

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FFCLRP - DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA**

**Alterações comportamentais e eletrofisiológica subjacentes à expressão  
de preferência e tolerância condicionada ao contexto induzidas por  
 morfina**

**FRANCIELY PALIARIN**

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 - SP**

**2020**

**FRANCIELY PALIARIN**

**Alterações comportamentais e eletrofisiológica subjacentes à expressão  
de preferência e tolerância condicionada ao contexto induzidas por  
morfina**

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 – SP**

**2020**

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.

Paliarin, Franciely

Alterações comportamentais e eletrofisiológica subjacentes à expressão de preferência e tolerância condicionada ao contexto induzidas por morfina

Ribeirão Preto, 2020.

108 p. :

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

Orientador: Nobre, Manoel Jorge.

1. Morfina. 2. Córtex Pré-Frontal. 3. Preferência Condicionada. 4. Potencial Evocado Auditivo.

Nome: PALIARIN, Franciely

Título: Alterações comportamentais e eletrofisiológicas subjacentes à expressão de preferência e tolerância condicionada ao contexto induzidas por morfina

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 : 03/03/2020.

#### **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.

**José Lino Oliveira Bueno (Assessor)** \_\_\_\_\_

Titulação: Professor Titular

Departamento: Departamento de Psicologia

Instituição/Unidade: Universidade de São Paulo/ FFCLRP.

**Julia Maria dos Santos** \_\_\_\_\_

Titulação: Professor Adjunto I

Departamento: Departamento de Fisioterapia

Instituição/Unidade: Faculdade de Educação Física e Fisioterapia/UFU.

**Kelly Jacqueline Barbosa** \_\_\_\_\_

Titulação: Professor Doutor

Departamento: Departamento de Enfermagem

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

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Manoel Jorge Nobre, por ter compartilhado comigo muito mais do que todo seu conhecimento acadêmico, pela orientação sólida e companhia divertida. Por todos os conselhos, os dias em que foi para bancada me ensinar, e por todo incentivo, você é um grande exemplo.

À Renata Ferreira, por todas as técnicas e procedimentos que pacientemente me ensinou, por todos os conselhos e sua grande ajuda, que esse seja só o começo da nossa parceria.

À Roberta Incrocci, por ter se tornado alguém tão importante, obrigada por todo seu tempo me ensinando, pelas inúmeras discussões, mas principalmente, por ter sido a pessoa que mais esteve ao meu lado durante todo esse doutorado, por todos os incentivos e happy-hours em dias que só quem faz PEA sabe o quão necessário é, obrigada por essa parceria na vida e também nos artigos.

À todo mundo que passou/está no laboratório, foi sempre muito divertido partilhar os dias, cafés, almoços e finais de semana com vocês.

À Renata Vicentini, por toda ajuda durante este doutorado.

À todos os amigos que a Psicobio me trouxe, fico feliz em não poder citar nomes devido a grande quantidade de pessoas incríveis que conheci dentro do programa.

À Brisa, Karim, Tamires e Tatiane de tudo que conquistei nesse doutorado, a amizade de vocês com toda certeza é a conquista mais valiosa, obrigada por cuidarem de mim, por estarem sempre presentes e por tudo que pude aprender com vocês.

À Dani, Renata, Monique e Maira por sempre se importarem e me apoiarem, à distância nunca fez eu me sentir longe de vocês, obrigada por se manterem tão importantes na minha vida.

À Carol, Ingrid, Josi, Sara e Marina a amizade de vocês me traz a segurança de que não importa o que aconteça, vamos resolver e rir da situação, não necessariamente nessa ordem.

À Vanessa e Fernanda, que conseguem me mostrar sempre, que não é a presença física que importa, e sim o quanto se está presente mesmo de longe. Obrigada por serem companhia diária mesmo nos anos que nem nos encontramos.

Ao Felipe, meu parça, Camilla, Luciana, Mariana vocês fizeram a minha vida em Ribeirão muito mais feliz.

À toda minha família, pelo apoio, carinho, e boas recepções sempre que volto, por rezarem sempre por mim, é bom saber que tenho sempre para onde voltar.

Ao meu pai Vergínio, por todo seu apoio, confiança e investimento no meu futuro, espero que um dia você se orgulhe.

À minha mãe Neide, nada do que eu escreva aqui será suficiente para demonstrar a minha gratidão a você, a todo apoio e incentivo, obrigada por acreditar tanto em mim, por estar sempre presente, pelas tardes no laboratório comigo quando estava aqui, você é a pessoa mais importante da minha vida.

À Sofia e a Pilicas, razões da minha felicidade, o que me faz sorrir ao chegar em casa mesmo depois de um dia exaustivo, a companhia em tempo integral durante a redação desta tese e principalmente ao sentimento de amor incondicional que me trazem.

À Larissa, que apareceu na minha vida para torná-la leve, por acreditar em mim mais do que eu mesma, você foi imprescindível nessa etapa final, obrigada pelo cuidado diário, por toda sua paciência, incentivo, companheirismo e por todo amor e felicidade que me faz sentir.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram na minha vida, contribuindo de forma direta ou indireta com este trabalho.

Ao CNPQ, CAPES, e FAPESP, pelo apoio financeiro.

“ A Felicidade é um estado  
mental ativado pelo Sistema  
Límbico”

Antonio Damasio

## RESUMO

PALIARIN, F. **Alterações comportamentais e eletrofisiológicas subjacentes à expressão de preferência e tolerância condicionada ao contexto induzidas por morfina**. 2020. 108f. Tese (Doutorado em Psicobiologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Vários fatores contribuem para a transição do uso recreativo para o uso compulsivo de opiáceos, assim como de outras drogas de abuso. Esta mudança se dá em função da característica reforçadora positiva da droga, encontrada nos estágios iniciais da sua utilização, e posteriormente, por sua característica reforçadora negativa alcançada após sua ingestão crônica, momento no qual a droga é ingerida como forma de aliviar os sintomas desagradáveis gerados a cada vez que seu consumo é interrompido. Em indivíduos dependentes, o desejo pela droga, evocado tanto por pistas contextuais ou pelo contexto em si (*craving*), e a abstinência, contribuem fortemente para a manutenção de seu consumo e recaída após um período de abstinência. O sistema encefálico de recompensa tem um papel preponderante na modulação destes comportamentos. Neste sistema, opioides como a morfina, que naturalmente induzem euforia e sensação de relaxamento, dentre outros efeitos, apresentam também a propriedade de induzir sua busca e consumo, após um período prolongado de uso. Consequentemente, esta droga pode modular de forma potente processos associativos ligados à memória e aprendizagem, e fortalecer grandemente a memória associada ao contexto relacionado aos efeitos reforçadores da droga, fenômeno que está subjacente à sua busca compulsiva, mesmo em face de suas consequências notadamente adversas. A técnica de condicionamento de preferência ao lugar pode ser utilizada para simular o desenvolvimento de um estado de dependência, aí incluídas as fases de aquisição, extinção e reestabelecimento (*reinstatement*), o que ressalta sua importância na avaliação dos efeitos da morfina, e outras drogas, na dependência crônica. Esta preferência pode resultar de alterações eletrofisiológicas em áreas encefálicas vinculadas ao controle da resposta motivacional, que se expressaria na capacidade do organismo de filtrar estímulos sensoriais do meio que não tenham caráter relevante, seja durante a expressão de comportamentos motivados relacionados à droga ou à extinção destas memórias. Os potenciais evocados auditivos (PEAs) podem ser modificados por aprendizagem associativa quando surgem respostas compensatórias aprendidas baseando-se na abstinência e recaída da droga. Contudo, embora a modulação tardia cognitiva e atencional do processamento da informação sensorial tenha sido bastante estudada, os mecanismos pré-atentivos que ocorrem nos estágios iniciais do processamento da informação sensorial relacionados ao efeito de drogas e sua associação com o contexto permanecem amplamente inexplorados. Objetivando uma avaliação das possíveis alterações eletrofisiológicas tanto precoce (colículo inferior) quanto tardia (córtex pré-límbico) concomitante à expressão de preferência condicionada ao lugar induzida por morfina e para entender a influência do sistema opioide nos estágios iniciais da informação auditiva, foi elaborada uma série de cinco experimentos nos quais foram testadas as habilidades da morfina, em diferentes doses, em produzir, preferência, aversão, tolerância comportamental e tolerância fisiológica, utilizando um procedimento de preferência condicionada. Estes resultados mostram que, apesar da ausência de eventos comportamentais, uma administração a curto prazo de uma dose baixa de morfina pode mudar precocemente o processamento de informações dos estímulos auditivos sensoriais no CIC. Além disso, boa parte dos efeitos da morfina resulta em tolerância comportamental e eletrofisiológica. Esses dados indicam que, mesmo na falta de manifestações comportamentais, o aparecimento de potenciais evocados coliculares compensatórios podem sinalizar o primeiro passo no desenvolvimento de dependência de drogas.

**Palavras-Chave:** Morfina, Preferência condicionada, Aversão condicionada, Tolerância condicionada, Colículo Inferior, Córtex Pré-Frontal, Potenciais evocados auditivos.

**Apoio Financeiro:** CNPQ (Processo nº140901/2016-7); CAPES; FAPESP





## ABSTRACT

PALIARIN, F. **Behavioral and electrophysiological changes underlying morphine-induced expression of preference and context-tolerance.** 2020. 108f. Tese (Doutorado em Psicobiologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Several factors contribute to the transition from recreational to compulsive use of opiates, as well as other drugs of abuse. This change is due to the positive reinforcing characteristic of the drug, found in the initial stages of its use, and subsequently due to its negative reinforcing characteristic achieved after its chronic ingestion, when the drug is ingested as a way of relieving the unpleasant symptoms generated by each time their consumption is stopped.

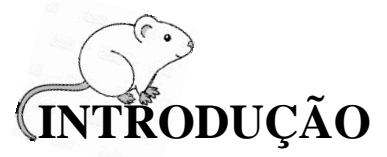
In addicted individuals, the desire for the drug, evoked either by contextual cues or by the context itself (craving), and abstinence, strongly contribute to the maintenance of its consumption and relapse after a period of abstinence. The brain reward system plays a major role in modulating these behaviors. In this system, opioids such as morphine, which naturally induce euphoria and a feeling of relaxation, among other effects, also have the property of inducing their search and consumption, after a long period of use. Consequently, this drug can potently modulate associative processes linked to memory and learning, and greatly strengthen the memory associated with the context related to the reinforcing effects of the drug, a phenomenon that underlies its compulsive search, even in the face of its notably adverse consequences. The conditioning technique of preference to the place can be used to simulate the development of a state of dependence, including the phases of acquisition, extinction and reinstatement, which highlights its importance in the evaluation of the effects of morphine, and others drugs, in chronic addiction. This preference may result from electrophysiological changes in brain areas linked to the control of the motivational response, which would be expressed in the body's ability to filter sensory stimuli from the environment that are not relevant, either during the expression of motivated behaviors related to the drug or the extinction of these. Auditory evoked potentials (AEPs) can be modified by associative learning when compensatory responses learned based on abstinence and drug relapse appear. However, although the late cognitive and attentional modulation of sensory information processing has been extensively studied, the pre-attentive mechanisms that occur in the early stages of sensory information processing related to the effect of drugs and their association with the context remain largely unexplored. In order to assess the possible electrophysiological changes, both early (inferior colliculus) and late (pre-limbic cortex) concomitant with the expression of preference conditioned to the place induced by morphine and to understand the influence of the opioid system in the initial stages of auditory information, we elaborated a series of five experiments in which the abilities of morphine were tested, in different doses, in producing, preference, aversion, behavioral tolerance and physiological tolerance, using a conditioned preference procedure. These results show that, despite the absence of behavioral events, a short-term administration of a low dose of morphine can change the information processing of sensory auditory stimulus in the CIC early. In addition, much of the effects of morphine result in behavioral and electrophysiological tolerance. These data indicate that, even in the absence of behavioral manifestations, the appearance of compensatory potential evoked potentials may signal the first step in the development of drug addiction.

**Keywords:** Morphine, Pre-frontal Cortex, Conditioned Place Preference, Auditory Evoked Potentials, Conditioned Aversion, Conditioned Tolerance, Inferior Colliculus

**.Financial support:** CNPQ (Process nº140901/2016-7 and 303144/2015-7), CAPES, and FAPESP (2014/23690-5 and 2017/18268-0).

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Abuso de Drogas .....	13
1.2	Dependência de Drogas e Controle Motivacional .....	14
1.3	Derivados Opioides .....	15
1.4	Dependência de Opioides .....	16
1.5	Córtex Pré-Frontal .....	18
1.6	Respostas Aprendidas Condicionadas .....	20
1.7	Potenciais Evocados Auditivos .....	22
1.8	Considerações Gerais .....	24
2	RACIONAL E OBJETIVOS .....	26
3	MATERIAIS E MÉTODO.....	29
3.1	Animais e Acomodações .....	29
3.2	Ética Experimental .....	29
3.3	Procedimentos Experimentais .....	29
4	RESULTADOS.....	45
4.1	Preferência Condicionada .....	45
4.2	Aversão Condicionada .....	46
4.3	Tolerância Condicionada Contextual .....	48
4.4	Potencial Evocado Auditivo Colicular .....	52
4.5	Potencial Evocado Auditivo Cortical .....	56
5	DISCUSSÃO.....	65
6	CONCLUSÃO.....	79
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
	ANEXOS .....	97



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Abuso de Drogas

A OMS (Organização Mundial de Saúde) e o NIDA (*National Institute on Drug Abuse*) dos Estados Unidos da América, definem droga de abuso como sendo qualquer substância, legal ou ilegal que, quando utilizada de forma crônica, produz severos danos na estrutura cognitiva, emocional e de personalidade do indivíduo, danos estes que se refletem em problemas secundários, mas não menos importantes, na esfera social, incluindo prejuízo no relacionamento familiar e de trabalho. Dito de outra forma, droga é qualquer substância que, quando introduzida no organismo, interfere no seu funcionamento regular. Portanto, por esta, e outras razões, a dependência de drogas é considerada uma doença crônica, além de recidivante. Ainda, pode-se definir droga de abuso como qualquer substância que modifica as funções fisiológicas, psicológicas ou imunológicas de um organismo, seja de forma temporária ou permanente (FERREIRA, 2010).

Em geral, as drogas funcionam como reforçadores condicionados em virtude de seus efeitos recompensadores, efeitos estes conectados a atributos adicionais (SHIPPENBERG, 2002). Vários são os fatores que contribuem para a transição do uso recreativo para o uso compulsivo de uma droga. Diz-se que esta mudança resulta da transição entre seus efeitos reforçadores positivos, alcançados nos estágios iniciais de consumo da substância e, posteriormente, por sua característica reforçadora negativa eliciada no indivíduo que a utiliza de forma contumaz, e que passa por um período de abstinência. Neste momento, a droga é consumida, principalmente, como forma de alívio para os sintomas desagradáveis gerados pela ausência da droga no corpo (KOOB et al., 1989; SCHULTEIS; KOOB, 1996). Portanto, a manutenção da dependência se consolidará a partir destes efeitos reforçadores negativos que apresentam a qualidade de estressores incondicionados (NOBRE; BRANDÃO, 2014).

