foram utilizados 30 ratos machos Hannover, com peso inicial de 220 g ( $\pm 10$  g).

#### *3.9.2. Drogas*

Foram utilizados o antagonista não competitivo dos receptores de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) cetamina (KET - cloridato de cetamina 10% cetamin, SP – Brasil) nas doses 10 e 80 mg/kg, administrado por via subcutânea (s.c.). Os animais do grupo controle receberam, cloreto de sódio (0.9%), no mesmo volume e via de administração.

#### *3.9.3. Aparato experimental*

*Registro da resposta de sobressalto:* Para o registro da resposta de sobressalto foram utilizados quatro estabilímetros (16,5 x 7,5 x 7,5 cm) sobre os quais foram anexadas quatro gaiolas de contenção (armação em PVC, 25,5 x 12,0 x 9,0 cm, Insight, Brasil, com paredes laterais e piso formados por barras de aço de 3 mm). Cada uma

das gaiolas foi mantida dentro de uma câmara de atenuação sonora (64×60×40 cm) com revestimento interno de espuma (Insight, Brasil). As amplitudes das respostas de sobressalto foram registradas através de células de carga inseridas na base dos estabilímetros. A resposta foi captada por sensores e amplificada, gerando um sinal analógico, posteriormente digitalizado para análise em um programa computacional (Sobressalto, Insight, Brasil). Essa resposta foi registrada dentro de uma janela de 200 ms. O estímulo sonoro utilizado para produção da resposta de sobressalto consistiu de estímulos sonoros de alta intensidade (ruído branco de 90, 95 e 105 dB, com 50 ms de duração), liberado por um alto falante localizado a 10 cm de distância da gaiola de contenção. As plataformas foram calibradas previamente, antes do início de cada sessão experimental, para garantir sensibilidade equivalente ao longo dos experimentos. As gaiolas de contenção utilizadas permitiram também a administração de choques elétricos nas patas (0,6  $\mu$ A, 1 segundo de duração), através de uma saída serial localizada na parede posterior, ligada a um gerador de choques (Insight, Brasil), que eletrificou as barras de aço inoxidável que compunham o piso da gaiola (ver o primeiro parágrafo do item 3.7.). Este aparato foi nomeado de contexto A. A transformação do contexto A em contexto B, foi realizada como descrito em 3.8.3. Os choques nas patas foram controlados e administrados pelo gerador de choques. Câmeras de vídeo, instaladas no interior de cada box de isolamento acústico, permitiram o monitoramento do animal durante os experimentos. Uma luz proveniente de uma lâmpada branca de 6 W, localizada acima do alto falante posicionado a frente da caixa de condicionamento, foi utilizada como estímulo condicionado (Figura 10).



**Figura 10.** A esquerda, a figura apresenta o conjunto gaiola de contenção/estabilímetro, para registro da resposta de sobressalto. Ao centro as peças de acrílico utilizadas para a mudança do contexto A em B. A direita, a caixa de condicionamento para aplicação dos choques nas patas.

### 3.9.4. Procedimento Experimental

O procedimento para registro do sobressalto potencializado pelo medo foi dividido em três etapas: Balanceamento (ou *matching*), condicionamento e teste.

- *Balanceamento*: No intuito de evitar com que diferenças individuais existentes *a priori* “contaminassem” resultados posteriores, foram realizadas três tomadas basais da resposta de sobressalto, com intervalo de 24h entre elas. O resultado da última sessão foi utilizado para agrupar os animais em grupos com médias de resposta similar (Brown et al., 1951; Davis, 2001). Os animais foram colocados nas caixas de contenção e, após 5 minutos, foram submetidos a 30 estímulos sonoros, com intervalo médio de 30 segundos entre os estímulos ( $\pm 15$  segundos). O tempo de duração de cada sessão foi de 20 minutos.
- *Condicionamento*: Foram realizadas quatro sessões de condicionamento com intervalo de 24h entre elas. Os animais foram colocados nas caixas de condicionamento e, após 5 minutos de habituação, foram submetidos a 10 associações luz (estímulo condicionado) x choque nas patas (estímulo incondicionado) com intervalo variado. Cada bloco de tentativas consistiu da apresentação de um estímulo luminoso por 10 segundos, ao final do qual foi apresentado de forma concomitante, no último segundo de luz, um choque de 1 segundo de duração no piso eletrificado da gaiola de contenção. O tempo de duração de cada sessão foi de 40 minutos.
- *Teste*: Após vinte e quatro horas da última sessão de condicionamento, os animais foram avaliados no teste de sobressalto potencializado pelo medo (FPS). Cada animal foi colocado na caixa experimental e após 5 minutos de habituação, foi exposto a um total de 60 estímulos sonoros nas intensidades de 90, 95 e 105 dB, com intervalo médio de 30 segundos ( $\pm 15$  segundos). Trinta dessas apresentações consistiram apenas da apresentação do estímulo sonoro (tentativas só-som),

intercaladas aleatoriamente com 30 apresentações de som precedido por luz (tentativas luz-som). O tempo de duração do teste foi de 45 minutos (Tabela 2).

Blocks	Trial	Tipo	Blocks	Trial	Tipo
1,00	1,00	Som 95 dB	6,00	1,00	Luz x Som 105 dB
	2,00	Som 90 dB		2,00	Luz x Som 95 dB
	3,00	Luz x Som 90 dB		3,00	Som 95 dB
	4,00	Som 105 dB		4,00	Luz x Som 90 dB
	5,00	Luz x Som 95 dB		5,00	Som 90 dB
	6,00	Luz x Som 105 dB		6,00	Som 105 dB
2,00	1,00	Som 90 dB	7,00	1,00	Som 95 dB
	3,00	Som 95 dB		3,00	Luz x Som 105 dB
	4,00	Luz x Som 95 dB		4,00	Luz x Som 90 dB
	5,00	Som 105 dB		5,00	Som 105 dB
	2,00	Luz x Som 90 dB		2,00	Luz x Som 95 dB
	6,00	Luz x Som 105 dB		6,00	Som 90 dB
3,00	1,00	Som 90 dB	8,00	1,00	Som 95 dB
	2,00	Som 95 dB		2,00	Luz x Som 90 dB
	3,00	Luz x Som 90 dB		3,00	Luz x Som 95 dB
	4,00	Som 105 dB		4,00	Luz x Som 105 dB
	5,00	Luz x Som 105 dB		5,00	Som 105 dB
	6,00	Luz x Som 95 dB		6,00	Som 90 dB
4,00	1,00	Som 95 dB	9,00	1,00	Luz x Som 105 dB
	3,00	Luz x Som 90 dB		3,00	Som 105 dB
	4,00	Som 90 dB		4,00	Luz x Som 95 dB
	5,00	Som 105 dB		5,00	Som 90 dB
	2,00	Luz x Som 95 dB		2,00	Luz x Som 90 dB
	6,00	Luz x Som 105 dB		6,00	Som 95 dB
5,00	1,00	Som 105 dB	10,00	1,00	Som 95 dB
	2,00	Som 95 dB		2,00	Luz x Som 90 dB
	3,00	Luz x Som 95 dB		3,00	Luz x Som 95 dB
	4,00	Luz x Som 105 dB		4,00	Luz x Som 105 dB
	5,00	Som 90 dB		5,00	Som 105 dB
	6,00	Luz x Som 90 dB		6,00	Som 90 dB

**Tabela 2.** Delineamento experimental para a apresentação dos estímulos sonoros ao longo do teste de registro da resposta de sobressalto potencializada pelo medo. Como notado, os seis diferentes conjuntos de estímulos (som: 90, 95, e 105 dB, e luz/som: 90, 95, e 105 dB) foram apresentadas aleatoriamente ao longo de cada um dos 10 blocos de tentativas.

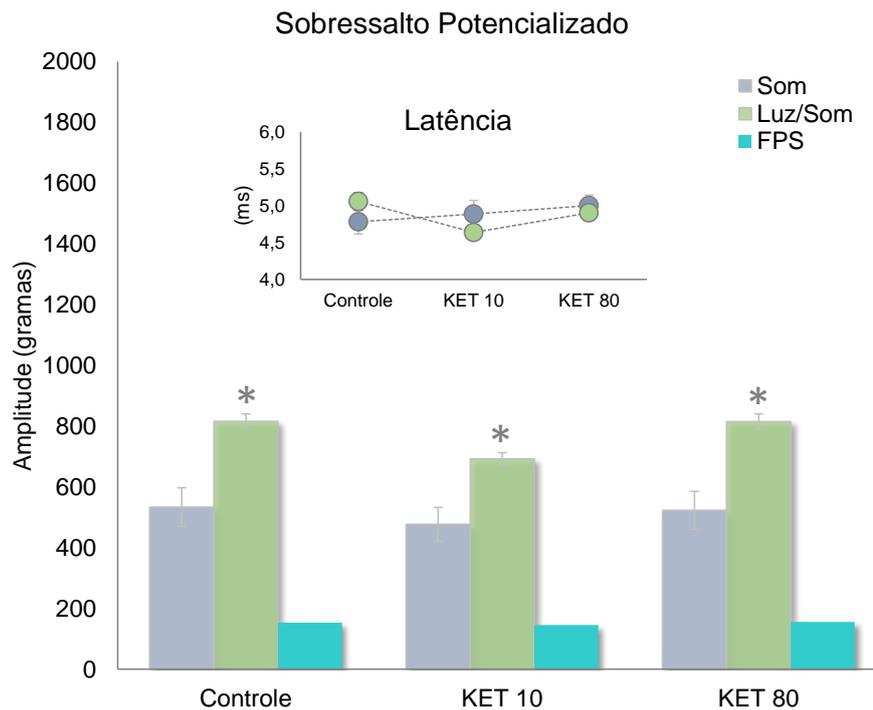
### 3.9.5. Análise estatística

Para a análise destes dados foi utilizada uma análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA): tratamentos (salina, KET 10, e KET 80 mg/kg) × condição de teste (só-som × luz-som). Análises *a posteriori* foram efetuadas com a utilização do teste HSD Tukey-Kramer para grupos com o mesmo tamanho amostral.

### 3.9.6. Resultados

Utilizando os parâmetros acima, a ANOVA apontou uma diferença significativa entre os tratamentos ( $F_{2,2}=5,055$ ;  $p<0,005$ ), e também na condição de teste (resposta ao estímulo só-som ou luz-som) ( $F_{1,2}=103,64$ ;  $p<0,0001$ ), mas ausência

de interação entre estes fatores ( $F_{2,54}=0,86$ ;  $p>0,05$ ). A aplicação do teste HSD Tukey-Kramer mostrou que estas diferenças se devem basicamente ao desenvolvimento de uma resposta condicionada ao estímulo luz-som de forma similar em todos os grupos. Dito de outra forma os grupos apresentam respostas condicionadas similares (potencialização do sobressalto), não sendo observado nenhum outro efeito com as variáveis independentes utilizadas (Figura 11).



**Figura 11.** A amplitude e latência da resposta de sobressalto potencializada pelo medo não é afetada pelo tratamento com KET, considerando as duas doses utilizadas. Os dados estão representados como a média  $\pm$  EPM. Foram utilizados 30 animais, com  $n=10$  para cada grupo. A amplitude da resposta de sobressalto é apresentada a partir dos dados brutos já que os dados passaram nos critérios de normalidade e homocedasticidade. ANOVA de dois fatores seguida do teste HSD de Tukey-Kramer, com a probabilidade de rejeição de  $H_0$  estabelecida em 5%.

### **3.10. Experimento 3 – *Análise dos efeitos da modulação GLU cortical sobre a resposta eletrofisiológica condicionada de animais submetidos à administração sistêmica de duas doses de KET.***

#### *3.10.1. Sujeito experimental*

Para este experimento, foram utilizados 96 ratos machos Hannover, com peso inicial de 220 g ( $\pm 10$  g).

#### *3.10.2. Cirurgia*

Conforme descrito no item 3.4.

#### *3.10.3. Administração de drogas.*

Conforme o descrito em 3.6.

#### *3.10.4. Setup, geração de estímulos e registro dos PEAs corticais.*

Conforme descrito em 3.7.

#### *3.10.5. Aparato experimental.*

Conforme descrito em 3.8.3.

#### *3.10.6. Delineamento experimental*

Este experimento objetivou analisar a influência da neurotransmissão GLU no desenvolvimento da resposta eletrofisiológica aprendida relacionada ao contexto em animais tratados com duas doses de KET, sendo uma delas uma dose subanestésica, e testados durante a abstinência da droga, através da administração intra-CA do agonista de receptores de GLU do tipo NMDA, ou do antagonista desses mesmos receptores AP-7. Grupos independentes de animais foram utilizados de forma a avaliar o impacto das variáveis independentes utilizadas sobre os PEAs registrados no CA. Ao final dos experimentos, os

grupos experimentais foram constituídos da forma a seguir (para um N total de 96 animais, com 7 deles removidos dos experimentos em função de problemas no registro dos sinais, totalizando  $\pm 6\%$  de descarte) (ver [Tabela 3](#) abaixo):

#### Teste com NMDA

1. Grupo controle AA (animais tratados e testados no contexto A): n=6
2. Grupo controle AB (animais tratados no contexto A, e testados no contexto B): n=6
3. Grupo controle NMDA/AA (animais tratados e testados no contexto A, após uma injeção intra-CA de NMDA): n=5
4. Grupo controle NMDA/AB (animais tratados no contexto A, e testados no contexto B, após uma injeção intra-CA de NMDA): n=6
5. Grupo KET 10 NMDA/AA: 5
6. Grupo KET 10 NMDA/AB: 6
7. Grupo KET 80 NMDA/AA: n=6
8. Grupo KET 80 NMDA/AB: n=5
- 9.

#### Teste com AP7

1. Grupo controle AA (animais tratados e testados no contexto A): n=5
2. Grupo controle AB (animais tratados no contexto A, e testados no contexto B): n=6
3. Grupo controle AP7/AA (animais tratados e testados no contexto A, após uma injeção intra-CA de AP7): n=6
4. Grupo controle AP7/AB (animais tratados no contexto A, e testados no contexto B, após uma injeção intra-CA de AP7): n=5
5. Grupo KET 10 AP7/AA: 6
6. Grupo KET 10 AP7/AB: 5
7. Grupo KET 80 AP7/AA: n=5
8. Grupo KET 80 AP7/AB: n=6

Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Grupos					Condicionamento				TESTE
Controle	Sal AA	Cirurgia	Habituação		Salina/Droga no Contexto A				NMDA/AP7 → PEA (A)
	Sal AB	Cirurgia	Habituação		Salina/Droga no Contexto A				NMDA/AP7 → PEA (B)
Experimental	Sal AA	Cirurgia	Habituação		Salina/Droga no Contexto A				NMDA/AP7 → PEA (A)
	Sal AB	Cirurgia	Habituação		Salina/Droga no Contexto A				NMDA/AP7 → PEA (B)
	KET 10 AA	Cirurgia	Habituação		Salina/Droga no Contexto A				NMDA/AP7 → PEA (A)
	KET 10 AB	Cirurgia	Habituação		Salina/Droga no Contexto A				NMDA/AP7 → PEA (B)
	KET 80 AA	Cirurgia	Habituação		Salina/Droga no Contexto A				NMDA/AP7 → PEA (A)
	KET 80 AB	Cirurgia	Habituação		Salina/Droga no Contexto A				NMDA/AP7 → PEA (B)

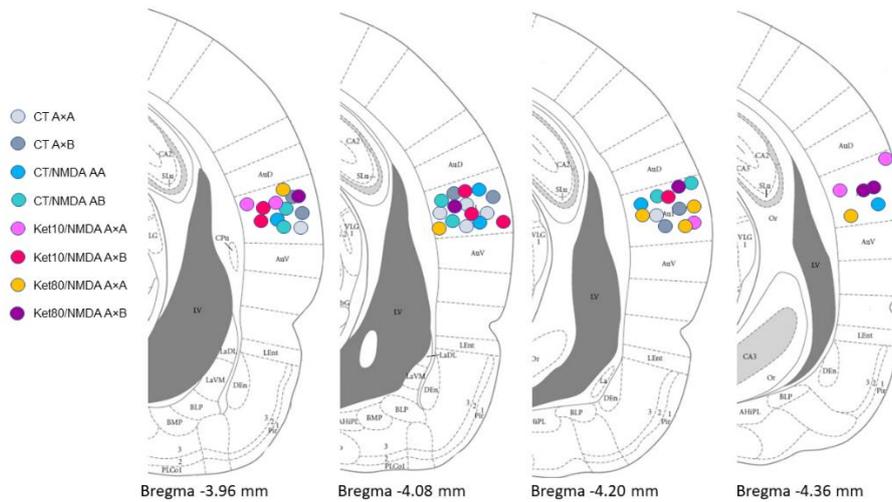
**Tabela 3.** Desenho experimental dos procedimentos, totalizando os 9 dias de experimentos: cirurgia, habituação (3 dias), condicionamento (4 dias) e teste, momento em que foram administrados o NMDA ou AP7.

Novamente, a atribuição de grupos independentes para os testes nos contextos AA e AB foi necessária para evitar o desenvolvimento de aprendizagem aversiva induzida pela exposição contínua ao estímulo sonoro utilizado (clicks). O experimento envolveu três etapas: habituação, condicionamento e teste.