O abuso de drogas é considerado um transtorno crônico porque o risco de recidiva permanece alto, mesmo após o término do tratamento (quando houver) e abstinência prolongada (SHIPPENBERG, 2002). Este efeito resulta de alterações neurobiológicas e comportamentais relacionadas a presença da droga no organismo, tendo como base o fenômeno da tolerância farmacológica e comportamental. Vale ressaltar que a tolerância, a

dependência física e a abstinência são fenômenos biológicos, sendo a dependência física definida pela presença de sintomas físicos que surgem quando a ingestão/administração da droga é interrompida. Estes sintomas variam de acordo com o tipo de substância ingerida, mas geralmente se apresentam como efeitos contrários àqueles originalmente produzidos pela administração aguda da droga. Já a dependência psicológica, se define como um estado de mal-estar e desconforto que aparece consequente a interrupção do uso da droga. De fato, as alterações psicológicas (cognitivas, afetivas, emocionais, de personalidade) induzidas pela interrupção na ingestão da droga são um dos mais importantes, e problemáticos, dos sintomas de abstinência.

## 1.2 Dependência de drogas e controle motivacional

A dependência de drogas está sob controle de *drives* motivacionais intensos que orientam o comportamento do indivíduo para sua busca e consumo, o que impulsiona o desejo por seu uso contínuo e/ou periódico, como meta para obter prazer. Cientificamente esta é definida como uma compulsão para ingerir uma substância, associada a perda do controle sobre sua ingestão (NESTLER, 1994). O desenvolvimento de dependência de drogas de abuso caracteriza-se pela ocorrência de uma síndrome de abstinência após a interrupção abrupta de seu consumo crônico (KOOB, 2000, 2006). Em qualquer dos casos, os aspectos motivacionais cumprem papel preponderante no descontrole motivacional, que leva à transição entre o consumo agudo e pontual e a ingestão intensa e perene de drogas.

A motivação e as construções motivacionais têm sido cêntricas em muitas abordagens teóricas da dependência. Em todas as áreas de investigação, o uso de substâncias foi abordado em termos de sua instrumentalidade para cumprir diferentes motivações ou objetivos. A explicação mais comum sobre a dependência geralmente assume a forma de uma hipótese hedônica bilateral: drogas de abuso são usadas para induzir prazer (BERRIDGE; ROBINSON, 2003; EVERITT; ROBBINS, 2005; HYMAN; MALENKA; NESTLER, 2006; STEWART; DE WIT; EIKELBOOM, 1984; STEWART; WISE, 1992) e/ou remover uma sensação desagradável, incluindo a dor e aspectos relacionados à afetos negativos (BAKER; MORSE; SHERMAN, 1986; KOOB; LE MOAL, 2008; PIPER et al., 2003; SOLOMON; CORBIT, 1974; WIKLER, 1948). Além de efeitos sobre motivações básicas, o comportamento do uso de substâncias tem sido discutido em termos de sua

operacionalização para cumprir motivos heterogêneos, como a socialização; como exemplo, dentre outras drogas, cumpre bem esta função o álcool etílico. Consequentemente, tanto o início quanto a manutenção do uso de substâncias são explicados pela expectativa dos indivíduos acerca dos resultados “positivos” relacionados ao uso destas substâncias (ver JONES; CORBIN; FROMME, 2001, para uma revisão; COOPER et al., 1995; COX; KLINGER, 1988; KUNTSCHE et al., 2005; PALFAI; WEAFFER, 2006). Da mesma forma, na economia comportamental, o uso e abuso de substâncias e a dependência são abordados como resultado de uma escolha “racional”, justificada pela instrumentalidade do uso da substância para maximizar o resultado desejado (por exemplo, sentir-se bem, não se sentir mal, interação social suave) e a falta de opções ou meios alternativos para esses resultados particulares (BECKER; MURPHY, 1988; HEYMAN, 2009; RACHLIN, 1997).

### 1.3 Derivados Opioides

O ópio, substância original que define seu grupo farmacológico, é extraído da papoula, nome popular do *Papaver somniferum*, uma das muitas espécies da família das Papaveráceas, que se caracteriza por apresentar folhas solitárias e frutos capsulados (DUARTE, 2005). Em 1805, o alemão Friedrich Wilhelm Adam Sertürner obteve um alcaloide derivado do ópio, e nomeou de *morphium* em homenagem ao Deus grego do sono Morfeu. O francês Gay Lussac ao traduzir os trabalhos de Sertürner propôs a substituição de *morphium* por morfina, denominação que ficou consagrada (HAMILTON; BASKETT, 2000).

Os opioides, classificados como agentes analgésicos, apresentam também a característica de induzir potente relaxamento e euforia, além de poder modular potencialmente processos associativos ligados a memória e aprendizagem, fortalecendo memórias associadas a seus efeitos reforçadores. Estes efeitos resultam de complexas interações entre essas drogas e receptores específicos, que podem ser identificados ao longo do sistema ascendente de transmissão da dor e do sistema descendente inibitório. Vários tipos e subtipos de receptores foram sugeridos, sendo os principais os receptores mu ( $\mu$ ), delta ( $\delta$ ) e kapa ( $\kappa$ ) (DUARTE, 2005). Sugere-se que estes diferentes tipos de receptores opioides podem estar envolvidos nos fenômenos citados, dentre outros. Como exemplo, a ativação de receptores opioides  $\mu$  ou  $\alpha$  induz a preferência condicionada ao contexto,

enquanto a ativação de receptores  $\kappa$  ou o bloqueio de receptores  $\mu$  promove aversão condicionada (AZAR; JONES; SCHULTEIS, 2003; CONTARINO et al., 2002; KOOB et al., 1986; SANTE; NOBRE; BRANDÃO, 2000; WHITE; HWANG; HOLTZMAN, 2005).

Além disso, em seres humanos, a regulação de estados afetivos e emocionais está francamente relacionada a ativação de receptores opioides  $\mu$ , o que sugere a importância desses receptores na regulação fisiológica de suas experiências afetivas. É possível considerar ainda que a tomada de decisões se torna diretamente dependente da associação emocional realizada pelo indivíduo ao vivenciar determinadas situações cotidianas (ESPERIDIÃO-ANTONIO et al., 2008).

#### 1.4 Dependência de Opioides

Como dito anteriormente, os opioides (assim como outras drogas de abuso) exercem efeitos pronunciados sobre o humor e a motivação (DUM; HERZ, 1987; STEIN; BELLUZZI, 1979). Causam extrema euforia em humanos e são auto administrados em animais de laboratório. A administração crônica de opioides resulta no desenvolvimento de tolerância e dependência física. Esses efeitos resultantes de sua ingestão/administração crônica podem ser relevantes para a manutenção da toxicodependência já estabelecida. Existem evidências de que a ativação do sistema de recompensa endógeno pode representar o passo inicial para o desenvolvimento da dependência psíquica, o que determina seu potencial de abuso (NESTLER, 2005). De fato, os mecanismos neurais, que medeiam os efeitos recompensadores e motivacionais dos opioides, e que também estão envolvidos nos efeitos de outras drogas de abuso, são os mesmo que modulam os efeitos dos reforçadores naturais (DI CHIARA; NORTH, 1992a; HERZ, 1998).

Algumas evidências sugerem que a dependência física produzida por opiáceos se deve à sua interação com receptores opioides na matéria cinzenta periaquedutal (MCP), no hipotálamo lateral e no *locus coeruleus*, já que a administração do antagonista de receptores opioides naloxona ou metilnaloxonium nessas áreas precipita sintomas somáticos de abstinência em animais submetidos ao tratamento crônico com morfina (BOZARTH; WISE, 1984; LANE-LADD et al., 1997; MALDONADO et al., 1992). Por outro lado, o componente afetivo/emocional da retirada de opioides parece ser mediado pelo núcleo *accumbens* (KOOB; WALL; BLOOM, 1989; STINUS; LE MOAL; KOOB, 1990),



amígdala (CABRAL et al., 2009; GRACY; DANKIEWICZ; KOOB, 2001; SCHULTEIS et al., 2000; STINUS; LE MOAL; KOOB, 1990), e pelo córtex pré-frontal medial (BISHOP et al., 2011; DAGLISH et al., 2001). Em humanos, a síndrome de abstinência aos opioides é claramente exuberante, sendo composta por sintomas somáticos (náuseas, distúrbios gastrintestinais, constipação, tremores e dores abdominais) e afetivos (disforia, agitação, irritabilidade e ansiedade) (JAFFE, 1990). Em animais de laboratório, os sintomas somáticos incluem perda de peso, diarreia, *wet dog shakes*, saltos, constrictões abdominais, ereção peniana, ranger de dentes e hiperalgesia (GOLD et al., 1994a; MALDONADO; NEGUS; KOOB, 1992; MCNALLY; AKIL, 2001). Os sintomas que denunciam alterações do tipo emocionais, por sua vez, incluem elevação do limiar de auto estimulação elétrica intracraniana, redução na atividade locomotora e na resposta operante por alimento, além de aversão condicionada por lugar (COIMBRA; BRANDÃO, 1993; GRACY; DANKIEWICZ; KOOB, 2001; KOOB et al., 2002; SCHULTEIS et al., 1994).

Os antagonistas de receptores opioides surgiram em 1915. A naloxona foi o primeiro antagonista opioide puro com grande afinidade pelos receptores  $\mu$ , mas também com afinidade pelos receptores delta ( $\delta$ ) e kappa ( $\kappa$ ). Os primeiros trabalhos com a naloxona foram realizados no início da década de 1960, inicialmente em animais e logo depois em seres humanos (DUARTE, 2005). A naloxona apresenta a capacidade de bloquear a ação dos peptídeos opioides endógenos, assim como aquela de fármacos semelhantes à morfina, tendo sido extensivamente utilizada como ferramenta experimental, para determinar o papel fisiológico destes peptídeos, particularmente na transmissão da dor (HOLDCROFT; POWER, 2003). Em um outro estudo (AZAR; JONES; SCHULTEIS, 2003), foi demonstrado que a abstinência de morfina precipitada por naloxona induz aversão condicionada após apenas duas sessões de condicionamento. Esse efeito foi dose-dependente tanto para naloxona (0,003 a 16,7 mg / kg) quanto para a morfina (1,0 a 5,6 mg / kg). Os resultados desses estudos indicam que o estado subjetivo produzido pela abstinência de morfina, precipitada por naloxona é francamente aversivo (WHITE; HWANG; HOLTZMAN, 2005). Estes mesmos efeitos podem ser obtidos com outro antagonista opioide, a naltrexona (WHITE; HWANG; HOLTZMAN, 2005). Isto demonstra que a importância de modelos de condicionamento, e conseqüentemente do contexto de administração, no estudo dos aspectos motivacionais da retirada da dependência aguda de opioides. De fato, sabe-se que o contexto presente no momento da administração da droga

se associa aos seus efeitos, produzindo tolerância farmacológica e facilitando a recaída (SIEGEL, 2005). Ou seja, em indivíduos dependentes, o desejo pela droga (*craving*), e os sintomas de abstinência eliciados por pistas contextuais, gerais ou específicas, contribuem sobremaneira para a manutenção de seu consumo e recaída após um período de abstinência (WEISS, 2005).

Várias pesquisas descrevem exemplos de pacientes que exibiam sintomas de abstinência quando confrontados com estímulos contextuais associados a droga e seus efeitos. Os resultados de diversos experimentos com animais e laboratório dão apoio a observações clínicas nas quais os estímulos discriminativos para a droga e seus efeitos são poderosos indutores de sintomas de abstinência (ver avaliações de MCDONALD; SIEGEL, 2004; SIEGEL, 2005; SIEGEL; RAMOS, 2002). O que ainda não está claro é qual, ou quais, as bases neurobiológicas relacionadas a estes processos. Entretanto, levando em consideração que a dependência de drogas resulta do enfraquecimento inibitório (*top-down*) das motivações relacionadas a droga e seus efeitos, e assumindo que as “pulsões” motivacionais geradas em estruturas mais ancestrais do tronco cerebral relacionadas a droga e seus efeitos (*bottom-up*) estão sob controle cortical (SHENG, 2001), uma das áreas encefálicas possivelmente relacionadas a este descompasso é o córtex medial pré-frontal, ou pré-límbico.

### 1.5 Córtex Pré-Frontal

Sabe-se que o tratamento com morfina promove uma reorganização das conexões sinápticas prosencefálicas (ROBINSON; KOLB, 1999), particularmente no córtex medial pré-frontal (ROBINSON; KOLB, 2004). Esta região encefálica tem grande importância no controle cognitivo e memória de trabalho, e no controle e orientação do comportamento motivado. O uso e, sobretudo, o abuso de drogas como os opioides, dos quais a morfina é o maior representante, leva a uma distorção na representação de metas e objetivos, promovendo então a expressão de uma resposta não adaptativa. Evidências recentes sugerem que peptídeos opioides, em particular a  $\beta$ -endorfina, podem influenciar processos motivacionais ao afetar emoções (DUM; HERZ, 2013). Sugere-se que o fundamento do problema repousa na perturbação causada pela droga nos mecanismos corticais de controle *top-down*, que cognitivamente se impõem sobre os mecanismos incondicionados

diencefálicos e mesencefálicos (*bottom-up*) (SHENG, 2001). Como exemplo, estudos utilizando a técnica de neuroimagem mostraram grande ativação metabólica do córtex medial pré-frontal durante a fissura por cocaína (GOLDSTEIN; VOLKOW, 2002).

Evidências recentes sugerem que o córtex medial pré-frontal é uma área crítica para o estabelecimento dos processos de extinção, tanto a estímulos aversivos quanto aos comportamentos vinculados à busca e consumo de drogas. Esta área apresenta uma subdivisão funcional bastante aparente, com o córtex pré-límbico, mais medial – cuja função está relacionada à expressão do medo e a busca e consumo de drogas, e o córtex infralímbico, mais ventral – relacionado a processos de extinção. A vulnerabilidade ao abuso de drogas está relacionada à busca de recompensas e à impulsividade, dois construtos que se acredita terem uma base biológica no córtex pré-frontal (PFC). Os córtices pré-límbico (PrL) e infralímbico (IL), estão conectados a outras regiões do cérebro que foram implicadas no abuso de drogas. Cada uma dessas redes medeiam comportamentos relacionados a recompensas de uma maneira diferente, mas eles parecem fazê-lo em roedores e primatas (PERRY et al., 2011). Dito de outra forma, o córtex medial pré-frontal monitora contingências de tarefas, as sub-regiões PrL e IL do mPFC parecem desempenhar papéis distintos no aprendizado e na ação impulsiva. Quando uma resposta específica não produz mais reforço, a ativação do mPFC parece estar associada à alteração do comportamento e à orientação para uma nova resposta para obter o reforço. O IL pode influenciar a resposta habitual inibindo ações direcionadas a objetivos, enquanto a PrL pode manter representações de objetivos e a relação entre ações e objetivos (PERRY et al., 2011). Dado que o córtex medial pré-frontal se apresenta como um sistema neural de controle modulatório tanto dos aspectos relacionados a motivação quanto impulsividade, um melhor entendimento de seu funcionamento pode levar a produção de tratamentos que auxiliem no alívio dos sintomas, tanto dos transtornos relacionados à ansiedade, quanto àqueles relacionados ao uso e abuso de drogas.

O córtex PrL também pode desempenhar um papel na inibição ativa das respostas habituais, sugerindo um papel mutuamente inibitório para o PrL, e também o IL. Essa inibição ativa dos hábitos pode permitir processos de tomada de decisão cognitiva mais planejados para orientar o comportamento (JENTSCH; TAYLOR, 1999; PERRY et al., 2011). Como seria de esperar, danos generalizados ao PrL e IL resultam em uma perda de

resposta direcionada a objetivos, bem como resposta habitual perseverante (RAGOZZINO; DETRICK; KESNER, 1999). O dano ao IL resulta em uma ação impulsiva (ou seja, aumento de respostas prematuras), enquanto o dano ao PrL resulta em resposta compulsiva (ou seja, respostas perseverantes) (CHUDASAMA et al., 2003; CHUDASAMA; MUIR, 2001). Ainda, algumas evidências indicam que, em humanos, o abuso de drogas está associado a alterações funcionais no mPFC, favorecendo déficits nas funções executivas cognitivas e nas decisões de risco, típicas entre indivíduos vulneráveis (FISHBEIN et al., 2007). Supõe-se que a circuitaria do PrL estimule a busca por drogas diante de pistas contextuais, enquanto os circuitos do IL têm uma influência inibidora no reestabelecimento espontâneo da busca por drogas (KALIVAS; PETERS; KNACKSTEDT, 2006).

Para drogas de abuso, em geral, a probabilidade de associação entre os efeitos do medicamento e o contexto ou pistas contextuais nas quais ocorre sua ingestão é muito grande. Esses comportamentos aprendidos podem ser conceituados como respostas compensatórias condicionadas (*compensatory conditioned responses - CCRs*), podendo se desenvolver através do condicionamento clássico (ou pavloviano). Como exemplo, uma resposta hiperalgésica compensatória condicionada pode ser aprendida pela exposição a um ambiente anterior emparelhado com drogas (SIEGEL, 1975). Portanto, espera-se que alguém que experimenta um resultado da droga em um ambiente não usual possa estar mais vulnerável, uma vez que pistas que normalmente acompanham a administração da droga para neutralizar seus efeitos estão ausentes.

## 1.6 Respostas Aprendidas Condicionadas

Ivan Pavlov, ao fazer observações sobre reflexos inatos, notou que seus sujeitos experimentais haviam aprendido novos reflexos, ou seja, estímulos que não eliciavam uma determinada resposta, passaram a fazê-lo (PAVLOV, 1927). A esse fenômeno de aprendizagem foi dado o nome de condicionamento pavloviano, ou também conhecido como condicionamento clássico (MOREIRA; MEDEIROS, 2018). Este tipo de condicionamento consiste na interação entre componentes. A apresentação de um estímulo neutro junto com um estímulo incondicionado em inúmeras ocasiões vai transformar o estímulo neutro em um estímulo condicionado. Assim, o estímulo condicionado levará a uma resposta condicionada,

assemelhada à resposta incondicionada, e uma nova memória será criada, através da aprendizagem por associação de estímulos.

De forma similar, o paradigma de condicionamento ao lugar é um procedimento de condicionamento pavloviano no qual o animal aprende a preferir um ambiente previamente pareado com a droga e seus efeitos (BRADLEY; HARRIS; JENNER, 2005). Este paradigma fornece uma medida de reforço condicionado que é conceitualmente semelhante às medidas fornecidas pelos paradigmas operantes (SHIPPENBERG, 2002), permitindo ainda a avaliação do estímulo reforçador, e fornecendo informações indiretas sobre os efeitos positivos e negativos das drogas.

O condicionamento de preferência ao lugar é um modelo experimental bastante utilizado na investigação das propriedades reforçadoras das drogas em geral (TZSCHENTKE, 1998), servindo também como ferramenta na avaliação dos efeitos de *priming* de uma droga sobre a recaída, após um treino de extinção (PARKER; MCDONALD, 2000). Vários estudos têm demonstrado que a morfina induz preferência condicionado ao lugar (RANDALL; KRAEMER; BARDO, 1998; TZSCHENTKE, 1998). Este modelo pode ser utilizado para simular o desenvolvimento de um estado de dependência, aí incluídas as fases de aquisição, extinção e restabelecimento (*reinstatement*), o que ressalta a importância de sua utilização na avaliação dos efeitos de drogas como a morfina, na dependência crônica. Em contraponto, a aversão condicionada ao lugar, é conhecida por ser uma medida do estado motivacional aversivo produzido pela abstinência, natural ou forçada de drogas, como a morfina. Este modelo animal mimetiza aspectos da dependência humana. Seu mecanismo opera de forma similar ao modelo de preferência condicionada, mas agora explorando a valência negativa dos estados emocionais associada ao contexto onde o estado aversivo é eliciado. A utilização deste procedimento permite também avaliar os correlatos eletrofisiológicos subjacentes à preferência a um ambiente específico, durante a exposição do animal a pistas contextuais previamente associadas com a droga. De forma geral, o paradigma geral do condicionamento por lugar, que inclui as CCRs, se baseia em uma aprendizagem associativa entre o estado afetivo e pistas ambientais que precedem a exposição a um estímulo reforçador ou aversivo (PALIARIN; INCROCCI; NOBRE, 2018), podendo induzir, no último caso, potente tolerância farmacológica como resultado da associação droga/contexto.

A natureza física das RCCs foi estudada extensivamente. Muitos desses estudos relatam a ativação de sub-regiões do córtex pré-frontal em resposta ao uso de várias drogas de abuso, como álcool (GRÜSSER et al., 2004; SINHA; LI, 2007), cocaína (KILTS et al., 2001; SINHA et al., 2000; WEXLER et al., 2001), tabaco (MCBRIDE et al., 2006; WILSON et al., 2005) e opioides (CHILDRESS; MCLELLAN; O'BRIEN, 1986; DAGLISH et al., 2001; YANG et al., 2009). No entanto, embora a influência dos CCRs nos processos atencionais e cognitivos tardios tenha sido extensivamente examinada, a tolerância condicionada contextual que ocorre em mecanismos pré-atencionais que operam em estágios iniciais do processamento de informações permanece amplamente inexplorada. Destes mecanismos, destaca-se o sistema auditivo mesencefálico, que modula vários processos pré-atencionais, como o gatilho sensorial auditivo (BOUTROS et al., 1997b). Nesse sistema, o colículo inferior (CI), uma região do mesencéfalo considerada uma das estruturas auditivas mais importantes, ocupa uma posição estratégica (CASSEDAY; COVEY, 1996). A localização sonora e a inibição de pré-pulso (PPI) do reflexo de sobressalto (BRAFF; GEYER, 1990; FENDT; LI; YEOMANS, 2001; LI; YUE, 2002) são altamente moduladas no CI (LI; YUE, 2002). Além disso, as alucinações auditivas provocadas durante um surto psicótico são acompanhadas pela ativação neural do CI (SHERGILL et al., 2000). Foi sugerido que anormalidades nesse circuito levam a um desnecessário “encharcamento” das funções encefálicas superiores com informações inócuas (ORANJE et al., 1999). Como os componentes cognitivos e motores dos mecanismos pré-atencionais tardios podem ficar sob controle de pistas contextuais relacionadas a droga e seus efeitos, é possível que mecanismos pré-atencionais precoces também permaneçam sob controle de estímulos ambientais ao longo do tempo. Nesse contexto, foi demonstrado que os potenciais evocados auditivos (PEAs) podem ser modificados por meio de aprendizagem associativa (NOBRE, 2013).

### **1.7 Potenciais Evocados Auditivos**

Os potenciais evocados auditivos (PEAs) se apresentam como pequenas alterações no potencial de campo, captados por eletrodos, alterações estas que surgem como resposta à apresentação de um estímulo acústico (BOUTROS et al., 1997b, 1997a; NOBRE, 2013). Estes potenciais refletem a atividade neural das regiões do complexo auditivo, particularmente o núcleo coclear, o complexo olivar superior e o colículo inferior (CI) (LONG; ALLEN, 1984). Nesta região, estímulos sensoriais inócuos são filtrados através de

um sistema específico (*auditory sensory gating*), o que impede o acesso de informações desnecessárias para estruturas mais superiores. Entretanto, o gatilho sensorial ativado por um estímulo auditivo pode também ser registrado em regiões corticais como o hipocampo (JOY; MCMAHON; SHEPARD, 2004) e córtex pré-frontal medial (MEARS; KLEIN; CROMWELL, 2006).

As aplicações práticas de medida de PEAs têm sido usadas para propósitos clínicos. BIACABE et al., (2001) publicaram uma revisão com o objetivo de descrever a anatomia funcional de estruturas auditivas do tronco encefálico nas quais são gerados potenciais evocados auditivos (*BAEP, brainstem auditory evoked potential*), e propuseram sua aplicação clínica para a identificação de neurinomas acústicos (tumores) ou lesões, diagnóstico precoce de problemas auditivos em crianças e para pacientes que não respondem a testes audiométricos tradicionais. No campo dos transtornos mentais, sabe-se que as alucinações auditivas induzidas durante surtos esquizofrênicos têm como correspondente neural uma ativação pronunciada do CI, além de outras áreas corticais e subcorticais como a ínsula, córtex cingulado anterior (CgA), córtex temporal, tálamo e hipocampo (SHERGILL et al., 2000). O núcleo central do CI (CIc) recebe as principais aferências auditivas ascendentes (MOORE; GOLDBERG, 1963; ROTH; BENDAYAN; ORCI, 1978; WOOLLARD; WEDDELL; HARPMAN, 1940). Do CI as fibras da via auditiva se dirigem para o núcleo geniculado medial do tálamo e deste para o córtex auditivo (OSEN, 1972). Todas estas projeções que ascendem em direção as áreas corticais auditivas mantêm uma incrível similaridade em uma ampla gama de mamíferos (FERREIRA, 2010; JONES; MOORE, 1977). No entanto, se, e qual área cortical está vinculada a modulação das alterações induzidas nos potenciais evocados no CI ainda é uma questão em aberto. Além disso, pouco se sabe sobre o impacto do uso repetido de opioides sobre as estruturas encefálicas e seu funcionamento. Vale ressaltar que, em um estudo anterior, foi demonstrado que as alterações na reatividade emocional induzidas pela retirada de morfina foram associadas à sensibilização dos substratos neurais do medo no CI (ÁVILA et al., 2008), sendo estas indiretamente moduladas por mecanismos opioides (ÁVILA et al., 2008; CARDOSO et al., 1992), principalmente através da modulação de receptores GABA<sub>A</sub> (CALVO; COIMBRA, 2006; TONGJAROENBUANGAM et al., 2006).

## 1.8 Considerações Gerais

A natureza física dos RCCs foi estudada extensivamente dentro da neurobiologia. Muitos desses estudos relatam a ativação de sub-regiões do córtex pré-frontal em resposta ao uso de várias drogas de abuso, incluindo o álcool (GRÜSSER et al., 2004; SINHA; LI, 2007), cocaína (KILTS et al., 2001; SINHA et al., 2000; WEXLER et al., 2001), tabaco (MCBRIDE et al., 2006; WILSON et al., 2005) e opioides (CHILDRESS; MCLELLAN; O'BRIEN, 1986; DAGLISH et al., 2001; YANG et al., 2009). Nessa região, envolvida principalmente com processos atencionais, na cognição, e no controle de comportamentos motivados (MILLER; COHEN, 2001) a morfina promove uma reorganização da morfologia sináptica (ROBINSON; KOLB, 1999), particularmente em seu segmento medial (ROBINSON; KOLB, 2004). No entanto, embora a influência dos RCCs nos processos atentos e cognitivos tardios tenha sido extensivamente examinada, a tolerância condicionada contextual que ocorre em mecanismos de pré-atencionais que operam em estágios iniciais do processamento de informações permanece amplamente inexplorada. Destes mecanismos, destaca-se o gatilho sensorial auditivo mesencefálico, um fenômeno neurofisiológico relacionado à inibição neural, na qual o encéfalo apresenta potenciais evocados reduzidos a estímulos repetidos (BOUTROS et al., 1997a). O funcionamento correto deste gatilho sensorial é um atributo importante da função normal do encéfalo, de tal forma que qualquer desequilíbrio em seu funcionamento facilita a entrada de informações sensoriais inócuas, o que pode levar a um déficit acentuado na avaliação e processamento correto das informações percebidas (ORANJE et al., 1999).

Evidências recentes sugerem que o córtex medial pré-frontal é uma área crítica para o estabelecimento dos processos de extinção relacionados tanto a estímulos aversivos quanto aos comportamentos vinculados à busca e consumo de drogas. Esta área apresenta uma subdivisão funcional bastante aparente: o córtex pré-límbico – cuja função está relacionada à expressão do medo e a busca e consumo de drogas, e o córtex infralímbico – relacionado a supressão destes comportamentos após a extinção. Dado que o córtex medial pré-frontal se apresenta como um sistema neural comum às duas condições, um melhor entendimento de seu funcionamento pode levar a produção de tratamentos que auxiliem no alívio dos sintomas, tanto dos transtornos relacionados à ansiedade, quanto àqueles relacionados ao uso e abuso de drogas, particularmente facilitando a memória de extinção. Embora o PFC pareça



mediar diferentes aspectos da resposta a estímulos anteriormente associados à recompensa, não está claro se essa estrutura também está envolvida na mediação da recaída no comportamento de procura de drogas após a retirada prolongada de drogas. A questão da regulação cortical pré-frontal do comportamento de busca de drogas é muito oportuna, uma vez que é possível que a heterogeneidade no PFC medial possa determinar o grau em que respostas associadas aos estímulos emparelhados com as drogas ocorrerão.



## 2. RACIONAL E OBJETIVOS

Em indivíduos dependentes o contexto relacionado às drogas pode evocar fissura, contribuindo muito para a recaída após um período de abstinência. Em relação aos opioides, mesmo poucos pareamentos podem potencialmente se tornar estímulos discriminativos para a droga e seus efeitos. De fato, para substâncias com essas características, a probabilidade de associação entre os efeitos do medicamento e o contexto, ou pistas contextuais, no qual ocorre sua ingestão, é muito grande. Esses comportamentos aprendidos podem ser conceituados como respostas compensatórias condicionadas (RCCs), que se desenvolvem através de condicionamento clássico. No entanto, embora a influência dos RCCs em processos atencionais e cognitivos tardios tenha sido extensivamente examinada, a tolerância condicionada contextual que ocorre em mecanismos de pré-atencionais que operam em estágios iniciais do processamento de informação permanece amplamente inexplorada. Por outro lado, sabendo que a morfina se apresenta como um potente estímulo reforçador para os indivíduos, e considerando sua ação controladora inibitória dos estados motivacionais relacionados a busca e consumo de drogas, é possível que ratos de laboratório submetidos a um procedimento de preferência ou aversão condicionada ao lugar apresentem uma alteração nos potenciais de campo do córtex pré-frontal medial, particularmente em sua sub-região pré-límbica, quando expostos ao ambiente previamente pareado com a droga. Estas áreas corticais têm relevância nos processos de aquisição e extinção de memórias aversivas. Entretanto, sabe-se que, no contexto do abuso de drogas, estes circuitos se sobrepõem (PETERS; HUGHES, 2010). Dito isto, este trabalho teve como objetivo:

### **Geral**

- Investigar os efeitos reforçadores, positivos e negativos da morfina, em modelos experimentais de preferência e tolerância condicionada ao contexto, utilizando como variável dependente as alterações no comportamento e nos potenciais eletrofisiológicos auditivos de campo, eliciados pelo tratamento com doses ascendentes de morfina.