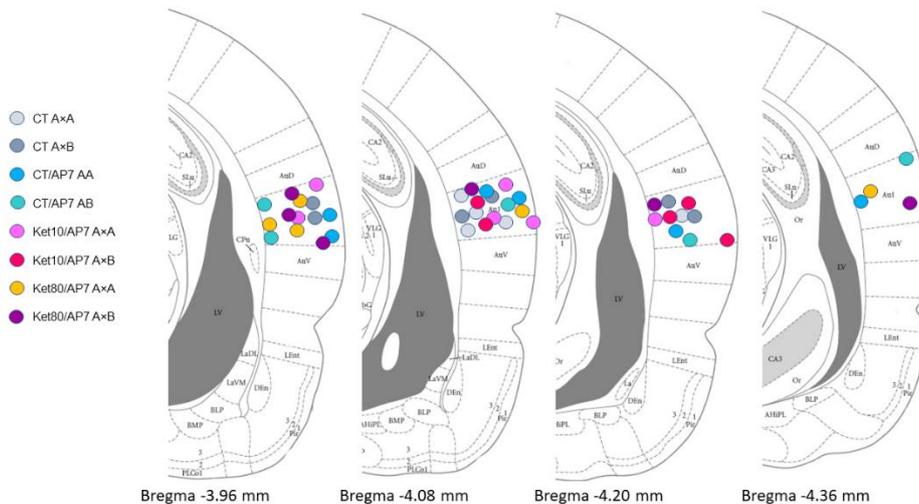
1. *Habituação*: Ver item 3.8.5.
2. *Condicionamento*: Idem
3. *Teste*: O teste foi realizado 24h após as sessões de condicionamento. Nesta etapa os animais de cada grupo, controle, controle/NMDA, KET 10/NMDA e KET 80/NMDA, foram divididos em outros dois, perfazendo então um total de oito grupos, metade deles testados no contexto A (o mesmo contexto em que foram condicionados), e a outra metade testada no contexto B (o ambiente novo).

### 3.10.7. Perfusão e histologia

Como descrito em 3.8.6. Os pontos de estimulação estão representados nas [Figuras 12 e 13](#), abaixo, de acordo com o atlas de [Paxinos and Watson \(2008\)](#).



**Figura 12.** Representação esquemática das áreas de inserção dos quimitrodos no CA, de acordo com o atlas Paxinos & Watson (2008). Foram utilizados oito grupos independentes, testados em duas condições, após uma injeção intra-CA de NMDA. AA: animais condicionados no contexto A e testados no contexto A. AB: animais condicionados no contexto A e testados no contexto B.



**Figura 13.** Representação esquemática das áreas de inserção dos quimitrodos no CA, de acordo com o atlas Paxinos & Watson (2008). Foram utilizados oito grupos independentes, testados em duas condições, após uma injeção intra-CA de AP7. AA: animais condicionados no contexto A e testados no contexto A. AB: animais condicionados no contexto A e testados no contexto B.

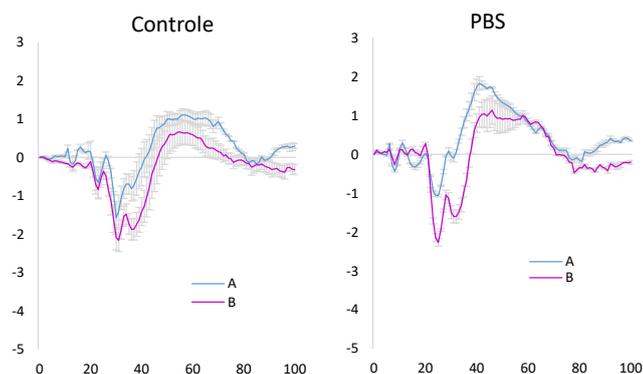
### 3.10.8. Análise estatística

Como um todo, os dados coletados não passaram nos critérios de normalidade e homocedasticidade. Portanto, estes foram normalizados com a aplicação da raiz quadrada

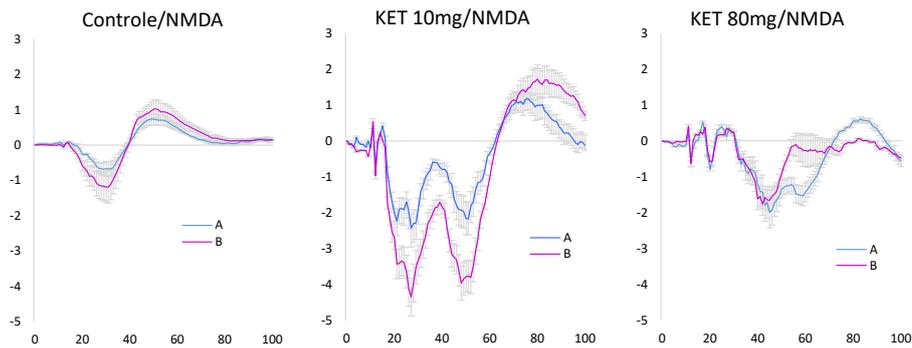
dos valores brutos, e analisados posteriormente com uma Análise de Variância de três vias (*three-way* ANOVA), considerando os grupos (controle  $\times$  NMDA ou AP7), os tratamentos (salina  $\times$  KET10  $\times$  KET 80), e o contexto de teste (AA $\times$ AB) como os fatores principais. A porcentagem de alterações induzidas pelo tratamento (controle  $\times$  doses de KET) foi analisada através de uma Análise de Variância de um fator (*one-way* ANOVA). Na ausência de interação significativa entre os fatores, foram realizadas análises secundárias com a utilização de uma *two-way* ANOVA para cada contexto do teste (AA e AB). Em qualquer dos casos, em caso de significância estatística, análises *a posteriori* foram realizadas com a utilização do teste de Tukey-Kramer para N desiguais. Comparações por pares (AA  $\times$  AB) foram realizadas com o Teste t, bicaudal, para amostras independentes, para cada dose de KET. Diferenças observadas entre as latências foram analisadas com uma *two-way* ANOVA seguida do teste de Tukey. Uma probabilidade de  $\leq 5\%$  para rejeição de  $H_0$  foi considerada estatisticamente significativa. A análise estatística foi realizada com o pacote estatístico *Statistica* (StatSoft, Inc., version 12.5, Palo Alto, CA, USA).

### 3.10.9. Resultados

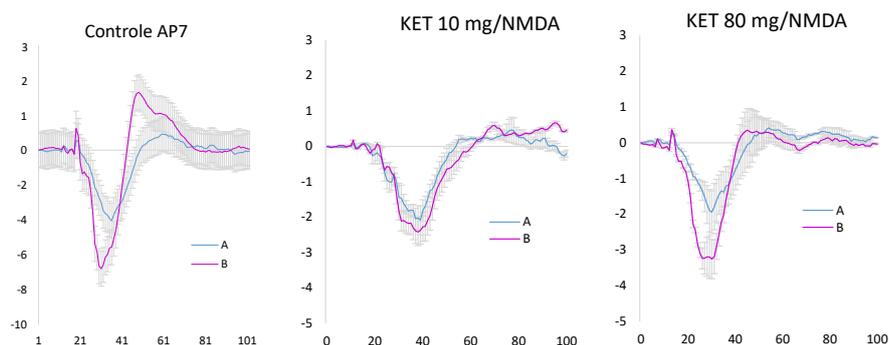
Os dados estão representados como a média  $\pm$  erro padrão. As [Figura 14](#), [15](#) e [16](#) apresentam PEAs típicos registrados no CA de ratos. Os efeitos da injeção local intra-CA de PBS ou NMDA sobre os PEAs de animais tratados com duas doses KET estão apresentados na [Figura 17](#). A ANOVA apontou uma diferença significativa mostrou que análise de variância de dois fatores indicou uma diferença significativa entre os tratamentos ( $F_{2,1}=14,34$ ;  $p<0,0001$ ) e no fator condição do teste (contexto pareado  $\times$  contexto não pareado com a droga:  $F_{1,2}=4,29$ ;  $p=0,057$ ). Não foi encontrada interação significativa entre esses fatores ( $F_{2,31}=2,03$ ;  $p=0,15$ ) ([Figura 7](#)).



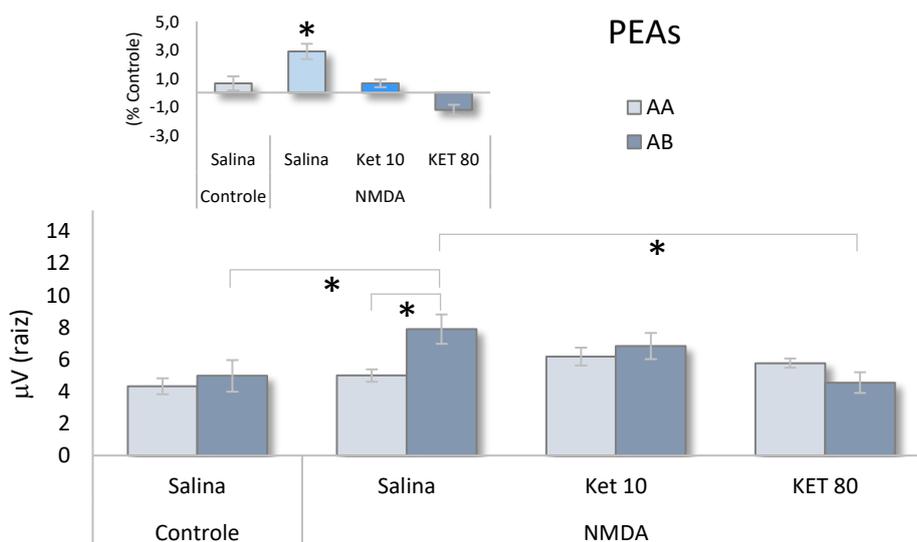
**Figura 14.** Representação esquemática de um potencial de campo registrado no CA como resultado da aplicação de um estímulo sonoro. A esquerda, estão apresentados os PEAs induzidos em animais do grupo controle. A direita, estão apresentados os PEAs evocados em animais do grupo controle, após uma administração intra-CA de tampão fosfato (PBS). Apesar da aplicação de promediação dos sinais, nota-se ainda a presença de ruídos, provavelmente devido a captação de potentes potenciais neuromusculares, já que os animais foram testados na ausência de sedação.



**Figura 15.** Representação esquemática de um potencial de campo registrado no CA como resultado da aplicação de um estímulo sonoro. A esquerda, estão apresentados os PEAs induzidos em animais do grupo controle. Ao centro e a direita os evocados em animais do grupo KET 10 e KET 80 mg/kg, respectivamente. Em qualquer dos casos, o registro foi efetuado após uma injeção intra-CA de NMDA. Apesar da aplicação de promediação dos sinais, nota-se ainda a presença de ruídos, principalmente nos grupos tratados com KET 10 mg/kg.



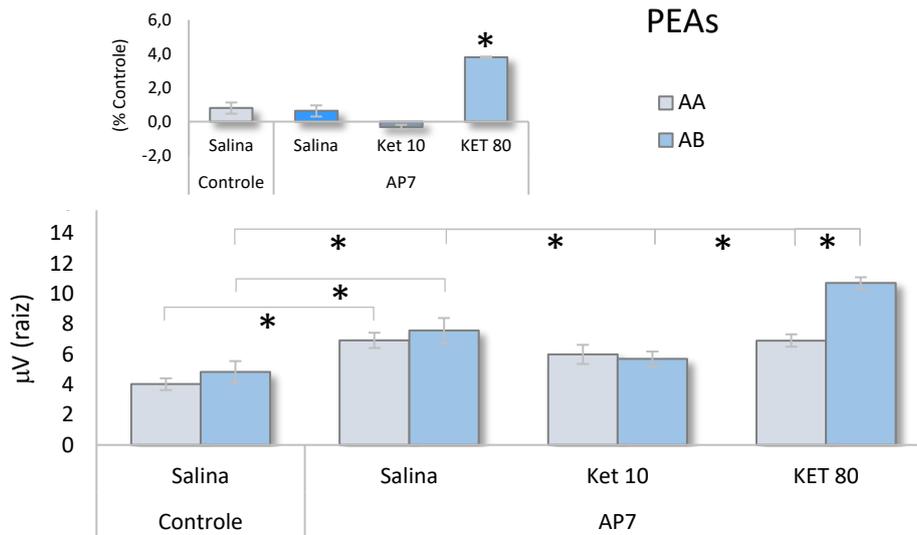
**Figura 16.** Representação esquemática de um potencial de campo registrado no CA como resultado da aplicação de um estímulo sonoro. A esquerda, estão apresentados os PEAs induzidos em animais do grupo controle. Ao centro e a direita os evocados em animais do grupo KET 10 e KET 80 mg/kg, respectivamente. Em qualquer dos casos, o registro foi efetuado após uma injeção intra-CA do antagonista de receptores de GLU do tipo NMDA AP7.



**Figura 17.** A administração intracerebral de NMDA no CA aumenta a resposta eletrofisiológica em ratos previamente condicionados do grupo controle e testados no ambiente novo (B), e reduz a amplitude desses potenciais nos animais tratados com KET 80 mg/kg, testados na mesma condição. AA: condicionamento e teste realizados no mesmo contexto. AB: condicionamento realizado em A, e teste de abstinência em B. Os dados, normalizados, estão representados com a média  $\pm$  EPM. Three-way ANOVA seguida pelo teste HSD Tukey-Kramer, para grupos com N diferentes. Os gráficos menores (insets) mostram a porcentagem das alterações nos PEAs registrados no CA para cada grupo utilizado ( $x = AB \times 10 / AA - 100$ ). Foi utilizada estatística comparativa e teste t não pareado. O nível de probabilidade de rejeição de H0 foi estabelecido em 5%.

A ANOVA apontou diferenças significativas no fator tratamento (saline  $\times$  KET 10  $\times$  KET 80) ( $F_{2,1}=26,85$ ;  $p=0,001$ ) e no fator drogas (PBS  $\times$  NMDA) ( $F_{1,1}=9,00$ ;  $p=0,005$ ). Não foi detectada interação significativa entre os fatores ( $F_{1,40}=0,67$ ;  $p>0,05$ ). A análise *post-hoc* revelou que os efeitos detectados se relacionam à capacidade do NMDA de acentuar

os PEAs de animais do grupo controle, quando expostos ao contexto B. Por outro lado, a administração de NMDA diretamente no CA, reduz os mesmos potenciais de campo em animais do grupo KET 80 testados na mesma condição (Figura 17). O teste *t* mostrou que a porcentagem média de PEAs corticais no grupo controle testado no contexto não pareado é significativamente maior que todos os outros (Figura 17, % Controle).



**Figura 18.** A administração intracerebral de AP7 no CA aumenta a resposta eletrofisiológica em ratos previamente condicionados do grupo controle e daqueles tratados com KET 80 mg/kg, testados no ambiente novo (B). AA: condicionamento e teste realizados no mesmo contexto. AB: condicionamento realizado em A, e teste de abstinência em B. Os dados, normalizados, estão representados com a média  $\pm$  EPM. Three-way ANOVA seguida pelo teste HSD Tukey-Kramer, para grupos com N diferentes. Os gráficos menores (insets) mostram a porcentagem das alterações nos PEAs registrados no CA para cada grupo utilizado ( $x = AB \times 10 / AA - 100$ ). Foi utilizada estatística comparativa e teste *t* não pareado. O nível de probabilidade de rejeição de  $H_0$  foi estabelecido em 5%.

## **4. DISCUSSÃO**

#### 4. DISCUSSÃO

O registro de potenciais evocados é uma ferramenta bastante útil na avaliação da integridade estrutural e fisiológica do SNC. Embora técnicas de imagem, como a ressonância magnética, tenham se tornado cada vez mais importantes no diagnóstico de doenças neurológicas, nos últimos 30 anos, muitos neurologistas continuam a empregar o registro de potenciais de campo em aplicações clínicas específicas (Morris et al., 1989; Brasil-Neto, 1992; Lascano et al., 2017). Como exemplo, o registro de potenciais decorrentes da estimulação gustativa, olfativa, auditiva, tátil, e dolorosa podem ser utilizados como marcadores clinicamente relevantes de diversos distúrbios neurodegenerativos, aí incluídos a doença de Parkinson (Liu et al., 2017), doença de Alzheimer (Tachibana et al., 1996), epilepsia (Iwasaki et al., 2010), esclerose múltipla (CALUGARU et al., 2016), além de outras neuropatias (Oh et al., 2015). No campo do transtorno mental o registros dos potenciais de campo adquire importância no estudo da ansiedade patológica (Drake et al., 1991), do transtorno depressivo maior (Kim et al., 2021), na esquizofrenia (Li et al., 2013), e na dependência química (Garg et al., 2015), incluindo o alcoolismo (Steinhauer et al., 1987).

Portanto, os potenciais evocados se mostram como biomarcadores confiáveis de progressão de várias doenças neurológicas. Dentre toda a gama de potenciais de campo passíveis de registro, em nosso estudo utilizamos aqueles de natureza auditiva (PEAs), dada nossa experiência no registro desse tipo de sinal (Nobre et al., 2003; Brandao et al., 2005; Nobre and Brandão, 2011; Nobre, 2013; Paliarin et al., 2018, 2018). Com este procedimento, em nosso primeiro experimento, avaliamos os efeitos de duas doses do anestésico dissociativo KET, uma delas francamente sedativa, sobre o comportamento de ratos de laboratório submetidos a procedimentos de condicionamento contextual, usando os potenciais de campo eletrofisiológicos do CA como resposta condicionada. Os resultados mostram que o tratamento com placebo, assim como com a dose de 10 mg/kg, administrada por via s.c., não altera os padrões de resposta dos animais.

Por outro lado, nos animais tratados com a dose mais alta de KET (80 mg/kg), observamos uma acentuação significativa na amplitude dos PEAs. Dada a existência deste fenômeno, e a inexistência de algum viés experimental induzido equivocadamente ao longo de nossos experimentos, estes dados sugerem que, durante os efeitos da anestesia induzida com o uso de KET em altas doses, os processos de aprendizagem se mantêm intactos, neste

nível encefálico. Ainda, como este fenômeno não foi observado nos animais tratados com placebo, podemos admitir que ele resulta dos efeitos próprios da KET, na concentração utilizada.

Além de induzir alterações nas funções comportamentais e cognitivas (Malhotra et al., 1997; Umbrecht et al., 2000), a utilização de KET pode alterar os potenciais fisiológicos de uma maneira consistente com a esquizofrenia (Maxwell et al., 2006). Na verdade, a KET, quando utilizada em doses altas, pode causar alterações na reatividade neural em várias regiões encefálicas responsáveis pelo processamento de uma variedade de estímulos sensoriais, incluindo os auditivos; apesar desta droga não promover de fato um bloqueio sensorial efetivo, um efeito que tem sido chamado de anestesia "dissociativa" (Corssen and Domino, 1966). De fato, é suposto que a KET rompe os processos de personalidade justamente por induzir uma sobrecarga sensorial resultante de uma quebra homeostática de processos relacionados ao que conhece como filtro sensório-motor (*sensorimotor gating*), um controle complexo da regulação da informação sensorial que ascende aos sistemas corticais (*bottom-up processes*) e que, quando perturbado permite a entrada de estímulos sensoriais irrelevantes, dificultando então o processamento de informações relacionadas à percepção da realidade como de fato se apresenta (Mansbach and Geyer, 1989; Sandner et al., 2002; Maxwell et al., 2006). Estas informações nos ajudam a entender os resultados obtidos, e de certa forma desconcertantes, já que os animais de nosso estudo, tratados com KET 80 mg/kg, foram condicionados ao longo de 4 dias num estado de franca sedação, mas testados na ausência dos efeitos da droga, no que chamamos de condição de abstinência. Dados oriundos de um estudo anterior de nosso laboratório reforçam estes achados (Incrocci et al., 2018).

De forma semelhante ao álcool etílico, a KET, sobretudo em altas doses, perturba o padrão normal de expressão dos PEAs registrados no núcleo central do CI, de tal forma que um “rebote” sensorial é induzido após a interrupção do um tratamento crônico. Dada sua relação importante com áreas corticais, incluindo o mPFC, e o CA, esta estrutura também desempenha um papel importante nas funções corticais (Mitani et al., 1983; Markovitz et al., 2013; Vollmer et al., 2017). Portanto é possível que as alterações induzidas pelo tratamento com KET 80 mg/kg sejam decorrentes de mudanças promovidas pela droga em sistemas a montante, particularmente aqueles relacionados ao processamento da informação auditiva, o que pode nos ajudar a fornecer novas informações sobre a compreensão da fisiopatologia de alguns sintomas psicóticos, incluídos aí os fenômenos alucinatórios auditivos.

A consolidação de traços de memória é um fenômeno transformativo contínuo relacionado aos processos de codificação e recuperação de representações mentais, ou de processos que transformam novas representações mentais em memórias duradouras (Dudai et al., 2015; Squire et al., 2015). A grande maioria dos estudos sobre a aprendizagem e memória ocorrem em sujeitos experimentais com o estado de consciência preservada. Menos comumente se encontra trabalhos que avaliam processos de aprendizagem na ausência de sedação/anestesia. Alguns estudos, entretanto, tem demonstrado que a aquisição e manutenção de novas memórias associativas podem ocorrer à revelia desses estados, como durante o sono (de Lavilléon et al., 2015), e durante anestesia profunda, induzida por uma variedade de agentes incluindo o pentobarbital (associado a adrenalina) (Weinberger et al., 1984), o anestésico de inalação halotano (Pang et al., 1996), e a KET (Edeline and Neuenschwander-El Massioui, 1988). Neste último estudo, o pareamento de um estímulo condicionado com um choque nas patas, em animais anestesiados com KET, resultou numa supressão significativa da resposta de pressão a barra para obtenção de alimento quando os animais foram testados 7 dias após o condicionamento.

Os dados obtidos em nosso segundo experimento onde animais anestesiados com uma dose alta de KET foram submetidos a condicionamento aversivo, com a utilização de choques nas patas como estímulo incondicionado em associação com um estímulo luminoso como estímulo condicionado, para induzir a expressão de sobressalto potencializado pelo medo, se adequam a este resultado.

Os dados acima reforçam uma série de proposições. Primeiro, para que o condicionamento tenha ocorrido é necessário que a percepção do estímulo estressor tenha sido mantida. Portanto, animais anestesiados com KET parecem preservar a capacidade de perceber estímulos sensoriais, à revelia de sua capacidade de conscientemente perceber o ambiente. Corroborando esta afirmação, trabalhos clássicos mostram que esta droga não é eficaz em abolir as respostas neurais evocadas no curso dorsal da medula espinhal a estímulos periférico nocivos e não nocivos, mesmo em doses que bloqueiam completamente os receptores NMDA (Anis, N.A., Headly, P.M., Lodge, D. and West, D.C., 1982; Allen, A.; Dawkins, S.; Headley, P.M.; Roe, C.; West, D. C., 1983; Headley et al., 1987). Ainda, não apenas parece ser possível perceber a estimulação aversiva, mas também fazer associações destes efeitos com o contexto no qual a estimulação acontece. A KET é um antagonista de receptores de GLU do tipo NMDA, neurotransmissor importante no controle

da plasticidade sináptica e dos processos de memória (Riedel et al., 2003). O bloqueio desses receptores causa prejuízos na plasticidade sináptica, além de comprometer o aprendizado e a memória. Sendo a KET um antagonista de receptores dessa classe, os efeitos obtidos em nossos experimentos podem se dever a sua ação em outros neurotransmissores, particularmente os receptores opioides (Smith et al., 1987; Haller et al., 2002; Williams et al., 2018) e serotoninérgicos (Martin et al., 1982; López-Gil et al., 2019), ou devido a sua ação paradoxal sobre a excitação cortical decorrente do aumento dos níveis de glutamato (Moghaddam et al., 1997; Abdallah et al., 2018; Silberbauer et al., 2020).

Em ensaios clínicos, Thomson et al., (1985) demonstraram que doses subanestésicas de KET exacerbam sintomas pré-existent de esquizofrenia (Lahti et al., 1995a, 1995b, 2001), além de eliciar, em indivíduos saudáveis, um ampla gama de sintomas associados à este transtorno, sintomas esses sensíveis à função do córtex pré-frontal (Ghoneim et al., 1985; Malhotra et al., 1996). Essas ações fundamentam atualmente a hipótese GLU da esquizofrenia (Kim et al., 1980; Deakin et al., 1989; Ulas and Cotman, 1993). Em nosso trabalho, a utilização de uma dose não anestésica não produziu qualquer efeito tanto sobre o condicionamento eletrofisiológico contextual quanto sobre a expressão da resposta condicionada de medo de animais condicionados com uma dose anestésica de KET. No entanto, estes potenciais de campo foram registrados no CA e, até o momento, não está claro ainda até que ponto um agente anestésico pode influenciar a resposta neural desta região a um estímulo auditivo. Em um estudo comparando as respostas de neurônios do CA em animais anestesiados com duas diferentes composições de agentes (KET e xilazina, ou medetomidina, midazolam e butorfanol) (Osanai and Tateno, 2016), embora as duas condições misturas tenham apresentado pouco ou nenhum impacto na transmissão de sinais da periferia para o CA, os neurônios de animais tratados com medetomidina, midazolam e butorfanol apresentaram significativamente maior inibição em comparação com aqueles que recebem KET e xilazina. Isto sugere que, assim como no córtex pré-frontal medial, a KET carece de uma ação inibitória nesta região.

Portanto, também estes resultados corroboram parte dos achados de nossos experimentos, na medida em que o aumento na amplitude dos PEAs registrados no CA foram observados nos animais anestesiados, apenas, sendo que este fortalecimento parece resultar de condicionamento induzido pela associação droga/contexto. Vale ressaltar que as latências dos potenciais não foram influenciadas pelos tratamentos em nenhum dos grupos, mostrando

que as alterações produzidas não se referem a um atraso no processamento, mas na qualidade das informações que chegam até ao CA.

Como informado anteriormente, estudos prévios de nosso laboratório mostram que o processamento da informação sensorial auditiva no colículo inferior é claramente alterado por doses anestésicas de KET (Incrocci et al., 2018). O colículo inferior é a região do cérebro conhecida por ser um importante relé sensorial e também de funções cognitivas, incluindo as experiências emocionais aversivas (Brandao et al., 1988, 1993; Nobre et al., 2003; Nobre and Brandão, 2011). No sistema auditivo o CA envia extensas projeções para vários núcleos envolvidos com o processamento dos sons, incluindo o corpo geniculado medial do tálamo (Alitto and Usrey, 2003; Rouiller and Durif, 2004), e o CI (Saldaña et al., 1996; Bajo et al., 2007). Apesar disso, o bloqueio desta atividade córtico-colicular de retorno (*feedback*) produz pouco efeito sobre a atividade do CI (Blackwell et al., 2020). Todas estas informações parecem indicar que a ação da KET, em doses anestésicas, sobre os PEAs, e consequentemente sobre o funcionamento do CA decorre de sua ação sobre todo o sistema auditivo. Dessa forma, ao inibir o funcionamento do filtro sensorial mesencefálico, a KET poderia facilitar o condicionamento em estruturas corticais em função do aumento da atividade GLU nesta região, em animais treinados sobre sedação/anestesia. Para entender a importância dos receptores de GLU do CA neste processo, em nosso terceiro experimento realizamos a modulação da neurotransmissão GLU no CA, através da administração local do agonista de receptores de GLU NMDA, e do antagonista destes mesmos receptores AP7.

No presente estudo, nós direcionamos nossa atenção na avaliação do desenvolvimento de uma resposta eletrofisiológica condicionada eliciada no CA como resultado da associação entre os efeitos da KET e as pistas contextuais presentes no contexto de condicionamento. Os dados coletados mostram que a administração de NMDA diretamente no CA reduz significativamente os PEAs eliciados no grupo tratado com KET em alta dose, além de acentuar estes mesmos potenciais nos animais do grupo controle testados no ambiente não utilizado no condicionamento (contexto B).

O aumento nas amplitudes dos PEAs pode resultar de plasticidade neural no CA. Galambos et al., (1956), mostraram que alterações eletrofisiológicas podem ser observadas no CA de gatos condicionados a um estímulo auditivo. A exemplo disso, destaca-se também o estudo de Carrascal et al., (1990), onde a atividade metabólica desta região foi medida após um processo de condicionamento no qual alimento foi utilizado como reforço. Os resultados mostraram que as alterações nas atividades do córtex auditivo são bastante dependentes do

que os pesquisadores chamaram de “*the behavioral meaning of the stimulus*”, literalmente, “o significado comportamental do estímulo”. Neste contexto, cumpre notar que a KET apresenta potente efeito reforçador. Apesar de não estar bem claro de que forma substâncias que induzem sensação de dissociação podem induzir abuso, sabe-se que animais de laboratório podem facilmente aprender a autoadministrar KET (Moreton et al., 1977; Strong et al., 2019). Como em nosso estudo os animais foram condicionados ao longo de quatro sessões diárias com KET, é possível que os efeitos observados no tratamento sejam devidos à abstinência induzida por tolerância condicionada ao contexto.

Dentre outras características farmacológicas, a KET apresenta a propriedade de antagonizar receptores NMDA localizados em interneurônios inibitórios GABAérgicos no córtex frontal (Moghaddam et al., 1997; Chatterjee et al., 2012), o que resulta na redução da liberação de GABA e consequente desinibição de neurônios piramidais, com elevação de níveis extracelulares de GLU (Moghaddam et al., 1997; Kim et al., 2011). Estas projeções GLU corticais exercem um papel modulador do tipo *top-down* sobre diversas áreas subcorticais, incluindo o núcleo *accumbens*, a principal estrutura dos gânglios da base para a qual aferem informações das regiões corticais e límbicas responsáveis pela modulação de comportamentos motivados, incluindo o abuso de substâncias. Portanto, em nosso estudo, é possível também que, ao longo do condicionamento tenha ocorrido uma redução nos efeitos da KET sobre a eletrofisiologia dos neurônios do CA, em função de rápida tolerância associada ao contexto. Vale ressaltar que a KET apresenta também profunda ação excitatória sobre os mecanismos dopaminérgicos. Várias evidências sugerem que este efeito é secundário a sua ação principal sobre os neurônios GABAérgicos na medida em que estas células regulam eferências excitatórias direcionadas a neurônios dopaminérgicos mesencefálicos.

Em nossos experimentos, ao utilizarmos o NMDA, administrado diretamente no CA, observamos uma redução significativa na excitação neural desta estrutura, medida pelo registro dos PEAs. Faz sentido que este efeito ocorra se admitirmos que, durante o teste, a tolerância induzida pelo tratamento contínuo com KET em alta dose se perde, em função da exposição agora a um ambiente não associado com a droga e seus efeitos. Na verdade, sabe-se que a tolerância aos efeitos de uma droga psicoativa pode ser mais acentuada em contextos nos quais a substância é geralmente utilizada, mais do que em contextos não usuais (Siegel, 1975, 1975; Crowell et al., 1981; White et al., 2002). A existência de tais processos podem ter grandes implicações, tanto na pesquisa básica, quanto no trabalho clínico e hospitalar.

Como exemplo, [Siegel et al., \(1982\)](#) argumentaram que o surgimento de tolerância condicionada poderia explicar o grande número de casos de toxicidade intensa aos efeitos de opioides em usuários crônicos. Portanto, ambientes não usuais poderiam eliciar no usuário, o que se chama de “respostas compensatórias condicionadas” ([Newlin, 1986; Duncan et al., 2000](#)), uma resposta autonômica oposta em direção aos efeitos da droga, e um fenômeno chave no desenvolvimento da dependência química.

Na última parte de nossos experimentos, tendo em conta que o condicionamento com doses anestésicas de KET elicia um descompasso eletrofisiológico resultante da associação efeitos da droga/contexto, e que estes efeitos podem ser modulados pelo agonista de receptores de GLU NMDA, mostrando o desenvolvimento de aprendizagem associativa, mesmo em irresponsividade, tentamos reforçar a importância dos receptores NMDA nestes processos, através da administração, desta feita, do antagonista destes receptores, AP7, diretamente no CA. Não foram observadas diferenças significativas nos grupos, considerando o contexto de teste, exceto no grupo condicionado com a dose de 80 mg/kg de KET. Na verdade, contrário aos efeitos dos efeitos do NMDA, a administração de AP7 aumentou significativamente a amplitude desses potenciais. À luz do que se discutiu até o presente momento, este aumento pode ser visto como um restauro dos potenciais eletrofisiológicos evocados nesta estrutura a sua condição basal. Por certo que a confirmação de tal afirmação depende da realização de experimentos adicionais, particularmente utilizando modelos de autoadministração associados ao registro *in vivo* dos potenciais de campo, e a modulação de outros receptores como os do tipo GABA<sub>A</sub>, no CA. Além disso, há que se investigar o processamento da informação auditiva ao longo dos principais núcleos desse sistema, particularmente o colículo inferior e o tálamo auditivo. Além disso, torna-se necessário investigar os efeitos da KET sobre o funcionamento dos neurônios hipocampais já que o condicionamento contextual difere do condicionamento realizado com a utilização de estímulos condicionados explícitos. Como exemplo, lesões do hipocampo posteriores ao condicionamento com som/choque nas patas interferem na expressão da resposta de medo ao contexto, mas não ao som propriamente ([Lu and Wehner, 1997; Oler and Markus, 1998](#)).

Os dados discutidos até agora devem ser interpretados com cautela, considerando algumas peculiaridades de nossos experimentos. Primeiro, as amplitudes dos PEAs podem ser influenciadas significativamente pela movimentação do animal na gaiola de contenção, já que os potenciais neuromusculares tendem a injetar forte ruído nos sinais coletados. Para reduzir essa influência os animais foram habituados regularmente às condições de

condicionamento e teste. Segundo, a qualidade do implante afeta, sobremaneira, a coleta dos sinais, já que o surgimento de gliose no local de implante do eletrodo aumenta a resistência, reduzindo por sua vez a condutância dos potenciais. Terceiro, a intensidade e a frequência de utilização dos estímulos utilizados (clicks) podem se somar aos experimentos como fator aversivo considerando que, apesar do tempo de sua apresentação ser curto (50ms) a intensidade é alta (95 dB). Ainda, nos estudos de [Simpson & Knight \(1993\)](#) em ratos, os autores sugerem que os PEAs eliciados no CA são amplamente limitados pela lateral do crânio, com poucas contribuições do crânio dorsal ou do *vertex*. O número de animais utilizados foi também motivo de variabilidade já que os grupos se diferenciaram em termos neste quesito. O tratamento estatístico, entretanto, visou justamente atenuar este viés, principalmente utilizando testes mais conservadores, como no teste de Tukey-Kramer.