### **Específicos**

- Analisar as possíveis alterações comportamentais e eletrofisiológicas eliciadas no núcleo central do colículo inferior como resposta compensatória a diferentes doses de morfina;

- Analisar as mudanças em potenciais de campo no córtex pré-límbico, eliciados por estimulação acústica, concomitante à expressão de preferência e aversão condicionada ao lugar induzida por morfina.



## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e Acomodações

Foram utilizados 215 ratos *Wistar* de cinco semanas com +/- 220g (valores estipulados de peso/idade segundo (UMEOKA et al., 2011) provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto. Os animais que não foram submetidos a cirurgia (testes de Preferência e Aversão Condicionada ao Lugar e Monitor de Atividade) foram alojados em grupos de quatro, em caixas de polipropileno de 35 x 19 x 25 cm, bem como os animais submetidos a cirurgia apenas para implantação de cânula-guia. Os animais que foram submetidos a cirurgia, para posteriormente integrar os grupos dos testes com Potencial Evocado Auditivo, tiveram de ser mantidos em duplas nas caixas, com uma separação de acrílico, pois o eletrodo implantado era de material plástico e poderia ser roído. Os ciclos de claro-escuro eram de 12 horas, com as luzes acesas às 7 horas da manhã, o biotério possuía temperatura ( $24 \pm 1$ o C), exaustão, luminosidade e umidade controladas. Água e comida estavam o tempo todo disponíveis.

#### 3.2 Ética Experimental

Os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações do Manual de Utilização de Animais da FIOCRUZ (2008, 1ª Ed.) e do U. S. *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Academic Press, Washington D.C. 8ª. Ed. 2011). O número de animais utilizado foi o mínimo necessário para permitir a confiabilidade dos resultados. De acordo com a prática aceita, foram feitos todos os esforços para minimizar o estresse e o sofrimento dos animais. Todos os experimentos foram conduzidos com o consentimento do CEUA (FFCLRP-USP, protocolo nº18.5.245.59.0).

#### 3.3 Procedimentos Experimentais

##### 3.3.1. Preferência Condicionada

Neste experimento, foram utilizados 46 ratos machos *Wistar Hannover* (250-300 g). No primeiro experimento, procurou-se obter os resultados do teste de preferência condicionada a lugar, para isso foram feitos três grupos de animais, destes o primeiro grupo

chamado de grupo controle, recebeu apenas salina; um segundo grupo recebeu uma dose de morfina na concentração de 10mg/kg, e o terceiro grupo uma dose de 20 mg/kg, a fim de estabelecer a dose que melhor se adequaria ao condicionamento.

### *Drogas*

Utilizou-se em todo teste Sulfato de Morfina, nas dosagens de 10 e, 20 mg/kg, e Cloreto de sódio (0,9%) nos grupos controle.

### *Aparato Experimental*

O aparato para realização do teste de preferência condicionada ao lugar consiste em uma câmara de acrílico com dois compartimentos (A e B) (60 cm largura x 25 cm profundidade x 40 cm altura). Apesar dos compartimentos se assemelharem em termos de tamanho (30 x 25 x 40 cm), eles se diferem na sua constituição visual e tátil (compartimento A: paredes compostas por faixas verticais brancas pretas de 5 cm de largura e piso constituído por 20 barras de aço inoxidável de 5 mm de diâmetro, distando 1,5 cm entre si; compartimento B: paredes e teto de acrílico na cor branca com bolhas pretas 2 cm e piso composto de uma placa de aço inoxidável vazada (vãos de 1 x 1cm quadrado). Os compartimentos são separados por uma parede removível, confeccionada em acrílico na cor preta, que pode ser retirada para permitir o acesso ou inserida no centro da caixa para bloquear o acesso dos animais à ambos compartimentos. O paradigma de condicionamento consistiu de três fases distintas: pré-condicionamento (baseline), condicionamento e pós-condicionamento (teste).

*Fase de pré-condicionamento:* Neste período, foram tomados os valores basais referentes à preferência incondicionada dos animais a um dos contextos (A ou B), em um estado livre de drogas. A porta deslizante de bloqueio entre os compartimentos permaneceu aberta e os animais tinham livre acesso a ambos os compartimentos pelo tempo de 10 minutos, a fim de medir as preferências basais, além de habituar os animais ao aparato, eliminando o viés da novidade. Os dados da linha de base foram determinados para três sessões diárias de 10 minutos, em que a porcentagem média de tempo gasto em ambas as câmaras foi tabulada. O comportamento do animal foi gravado através de duas microcâmeras colocadas 40 cm acima da parte superior de cada compartimento, ligadas a um monitor e um

aparelho de sistema de gravação localizado fora da sala experimental. A preferência foi determinada registrando o tempo gasto em cada câmara. No final de cada sessão, a urina e as fezes foram removidas e o aparelho foi limpo com um pano úmido (álcool etílico a 20%), seguido de um tecido seco.

*Fase de Condicionamento:* O treinamento (condicionamento) começou 24 horas após o último teste de linha de base. Foram utilizados três grupos independentes de ratos. Cada animal recebeu uma injeção subcutânea (*s.c.*) de solução salina isotônica ( $n = 18$ ), morfina 10 mg / kg ( $n = 18$ ) ou morfina 20 mg / kg ( $n = 10$ ), em cada um dos dias de tratamento. Durante esta fase a porta deslizante da câmara de condicionamento permaneceu fechada, isolando os ambientes A e B. Após a injeção o animal foi imediatamente confinado no lado menos preferido, conforme determinado durante a linha de base. Cada sessão de condicionamento durou 60 minutos. O tratamento durou quatro dias.

*Fase de Pós-Condicionamento (Teste de Preferência Condicionada):* a preferência por local induzido por morfina foi registrada 24 horas após o último teste de condicionamento. Alterações nas preferências anteriores dos sujeitos experimentais pela câmara foram indicativos de que a morfina induziu um efeito gratificante no estado afetivo do animal, com o oposto indicando que a manipulação experimental teve um efeito aversivo no estado afetivo do animal (PRUS; JAMES; ROSECRANS, 2009). As sessões foram realizadas de forma semelhante à linha de base, com os animais obtendo livre acesso aos compartimentos A e B por 10 minutos. Os escores de preferência condicionada foram definidos como a taxa entre o tempo gasto no compartimento pareado com drogas - tempo gasto no compartimento não relacionado a drogas, levando em consideração a média de tempo gasto em cada câmara (A e B) do aparato de preferência de local registrado durante a linha de base.

#### *Análise Estatística*

Os dados foram analisados como Média  $\pm$  SEM. A partir de então, a suposição de normalidade e homogeneidade das variações foi determinada pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os efeitos da morfina na preferência da câmara foram analisados por uma ANOVA de medidas repetidas bifatorial (*two-way*) sendo: tratamento (doses de veículo e medicamento) x momento (preferência basal x efeitos da morfina). A ANOVA



unifatorial (*one-way*) foi usada para examinar a taxa de preferência. Para preservar o erro  $\alpha$  (tipo I), a análise Post-hoc foi realizada com o teste Tukey-Kramer HSD. A probabilidade foi estipulada em 5% ( $P \leq 0,05$ ).

Tabela 1. Grupos Experimentais e Ilustração Esquemática do Procedimento

Grupos								
Salina				N = 18				
Morfina – 10 mg/Kg				N = 18				
Morfina – 20 mg/Kg				N = 10				

	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8
	BASELINE 1	BASELINE 2	BASELINE 3	TRATAMENTO 1	TRATAMENTO 2	TRATAMENTO 3	TRATAMENTO 4	TESTE
Drogas	Sem Drogas	Sem Drogas	Sem Drogas	Salina ou Morfina	Salina ou Morfina	Salina ou Morfina	Salina ou Morfina	Sem Drogas

Fonte: Paliarin e Nobre 2020.

### 3.3.2 Aversão Condicionada

Foram utilizados 25 ratos machos *Wistar*, pesando aproximadamente de 250 a 300g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de São Paulo, campus de Ribeirão Preto. Os grupos se dividiram em: Controle (n= 6), neste aplicou-se a dose de Salina (10 mg/Kg) em ambos os horários. Experimental 1 (n=6), neste os animais receberam a primeira dose de Salina (1 mg/Kg), e no segundo condicionamento uma dose de Morfina (10mg/Kg). O grupo experimental 2 (n=6), recebeu Salina (1mg/Kg) pela manhã, e Naltrexona (0,3mg/Kg) a tarde. O grupo experimental 3 (n=7), recebeu Morfina (10 mg/Kg) pela manhã, e Naltrexona (0,3 mg/Kg) pela tarde. Inicialmente fez-se três dias de *baseline* nos quais o animal ficava livre para escolher o ambiente que mais lhe agradava, ao fim de três dias o ambiente no qual o animal passou maior tempo foi definido com o de preferência. Então, aplicou-se a droga e foi feito condicionamento durante quatro dias. No quinto dia repetiu-se o teste tal como feito no pré-condicionamento.

#### *Drogas*

Utilizou-se em todo teste Sulfato de Morfina (Dimorf), na dosagem de 10 mg/kg, Naloxona (Sigma-Aldrich, USA) na dosagem de 0,3 mg/Kg e Cloreto de sódio (0,9%) nos grupos controle.

### *Aparato experimental*

O aparato utilizado neste experimento é o mesmo já descrito anteriormente para o experimento de preferência condicionada ao lugar. Desta vez, testou-se a capacidade de 10 mg/kg de morfina (a dose mais eficaz para induzir preferência de local) para induzir aversão ao local quando seguido por uma injeção (*s.c.*) do antagonista do receptor  $\mu$  opioide naltrexona (0,3 mg / kg).

*Fase de Pré-condicionamento:* os animais tinham livre acesso a ambos os compartimentos por 15 minutos. A média de permanência em cada compartimento foi utilizada para definir o compartimento mais e o menos preferido.

*Fase de condicionamento aversivo:* Por quatro dias, os animais receberam injeções de salina e morfina (*s.c.*), que foram realizadas de manhã (08:00) e confinados por 30 minutos logo em seguida. Após 7 horas receberam uma segunda injeção de soro fisiológico ou do antagonista opiáceo naltrexona (*s.c.*). Para aversão induzida, a porta da guilhotina foi trancada e o placebo, os efeitos da morfina ou a abstinência precipitada de morfina induzida pela naloxona foram registrados com os animais confinados na câmara de maior preferência.

*Fase de Pós-Condicionamento (Teste de Aversão Condicionada):* a aversão ao local induzida por morfina foi conduzida 24 horas após a última sessão de condicionamento. Durante esta fase, os animais tiveram livre acesso aos dois compartimentos A e B, como na fase de pré-condicionamento, durante os 10 minutos de teste. Alterações nas preferências da câmara dos sujeitos experimentais foram indicativas de que a morfina induziu um efeito aversivo no estado afetivo do animal, com o oposto indicando que a manipulação experimental teve um efeito reforçador no estado afetivo do animal (PRUS; JAMES; ROSECRANS, 2009). Os escores de preferência condicionada foram definidos como a taxa entre o tempo gasto no compartimento pareado com drogas subtraída do tempo gasto no compartimento não relacionado a drogas, levando em consideração a média de tempo gasto em cada câmara (A e B) do aparelho de preferência de local registrado durante a linha de base.

### Análise Estatística

Os dados foram analisados como média  $\pm$  SEM. A aversão ao local induzida por morfina foi analisada por RM ANOVA bifatorial sendo: tratamento (doses de veículo e medicamento) x momento (preferência basal x efeitos de morfina). As principais diferenças na taxa de referência foram avaliadas com ANOVA unifatorial (*one-way*).

Tabela 2. Grupos Experimentais e Ilustração Esquemática do Procedimento

Grupos								
Salina x Salina				N = 06				
Morfina x Salina				N = 06				
Salina x Naloxona				N = 06				
Morfina x Naloxona				N = 07				

	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8
	BASELINE 1	BASELINE 2	BASELINE 3	TREINAMENTO 1	TREINAMENTO 2	TREINAMENTO 3	TREINAMENTO 4	TESTE
Primeira Injeção (Pela manhã)	Sem Drogas	Sem Drogas	Sem Drogas	Salina ou Morfina	Salina ou Morfina	Salina ou Morfina	Salina ou Morfina	Sem Drogas
Segunda Injeção (7 horas após)	-	-	-	Salina ou Naloxona	Salina ou Naloxona	Salina ou Naloxona	Salina ou Naloxona	-

Fonte: Paliarin e Nobre 2020.

### 3.3.3 Tolerância Condicionada Contextual

Foram utilizados 82 ratos machos *Wistar*, pesando aproximadamente de 250 a 300g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de São Paulo, campus de Ribeirão Preto. O paradigma de tolerância condicionada contextual é baseado no fenômeno bem conhecido do condicionamento clássico (ou Pavloviano), no qual se supõe que a tolerância comportamental (e farmacológica) a uma dosagem de medicamento ocorre no contexto em que a droga é geralmente ingerida (SIEGEL, 1975; SIEGEL et al., 1982). Para esta análise, foi utilizado um campo aberto eletrônico (50 cm x 50 cm x 50 cm) a ser descrito. Os dados foram registrados em um PC e posteriormente analisados por um software (Activity Monitor, Insight, Brasil).

### *Drogas*

Utilizou-se em todo teste Sulfato de Morfina (Dimorf), nas dosagens de 10, 40 e 80mg/kg, e Cloreto de sódio (0,9%) nos grupos controle.

### *Procedimento experimental*

O teste do campo aberto foi executado em uma arena de 50 x 50 x 50 cm, tendo dois sistemas de LEDs infravermelhos inseridos nas laterais, para monitoramento eletrônico da atividade locomotora do animal, onde o movimento dele gera perturbação dos sensores. O monitor de atividade eletrônico (IR), por sua vez, capta movimentos através de 24 pares de sensores de infravermelhos dispostos ao longo das paredes, registrando os dados no software. O software monitorou os eixos x, y e z, que correspondem à altura, largura e profundidade, podendo reconhecer assim movimentos circulares, horário, anti-horário e caminhadas, medindo espaço e tempo. Existiam duas arenas, uma sendo composta de paredes e chão de acrílico transparente, a qual nomeou-se de Contexto A, no qual as luzes sempre estavam acesas durante os registros. E uma segunda, cujas paredes eram compostas por listras intercaladas pretas e brancas, e o chão foi forrado com papel marrom, diferindo a textura do piso, e as luzes sempre apagadas, a esta foi dado o nome de Contexto B.

Após a chegada e habituação as condições do biotério por três dias, os experimentos foram iniciados. Dividiu-se nesse momento os animais em dois grandes grupos: Morfina e Salina (grupo controle). Os animais foram pesados e submetidos a quatro dias de uma única injeção diária de morfina na dose de 10mg/kg ou salina, de acordo com seu grupo. Todos esses registros aconteceram apenas no Contexto A. Os dados registrados foram divididos nos seus aspectos emocionais (tempo gasto ao longo da periferia (paredes) e no centro do monitor, ou motores (velocidade, distância percorrida, ambulação, elevação, imobilidade). Os registros foram divididos em oito blocos de 5 minutos cada, totalizando 40 minutos e foram realizados logo após uma injeção intraperitoneal de morfina ou placebo, ao longo dos quatro dias de tratamento, com os registros diários, seguido então de uma sessão teste, na qual o animal recebeu uma overdose (40 ou 80 mg/Kg) realizada em contexto diferente ou não, de acordo com o grupo ao qual pertencia.

No dia do teste os animais foram desafiados com uma overdose de 40 ou 80 mg/kg de morfina ou placebo, logo em seguida, foram colocados no aparato e os comportamentos foram registrados. Houve uma nova divisão dos animais, em que duas eram as condições do teste: ratos previamente condicionados no contexto A foram testados no mesmo contexto com uma overdose de morfina (40 ou 80 mg / kg) (A x A) ou, ratos previamente condicionados no contexto A foram testados no contexto B com uma overdose de morfina (A x B). No geral, seis grupos foram formados: solução salina A x A (n = 20), solução salina A x B (n = 20), morfina 40 mg/Kg A x A (n = 10), morfina 40 mg/Kg A x B (n = 10), morfina 80 mg/Kg A x A (n = 10) e morfina 80 mg/Kg A x B (n = 12).

### *Análise Estatística*

Os dados experimentais da tolerância condicionada contextual foram analisados com uma ANOVA bifatorial (*two-way*), sendo solução salina / morfina x contexto A / B para cada variável em estudo (velocidade, distância percorrida, ambulação, elevação, tempo de imobilidade e tempo gasto no centro do campo aberto). Alterações na taxa de preferência foram avaliadas com o teste T de *Student*. Quando necessário, foi utilizado o teste Tukey-Kramer HSD ( $P \leq 0,05$ ).

Tabela 3. Grupos Experimentais e Ilustração Esquemática do Procedimento

Grupos					
	Salina AxA				N = 20
	Salina AxB				N = 20
	Morfina AxA – 40mg				N = 10
	Morfina AxB – 40mg				N = 10
	Morfina AxA – 80mg				N = 10
	Morfina AxB – 80mg				N = 12
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5
	TRATAMENTO 1	TRATAMENTO 2	TRATAMENTO 3	TRATAMENTO 4	TESTE (OVERDOSE)
Drugs	Salina ou Morfina (10 mg/Kg)	Salina ou Morfina (10 mg/Kg)	Salina ou Morfina (10 mg/Kg)	Salina ou Morfina (10 mg/Kg)	Salina ou Morfina (40 ou 80 mg/Kg)

Fonte: Paliarin e Nobre 2020.

### 3.3.4 Preferência Condicionada ao Contexto e PEAs Coliculares

Foram utilizados um total de 30 ratos machos *Wistar* de cinco semanas com +/- 220g (valores estipulados de peso/idade segundo UMEOKA et al., 2011) provenientes do Biotério

Central da Universidade Estadual de São Paulo, campus de Ribeirão Preto. Antes do início dos experimentos, foram mantidos durante três dias no biotério local do laboratório de neuropsicofarmacologia para se aclimatarem. Os animais foram divididos em dois grupos: Experimental 1: Receberam ou não Xilazina antes dos registros dos potenciais nos dias de baseline e teste, durante o condicionamento receberam morfina na dosagem de 10 mg/Kg, esse grupo foi finalizado com 12 animais. Experimental 2: Estes animais não receberam drogas nos dias de baseline e teste, seu condicionamento foi feito com uma dose de salina, Finalizado com 10 animais. Nove animais não tiveram seus dados utilizados, ou por morte durante o período de procedimento ou por problemas com o eletrodo.

### *Drogas*

Utilizou-se em todo teste Sulfato de Morfina (Dimorf), nas dosagens de 10 mg/kg e Cloreto de sódio (0,9%) nos grupos controle. Também foi realizada em alguns animais de ambos os grupos sedação com Xilazina (0,25 mg/kg).

### *Cirurgia*

Os animais foram submetidos a um implante cirúrgico de um conjunto de eletrodos. Eles foram anestesiados intraperitonealmente com uma mistura de 60 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina (Agener, Brasil) e alocados em um estereotáxico digital (Insight, Brasil) onde tiveram o crânio fixado pelo rochedo temporal e incisivos superiores. A lidocaína (20 mg/ml) foi injetada em torno do campo cirúrgico como complemento local da anestesia geral. Em seguida, uma incisão longitudinal foi feita na pele da cabeça e, após remoção do perióstio por raspagem, três orifícios foram feitos no crânio com auxílio de uma broca dental, nos quais fixou-se três parafusos de aço inoxidável. Para registro dos potenciais evocados auditivos outro orifício foi perfurado para o implante de um eletrodo bipolar torcido (12,0 mm de comprimento), feito de fios esmaltados de aço inoxidável (produtos Plastic-One, Roanoke, VA, EUA), 150 µm de diâmetro, isolados, exceto na seção transversal da ponta, que visava o núcleo central do colículo inferior (CIC) (-8,6 mm posterior, ± 1,5 mm lateral, -4,0 mm de profundidade em relação ao bregma) (PAXINOS, 2008) foi introduzido verticalmente. A fixação no crânio foi feita por meio de resina acrílica e os três parafusos de aço inoxidável. Ao término da cirurgia cada animal recebeu, por via intramuscular, uma injeção de pentabiótico (60.000 UI, 0,2 ml) e uma injeção intramuscular

do analgésico e anti-inflamatório banamine (2,5 mg/Kg). A administração do pentabiótico foi repetida a cada cinco dias. Em conjunto, estes procedimentos visaram minimizar ao máximo problemas com infecção.

### *Aparato Experimental*

Os registros dos PEAs foram conduzidos com os animais mantidos dentro de uma gaiola de contenção (dimensões externas: 19 cm × 9 cm × 9 cm; dimensões internas: 16 cm × 6 cm × 7 cm) localizada dentro de um sistema isolado de Faraday e cercada por uma câmara de atenuação de som ventilada de compensado (64 × 60 × 40 cm). O piso da gaiola consistia em seis barras de aço inoxidável de 3,0 mm de diâmetro, espaçadas de 1,0 mm, 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) eram 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, chamou-se este conjunto de Contexto A. Durante o período de condicionamento, onde dentro desta caixa, inseriu-se um aparato constituído de três paredes com listras pretas e brancas, e então a gaiola de contenção ficou centralizada entre essas paredes, e o lado em aberto foi direcionado aos *tweeters*, este definiu-se como sendo o Contexto B. Um alto-falante, localizado 10 cm atrás da gaiola, emitia ruído de fundo contínuo (nível de pressão sonora de 55 dB). Um Software de interface apropriada (*Lynx*, São Paulo, Brasil) controlava a apresentação e o sequenciamento dos estímulos acústicos. Os níveis de pressão sonora foram medidos no nível das orelhas dos animais usando um microfone de 0,125 polegadas e um amplificador de medição tipo 2636 DK-2580 (Briel e Kjaer, Naerum, Dinamarca). Os estímulos acústicos foram apresentados através de dois alto-falantes piezoelétricos (12 Ω, 200 W, LeSon, Brasil) montados nas paredes laterais da câmara de isolamento acústico, a 15 cm da gaiola experimental. Os animais foram previamente habituados à restrição comportamental da gaiola experimental. Dado tamanho da gaiola de contenção, apesar de não totalmente contidos, os animais ficaram 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.

### *Registro dos PEAs*

Uma voltagem elétrica muito pequena do PEA foi registrada através dos eletrodos implantados unilateralmente no CIC. Esse PEA ocorre em resposta a um estímulo repetitivo ao longo de uma via auditiva específica do tronco cerebral e reflete a atividade neuronal no complexo auditivo, principalmente no núcleo coclear, na oliva superior e na CI (LONG; ALLEN, 1984). Os estímulos foram cliques puros (duração de 50 ms; pulsos de onda quadrada de 3000 Hz, nível de pressão sonora de 95 dB). O PEA foi registrado após cada um dos 100 estímulos auditivos como diferença de tensão entre as pontas do eletrodo bipolar (150  $\mu$ m). Essa diferença de voltagem foi introduzida em um amplificador (TX001, Lynx, São Paulo, Brasil) através de cabos condutores isolados por uma passagem no teto da gaiola de Faraday, vinculados a um dispositivo de giro elétrico de escova dupla (SL2C, Plastics-Um, EUA). A saída do amplificador foi conectada a um conversor analógico / digital (CAD 12/36) conectado a um microcomputador. Os sinais do potencial foram amostrados a uma taxa de 0,33 kHz e filtrados (frequência passa-alto, 20 Hz, frequência passa-baixo, 200 Hz). A filtragem, amplificação e digitalização dos sinais foram realizadas pelo software do sistema Sysdin (Lynx, São Paulo, Brasil). O software Sysdin foi configurado para resumir amplitudes individuais de PEA. Os valores médios foram obtidos no final das sessões. A varredura de aquisição de dados começou 10 ms antes do início do estímulo sonoro (latência para ligar o som mais propagação sonora) e continuou até 200 ms após o término do estímulo sonoro. Durante as experiências, os animais foram monitorados através de um sistema de câmera de vídeo colocado na sala experimental. As amplitudes dos picos foram definidas como a amplitude máxima medida entre N1 e o final de P1 (BRANDÃO et al., 2005; BRANDÃO; COIMBRA; OSAKI, 2001; NOBRE; SANDNER; BRANDÃO, 2003). O pico positivo P1 é considerado um componente inicial da resposta colicular. Sua amplitude é medida pico a pico, com latência de pico entre 5 e 10 ms (HALL; MARK, 1967). Essa forma de análise é comparável à observada em estudos anteriores de nossos e de outros laboratórios usando protocolos semelhantes (HALL; MARK, 1967; NOBRE; CABRAL; BRANDÃO, 2010; NOBRE; SANDNER; BRANDÃO, 2003; SZCZEPANIAK; MØLLER, 1995). A gravação de dados foi verificada na tela do computador. A saída do computador foi exibida



graficamente em uma plotadora XY (Hewlett-Packard 1100, Palo Alto, CA, EUA). Os dados do PEA foram armazenados no disco rígido do computador e transferidos para as tabelas do Microsoft Excel (Microsoft Corp., Mountain View, CA, EUA) para visualização e análise off-line. Os PEA extraídos do CIC foram registrados a partir das porções ventro-caudais do núcleo.

### *Procedimento Experimental*

Este experimento buscou determinar a influência de um contexto e o pareamento com droga na expressão da tolerância a uma resposta fisiológica. Para isso, foi inserido um procedimento comportamental de preferência de local em um aparato de registro fisiológico dos potenciais do campo colicular em dois ambientes distintos. Um estudo anterior já havia apontado a utilidade de um sedativo na mensuração dos potenciais evocados auditivos do tronco cerebral para controlar a influência das respostas motoras nas latências de pico (ARAI, 2008). Portanto, para analisar essa afirmação, os animais foram submetidos a uma injeção intramuscular de xilazina (10 mg / kg, 0,1 ml) imediatamente antes do registro dos dados.

*Fase de Pré-condicionamento:* As amplitudes basais dos PEAs foram determinadas em um estado livre de drogas, com os animais confinados no contexto A. Três medidas foram tomadas como base e a amplitude e latência médias foram usadas como valores basais da PEA. Este procedimento foi repetido por três dias. As experiências foram iniciadas com 30 animais e finalizadas com 21 (solução salina = 10 animais, morfina = 11 animais). Essa diferença ocorreu devido a problemas com eletrodos (alta impedância ou necrose tecidual - 3 animais) ou morte por tratamentos (6 animais).

*Fase de Condicionamento:* Em geral, o condicionamento com a droga foi realizado de forma semelhante ao experimento de preferência de lugar. A principal diferença foi que o PEA foi registrado com os animais experimentando efeitos da droga em um contexto específico (B). O PEA foi registrado 15 minutos após a injeção de placebo ou morfina. Foram realizadas quatro sessões de condicionamento, com duração de uma hora cada.

*Fase de Pós-condicionamento:* A sessão de teste foi realizada 24 horas após o condicionamento, da mesma forma que a linha de base e na ausência de efeitos e drogas. As

sessões foram realizadas aleatoriamente nos dois contextos (A e B). No geral, cada animal foi testado oito vezes ao longo de oito dias (três dias da linha de base, quatro dias de condicionamento da droga / contexto e um dia de teste).

### *Histologia*

Seguiu-se o mesmo protocolo histológico descrito anteriormente.

### *Análise Estatística*

As ondas dos potenciais evocados auditivos (PEA) foram rotuladas e avaliadas de acordo com trabalhos anteriores (BAGRI; SANDNER; DI SCALA, 1989; BRANDÃO et al., 2005; BRANDÃO; COIMBRA; OSAKI, 2001; NOBRE, 2013). Os dados utilizados para a análise estatística foram a latência média e a amplitude do PEA registradas durante a sessão de linha de base, a latência e o PEA registrados após uma injeção aguda de placebo ou morfina (primeiro teste de condicionamento - CD1) e os registrados na ausência de efeitos de medicamentos durante o confinamento. No contexto A ou B, os efeitos da tolerância eletrofisiológica induzida pela morfina à latência e à amplitude do PEA foram analisados por uma ANOVA RM bifatorial sendo: tratamento (veículo x morfina) x momento do teste (linha de base > CD1 > A / A > A / B). Quando necessário, a RM ANOVA bifatorial foi seguida pelo teste de intervalo múltiplo (MRT) de Duncan para especificar diferenças entre pares de médias. A análise post-hoc foi realizada com o teste Tukey-Kramer HSD. Os efeitos dos tratamentos na latência para a primeira onda negativa (N1) foram determinados por uma RM ANOVA bifatorial, seguida pelo teste de Tukey. Para todas as comparações, o nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

Tabela 4. Grupos Experimentais e Ilustração Esquemática do Procedimento

Grupos								
Salina				N = 10				
Morfina – 10 mg/Kg				N = 11				

	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8
	BASELINE 1	BASELINE 2	BASELINE 3	TREINAMENTO 1	TREINAMENTO 2	TREINAMENTO 3	TREINAMENTO 4	TESTE
Aplicação de Drogas	Sem Drogas	Sem Drogas	Sem Drogas	Salina ou Morfina	Salina ou Morfina	Salina ou Morfina	Salina ou Morfina	Sem Drogas
Registros de PEAs	Contexto A	Contexto A	Contexto A	Contexto B	Contexto B	Contexto B	Contexto B	Contexto A e B

Fonte: Paliarin e Nobre 2020.

### 3.3.5 Preferência Condicionado ao Contexto e PEAs Corticais

Foram utilizados 32 ratos machos *Wistar Hannover* de 5 semanas com +/- 220g provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto. Antes do início dos experimentos, foram mantidos durante três dias no biotério local do laboratório de neuropsicofarmacologia para se aclimatarem.

#### *Drogas*

Utilizou-se em todo teste Sulfato de Morfina (Dimorf), na dosagem de 10mg/kg, Naltrexona (Sigma-Aldrich, USA) na dosagem de 0,3 mg/Kg e Cloreto de sódio (0,9%) nos grupos controle, além das drogas já descritas e mesmas dosagens utilizadas no processo cirúrgico.