## **5. CONCLUSÕES**

## 5. CONCLUSÕES

Concluimos que altas dosagens de KET são capazes de causar uma acentuação na amplitude dos potenciais auditivos, pode-se inferir que este aumento significativo é proveniente do condicionamento induzido pela associação droga/contexto, sugerindo que o processo de aprendizagem se mantém intactos, sobretudo no nível encefálico do CA.

A utilização de dosagem não anestésica, de 10mg/kg, não ocasionou nenhuma alteração eletrofisiológica, mostrando -se similar ao grupo controle. O mesmo ocorreu no experimento comportamental sobressalto potencializado pelo medo. Já na dosagem de 80 mg/kg,

Os efeitos comportamentais e eletrofisiológicos da KET foram observados com poucos dias de condicionamento, o que sugere que a tolerância farmacológica aos efeitos da KET é rápida.

O achado mais importante foi a observação de que a percepção dos animais a estímulos sensoriais ainda que submetidos a uma dosagem que impedisse que este processo seja realizado de forma consciente.

## **5. REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

- Alho K, Woods DL, Algazi A, Näätänen R (1992) Intermodal selective attention. II. Effects of attentional load on processing of auditory and visual stimuli in central space. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 82:356–368.
- Abdallah CG, De Feyter HM, Averill LA, Jiang L, Averill CL, Chowdhury GMI, Purohit P, de Graaf RA, Esterlis I, Juchem C, Pittman BP, Krystal JH, Rothman DL, Sanacora G, Mason GF (2018) The effects of ketamine on prefrontal glutamate neurotransmission in healthy and depressed subjects. *Neuropsychopharmacology* 43:2154–2160.
- Agus TR, Thorpe SJ, Pressnitzer D (2010) Rapid Formation of Robust Auditory Memories: Insights from Noise. *Neuron* 66:610–618.
- Alitto HJ, Usrey WM (2003) Corticothalamic feedback and sensory processing. *Curr Opin Neurobiol* 13:440–445.
- Allen, A.; Dawkins, S.; Headley, P.M.; Roe, C.; West, D. C. (1983) Ketamine reduces nociceptive responses of spinal motoneurons in rats and cats, probably by an effect in the ventral horn. *J Physiol* 345:156P.
- Amat J, Dolzani SD, Tilden S, Christianson JP, Kubala KH, Bartholomay K, Sperr K, Ciancio N, Watkins LR, Maier SF (2016) Previous Ketamine Produces an Enduring Blockade of Neurochemical and Behavioral Effects of Uncontrollable Stress. *J Neurosci* 36:153–161.
- Andrillon T, Pressnitzer D, Léger D, Kouider S (2017) Formation and suppression of acoustic memories during human sleep. *Nat Commun* 2017 8:1–15.
- Anis, N.A., Headly, P.M., Lodge, D. and West, D.C. (1982) Lack of involvement of N-methylaspartate receptors in segmental synaptic excitation of cat lumbar dorsal horn neurons: studies with Ketamine. *J Physiol* 328:10P.
- Bajo VM, Nodal FR, Bizley JK, Moore DR, King AJ (2007) The ferret auditory cortex: descending projections to the inferior colliculus. *Cereb Cortex N Y N* 1991 17:475–491.
- Banov MD, Young JR, Dunn T, Szabo ST (2020) Efficacy and safety of ketamine in the management of anxiety and anxiety spectrum disorders: a review of the literature. *CNS Spectr* 25:331–342.
- Bao S, Chang EF, Woods J, Merzenich MM (2004) Temporal plasticity in the primary auditory cortex induced by operant perceptual learning. *Nat Neurosci* 7:974–981.
- Biacabe B, Chevallier JM, Avan P, Bonfils P (2001) Functional anatomy of auditory brainstem nuclei: application to the anatomical basis of brainstem auditory evoked potentials. *Auris Nasus Larynx* 28:85–94.
- Birak KS, Higgs S, Terry P (2011) Conditioned Tolerance to the Effects of Alcohol on Inhibitory Control in Humans. *Alcohol* 46:686–693.

- Bizley JK, Cohen YE (2013) The what, where and how of auditory-object perception. *Nat Rev Neurosci* 14:693–707.
- Blackwell JM, Lesicko AM, Rao W, De Biasi M, Geffen MN (2020) Auditory cortex shapes sound responses in the inferior colliculus. *eLife* 9.
- Borsato GS, Siegel JL, Rose MQ, Ojard M, Feyissa AM, Quinones-Hinojosa A, Jackson DA, Rogers ER, Freeman WD (2020) Ketamine in seizure management and future pharmacogenomic considerations. *Pharmacogenomics J* 20:351–354.
- Brandao ML, Borelli KG, Nobre MJ, Santos JM, Albrechet-Souza L, Oliveira AR, Martinez RC (2005) Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1299–1311.
- Brandao ML, Coimbra NC, Osaki MY (2001) Changes in the auditory-evoked potentials induced by fear-evoking stimulations. *Physiol Behav* 72:365–372.
- Brandao ML, Melo LL, Cardoso SH (1993) Mechanisms of defense in the inferior colliculus. *Behav Brain Res* 58:49–55.
- Brandao ML, Tomaz C, Borges PC, Coimbra NC, Bagri A (1988) Defense reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus. *Physiol Behav* 44:361–365.
- Brasil-Neto JP (1992) Critical review of the usefulness of evoked potential studies in clinical neurology. *Arq Neuro-Psiquiatr* 50:141–146.
- Broadbear JH, Winger G, Woods JH (2004) Self-administration of fentanyl, cocaine and ketamine: effects on the pituitary-adrenal axis in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* 176:398–406.
- Brown JS, Kalish HI, Farber IE (1951) Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. *J Exp Psychol* 41:317–328.
- Buffalo EA, Gillam MP, Allen RR, Paule MG (1994) Acute behavioral effects of MK-801 in rhesus monkeys: assessment using an operant test battery. *Pharmacol Biochem Behav* 48:935–940.
- CALUGARU L, CALUGARU GT, CALUGARU OM (2016) Evoked Potentials in Multiple Sclerosis Diagnosis and Management. *Curr Health Sci J* 42:385–389.
- Carrascal E, Ortin A, Collia F, Arévalo M (1990) Metabolic activity changes in auditory system of the rat during associative learning. *New Trends Exp Clin Psychiatry* 6:53–63.
- Chatterjee M, Verma R, Ganguly S, Palit G (2012) Neurochemical and molecular characterization of ketamine-induced experimental psychosis model in mice. *Neuropharmacology* 63:1161–1171.
- Christison-Lagay KL, Cohen YE (2018) The Contribution of Primary Auditory Cortex to Auditory Categorization in Behaving Monkeys. *Front Neurosci* 12 Available at:

- <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2018.00601> [Accessed September 14, 2022].
- Corssen G, Domino EF (1966) Dissociative Anesthesia: Further Pharmacologic Studies and First Clinical Experience with the Phencyclidine Derivative CI-581. *Anesth Analg* 45:29–40.
- Crombag HS, Bossert JM, Koya E, Shaham Y (2008) Review. Context-induced relapse to drug seeking: a review. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:3233–3243.
- Crowell CR, Hinson RE, Siegel S (1981) The role of conditional drug responses in tolerance to the hypothermic effects of ethanol. *Psychopharmacology (Berl)* 73:51–54.
- Davis M (2001) Fear-potentiated startle in rats. *Curr Protoc Neurosci* Editor Board Jacqueline N Crawley AI Chapter 8:Unit 8 11A.
- Davis S, Butcher SP, Morris RG (1992) The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 12:21–34.
- de Lavilléon G, Lacroix MM, Rondi-Reig L, Benchenane K (2015) Explicit memory creation during sleep demonstrates a causal role of place cells in navigation. *Nat Neurosci* 18:493–495.
- De Luca MT, Badiani A (2011) Ketamine self-administration in the rat: evidence for a critical role of setting. *Psychopharmacology (Berl)* 214:549–556.
- Deakin JF, Lees J, McKie S, Hallak JE, Williams SR, Dursun SM (2008) Glutamate and the neural basis of the subjective effects of ketamine: a pharmaco-magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry* 65:154–164.
- Deakin JF, Slater P, Simpson MD, Gilchrist AC, Skan WJ, Royston MC, Reynolds GP, Cross AJ (1989) Frontal cortical and left temporal glutamatergic dysfunction in schizophrenia. *J Neurochem* 52:1781–1786.
- Diana M, Pistis M, Muntoni A, Gessa G (1995) Profound decrease of mesolimbic dopaminergic neuronal activity in morphine withdrawn rats. *J Pharmacol Exp Ther* 272:781–785.
- Drake ME, Pakalnis A, Phillips B, Padamadan H, Hietter SA (1991) Auditory evoked potentials in anxiety disorder. *Clin EEG Electroencephalogr* 22:97–101.
- Driscoll ME, Tadi P (2022) Neuroanatomy, Inferior Colliculus. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554468/> [Accessed September 26, 2022].
- Du Y, Du L, Cao J, Hölscher C, Feng Y, Su H, Wang Y, Yun K-M (2017) Levotetrahdropalmatine inhibits the acquisition of ketamine-induced conditioned place

- preference by regulating the expression of ERK and CREB phosphorylation in rats. *Behav Brain Res* 317:367–373.
- Dudai Y, Karni A, Born J (2015) The Consolidation and Transformation of Memory. *Neuron* 88:20–32.
- Duncan PM, Alici T, Woodward JD (2000) Conditioned compensatory response to ethanol as indicated by locomotor activity in rats. *Behav Pharmacol* 11:395–402.
- Edeline J-M, Neuenschwander-El Massioui N (1988) Retention of CS-US association learned under ketamine anesthesia. *Brain Res* 457:274–280.
- Feng AS (1992) Information processing in the auditory brainstem. *Curr Opin Neurobiol* 2:511–515.
- Friedland DR (2006) Structure and Function in the Auditory System. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288:326–330.
- Galambos R, Sheatz G, Vernier VG (1956) Electrophysiological correlates of a conditioned response in cats. *Science* 123:376–377.
- Gao M, Rejaei D, Liu H (2016) Ketamine use in current clinical practice. *Acta Pharmacol Sin* 37:865–872.
- Garg S, Sharma R, Mittal S, Thapar S (2015) Alterations in brain-stem auditory evoked potentials among drug addicts. A cross-sectional study. *Neurosci Riyadh Saudi Arab* 20:253–258.
- Géczy J (2010) Glutamate receptors and learning and memory. *Nat Genet* 42:925–926.
- George O, Koob GF (2011) Craving, context and the cortex. *Nat Neurosci* 14:409–410.
- Gerhard DM, Pothula S, Liu R-J, Wu M, Li X-Y, Girgenti MJ, Taylor SR, Duman CH, Delpire E, Picciotto M, Wohleb ES, Duman RS (2020) GABA interneurons are the cellular trigger for ketamine's rapid antidepressant actions. *J Clin Invest* 130:1336–1349.
- Ghoneim MM, Hinrichs JV, Mewaldt SP, Petersen RC (1985) Ketamine: behavioral effects of subanesthetic doses. *J Clin Psychopharmacol* 5:70–77.
- Ghosh M, Ghosh T, Hirose MY (2021) Poisson Counts, Square Root Transformation and Small Area Estimation: Square Root Transformation. *Sankhya Ser B* 2008:1–23.
- Griffiths TD, Warren JD (2004) What is an auditory object? *Nat Rev Neurosci* 5:887–892.
- Grosso A, Cambiaghi M, Concina G, Sacco T, Sacchetti B (2015) Auditory cortex involvement in emotional learning and memory. *Neuroscience* 299:45–55.
- Haller G, Waeber J-L, Infante NK, Clergue F (2002) Ketamine Combined with Morphine for the Management of Pain in an Opioid Addict. *Anesthesiology* 96:1265–1266.

- Hancock PJ, Stamford JA (1999) Stereospecific effects of ketamine on dopamine efflux and uptake in the rat nucleus accumbens. *Br J Anaesth* 82:603–608.
- Headley PM, Parsons CG, West DC (1987) The role of N-methylaspartate receptors in mediating responses of rat and cat spinal neurones to defined sensory stimuli. *J Physiol* 385:169–188.
- Hebb DO (1949) *The organization of behavior; a neuropsychological theory*. Oxford, England: Wiley.
- Heinz A, Beck A, Halil MG, Pilhatsch M, Smolka MN, Liu S (2019) Addiction as Learned Behavior Patterns. *J Clin Med* 8.
- Herron CE, Forsythe ID (1989) Hippocampal synaptic transmission: Regulation of the NMDA receptor-mediated component. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 93:203–210.
- Huang X, Huang K, Zheng W, Beveridge TJR, Yang S, Li X, Li P, Zhou W, Liu Y (2015) The effects of GSK-3 $\beta$  blockade on ketamine self-administration and relapse to drug-seeking behavior in rats. *Drug Alcohol Depend* 147:257–265.
- Hynd MR, Scott HL, Dodd PR (2004) Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 45:583–595.
- Incrocci RM, Paliarin F, Nobre MJ (2018) Prelimbic NMDA receptors stimulation mimics the attenuating effects of clozapine on the auditory electrophysiological rebound induced by ketamine withdrawal. *NeuroToxicology* 69:1–10.
- Iwasaki M, Enatsu R, Matsumoto R, Novak E, Thankappen B, Piao Z, O'Connor R T, Horning K, Bingaman W, Nair D (2010) Accentuated cortico-cortical evoked potentials in neocortical epilepsy in areas of ictal onset. *Epileptic Disord* 12:292–302.
- J T, S W, M S, A D, Ct W (2003) Potentiation of amygdaloid and hippocampal auditory-evoked potentials in a discriminatory fear-conditioning task in mice as a function of tone pattern and context. *Eur J Neurosci* 18 Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12911760/> [Accessed September 21, 2022].
- Kang H, Auksztulewicz R, An H, Abi Chacra N, Sutter ML, Schnupp JWH (2021) Neural Correlates of Auditory Pattern Learning in the Auditory Cortex. *Front Neurosci* 15.
- Khoo SY-S, Gibson GD, Prasad AA, McNally GP (2017) How contexts promote and prevent relapse to drug seeking. *Genes Brain Behav* 16:185–204.
- Kim JS, Kim S, Lee H-S, Kwon YJ, Lee HY, Shim S-H (2021) Auditory evoked potentials and suicidal behaviors in patients with major depressive disorders. *Sci Rep* 11:7255.
- Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmüller B (1980) Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett* 20:379–382.

- Kim S-Y, Lee H, Kim H-J, Bang E, Lee S-H, Lee D-W, Woo D-C, Choi C-B, Hong KS, Lee C, Choe B-Y (2011) In vivo and ex vivo evidence for ketamine-induced hyperglutamatergic activity in the cerebral cortex of the rat: Potential relevance to schizophrenia. *NMR Biomed* 24:1235–1242.
- Kochs E, Bischoff P (1994) [Ketamine and evoked potentials]. *Anaesthesist* 43 Suppl 2:S8-14.
- Konorski J (1948) *Conditioned reflexes and neuron organization*. New York, NY, US: Cambridge University Press.
- Lahti AC, Holcomb HH, Medoff DR, Tamminga CA (1995a) Ketamine activates psychosis and alters limbic blood flow in schizophrenia. *Neuroreport* 6:869–872.
- Lahti AC, Koffel B, LaPorte D, Tamminga CA (1995b) Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 13:9–19.
- Lahti AC, Weiler MA, Tamara M, Parwani A, Tamminga CA (2001) Effects of Ketamine in Normal and Schizophrenic Volunteers. *Neuropsychopharmacology* 25:455–467.
- Lascano AM, Lalive PH, Hardmeier M, Fuhr P, Seeck M (2017) Clinical evoked potentials in neurology: a review of techniques and indications. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88:688–696.
- Leon MI, Miasnikov AA, Wright EJ, Weinberger NM (2017) CS-specific modifications of auditory evoked potentials in the behaviorally conditioned rat. *Brain Res* 1670:235–247.
- Léveillé F, El Gaamouch F, Gouix E, Lecocq M, Lobner D, Nicole O, Buisson A (2008) Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 22:4258–4271.
- Li Z, Zheng B, Deng W, Liu X, Zheng Z, Li T (2013) Multi-components of evoked-brain potentials in deficit and nondeficit schizophrenia. *Asia-Pac Psychiatry Off J Pac Rim Coll Psychiatr* 5:69–79.
- Liu C, Zhang Y, Tang W, Wang B, Wang B, He S (2017) Evoked potential changes in patients with Parkinson's disease. *Brain Behav* 7:e00703.
- López-Gil X, Jiménez-Sánchez L, Campa L, Castro E, Frago C, Adell A (2019) Role of Serotonin and Noradrenaline in the Rapid Antidepressant Action of Ketamine. *ACS Chem Neurosci* 10:3318–3326.
- Lu K, Liu W, Zan XP, Stephen X, David V, Fritz JB, Shihab X, Shamma A (2018) Behavioral/Cognitive Implicit Memory for Complex Sounds in Higher Auditory Cortex of the Ferret.
- Lu Y (2014) Metabotropic glutamate receptors in auditory processing. *Neuroscience* 274:429–445.