#### *Cirurgia*

Os animais foram submetidos a implantação cirúrgica, conforme já descrito anteriormente, mas como neste teste houve uma alteração da área ao qual se inseriu o eletrodo, o mesmo possuía 6.0 mm de comprimento (Plastic-One products, Roanoke, VA, USA), 150 µm de diâmetro, isolado, exceto na seção transversal da ponta, e foi alocado no córtex pré-límbico (PrL) (3,2 mm posterior, ± 0.7 mm lateral, -4.0 mm profundidade, em

relação ao *bregma*) (PAXINOS & WATSON, 2008). A fixação no crânio se fez por meio de resina acrílica e os três parafusos de aço inoxidável.

#### *Aparato Experimental*

Foi utilizado o mesmo aparato descrito anteriormente, mantendo todas as suas especificações e configurações.

#### *Registro dos Potenciais Evocados Auditivos*

Uma voltagem elétrica muito pequena do PEA foi registrada através dos eletrodos. Os registros foram feitos de forma idêntica à já explicada anteriormente, porém desta vez os eletrodos foram implantados no Córtex Pré-Frontal Pré-Límbico.

#### *Procedimento Experimental*

Este experimento se objetivou a determinar a latência e amplitude dos PEAs em dois contextos diferentes dentro de um sistema de gaiola de Faraday. Os tratamentos foram capazes de induzir facilmente o contexto associado a droga. Para isso, foi inserido um procedimento comportamental de preferência de local em um registro eletrofisiológico dos potenciais do campo do córtex pré-límbico.

*Fase de Pré-condicionamento:* As amplitudes basais dos PEAs foram determinadas em um estado livre de drogas, com os animais confinados no contexto A. Três medidas foram tomadas, e a amplitude e latência médias foram usadas como o valor dos PEA basais. Este procedimento foi repetido por três dias. O experimento foi iniciado com 32 animais e finalizado com 25 (solução salina = 09 animais, morfina = 16 animais). Essa diferença ocorreu devido à morte (4 animais) ou problemas com eletrodos (alta impedância, necrose tecidual ou erro na localização do eletrodo - 3 animais).

*Fase de Condicionamento:* O tratamento começou 24 horas após o último dia de linha de base com quatro grupos independentes. Dois grupos, solução salina e morfina, foram condicionados e testados no ambiente A outros dois grupos foram condicionados no ambiente A e testados no ambiente B (contexto de novidade). Cada animal foi submetido a uma injeção subcutânea de solução salina isotônica (n = 9) ou morfina 10 mg / kg (n = 16)

e o animal foi confinado por 60 minutos, tudo no contexto A. Durante essa etapa, não foi feito registro do PEA.

*Fase de Pós-condicionamento:* a sessão teste foi realizada 24 horas após o último condicionamento, da mesma forma que a linha de base e sem aplicação de drogas em quatro grupos, outros dois grupos tiveram seus registros mostrando os efeitos da droga. As sessões foram conduzidas aleatoriamente nos contextos A ou B, de acordo com o grupo ao qual estavam inseridos, a parede foi alocada no grupo de teste no ambiente B, apenas dois grupos foram submetidos a dois testes no mesmo dia, um pela manhã após uma dose de 10 mg / kg de morfina e outro 4 horas depois, em que receberam uma injeção subcutânea de naltrexona (0,3 mg / kg) e foram alocados ao aparato teste 10 minutos após o mesmo, um grupo no mesmo contexto e outro grupo no contexto diferente de condicionamento. No geral, cada animal foi testado quatro dias ao longo de oito dias (três dias da linha de base e um dia do teste).

### *Histologia*

Seguiu-se o mesmo protocolo histológico descrito anteriormente.

### *Análise Estatística*

Foi realizada de forma idêntica ao experimento anterior.

Tabela 5. Grupos Experimentais e Ilustração Esquemática do Procedimento

Grupos	
Salina x Teste Sem Drogas - AxA	N = 04
Salina x Teste Sem Drogas - AxB	N = 04
Morfina x Teste Sem Drogas - AxA	N = 05
Morfina x Teste Sem Drogas - AxB	N = 04
Morfina x Naloxona – AxA	N = 04
Morfina x Naloxona – AxB	N = 04

	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 8 (3.45h depois)
	BASELINE 1	BASELINE 2	BASELINE 3	TREINAMENTO 1	TREINAMENTO 2	TREINAMENTO 3	TREINAMENTO 4	TESTE	TESTE - 2
Aplicação de Drogas	Sem Drogas	Sem Drogas	Sem Drogas	Salina ou Morfina	Salina ou Morfina	Salina ou Morfina	Salina ou Morfina	Sem Drogas ou Morfina	Naloxona
Registros de PEAs* ou Condicionamento	Contexto A*	Contexto A*	Contexto A*	Contexto A	Contexto A	Contexto A	Contexto A	Contexto A ou B*	Contexto A ou B*

Fonte: Paliarin e Nobre 2020.



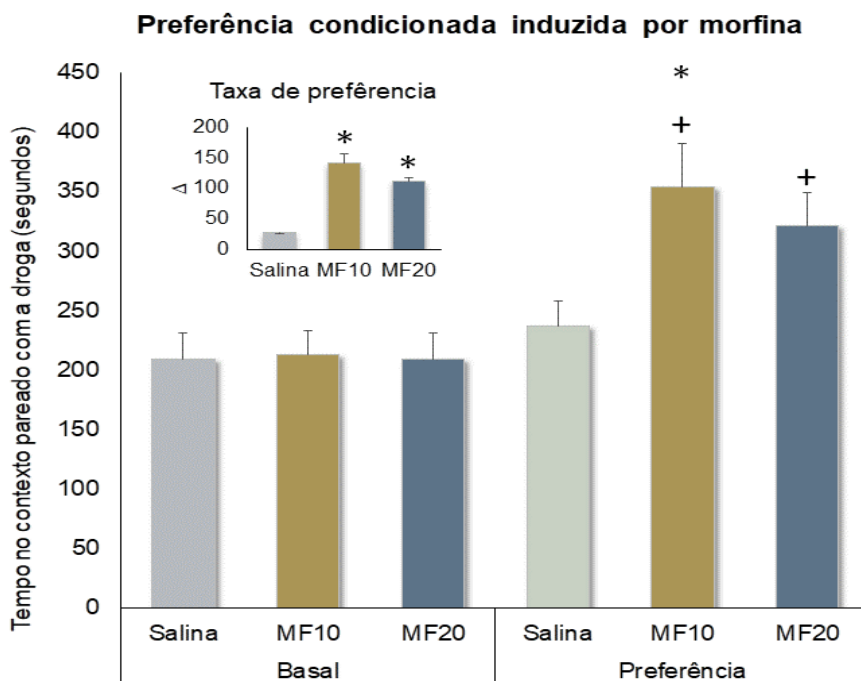
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Preferência Condicionada

Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM do tempo de permanência no contexto de condicionamento de animais submetidos ao procedimento de preferência condicionada induzida por morfina (**Figura 1**). Foram utilizados grupos independentes de animais. Os resultados foram submetidos a análise estatística com a utilização de uma ANOVA bifatorial com medidas repetidas. Os resultados obtidos mostram que o tempo de permanência no contexto de condicionamento é afetado de forma significativa pelo tratamento com morfina ( $F_{2,1} = 12,74$ ;  $P = 0,00054$ ). Além disso, foi encontrada interação significativa entre os fatores ( $F_{2,5} = 5,34$ ;  $P = 0,001$ ). Essas diferenças foram devidas principalmente à capacidade da morfina de alterar a preferência da câmara nas duas doses utilizadas, conforme revelado pela ANOVA de uma via aplicada aos dados da taxa de tolerância ( $F_{1,34} = 4,14$ ;  $P = 0,001$ ) (**Figura 1 – inserção**).



**Figura 1.** O gráfico apresenta os efeitos do condicionamento com morfina (MF) sobre a resposta de preferência ao contexto. Duas doses de morfina foram utilizadas (10 e 20 mg/kg). A taxa de preferência ao contexto previamente pareado com a droga é informada no gráfico menor (ver inserção). Inicialmente, foram tomados os limiares basais. Posteriormente, foi iniciado o condicionamento, seguido 24 horas após a última sessão, pelo teste. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey com probabilidade de 5% para significância.

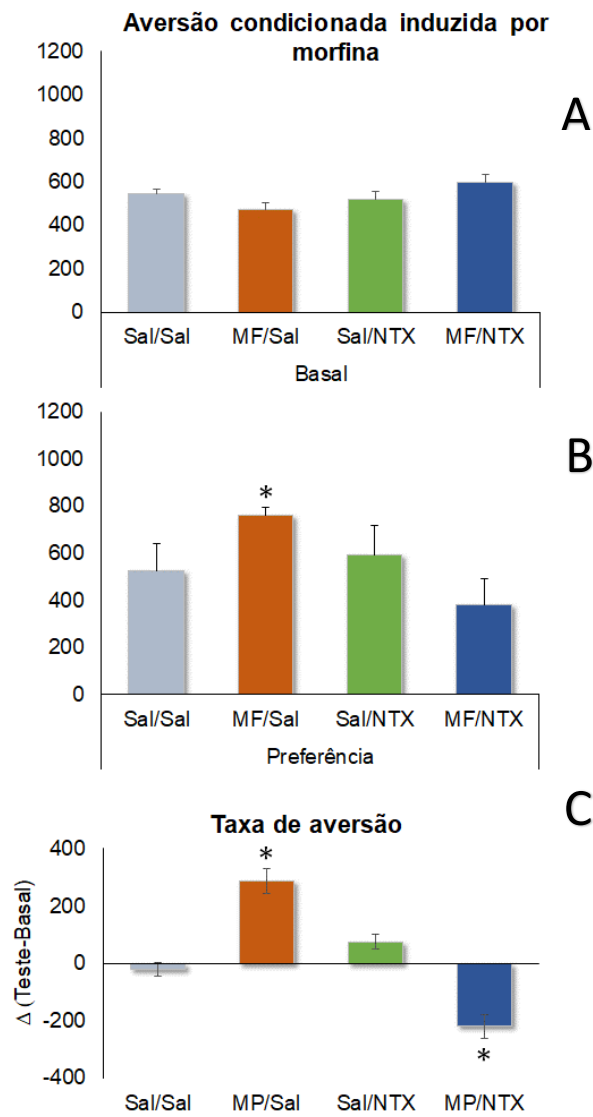


Fonte: Paliarin e Nobre 2020.

## 4.2 Aversão Condicionada

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  EPM do tempo de permanência no contexto de condicionamento de animais submetidos ao procedimento de aversão condicionada induzida por morfina (**Figura 2**). A ANOVA de dois fatores com medidas repetidas aplicada aos dados brutos mostrou que apenas o grupo morfina diferiu significativamente do grupo controle ( $F_{1,3} = 8,91$ ;  $P < 0,05$ ) (**A e B**). Comparações *a posteriori* com uma ANOVA unifatorial revelou que a preferência pela câmara emparelhada com a droga diminuiu significativamente em ratos abstinentes de morfina, conforme determinado pela taxa de aversão ( $F_{3,24} = 7,77$ ;  $P < 0,05$ ) (**Figura 2 – C**).

**Figura 2.** O gráfico apresenta os efeitos do condicionamento com morfina (MF) sobre a resposta de aversão ao contexto, evocada durante a abstinência precipitada de morfina induzida por naltrexona. A taxa de aversão ao contexto previamente pareado com a droga é informada em C. Inicialmente, foram tomados os limiares basais. Posteriormente, foi iniciado o condicionamento, seguido 24 horas após a última sessão, pelo teste.



Fonte: Paliarin e Nobre 2020.

### 4.3 Tolerância Condicionada contextual

Foram utilizados grupos independentes. Observou-se diferenças estatisticamente significantes nas variáveis velocidade ( $F_{1,3} = 19,54$ ;  $P < 0,0001$ ), distância percorrida ( $F_{1,3} = 9,99$ ;  $P < 0,001$ ), ambulação ( $F_{1,3} = 13,26$ ;  $P < 0,005$ ), levantamento ( $F_{1,3} = 15,01$ ;  $P < 0,0001$ ) e tempo de imobilidade ( $F_{1,3} = 14,00$ ;  $P < 0,0005$ ). O tempo gasto no centro do campo aberto também foi significativamente afetado ( $F_{1,3} = 18,1$ ;  $P < 0,0001$ ). A análise post-hoc apontou um aumento no desempenho de ratos controle quando expostos ao contexto B. Exceto pela velocidade, apenas a dose mais alta de morfina altera significativamente todas as medidas do estudo, conforme determinado pelas comparações do teste T de Student ( $P < 0,05$ ).

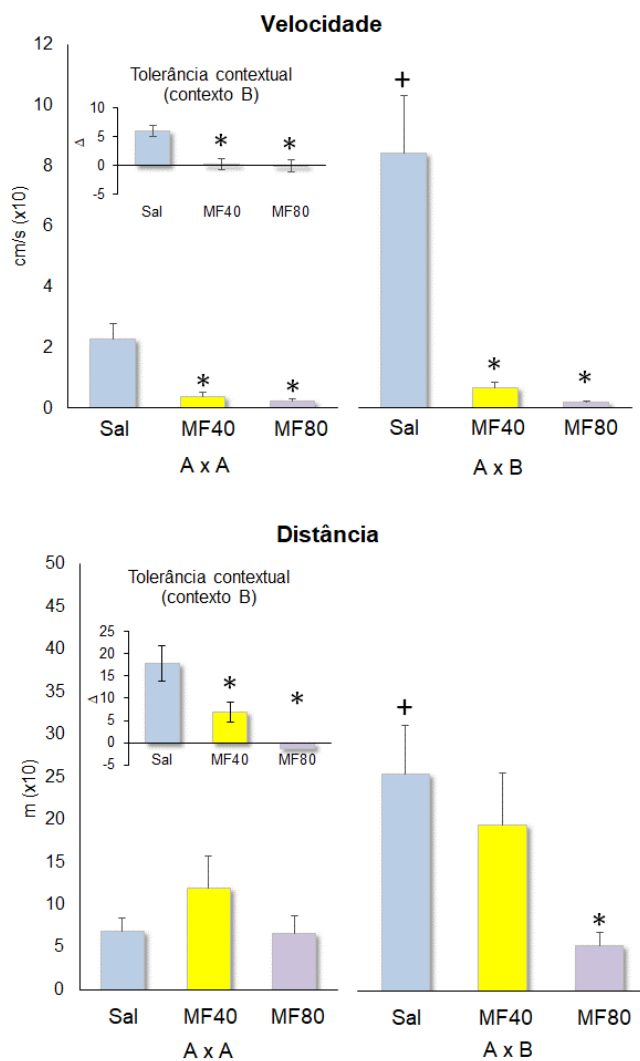
**Tabela 3.** A tabela ilustra alterações registradas durante a abstinência precipitada pela morfina

Tratamento	Teste	Velocidade	Distância	Ambulação	Levantamento	Imobilidade	Tempo Centro
Saline	A x A	-	-	+	+	+	=
	A x B	-	-	+	+	+	=
MP40	A x A	-	-	+	=	+	+
	A x B	-	-	+	+	+	+
MP80	A x A	-	-	+	=	=	=
	A x B	-	=	-	=	+	=

(-) A frequência ou duração da ocorrência do evento tende a diminuir ao longo dos 30 minutos do test.  
 (=) A frequência ou duração da ocorrência do evento permanece igual ao longo dos 30 minutos do test.  
 (+) A frequência ou duração da ocorrência do evento tende a aumentar ao longo dos 30 minutos do test.