- Lu Y, Wehner JM (1997) Enhancement of contextual fear-conditioning by putative ( $\pm$ )- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptor modulators and N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor antagonists in DBA/2J mice. *Brain Res* 768:197–207.
- Luo J, Phan TX, Yang Y, Garelick MG, Storm DR (2013) Increases in cAMP, MAPK Activity, and CREB Phosphorylation during REM Sleep: Implications for REM Sleep and Memory Consolidation. *J Neurosci* 33:6460.
- Lynch JJ, Fertziger AP, Teitelbaum HA, Cullen JW, Gantt WH (1973) Pavlovian conditioning of drug reactions: Some implications for problems of drug addiction. *Cond Reflex Pavlov J Res Ther* 8:211–223.
- Malhotra AK, Pinals DA, Adler CM, Elman I, Clifton A, Pickar D, Breier A (1997) Ketamine-induced exacerbation of psychotic symptoms and cognitive impairment in neuroleptic-free schizophrenics. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 17:141–150.
- Malhotra AK, Pinals DA, Weingartner H, Sirocco K, Missar CD, Pickar D, Breier A (1996) NMDA receptor function and human cognition: the effects of ketamine in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* 14:301–307.
- Mansbach RS, Geyer MA (1989) Effects of phencyclidine and phencyclidine biologs on sensorimotor gating in the rat. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 2:299–308.
- Markovitz CD, Tang TT, Lim HH (2013) Tonotopic and localized pathways from primary auditory cortex to the central nucleus of the inferior colliculus. *Front Neural Circuits* 7:77.
- Martin LL, Bouchal RL, Smith DJ (1982) Ketamine inhibits serotonin uptake in vivo. *Neuropharmacology* 21:113–118.
- Maruyama AT, Komai S (2018) Auditory-induced response in the primary sensory cortex of rodents. *PLoS ONE* 13 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6301624/> [Accessed August 28, 2019].
- Maxwell CR, Ehrlichman RS, Liang Y, Trief D, Kanés SJ, Karp J, Siegel SJ (2006) Ketamine produces lasting disruptions in encoding of sensory stimuli. *J Pharmacol Exp Ther* 316:315–324.
- McEntee WJ, Crook TH (1993) Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology (Berl)* 111:391–401.
- Memon RI, Naveed S, Faquih AE, Fida A, Abbas N, Chaudhary AMD, Qayyum Z (2020) Effectiveness and Safety of Ketamine for Unipolar Depression: a Systematic Review. *Psychiatr Q* 91:1147–1192.

- Miserendino MJD, Sananes CB, Melia KR, Davis M (1990) Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature* 345:716–718.
- Mitani A, Shimokouchi M, Nomura S (1983) Effects of stimulation of the primary auditory cortex upon colliculogeniculate neurons in the inferior colliculus of the cat. *Neurosci Lett* 42:185–189.
- Miyashita Y (2022) Operating principles of the cerebral cortex as a six-layered network in primates: beyond the classic canonical circuit model. *Proc Jpn Acad Ser B* 98:93–111.
- Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D (1997) Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 17:2921–2927.
- Moreton JE, Meisch RA, Stark L, Thompson T (1977) Ketamine self-administration by the rhesus monkey. *J Pharmacol Exp Ther* 203:303–309.
- Morosan P, Rademacher J, Schleicher A, Amunts K, Schormann T, Zilles K (2001) Human primary auditory cortex: cytoarchitectonic subdivisions and mapping into a spatial reference system. *NeuroImage* 13:684–701.
- Morris HH, Lüders H, Dinner DS, Lesser RP, Wyllie E (1989) Clinical Use of Evoked Potentials: A Review. In: *Advanced Evoked Potentials* (Lüders H, ed), pp 143–159 *Topics in Neurosurgery*. Boston, MA: Springer US. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-9007-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-9007-7_6) [Accessed September 28, 2022].
- Neill JC, Barnes S, Cook S, Grayson B, Idris NF, McLean SL, Snigdha S, Rajagopal L, Harte MK (2010) Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. *Pharmacol Ther* 128:419–432.
- Newlin DB (1986) Conditioned compensatory response to alcohol placebo in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 88:247–251.
- Niesters M, Martini C, Dahan A (2014) Ketamine for chronic pain: risks and benefits. *Br J Clin Pharmacol* 77:357–367.
- Nobre MJ (2013) Changes on auditory physiology in response to the inactivation of amygdala nuclei in high anxiety rats expressing learned fear. *Physiol Behav* 118:80–87.
- Nobre MJ, Brandão ML (2011) Modulation of auditory-evoked potentials recorded in the inferior colliculus by GABAergic mechanisms in the basolateral and central nuclei of the amygdala in high- and low-anxiety rats. *Brain Res* 1421:20–29.
- Nobre MJ, Sandner G, Brandao ML (2003) Enhancement of acoustic evoked potentials and impairment of startle reflex induced by reduction of GABAergic control of the neural substrates of aversion in the inferior colliculus. *Hear Res* 184:82–90.

- Oh KJ, Kim SH, Lee Y-H, Kim JH, Jung HS, Park TJ, Park J, Shinn JM (2015) Pain-Related Evoked Potential in Healthy Adults. *Ann Rehabil Med* 39:108–115.
- Oler JA, Markus EJ (1998) Age-related deficits on the radial maze and in fear conditioning: hippocampal processing and consolidation. *Hippocampus* 8:402–415.
- Osanai H, Tateno T (2016) Neural response differences in the rat primary auditory cortex under anesthesia with ketamine versus the mixture of medetomidine, midazolam and butorphanol. *Hear Res* 339:69–79.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54:581–618.
- Paliarin F, Incrocci RM, Nobre MJ (2018) Behavioral and Auditory Electrophysiological Rebound as a Compensatory Response to the Reinforcing Effects of Morphine. *Neuroscience* 392:66–76.
- Pang R, Turndorf H, Quartermain D (1996) Pavlovian fear conditioning in mice anesthetized with halothane. *Physiol Behav* 59:873–875.
- Parsons LH, Koob GF, Weiss F (1996) Extracellular serotonin is decreased in the nucleus accumbens during withdrawal from cocaine self-administration. *Behav Brain Res* 73:225–228.
- Paxinos GW C (2008) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinat.*
- Peng S, Zhang Y, Zhang J, Wang H, Ren B (2011) Glutamate receptors and signal transduction in learning and memory. *Mol Biol Rep* 38:453–460.
- Plourde G (2006) Auditory evoked potentials. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 20:129–139.
- Pollak GD, Burger RM, Klug A (2003) Dissecting the circuitry of the auditory system. *Trends Neurosci* 26:33–39.
- Powers AR, Gancsos MG, Finn ES, Morgan PT, Corlett PR (2015) Ketamine-Induced Hallucinations. *Psychopathology* 48:376–385.
- Rauschecker JP, Tian B (2000) Mechanisms and streams for processing of “what” and “where” in auditory cortex. *Proc Natl Acad Sci* 97:11800–11806.
- Riedel G, Platt B, Micheau J (2003) Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* 140:1–47.
- Risner ME (1982) Intravenous self-administration of phencyclidine and related compounds in the dog. *J Pharmacol Exp Ther* 221:637–644.
- Romanski LM, Averbeck BB (2009) The primate cortical auditory system and neural representation of conspecific vocalizations. *Annu Rev Neurosci* 32:315–346.

- Romanski LM, Tian B, Fritz J, Mishkin M, Goldman-Rakic PS, Rauschecker JP (1999) Dual streams of auditory afferents target multiple domains in the primate prefrontal cortex. *Nat Neurosci* 2:1131–1136.
- Rouiller EM, Durif C (2004) The dual pattern of corticothalamic projection of the primary auditory cortex in macaque monkey. *Neurosci Lett* 358:49–52.
- Rubel EW, Fritsch B (2002) Auditory System Development: Primary Auditory Neurons and Their Targets. *Annu Rev Neurosci* 25:51–101.
- Saldaña E, Feliciano M, Mugnaini E (1996) Distribution of descending projections from primary auditory neocortex to inferior colliculus mimics the topography of intracollicular projections. *J Comp Neurol* 371:15–40.
- Sandner G, Canal NM, Brandao ML (2002) Effects of ketamine and apomorphine on inferior colliculus and caudal pontine reticular nucleus evoked potentials during prepulse inhibition of the startle reflex in rats. *Behav Brain Res* 128:161–168.
- Schwender D, Klasing S, Madler C, Pöppel E, Peter K (1993) MID-LATENCY AUDITORY EVOKED POTENTIALS DURING KETAMINE ANAESTHESIA IN HUMANS. *Br J Anaesth* 71:629–632.
- Siegel S (1975) Evidence from rats that morphine tolerance is a learned response. *J Comp Physiol Psychol* 89:498–506.
- Siegel S (1999) Drug anticipation and drug addiction. The 1998 H. David Archibald Lecture. *Addict Abingdon Engl* 94:1113–1124.
- Siegel S (2005) Drug Tolerance, Drug Addiction, and Drug Anticipation. *Curr Dir Psychol Sci* 14:296–300.
- Siegel S, Hinson RE, Krank MD, McCully J (1982) Heroin “overdose” death: contribution of drug-associated environmental cues. *Science* 216:436–437.
- Silberbauer LR, Spurny B, Handschuh P, Klöbl M, Bednarik P, Reiter B, Ritter V, Trost P, Konadu ME, Windpassinger M, Stimpfl T, Bogner W, Lanzenberger R, Spies M (2020) Effect of Ketamine on Limbic GABA and Glutamate: A Human In Vivo Multivoxel Magnetic Resonance Spectroscopy Study. *Front Psychiatry* 11 Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsyt.2020.549903> [Accessed September 29, 2022].
- Silva-Cardoso GK, Nobre MJ (2021) Context-Specific Tolerance and Pharmacological Changes in the Infralimbic Cortex-Nucleus Accumbens Shell Pathway Evoked by Ketamine. *Neurochem Res* 46:1686–1700.
- Simpson GV, Knight RT (1993) Multiple brain systems generating the rat auditory evoked potential. I. Characterization of the auditory cortex response. *Brain Res* 602:240–250.

- Smith DJ, Bouchal RL, deSanctis CA, Monroe PJ, Amedro JB, Perrotti JM, Crisp T (1987) Properties of the interaction between ketamine and opiate binding sites in vivo and in vitro. *Neuropharmacology* 26:1253–1260.
- Squire LR, Genzel L, Wixted JT, Morris RG (2015) Memory Consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a021766.
- Steinhauer SR, Hill SY, Zubin J (1987) Event-related potentials in alcoholics and their first-degree relatives. *Alcohol* 4:307–314.
- Strong CE, Wright KN, Kabbaj M (2019) Sex and Individual Differences in Alcohol Intake Are Associated with Differences in Ketamine Self-Administration Behaviors and Nucleus Accumbens Dendritic Spine Density. *eNeuro* 6:ENEURO.0221-19.2019.
- Tachibana H, Takeda M, Okuda B, Kawabata K, Nishimura H, Kodama N, Iwamoto Y, Sugita M (1996) Multimodal evoked potentials in Alzheimer's disease and Binswanger's disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 9:7–12.
- Tang J, Wotjak CT, Wagner S, Williams G, Schachner M, Dityatev A (2001) Potentiated amygdaloid auditory-evoked potentials and freezing behavior after fear conditioning in mice. *Brain Res* 919:232–241.
- Thomson AM, West DC, Lodge D (1985) An N-methylaspartate receptor-mediated synapse in rat cerebral cortex: a site of action of ketamine? *Nature* 313:479–481.
- Troisi JR (2013) Perhaps More Consideration of Pavlovian–Operant Interaction May Improve the Clinical Efficacy of Behaviorally Based Drug Treatment Programs. *Psychol Rec* 63:863–894.
- Ułtas J, Cotman CW (1993) Excitatory amino acid receptors in schizophrenia. *Schizophr Bull* 19:105–117.
- Umbrecht D, Schmid L, Koller R, Vollenweider FX, Hell D, Javitt DC (2000) Ketamine-induced deficits in auditory and visual context-dependent processing in healthy volunteers: implications for models of cognitive deficits in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 57:1139–1147.
- Uno Y, Coyle JT (2019) Glutamate hypothesis in schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci* 73:204–215.
- van der Kam EL, De Vry J, Tzschentke TM (2009) 2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) potentiates ketamine and heroin reward as assessed by acquisition, extinction, and reinstatement of conditioned place preference in the rat. *Eur J Pharmacol* 606:94–101.
- Venniro M, Mutti A, Chiamulera C (2015) Pharmacological and non-pharmacological factors that regulate the acquisition of ketamine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 232:4505–4514.

- Verma A, Moghaddam B (1996) NMDA receptor antagonists impair prefrontal cortex function as assessed via spatial delayed alternation performance in rats: modulation by dopamine. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 16:373–379.
- Vollmer M, Beitel RE, Schreiner CE, Leake PA (2017) Passive stimulation and behavioral training differentially transform temporal processing in the inferior colliculus and primary auditory cortex. *J Neurophysiol* 117:47–64.
- Weinberger NM, Gold PE, Sternberg DB (1984) Epinephrine enables Pavlovian fear conditioning under anesthesia. *Science* 223:605–607.
- White AM, Roberts DC, Best PJ (2002) Context-specific tolerance to the ataxic effects of alcohol. *Pharmacol Biochem Behav* 72:107–110.
- Williams NR, Heifets BD, Blasey C, Sudheimer K, Pannu J, Pankow H, Hawkins J, Birnbaum J, Lyons DM, Rodriguez CI, Schatzberg AF (2018) Opioid Receptor Antagonism Attenuates Antidepressant Effects of Ketamine. *Am J Psychiatry* 175:1205–1215.
- Wong PT (1985) Abnormalities in glutamatergic mechanisms in human Huntington's disease. *Ann Acad Med Singapore* 14:147–152.
- Wood D, Cottrell A, Baker SC, Southgate J, Harris M, Fulford S, Woodhouse C, Gillatt D (2011) Recreational ketamine: from pleasure to pain. *BJU Int* 107:1881–1884.
- Wu GK, Tao HW, Zhang LI (2011) From elementary synaptic circuits to information processing in primary auditory cortex. *Neurosci Biobehav Rev* 35:2094–2104.
- Zanos P, Gould TD (2018) Mechanisms of Ketamine Action as an Antidepressant. *Mol Psychiatry* 23:801–811.
- Zhang Z, Zhang S, Fu P, Zhang Z, Lin K, Ko JK-S, Yung KK-L (2019) Roles of Glutamate Receptors in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* 20:E4391.

## **6. ANEXOS**

Novelty disrupts primary cortical auditory electrophysiology induced by  
short-term ketamine following context-drug effects association

Roberta Monteiro Incrocci <sup>b</sup>, and Manoel Jorge Nobre <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Psicologia, Uni-FACEF, 14401-135, Franca, SP, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Psicologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Corresponding author: M.J. Nobre (<https://orcid.org/0000-0003-1837-9429>)

FFCLRP, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14090-901, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Phone: 551636023788

Fax: 551636024830

E-mail: [mjnes@usp.br](mailto:mjnes@usp.br)

## Abstract

In the present report, our focus is on the effects of one low and one higher dose of ketamine on the field potentials recorded in the primary auditory cortex (AC) of rats, measured as changes in latency and auditory evoked potentials (AEPs). For this, one bipolar stainless-steel enameled wire twisted electrode was aimed at the primary auditory cortex (AC) to determine the influence of drug effects-context pairing on the expression of a physiological response. We found that an anesthetic dose of ketamine (but not a low dose) can induce associative learning when the animals are tested twenty-four hours after the last conditioning session. On the other hand, a rebound enhancement of AEPs following exposure to the non-related drug environment ensues, probably due to the loss of tolerance to ketamine effects promoted by exposure to novelty. The findings of the present study are in agreement with previous research demonstrating that the repeated pairing of ketamine effects with contextual cues can lead to an enhancement of the response, with tolerance to drug effects being expressed when such cues are not present.

## 1. Introduction

Seventy years ago, Parke-Davis industries were looking for an ultimate anesthetic agent with analgesic properties combined with hypnotic-producing effects, in the absence of significant cardiovascular and respiratory depression and behavioral toxicity, as well (Corssen and Domino, 1966). From these drugs, CI-400 also known as ketamine (N-ethyl-1-phenyl-cyclohexamine chlorhydrate) showed to be preferred over its precursor CI-395 also known as phencyclidine or PCP (phencyclidine or N-1-phenyl-cyclohexyl-piperidine [PCP] chlorhydrate). Overall, although both drugs induce severe psychodysleptic disturbances, including vivid dreams, hallucinations — sometimes involving outer space experiences —, ketamine showed lower and shorter outcomes than PCP. Since then, due to its reinforcing and rewarding side-effects, the non-medical use of ketamine has grown progressively worldwide with the drug becoming increasingly popular (Weiner et al., 2000; Sassano-Higgins et al., 2016).

Pharmacologically, ketamine is a non-competitive N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptors antagonist with strong dissociative and sedative anesthetic properties whose administration elicits sensory, cognitive, and motor disturbances, and memory deficits (Tricklebank et al., 1989; Carlsson, 1993; Imre et al., 2006; Kos et al., 2006; Morgan and Curran, 2006), besides the severe risk of drug misuse (Lim, 2003; Trujillo et al., 2011; Sassano-Higgins et al., 2016). Aside from the effect on behavior and cognitive function, it has been shown that ketamine can disturb auditory evoked potentials (AEPs) in a way consistent with schizophrenia (Maxwell et al., 2006); an effect probably related to the sensory overload resulting from the weakening of the inhibitory cortical top-down control on the mesencephalic bottom-up processes, resulting in the induction of psychotic-like symptoms (Powers et al., 2015). In humans, these auditory hallucinations are reputed to be due to functional and/or structural abnormalities in several regions of the brain auditory

system, among them the inferior colliculus (Martinez-Granados et al., 2014), and the frontal and temporal cortex (Lennox et al., 2000).

In the midbrain, it has been suggested that ketamine changes primarily auditory signaling by disrupting electrophysiological responses recorded in the auditory colliculi (Incrocci et al., 2018), the most important relay involved in several aspects of behavior as sound-oriented action (Blackwell et al., 2020), emotionality (Brandão et al., 2003), and personality (Martinez-Granados et al., 2014). The influence of the inferior colliculus on ascending auditory information seems to be under modulation of the auditory cortex (AC) (Blackwell et al., 2020) and the primary AC undergoes neuroplasticity that modulates the emotional features of auditory information (Recanzone et al., 1993; McGann, 2015). Therefore, it is expected that context-dependent changes on cortical AEPs ensue following associative learning induced by repeated ketamine administration, a drug that shares the ability to increase the risk of dependence by eliciting unconditioned craving and withdrawal responses (Chatterjee et al., 2011; Walgren et al., 2014; Chen et al., 2020). Notably, impairments in learning and memory processing have long been associated with chronic ketamine use (Liu et al., 2016). Therefore, given that the ability of ketamine to induce electrophysiological impairments in the auditory system, in the present report we drive our efforts to the study of the electrophysiological responses induced downstream the inferior colliculus, precisely at the primary auditory cortex of albino rats, following exposure of the subjects to an associative learning procedure using ketamine effects and environmental cues as main independent variables. In this regard, auditory conditioning to a tone predicting rewarding or punishing has been previously reported (Recanzone et al., 1993; Rutkowski and Weinberger, 2005; Bieszczad and Weinberger, 2012; Leon et al., 2017). However, in the present study, our focus is on the learned conditioned tolerance to

the effects of ketamine, measured as changes in latency and AEPs amplitude, recorded in the AC of rats previously submitted to a drug/context association.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Animals and housing conditions*

Forty-four male Sprague-Dawley rats, weighing 220 g ( $\pm 10$  g) at the beginning of the experiments, were used. From this total, 7 animals were discarded from the AEPs experiment due to problems in the assessment of electrophysiological signals. They were retained in groups of four animals per cage under controlled conditions ( $22 \pm 1$  °C, 12 h light/12 h dark cycles) and fed with standard diet pellets (Labmix, Brazil) and tap water. The study was reviewed and approved by the Committee on Animal Research and Ethics (CEUA) of the University of São Paulo (protocol no. 18.5.300.59.0). To keep with accepted practice, animal stress and suffering were minimized through averting social isolation, the maintenance of adequate low levels of ambient light and noise, preventing fluctuations of temperature and humidity, besides periodic facility cleaning. We use the subcutaneous injection considering that animal wellbeing is enhanced by this route of administration because it may cause less distress and does not involve turning the animal on its back. Besides, using the subcutaneous route, we obviate the risk of puncture of abdominal organs (Turner et al., 2011; Levin-Arama et al., 2016).

### *2.2. Drugs.*

Drugs used were ketamine hydrochloride (10 and 80 mg/kg, Cetamin-Syntec, Brasil), the voltage-gated Na<sup>+</sup> channels blocker lidocaine (10 mg/kg - Lidostesim, Densply, Brazil), the  $\alpha 2$  adrenergic receptor agonist xylazine (10 mg/kg – Calmiun, Agener, Brazil), the nonsteroidal anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic drug flunixin (2.5 mg/kg - Banamine (meglumine salt), MSD, Brazil). Phosphate-buffer saline served as a vehicle. The doses of drugs used were based on a previous study (Incrocci et al., 2018).

### 2.3. *Implant surgery.*

For the recording of the extracellular field potentials, one bipolar twisted electrode (12.0 mm length), made of stainless-steel enameled wires (Plastic-One products, Roanoke, VA, USA), 150 $\mu$ m in diameter, insulated except at the cross-section of the tip, was aimed at the primary AC ( $-4.16$  mm anteroposterior,  $\pm 3.0$  mm lateral,  $-5.0$  mm deep, relative to bregma) (Paxinos and Watson, 1986), using an angulation of  $30^\circ$ .

Animals were anesthetized with a mix of 100 mg/kg ketamine + 4.5 mg/kg xylazine and fixed in a digital stereotaxic frame. Lidocaine (20 mg/ml) was injected around the surgical field as a local complement to general anesthesia. A 1.5 mm diameter craniotomy was made at the stereotaxic coordinates informed and sealed with acrylic resin and the three stainless steel screws. At the end of the surgery, each animal received an intramuscular injection of a veterinary pentabiotic (120.000 UI, 0.2 ml) followed by an intraperitoneal injection of the anti-inflammatory and analgesic drug Banamine (flunixin meglumine, 2.5 mg/kg). The animals were allowed four days of post-surgery recovery.

### 2.4. *Set-up, stimulus generation, and AEPs recording*

An experimental cage (external dimensions: 19 cm  $\times$  9 cm  $\times$  9 cm; internal dimensions: 16 cm  $\times$  6 cm  $\times$  7 cm) located inside a Faraday insulated system fitted at the interior walls of a ventilated plywood sound-attenuating chamber (64  $\times$  60  $\times$  40 cm) was used. The floor of the cage consisted of six 3.0 mm diameter stainless steel bars spaced 1.0 mm apart. A 7.5W red LED, positioned at the ceiling of the chamber, was switched on during test sessions. A fan, located behind the cage, 20 cm above the floor, delivered continuous background noise (55 dB sound pressure level). Acoustic stimuli were delivered via two piezoelectric speakers (12 $\Omega$ , 200 W, LeSon, Brazil) mounted on each side of the lateral walls of the sound-insulating chamber (20 cm above the floor and 22 cm distant from the experimental cage), placed orthogonal to the bottom wall. Software and an

appropriate interface (Lynx, São Paulo, Brazil) controlled the presentation and sequencing of the acoustic stimuli. Sound pressure levels were measured at the level of the ears of the animals using a 0.125-in. microphone and a type 2636 measuring amplifier DK-2580 (Bruel and Kjaer, Naerum, Denmark). The animals were previously habituated to the behavioral restraining of the experimental cage — which limited their movements except for a small gap — until that the aversive effects of the restriction ceased. The experimental cage was placed in the middle of the Faraday cage, centered exactly between the two piezoelectric speakers to ensure equivalent sensitivities during sessions. This assembly was named context A. When necessary, context A was converted into context B through insertion into the Faraday cage of a black/white Plexiglas striped square-like structure (40 cm) that just partially covered the interior walls of the apparatus; to avoid blocking sound emission by tweeters, the camera vision, the red-light bulb, and the stimulation cable hanging from the ceiling of the cage. The methods used in the present experiment were based on previous studies using context variations to examine some features of the context-drug effects association on rat's behavior ([Crombag et al., 2008](#); [George and Koob, 2011](#); [Khoo et al., 2017](#); [Incrocci et al., 2018](#); [Paliarin et al., 2018](#); [Silva-Cardoso and Nobre, 2021](#)).

Ketamine administration and AEPs recording parameters were comparable to previous studies ([Nobre, 2013](#); [Incrocci et al., 2018](#)). Briefly, the very small electrical voltage AEPs were recorded from electrodes unilaterally implanted in the AC. Stimuli were pure tone clicks (50 ms duration; 3000 Hz square-wave pulses, 95 dB sound pressure level). AEPs were recorded after each of the 50 auditory stimuli as the voltage difference between the tips of the bipolar electrode (150 $\mu$ m). This voltage difference was fed into an amplifier (TX001, Lynx, São Paulo, Brasil) through two noiseless shielded cables linked to a double-brush electric swivel (SL2C, Plastics-One, USA) going through a hole in the roof

of the Faraday cage. The output of the amplifier was connected to an analog/digital converter (CAD 12/36) plugged into a PC. Local field potentials were sampled at a rate of 0.33 kHz and filtered (high-pass filter, 20 Hz, low-pass filter, 200 Hz). Filtering, amplification, and digitalization of the signals were performed by Sysdin system software (Lynx, São Paulo, Brazil). Sysdin software was set to sum up individual AEPs amplitudes. Average values were obtained at the end of the sessions. The data-acquisition sweep began 10 ms before the onset of the sound stimulus (latency to switch on the sound plus sound propagation) and continued until 100 ms after its termination. During the experiments, the animals were monitored via a video camera system mounted in the experimental room. Amplitudes were measured as the voltage between successive peaks (the negative (N1) and the positive (P1) potentials), based on the study of [Hidisoglu and Yargicoglu \(2020\)](#). Data recording was checked on the computer screen. The computer output was graphically displayed on an XY plotter (Hewlett-Packard 1100, Palo Alto, CA, USA). AEPs data were stored on a computer hard disc and transferred to Microsoft Excel (Microsoft Corp., Mountain View, CA, USA) tables for offline visualization and analysis.

### *2.5. Experimental Procedure*

This experiment aims to determine the influence of drug effects-context pairing on the expression of learned conditioned tolerance of a physiological response. Independent groups of rats were used to evaluate the impact of short-term ketamine administration on the AEPs recorded in the AC. This was necessary to avoid possible learned aversive arousal induced by exposure to continuous AEP stimuli. Groups were as follows: Control AA (n=6), Control AB (n=5), ketamine 10 AA (n=6), ketamine 10 AB (n=7), ketamine 80 AA (n=8), and ketamine 80 AB (n=5). Overall, the experiment was divided into three phases: a) habituation to the experimental apparatus, b) conditioning (context-drug effects

association, and c) the test phase, where the influence of conditioning on cortical AEPs was put to the test.

*Habituation:* To avoid the influence of the testing-room environment on the electrophysiological response, the animals were submitted, one at a time, to three daily sessions of 60 minutes of a habituation period. Habituation was initiated one day after the surgery.

*Conditioning:* Training started one day after ended habituation. Animals received a subcutaneous injection of vehicle or ketamine (10 or 80 mg/kg). Soon after, the animal was placed in context A. Conditioning sessions were 60 minutes in duration along four days. At the end of each session urine and feces were removed and the apparatus was cleaned with a damp cloth (20% ethyl alcohol) followed by a dry tissue.

*Test session:* Twenty-four hours after the last conditioning trial, three groups of animals were tested in the same context where conditioning was performed (control, ketamine 10, and ketamine 80 — conditioning in context A, and test in context A). Three additional groups were tested in a different environment from that one of conditioning (control, ketamine 10, and ketamine 80 — conditioning in context A, and test in context B). Therefore, tests were performed in the absence of drug effects.

## 2.6. Euthanasia and histology

Upon completion of the experiments, the animals were deeply anesthetized with an overdose of ketamine (225 mg/kg) + Xylazine (30 mg/kg) and perfused intracardially with PBS (0.1 M) followed by a paraformaldehyde solution (4%). Brains were removed and maintained in paraformaldehyde for 4 h, and later immersed in sucrose solution (30%). After 7 days, the brains were frozen. Serial 60µm frontal brain sections were collected and stained with neutral red to localize the actual recording sites, which were drawn on corresponding planes of the [Paxinos and Watson's atlas \(2008\)](#) (Figure 1).

## 2.8. Statistics

A representative cortical AEPs amplitude averaged across 50 trials is showed in [Figure 2](#). The data are exhibited as mean  $\pm$  SEM. Due to problems in normality criteria, AEPs data were standardized using the square root of the raw values and analyzed with a two-way analysis of variance (ANOVA), in a treatment (vehicle/ketamine dosages)  $\times$  condition (AA/AB) design. The percentage of changes induced by treatments (control  $\times$  ketamine dosages) was evaluated with a one-way ANOVA. In the absence of significant interaction between factors, follow-up analyses were conducted with a two-way ANOVA for each condition of the test (AA, and AB). In the case of a statistically significant difference have been found, we performed a Tukey post-hoc comparisons for unequal N. Pairwise comparisons (AA  $\times$  AB) were done with a two-tailed independent t-test, for each dose of ketamine. Main differences in latency were analyzed with a two-way ANOVA followed by HSD-Tukey for unequal N. A probability of  $\leq 5\%$  was considered statistically significant. The statistical analysis was performed using STATISTICA Application (StatSoft, Inc., version 12.5, Palo Alto, CA, USA).

## 3. Results

Waves of AEPs recorded from AC of rats submitted to two doses of ketamine are represented in [Figure 3](#). Two-way ANOVA points out a significant difference between treatments ( $F_{2,1}=14.34$ ;  $p<0.0001$ ), and significant differences on factor condition of test (drug pairing  $\times$  non-drug pairing context:  $F_{1,2}=4.29$ ;  $p=0.057$ ). A significant interaction between these factors was not found ( $F_{2,31}=2.03$ ;  $p=0.15$ ) ([Figure 4](#)). One-way ANOVA showed that ketamine 80 mg/kg significantly increase the percentage of cortical AEPs ( $F_{2,14}=3.09$ ;  $p=0,47$ ) ([Figure 4, inset](#)). Post-hoc analysis revealed that ketamine 80 mg/kg increases the AEPs amplitude, compared with the other groups. In follow-up comparisons,

two-way ANOVA stressed the main difference between treatments, considering the dose of 10 mg/kg of ketamine ( $F_{1,1}=12.72$ ;  $p<0.005$ ) (Figure 5A). No changes were found on condition ( $F_{1,1}=0.33$ ;  $p=0.57$ ) and even interaction between factors, as well ( $F_{1,20}=0.05$ ;  $p=0.82$ ). A two-tailed t-test revealed that the mean percentage of cortical AEPs between control and ketamine 10 groups was similar ( $t_{11}=0.22$ ;  $p=0.87$ ) (Figure 5A, inset).

Considering the dose of 80 mg/kg of ketamine, two-way ANOVA revealed significant differences on treatment factor ( $F_{1,1}=32.14$ ;  $p<0.0001$ ), and condition ( $F_{1,1}=5.10$ ;  $p=0.035$ ), in the absence of significant interaction ( $F_{1,20}=3.69$ ;  $p=0.069$ ) (Figure 5B). Two-tailed t-test showed that the percentage of cortical AEPs is increased by ketamine 80 mg/kg in the A×B context, comparing with the data found in the A×A context ( $t_{11}=2.25$ ;  $p=0.046$ ) (Figure 5B, inset). Two-way ANOVA applied on data from latency pointed out significant differences among groups ( $F_{2,1}=6.76$ ;  $p<0.005$ ) but not on condition of test ( $F_{1,1}=0.029$ ;  $p=0.87$ ), or interaction between factors ( $F_{2,31}=1.95$ ;  $p=0.16$ ). Tukey post-hoc showed that exposure to a novel environment (B) decreases P2 peak latency of KET 80 mg/kg pre-treated group, compared with data from the control group.

#### 4. Discussion

Auditory-evoked potentials (AEPs) are used in a broad range of pharmacological, neuropharmacological, physiological, and behavioral studies in laboratory animals and humans (Schlör et al., 1985; Boutros et al., 1997; Brandao et al., 2001; Plourde, 2006; Stone et al., 2009; Washnik et al., 2019; Hidisoglu and Yargicoglu, 2020). We had previously demonstrated that the auditory sensory processing, at the level of the inferior colliculus, is clearly disturbed by ketamine effects and withdrawal (Incrocci et al., 2018). The inferior colliculus is the first great relay of the auditory information that travels toward the auditory cortex, a brain region reputed to be central to sensory and cognitive functions,

including those that parallel the animal's emotional experience with sound, as the auditory learned response following conditioning (Diamond and Weinberger, 1986; Bakin and Weinberger, 1990; Kisley and Gerstein, 1999; Gao and Suga, 2000; Tzounopoulos and Leão, 2012).

It has been proved that the dose of 10 mg/kg of ketamine easily induces conditioned place preference (Suzuki et al., 1999, 2000; Gao et al., 2003) since ketamine, like other drugs of abuse, can control behavior in the same way as natural reinforcers do (Di Chiara and North, 1992; Koob, 1992; Grigson, 2002). On the other hand, little has been shown concerning the development of overt and covert learned responses following conditioning with higher ketamine dosages; including those related to cortical electrophysiology. In the present study, we drove our efforts to evaluate the possible development of conditioned learned electrophysiological responses in the ultimate brain region of the auditory system, the primary auditory cortex (AC), following short-term context/drug effects association induced by one lower stimulatory dose, and one higher anesthetic dose of ketamine. It was expected that, with the use of such a conditioning procedure, where contextual cues were associated with the most effective dose of ketamine to favor conditioning, an increase in the electrophysiological response of the auditory cortex ensued. Our data highlight that ketamine enhances AEPs amplitude, mainly with the dose of 80 mg/kg, as revealed by the increase in the percentage of AEPs amplitude; although the dose of 10 mg/kg has also increased electrophysiological potentials, it proved to be non-significant. Moreover, changes in AEPs induced by ketamine 80 mg/kg were greatly facilitated when auditory stimulation was performed in a non-drug effect-related environment.

Besides acts as a reinforcer (Lim, 2003; Liu et al., 2016), ketamine administration is also considered a valid human model of psychosis since it elicits psychotic-like symptoms in normal controls and exacerbates specific symptoms of schizophrenia in

psychotic patients (Lahti et al., 1995, 2001). Therefore, identifying the neural substrates of learning and memory is essential in the study of the neuroscience of several mental disorders as drug abuse and schizophrenia.