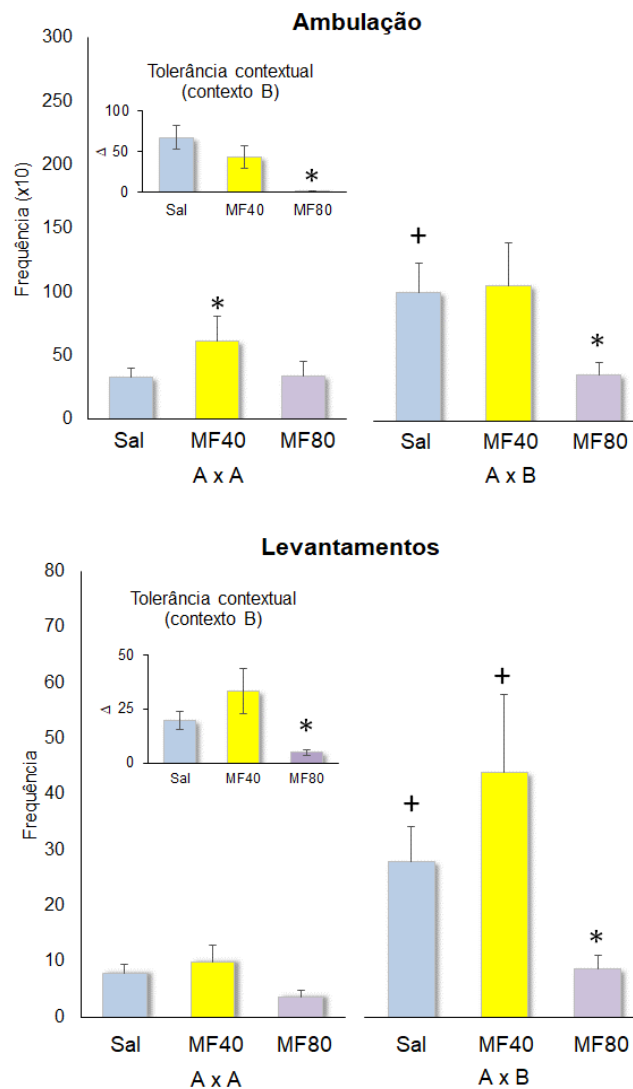
Fonte: Paliarin e Nobre 2020.

**Figura 3.** Tolerância contextual induzida por 10 mg/kg de morfina (MF), conforme determinado pela utilização de duas superdosagens (40 e 80 mg / kg). Os dados estão apresentados como média ± EPM. As variáveis apresentadas são a velocidade e distância percorrida ao longo do tempo do teste de ratos treinados no contexto A e testados com uma *overdose* de MF no mesmo contexto, ou ratos treinados no contexto A e testados com uma overdose de MF no contexto B. Foram utilizados seis grupos independentes: Salina (Sal) A × A (n = 20), Sal A × B (n = 20), MF40 A × A (n = 10), MF40 A × B (n = 10), MF80 A × A (n = 10), MF80 A × B (n = 12). (\*) Diferença significativa entre os dados do grupo MF *versus* controle (Sal) na mesma condição e teste (A × A ou A × B). (+) Diferença significativa entre os dados registrados durante os ensaios A × A *versus* A × B dentro do mesmo tratamento (Sal, MF40 ou MF80). ANOVA RM bidirecional seguida, quando necessário pelo teste *post-hoc* de Tukey-Kramer *post-hoc* (\* P ≤ 0,05). As inserções representam a taxa de tolerância para as duas overdoses de MF (ANOVA *one-way*).



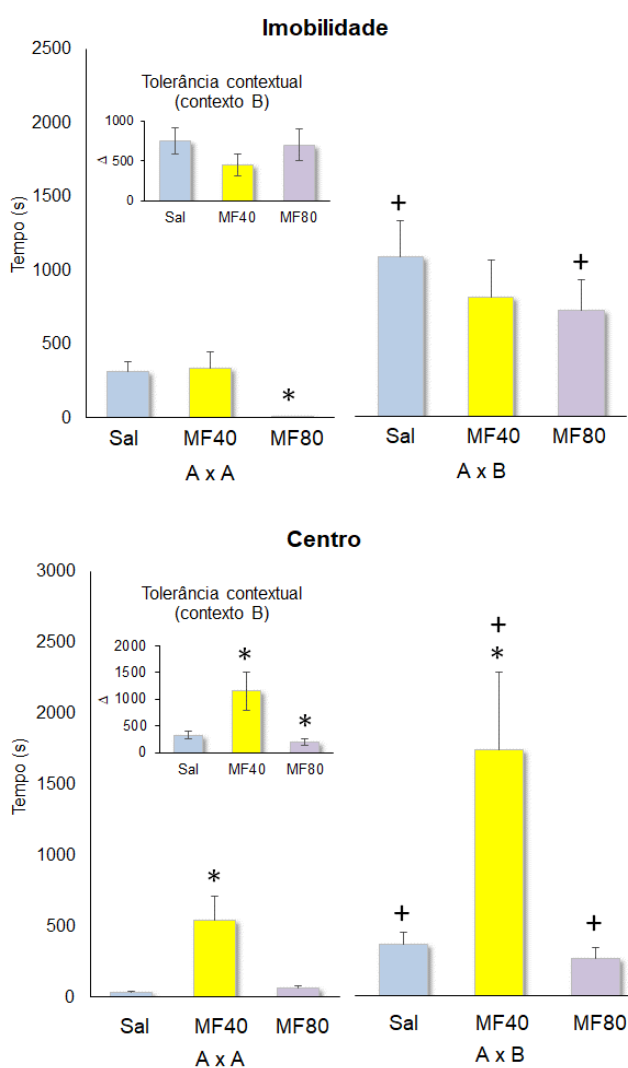
Fonte: Paliarin e Nobre 2020.

**Figura 4.** Tolerância contextual induzida por 10 mg / kg de morfina (MF), conforme determinado pela utilização de duas superdosagens (40 e 80 mg / kg). Os dados estão apresentados como média ± EPM. As variáveis apresentadas são a velocidade e distância percorrida ao longo do tempo do teste de ratos treinados no contexto A e testados com uma *overdose* de MF no mesmo contexto, ou ratos treinados no contexto A e testados com uma overdose de MF no contexto B. Foram utilizados seis grupos independentes: Salina (Sal) A × A (n = 20), Sal A × B (n = 20), MF40 A × A (n = 10), MF40 A × B (n = 10), MF80 A × A (n = 10), MF80 A × B (n = 12). (\*) Diferença significativa entre os dados do grupo MF *versus* controle (Sal) na mesma condição e teste (A × A ou A × B). (+) Diferença significativa entre os dados registrados durante os ensaios A × A *versus* A × B dentro do mesmo tratamento (Sal, MF40 ou MF80). ANOVA RM bidirecional seguida, quando necessário pelo teste *post-hoc* de Tukey-Kramer *post-hoc* (\* P ≤ 0,05). As inserções representam a taxa de tolerância para as duas overdoses de MF (ANOVA *one-way*).



Fonte: Paliarin e Nobre 2020.

**Figura 5.** Tolerância contextual induzida por 10 mg / kg de morfina (MF), conforme determinado pela utilização de duas superdosagens (40 e 80 mg / kg). Os dados estão apresentados como média ± EPM. As variáveis apresentadas são a velocidade e distância percorrida ao longo do tempo do teste de ratos treinados no contexto A e testados com uma *overdose* de MF no mesmo contexto, ou ratos treinados no contexto A e testados com uma overdose de MF no contexto B. Foram utilizados seis grupos independentes: Salina (Sal) A × A (n = 20), Sal A × B (n = 20), MF40 A × A (n = 10), MF40 A × B (n = 10), MF80 A × A (n = 10), MF80 A × B (n = 12). (\*) Diferença significativa entre os dados do grupo MF *versus* controle (Sal) na mesma condição e teste (A × A ou A × B). (+) Diferença significativa entre os dados registrados durante os ensaios A × A *versus* A × B dentro do mesmo tratamento (Sal, MF40 ou MF80). ANOVA RM bidirecional seguida, quando necessário pelo teste *post-hoc* de Tukey-Kramer *post-hoc* (\* P ≤ 0,05). As inserções representam a taxa de tolerância para as duas overdoses de MF (ANOVA *one-way*).

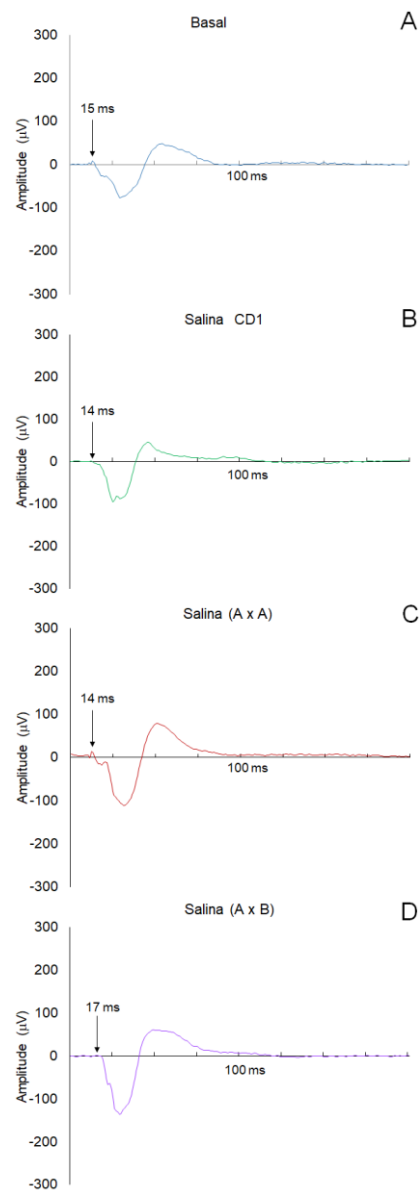


Fonte: Paliarin e Nobre 2020.

#### 4.4 Potencial Evocado Auditivo Colicular

Foi utilizada uma ANOVA bifatorial (*two-way*). Os resultados revelam que a amplitude dos PEA difere significativamente entre os tratamentos ( $F_{1,3} = 16,90$ ;  $P = 0,005$ ) (**Figuras 6, 7 e 8**). Além disso, a amplitude dos PEAs foi influenciada notavelmente pelo contexto ( $F_{1,19} = 5,89$ ;  $p = 0,001$ ) (**Figura 8**), conforme revelado pela interação significativa entre os fatores ( $F_{3,19} = 5,89$ ;  $p = 0,001$ ). No geral, uma injeção aguda de morfina (primeiro dia de condicionamento) foi capaz de aumentar a amplitude dos PEA. O efeito do condicionamento nos PEA durante o teste de tolerância foi claramente dependente de que as indicações ambientais fossem como a própria morfina no contexto B ( $F_{3,19} = 7,19$ ;  $p = 0,005$ ). A latência não foi afetada pelos tratamentos (**Figura 8**).

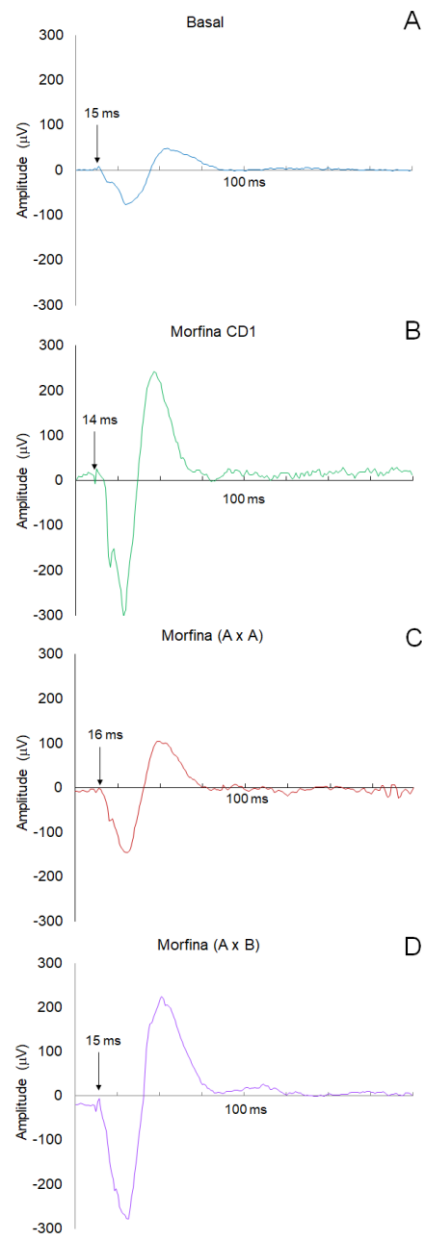
**Figura 6.** A figura representa ondas PEA evocados por clique registradas no núcleo central do colículo inferior de animais controle (salina, n = 10). (A) amplitude inicial do PEA. (B) os efeitos agudos das injeções de solução salina (primeiro dia de condicionamento). (C) a amplitude dos PEA evocados no contexto pareado a drogas. (D) a amplitude dos PEA evocados no contexto pareado não medicamentoso. As amplitudes foram determinadas como o pico entre os componentes N1 e P1. As setas indicam a latência do primeiro pico negativo (N1).



Fonte: Paliarin e Nobre 2020.

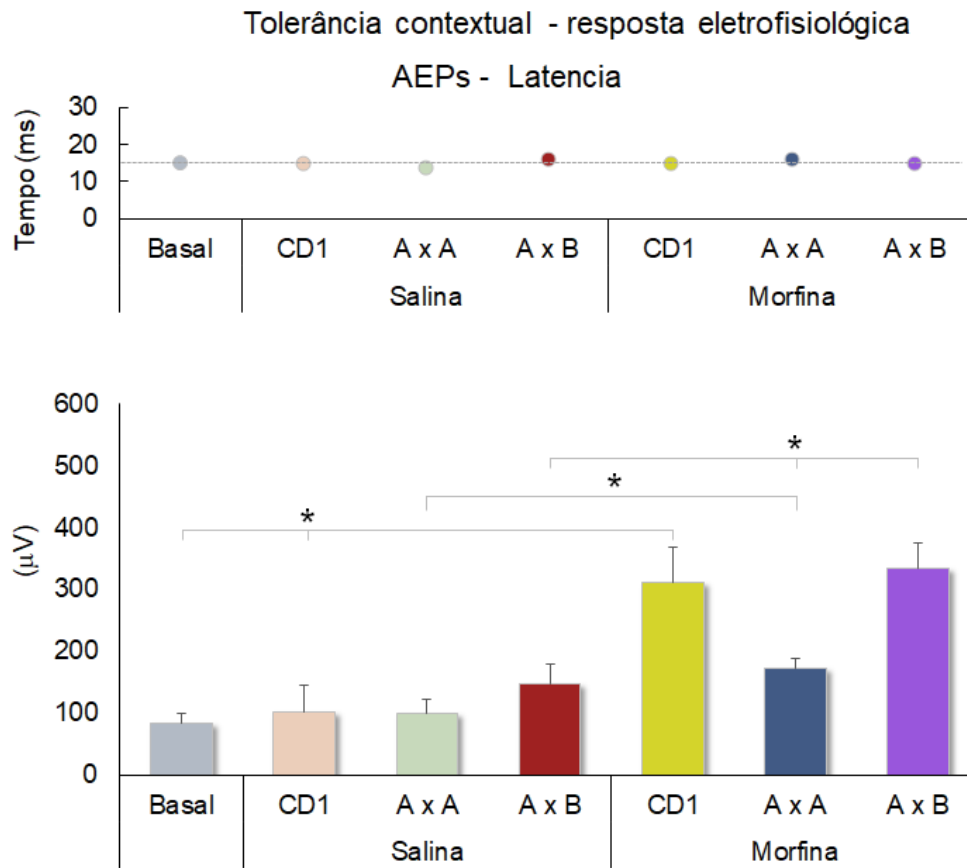


**Figura 7.** A figura representa ondas PEA evocadas por clique registradas no núcleo central do colículo inferior de animais controle (salina, n = 10). (A) amplitude inicial do PEA. (B) os efeitos agudos das injeções de morfina (primeiro dia de condicionamento). (C) a amplitude dos PEA evocados no contexto pareado a drogas. (D) a amplitude dos PEA evocados no contexto pareado não medicamentoso. As amplitudes foram determinadas como o pico entre os componentes N1 e P1. As setas indicam a latência do primeiro pico negativo (N1).