Ketamine 10 mg/kg lightly enhances AEPs but this increase is similar no matter the test session was performed in context A or B. Hence, contrary to noticeable conditioned behavioral responses elicited by low doses of ketamine (Xu et al., 2006; Li et al., 2008; Du et al., 2017; Silva-Cardoso and Nobre, 2021), at the electrophysiological level the influence of the same doses on the potentials evoked in the auditory cortex was insignificant. This ability of ketamine to induce preference behavior but not changes on the AEPs amplitude following Pavlovian conditioning may establish the limits between the behavioral reinforcing per se, and the physiological changes responsible for the compulsive maintenance of drug-oriented behaviors. This assumption sounds plausible since sensory systems, including the auditory cortex, have usually been recognized as mere ‘stimulus analyzers’ (Weinberger, 2004). Indeed, early studies have consistently described learning-induced plasticity in this brain region. For instance, electrophysiological changes can be observed in the brain of cats when animals are conditioned and extinguished to an auditory stimulus. In other words, larger evoked auditory responses related to conditioning can be reliably recorded in several brain regions, as the primary auditory cortex (Galambos et al., 1956). More importantly, the study of Carrascal et al. (1990), — where the metabolic activity in the auditory cortex was measure after associative learning using food as reinforcer —, showed that changes in the activity in the AC are quite dependent on what they call “the behavioral meaning of the stimulus”. This is in line with our findings where the amplitude, and latency, of AEPs, are increased after a conditioning procedure where contextual cues previously paired with the effects of an anesthetic dose of ketamine were used as the conditioned stimuli. Therefore, the previous association of a higher dose of

ketamine with environmental cues was able to enhance AEPs in the AC when the animals were later tested in the absence of the ketamine effects.

Our data points out that an anesthetic dose of ketamine can change the cortical electrophysiology of the AC through associative learning. At this step, one main point to take into consideration is how ketamine can induce associative learning in rats under sedation, supposing that be awake is a condition necessary for someone to learning something. With regard to this point, studies on this subject highlight that, a subset of neurons in the medial prefrontal cortex have increased activity during CS+ but not CS- presentation after olfactory discrimination learning under anesthesia ([Laviolette et al., 2005](#); [Laviolette and Grace, 2006](#)). This increase is only observed in neurons that receive functional input from the basolateral nucleus of the amygdala, being blocked by BLA inactivation, suggesting that BLA is involved in mediating discrimination learning under anesthesia ([McDonald, 1991](#); [McDonald et al., 1996](#)).

About the AC, less has been discussed but our data support its role on discriminative learning considering that stimuli that acquire behavioral significance (as drug-related cues) gain increased representation in the cortex, including the AC. Therefore, the influence of basolateral amygdala nuclei on the AC function may be on the strengthening of memory, accomplished in part by increasing the representation of an environmental stimulus ([Weinberger, 2007](#)). This memory strengthening can be attributed to the influence of the auditory thalamic nuclei in the cholinergic neurons of the nucleus basalis which in turn releases acetylcholine in the AC, promoting the long-term storage of information ([Chavez et al., 2009](#)). Indeed, acetylcholine release is a critical component for plasticity in the AC ([Leach et al., 2013](#)), and auditory classical conditioning causes a specific increase in acetylcholine in the AC ([Butt et al., 2009](#)). Importantly for the present report, ketamine is a singular anesthetic agent that does not share the mechanistic

frameworks of other anesthetic-induced unconsciousness since it enhances higher frequency electrophysiological activity (Maksimow et al., 2006; Lee et al., 2013).

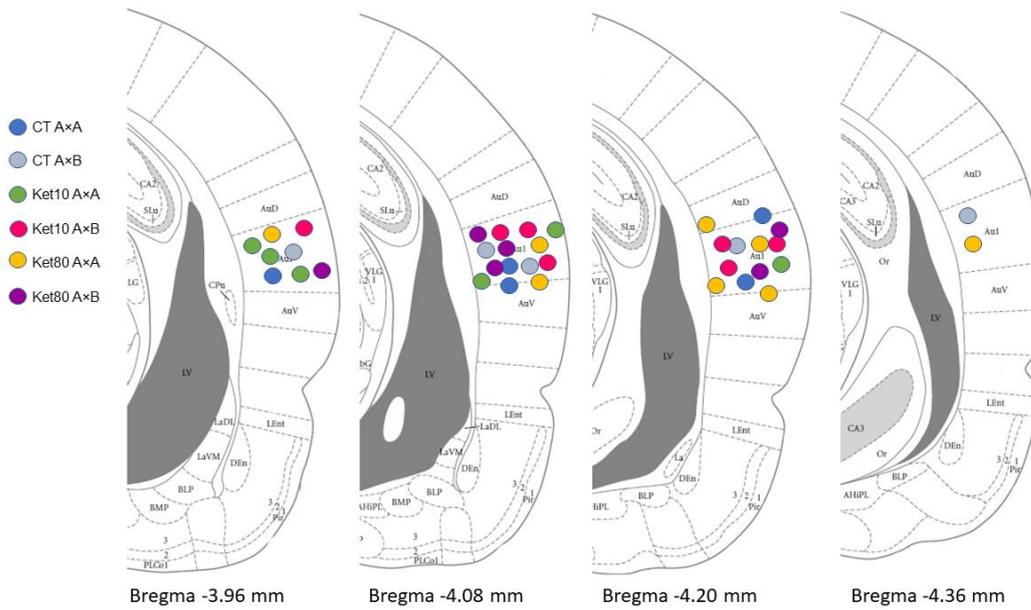
Moreover, ketamine-induced unconsciousness is followed by an increased cholinergic tone in the prefrontal cortex. Although nothing has been proved regarding the AC, a possible role of acetylcholine on the learned AEPs rebound in this cortical region, as saw in our study, cannot be ruled out.

Overall, our data point out that an anesthetic dose of ketamine (but not a low dose) can induce associative learning in rats. When tested twenty-four hours after the last conditioning session, an enhancement in the evoked potentials amplitude is noted in the AC of rats conditioned with 80 mg/kg of ketamine. However, a rebound enhancement of AEPs following exposure to the non-related drug environment ensues, probably due to the loss of tolerance to ketamine effects promoted by exposure to novelty. This form of compensatory response has already been described in a previous study (Incrocci et al., 2018) in other structures of the auditory system and seems to be on the basis for the appearance of withdrawal symptoms induced by drug-related cues (Woods and Ramsay, 2000). Therefore, the findings of the present study are in agreement with previous research demonstrating that the repeated pairing of drug effects with contextual cues can lead to a tolerance to drug effects that are maximally expressed when such cues are present (Le et al., 1979; Thiele et al., 1998).

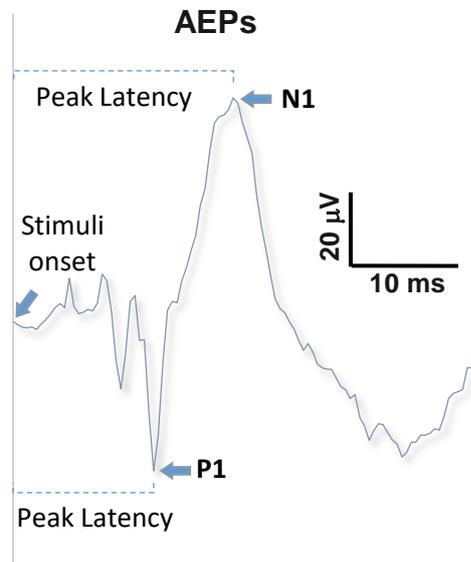
The data discussed so far can be interpreted with care, considering some drawbacks of our experiments. First, the AEPs amplitude can vary significantly according to the position of the electrode tip. In the pivotal study of Simpson & Knight (1993). In rats, the authors suggest that the AEPs produced by AC are largely circumscribed to the lateral skull, with fewer contributions from the dorsal skull or vertex. Although we have only considered for the present study the data collected from electrodes localized inside the

lateral field of the AC, the same is not true regarding the depth of the electrode tip which strongly influences the amplitude of field potentials. The number of animals used was also a source of variability since the groups are not equal; nonetheless, the treatment of data before statistical analysis aims to reduce such a bias. Finally, we are comparing the data collected from awake animals with those under sedation and this is also a source of bias considering the high amplitude of noise-induced muscle potentials can mask the low amplitude of AEPs.

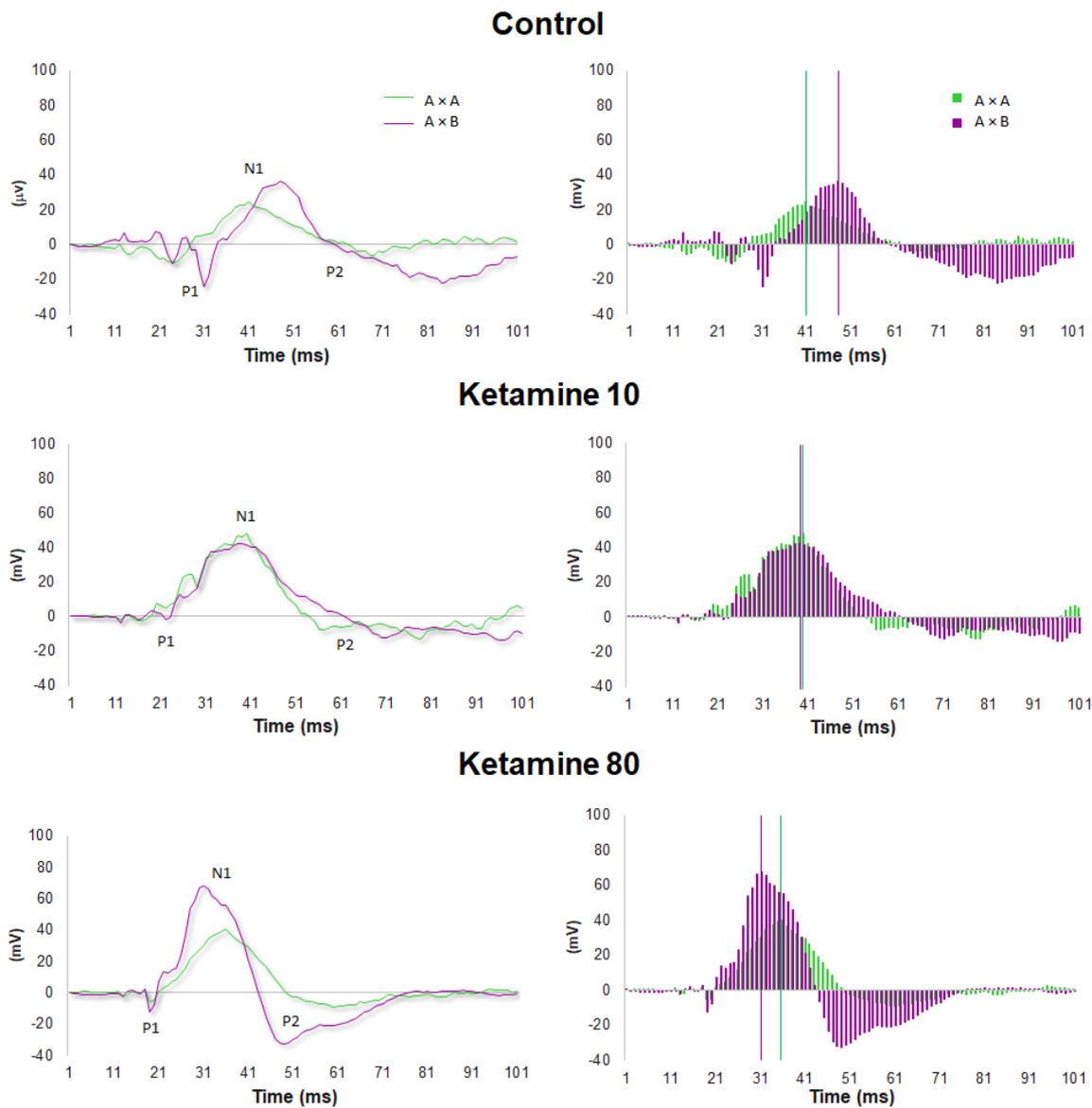
## FIGURES AND LEGENDS



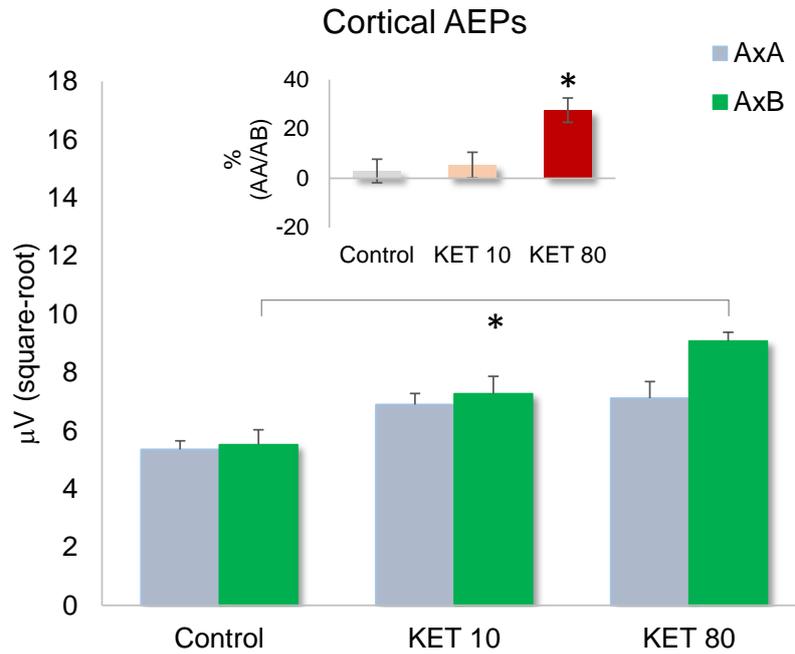
**Figure 1.** The figure represents the sites of placements of electrodes in the primary auditory cortex (Au1) according with the atlas of (Paxinos and Watson, 2008). Six independent groups were used, with two doses of ketamine being challenged with vehicle in two conditions: A×A - drug training in A, test in A. A×B: drug training in A, test in B.



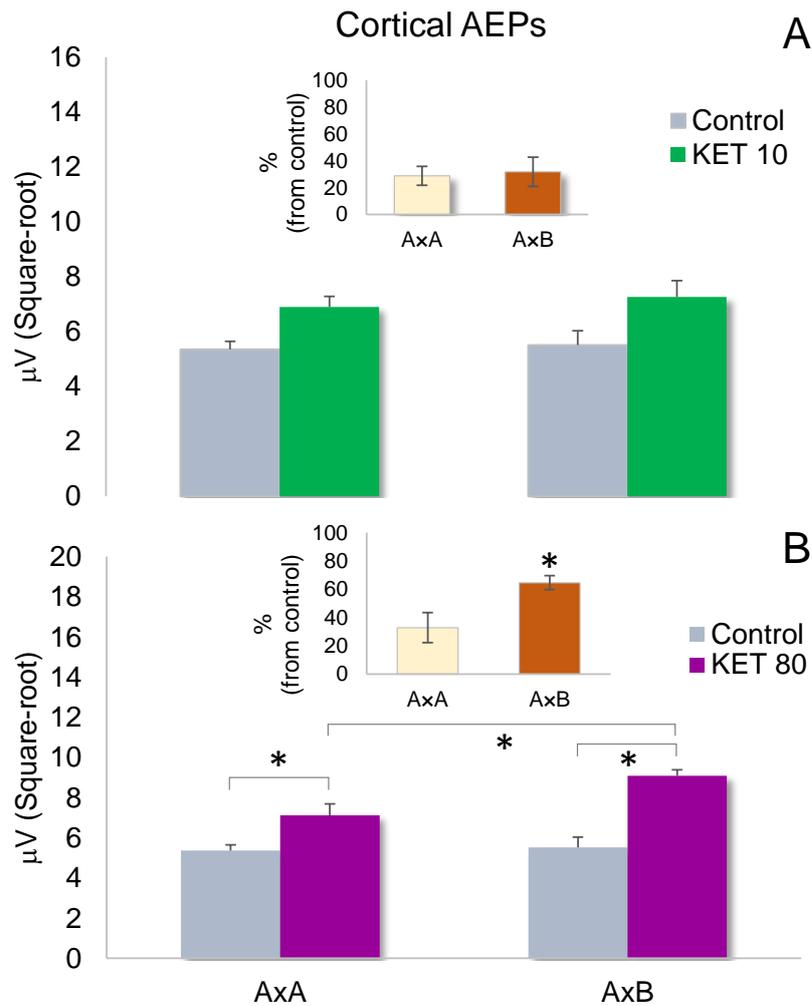
**Figure 2.** Representative auditory evoked potentials (AEPs) averaged across 50 trials were a square wave 3kHz auditory stimuli (95 dB intensity, 50 ms in duration, 0.33 Hz frequency of stimuli presentation) was presented. Arrows identify the auditory stimuli onset, and the peaks of N1 and P2 components. Calibration bars: 10 ms (X-axis) and 20  $\mu\text{V}$  (Y-axis).



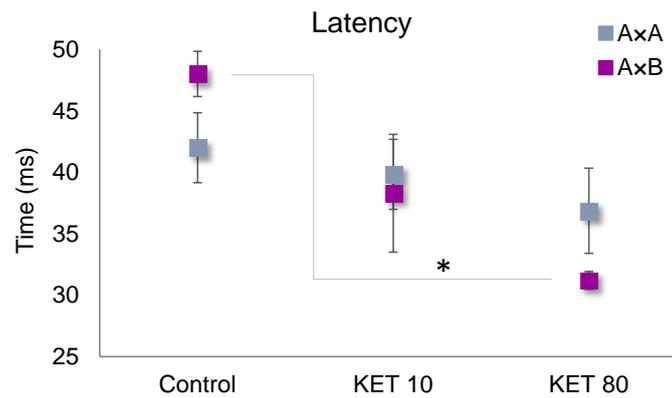
**Figure 3.** The amplitude of AEPs in ketamine pre-treated rats recorded in awake animals tested in the absence of the drug effects in two conditions: A×A means that the drug training was performed in context A, with the test occurring in the same context. A×B means that the drug training was performed in context A, while the test trials have been realized in context B. Amplitudes are shown as the average of 50 auditory stimuli (3 kHz, 50 ms, 0.33 Hz frequency of presentation). Amplitudes were measured as the voltage between successive peaks. Measurements were made on one negative (N1) and two positive (P1, P2) potentials. Eight independent groups and two doses of ketamine were used. Raw (left) and superimposed (right) AEPs recorded in the AC are shown.



**Figure 4.** Exposure to a non-experienced drug-effects environment increases the electrophysiological response in the AC of rats previously conditioned with ketamine in a context-drug effect pairing procedure. Data were normalized before submitted to a two-way ANOVA and are presented as the Mean  $\pm$  SEM. Insets: percentage of changes in cortical AEPs induced by two ketamine dosages. In this case, one-way ANOVA was used. Post-hoc comparisons were performed with the HSD Tukey-Kramer test for unequal N. Probability of significance was settled at 5%.



**Figure 5.** Exposure to a non-experienced drug-effects environment increases the electrophysiological response in the AC of rats previously conditioned with ketamine in a context-drug effects pairing procedure. Above is shown the influence of ketamine 10 mg/kg on later assessment of the cortical AEPs. Below, is the data related to the effects of ketamine 80 mg/kg. A×B: drug training in A, test in B. A×A: drug training in A, test in A). Data were normalized before submitted to one-way ANOVA and are presented as the Mean ± SEM. Insets: percentage of changes in cortical AEPs induced by ketamine. Statistical comparisons were performed with the t-test (unpaired). Post-hoc analysis was realized with the HSD Tukey-Kramer test for unequal N. Probability of significance was settled at 5%.



**Figure 6.** Exposure to a non-experienced drug-effects environment decreases the P2 peak latency response in the AC of rats previously conditioned with ketamine in a context-drug effects pairing procedure. A×B: drug training in A, test in B. A×A: drug training in A, test in A). Raw latency measures were submitted to a two-way ANOVA and are presented as the Mean ± SEM, followed by HSD Tukey-Kramer test for unequal N. The level of P was settled at 5%.

## References

- Bakin JS, Weinberger NM (1990) Classical conditioning induces CS-specific receptive field plasticity in the auditory cortex of the guinea pig. *Brain Research* 536:271–286.
- Bieszczad KM, Weinberger NM (2012) Extinction reveals that primary sensory cortex predicts reinforcement outcome. *Eur J Neurosci* 35:598–613.
- Blackwell JM, Lesicko AM, Rao W, De Biasi M, Geffen MN (2020) Auditory cortex shapes sound responses in the inferior colliculus. *Elife* 9.
- Boutros N, Nasrallah H, Leighty R, Torello M, Tuetting P, Olson S (1997) Auditory evoked potentials, clinical vs. research applications. *Psychiatry research* 69:183–195.
- Brandao ML, Coimbra NC, Osaki MY (2001) Changes in the auditory-evoked potentials induced by fear-evoking stimulations. *Physiol Behav* 72:365–372.
- Brandao ML, Troncoso AC, de Souza Silva MA, Huston JP (2003) The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. *Eur J Pharmacol* 463:225–233.
- Butt AE, Chavez CM, Flesher MM, Kinney-Hurd BL, Araujo GC, Miasnikov AA, Weinberger NM (2009) Association learning-dependent increases in acetylcholine release in the rat auditory cortex during auditory classical conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory* 92:400–409.
- Carlsson ML (1993) Are the disparate pharmacological profiles of competitive and uncompetitive NMDA antagonists due to different baseline activities of distinct glutamatergic pathways? (Hypothesis). *Journal of neural transmission General section* 94:1–10.
- Carrascal E, Ortin A, Collia F, Arévalo M (1990) Metabolic activity changes in auditory system of the rat during associative learning. *New Trends in Experimental & Clinical Psychiatry* 6:53–63.
- Chatterjee M, Ganguly S, Srivastava M, Palit G (2011) Effect of “chronic” versus “acute” ketamine administration and its “withdrawal” effect on behavioural alterations in mice: implications for experimental psychosis. *Behavioural brain research* 216:247–254.
- Chavez CM, McGaugh JL, Weinberger NM (2009) The basolateral amygdala modulates specific sensory memory representations in the cerebral cortex. *Neurobiol Learn Mem* 91:382–392.
- Chen L-Y, Chen C-K, Chen C-H, Chang H-M, Huang M-C, Xu K (2020) Association of Craving and Depressive Symptoms in Ketamine-Dependent Patients Undergoing Withdrawal Treatment. *Am J Addict* 29:43–50.
- Corssen G, Domino EF (1966) Dissociative Anesthesia: Further Pharmacologic Studies and First Clinical Experience with the Phencyclidine Derivative CI-581. *Anesthesia & Analgesia* 45:29–40.

- Crombag HS, Bossert JM, Koya E, Shaham Y (2008) Review. Context-induced relapse to drug seeking: a review. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:3233–3243.
- Di Chiara G, North RA (1992) Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacol Sci* 13:185–193.
- Diamond DM, Weinberger NM (1986) Classical conditioning rapidly induces specific changes in frequency receptive fields of single neurons in secondary and ventral ectosylvian auditory cortical fields. *Brain Research* 372:357–360.
- Du Y, Du L, Cao J, Hölscher C, Feng Y, Su H, Wang Y, Yun K-M (2017) Levo-tetrahydropalmatine inhibits the acquisition of ketamine-induced conditioned place preference by regulating the expression of ERK and CREB phosphorylation in rats. *Behav Brain Res* 317:367–373.
- Galambos R, Sheatz G, Vernier VG (1956) Electrophysiological correlates of a conditioned response in cats. *Science* 123:376–377.
- Gao C, Chen LW, Chen J, Xu XJ, Chi ZQ (2003) Ohmefentanyl stereoisomers induce changes of CREB phosphorylation in hippocampus of mice in conditioned place preference paradigm. *Cell Research* 13:29–34.
- Gao E, Suga N (2000) Experience-dependent plasticity in the auditory cortex and the inferior colliculus of bats: Role of the corticofugal system. *PNAS* 97:8081–8086.
- George O, Koob GF (2011) Craving, context and the cortex. *Nat Neurosci* 14:409–410.
- Grigson PS (2002) Like drugs for chocolate: separate rewards modulated by common mechanisms? *Physiol Behav* 76:389–395.
- Hisdisoglu E, Yargicoglu P (2020) Auditory evoked potentials might have the potential to serve as early indicators related to amyloid beta peptide toxicity. *Advances in Medical Sciences* 65:223–232.
- Imre G, Fokkema DS, Den Boer JA, Ter Horst GJ (2006) Dose-response characteristics of ketamine effect on locomotion, cognitive function and central neuronal activity. *Brain research bulletin* 69:338–345.
- Incrocci RM, Paliarin F, Nobre MJ (2018) Prelimbic NMDA receptors stimulation mimics the attenuating effects of clozapine on the auditory electrophysiological rebound induced by ketamine withdrawal. *NeuroToxicology* 69:1–10.
- Khoo SY-S, Gibson GD, Prasad AA, McNally GP (2017) How contexts promote and prevent relapse to drug seeking. *Genes Brain Behav* 16:185–204.
- Kisley MA, Gerstein GL (1999) Trial-to-Trial Variability and State-Dependent Modulation of Auditory-Evoked Responses in Cortex. *J Neurosci* 19:10451–10460.
- Koob GF (1992) Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* 13:177–184.

- Kos T, Popik P, Pietraszek M, Schafer D, Danysz W, Dravolina O, Blokhina E, Galankin T, Besspalov AY (2006) Effect of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist MDL 72222 on behaviors induced by ketamine in rats and mice. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 16:297–310.
- Lahti AC, Holcomb HH, Medoff DR, Tamminga CA (1995) Ketamine activates psychosis and alters limbic blood flow in schizophrenia. *Neuroreport* 6:869–872.
- Lahti AC, Weiler MA, Tamara M, Parwani A, Tamminga CA (2001) Effects of Ketamine in Normal and Schizophrenic Volunteers. *Neuropsychopharmacology* 25:455–467.
- Laviolette SR, Grace AA (2006) Cannabinoids Potentiate Emotional Learning Plasticity in Neurons of the Medial Prefrontal Cortex through Basolateral Amygdala Inputs. *J Neurosci* 26:6458–6468.
- Laviolette SR, Lipski WJ, Grace AA (2005) A Subpopulation of Neurons in the Medial Prefrontal Cortex Encodes Emotional Learning with Burst and Frequency Codes through a Dopamine D4 Receptor-Dependent Basolateral Amygdala Input. *J Neurosci* 25:6066–6075.
- Le AD, Poulos CX, Cappell H (1979) Conditioned tolerance to the hypothermic effect of ethyl alcohol. *Science* 206:1109–1110.
- Leach ND, Nodal FR, Cordery PM, King AJ, Bajo VM (2013) Cortical cholinergic input is required for normal auditory perception and experience-dependent plasticity in adult ferrets. *J Neurosci* 33:6659–6671.
- Lee U, Ku S, Noh G, Baek S, Choi B, Mashour GA (2013) Disruption of frontal-parietal communication by ketamine, propofol, and sevoflurane. *Anesthesiology* 118:1264–1275.
- Lennox BR, Park SBG, Medley I, Morris PG, Jones PB (2000) The functional anatomy of auditory hallucinations in schizophrenia. *Psychiatry Research: Neuroimaging* 100:13–20.
- Leon MI, Miasnikov AA, Wright EJ, Weinberger NM (2017) CS-specific modifications of auditory evoked potentials in the behaviorally conditioned rat. *Brain Research* 1670:235–247.
- Levin-Arama M, Abraham L, Waner T, Harmelin A, Steinberg DM, Lahav T, Harlev M (2016) Subcutaneous Compared with Intraperitoneal Ketamine/Xylazine for Anesthesia of Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 55:794–800.
- Li F, Fang Q, Liu Y, Zhao M, Li D, Wang J, Lu L (2008) Cannabinoid CB(1) receptor antagonist rimonabant attenuates reinstatement of ketamine conditioned place preference in rats. *Eur J Pharmacol* 589:122–126.
- Lim DK (2003) Ketamine associated psychedelic effects and dependence. *Singapore medical journal* 44:31–34.
- Liu Y, Lin D, Wu B, Zhou W (2016) Ketamine abuse potential and use disorder. *Brain Res Bull* 126:68–73.
- Machado, A. (2003) *Neuroanatomia Funcional*. 2<sup>o</sup> edição. Editora Atheneu - São Paulo.

- Maksimow A, Särkelä M, Långsjö JW, Salmi E, Kaisti KK, Yli-Hankala A, Hinkka-Yli-Salomäki S, Scheinin H, Jääskeläinen SK (2006) Increase in high frequency EEG activity explains the poor performance of EEG spectral entropy monitor during S-ketamine anesthesia. *Clin Neurophysiol* 117:1660–1668.
- Martinez-Granados B, Martinez-Bisbal MC, Sanjuan J, Aguilar EJ, Marti-Bonmati L, Molla E, Celda B (2014) Study of the inferior colliculus in patients with schizophrenia by magnetic resonance spectroscopy. *Rev Neurol* 59:1–7.
- Maxwell CR, Ehrlichman RS, Liang Y, Trief D, Kaness SJ, Karp J, Siegel SJ (2006) Ketamine produces lasting disruptions in encoding of sensory stimuli. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 316:315–324.
- McDonald AJ (1991) Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. *Neuroscience* 44:1–14.
- Mcdonald AJ, Mascagni F, Guo L (1996) Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience* 71:55–75.
- McGann JP (2015) Associative learning and sensory neuroplasticity: how does it happen and what is it good for? *Learn Mem* 22:567–576.
- Morgan CJ, Curran HV (2006) Acute and chronic effects of ketamine upon human memory: a review. *Psychopharmacology* 188:408–424.
- Nobre MJ (2013) Changes on auditory physiology in response to the inactivation of amygdala nuclei in high anxiety rats expressing learned fear. *Physiology & behavior* 118:80–87.
- Paliarin F, Incrocci RM, Nobre MJ (2018) Behavioral and Auditory Electrophysiological Rebound as a Compensatory Response to the Reinforcing Effects of Morphine. *Neuroscience* 392:66–76.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed. Sydney: Academic Press.
- Plourde G (2006) Auditory evoked potentials. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 20:129–139.
- Powers AR, Gancsos MG, Finn ES, Morgan PT, Corlett PR (2015) Ketamine-Induced Hallucinations. *Psychopathology* 48:376–385.
- Recanzone GH, Schreiner CE, Merzenich MM (1993) Plasticity in the frequency representation of primary auditory cortex following discrimination training in adult owl monkeys. *J Neurosci* 13:87–103.
- Rutkowski RG, Weinberger NM (2005) Encoding of learned importance of sound by magnitude of representational area in primary auditory cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13664–13669.
- Sassano-Higgins S, Baron D, Juarez G, Esmaili N, Gold M (2016) A REVIEW OF KETAMINE ABUSE AND DIVERSION. *Depress Anxiety* 33:718–727.

- Schlör KH, Moises HW, Haas S, Rieger H (1985) Schizophrenia, psychoticism, neuroleptics, and auditory evoked potentials. *Pharmacopsychiatry* 18:293–296.
- Silva-Cardoso GK, Nobre MJ (2021) Context-Specific Tolerance and Pharmacological Changes in the Infralimbic Cortex-Nucleus Accumbens Shell Pathway Evoked by Ketamine. *Neurochem Res.*
- Simpson GV, Knight RT (1993) Multiple brain systems generating the rat auditory evoked potential. I. Characterization of the auditory cortex response. *Brain Res* 602:240–250.
- Stone JL, Calderon-Arnulphi M, Watson KS, Patel K, Mander NS, Suss N, Fino J, Hughes JR (2009) Brainstem Auditory Evoked Potentials—A Review and Modified Studies in Healthy Subjects. *Journal of Clinical Neurophysiology* 26:167–175.
- Suzuki T, Aoki T, Kato H, Yamazaki M, Misawa M (1999) Effects of the 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist ondansetron on the ketamine- and dizocilpine-induced place preferences in mice. *European Journal of Pharmacology* 385:99–102.
- 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 Sci* 67:383–389.
- Thiele TE, Roitman MF, Bernstein IL (1998) Learned tolerance to ethanol-induced c-Fos expression in rats. *Behav Neurosci* 112:193–198.
- Tricklebank MD, Singh L, Oles RJ, Preston C, Iversen SD (1989) The behavioural effects of MK-801: a comparison with antagonists acting non-competitively and competitively at the NMDA receptor. *European journal of pharmacology* 167:127–135.
- Trujillo KA, Smith ML, Sullivan B, Heller CY, Garcia C, Bates M (2011) The neurobehavioral pharmacology of ketamine: implications for drug abuse, addiction, and psychiatric disorders. *ILAR J* 52:366–378.
- Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA (2011) Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 50:600–613.
- Tzounopoulos T, Leão RM (2012) Mechanisms of Memory and Learning in the Auditory System. In: *Synaptic Mechanisms in the Auditory System* (Trussell LO, Popper AN, Fay RR, eds), pp 203–226 Springer Handbook of Auditory Research. New York, NY: Springer. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9517-9\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9517-9_9) [Accessed March 30, 2021].
- Walgren JL, Carfagna MA, Koger D, Sgro M, Kallman MJ (2014) Withdrawal assessment following subchronic oral ketamine administration in *Cynomolgus* macaques. *Drug development research* 75:162–171.
- Washnik NJ, Anjum J, Lundgren K, Phillips S (2019) A Review of the Role of Auditory Evoked Potentials in Mild Traumatic Brain Injury Assessment. *Trends Hear* 23 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6475843/> [Accessed March 30, 2021].

- Weinberger NM (2004) Specific long-term memory traces in primary auditory cortex. *Nature Reviews Neuroscience* 5:279–290.
- Weinberger NM (2007) Associative representational plasticity in the auditory cortex: a synthesis of two disciplines. *Learn Mem* 14:1–16.
- Weiner AL, Vieira L, McKay CA, Bayer MJ (2000) Ketamine abusers presenting to the emergency department: a case series. *The Journal of emergency medicine* 18:447–451.
- Woods SC, Ramsay DS (2000) Pavlovian influences over food and drug intake. *Behav Brain Res* 110:175–182.
- Xu DD, Mo ZX, Yung KKL, Yang Y, Leung Awn (2006) Individual and combined effects of methamphetamine and ketamine on conditioned place preference and NR1 receptor phosphorylation in rats. *Neurosignals* 15:322–331.