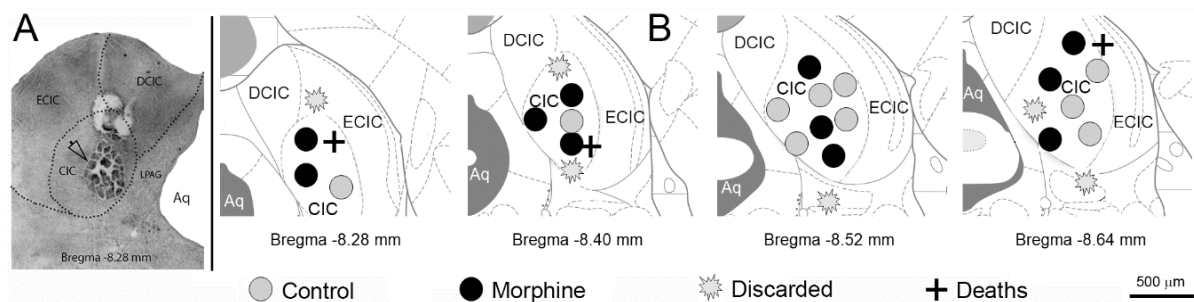
Fonte: Paliarin e Nobre 2020.

**Figura 8.** Potenciais auditivos eletrofisiológicos (PEAs) em resposta a exposição a pistas contextuais associadas aos efeitos da morfina. A figura apresenta a média ± SEM da latência (acima) e amplitude dos PEAs registrados no CIC (abaixo). Dois grupos independentes foram utilizados: solução salina (n = 10) e morfina 10 mg / kg (n = 11). CD1: primeiro teste de condicionamento. A × A: amplitude dos PEAs registrados no contexto pareado com morfina. A × B: amplitude dos PEA evocados no contexto não pareado com morfina. ANOVA *two-way* com medidas repetidas , seguida pelo teste de Duncan (MRT) (\* P ≤ 0,05).



Fonte: Paliarin e Nobre 2020.

**Figura 10.** (A) Fotomicrografia mostrando um sítio representativo de inserção do eletrodo bipolar no núcleo central do colículo inferior (CIC). Em B estão representadas a localização das pontas de registro dos eletrodos. Do total de animais utilizados ( $n = 31$ ), nove foram descartados, por óbito (três animais) e outros seis animais foram removidos dos experimentos devido a problemas técnicos. ECIC: córtex externo do colículo inferior, DCIC: córtex dorsal do colículo inferior, LPAG: substância cinzenta periaquedutal lateral, Aq: Aquaeducto de Sylvius.

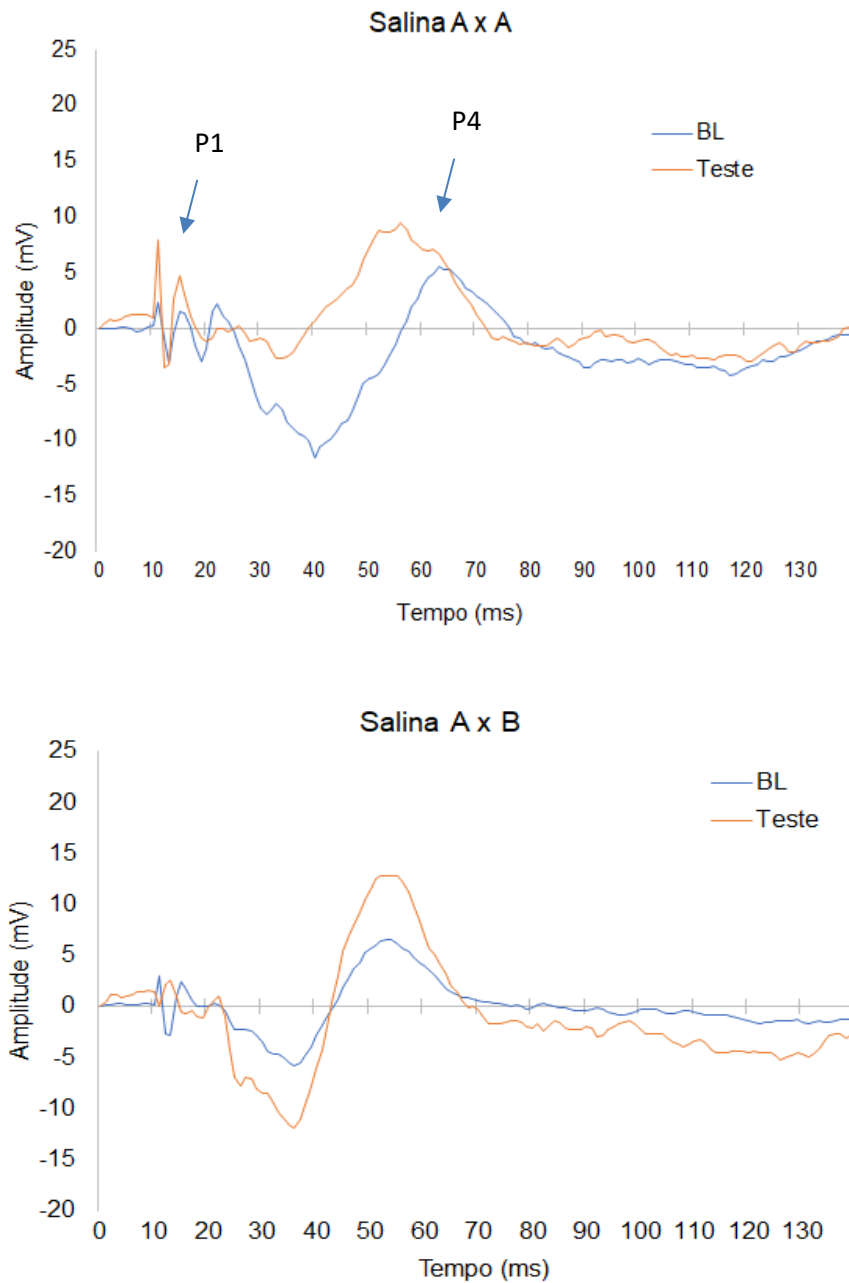


Fonte: Paliarin e Nobre 2020.

#### 4.5 Potencial Evocado Auditivo Cortical

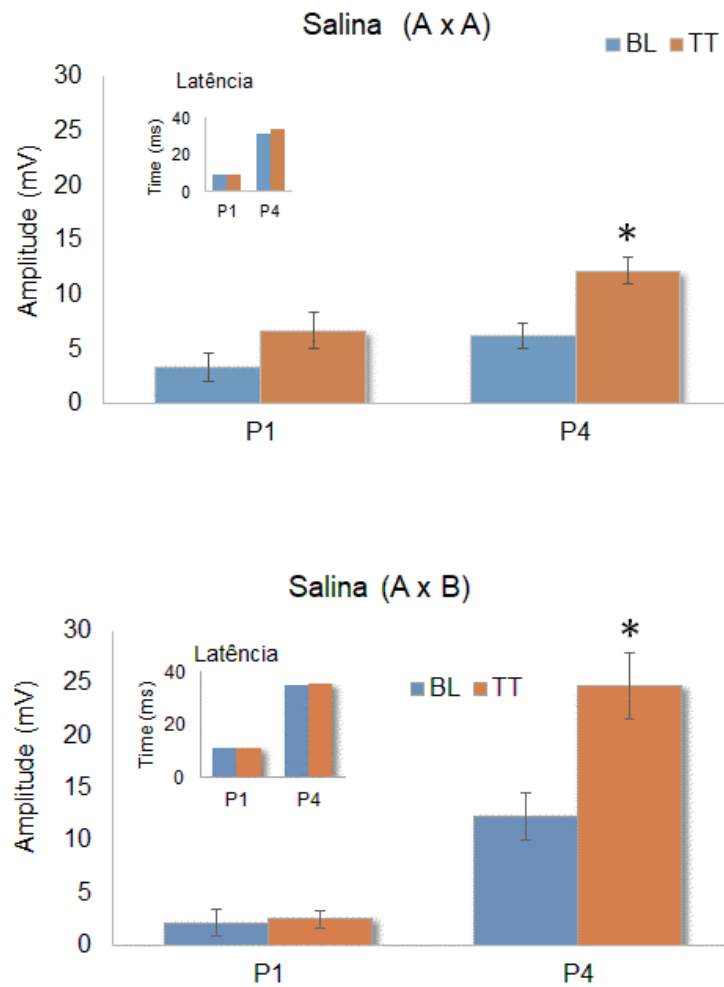
Para a análise dos efeitos da administração e abstinência de morfina sobre os potenciais evocados auditivos eliciados no córtex pré-límbico foi utilizada uma ANOVA de dois fatores bidirecional que revelou que a amplitude do PEA não difere na linha de base ( $F_{1,17} = 0,072$ ;  $P = 0,79$ ), revelada pela interação significativa entre os fatores no teste ( $F_{1,13} = 4,95$ ;  $P = 0,04$ ). O teste T não revelou diferença significativa no grupo tratado e testado no ambiente A (valor  $t = -0,47$ ), mas uma diferença significativa entre os grupos condicionados no ambiente A e testados no ambiente B (valor  $t = 3,63$ ).

**Figura 11.** A figura representa os potenciais evocados auditivos (PEAs) registrados no córtex pré-límbico de ratos submetidos ao condicionamento com placebo (salina). Foram tomadas as medidas basais (BL – três sessões). Posteriormente, os animais foram condicionados e testados no mesmo contexto do condicionamento (A), ou em um contexto diferente (B, abaixo) (n=9). As amplitudes foram determinadas para os picos dos componentes P1 (mesencefálico) e P4 (cortical).



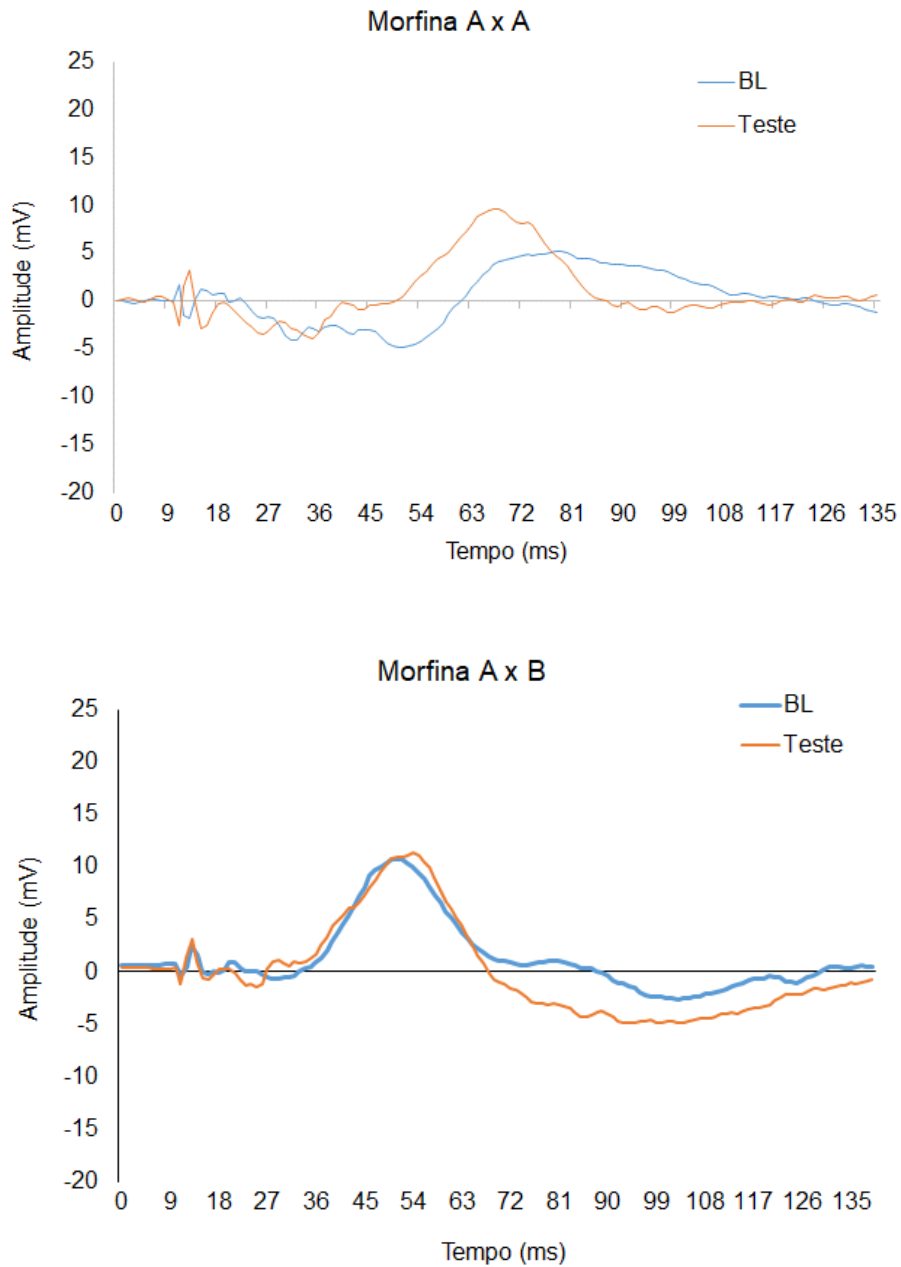
Fonte: Paliarin e Nobre 2020.

**Figura 12.** Média ± EPM dos PEAs evocados no córtex prélimbico de ratos testados antes (linha basal tomada no contexto A – BL), e depois condicionados e testados (TT) no mesmo contexto (acima). Um grupo independente de animais foi submetido ao mesmo tratamento, mas testado posteriormente em um contexto diferente daquele do condicionamento (B) (n=8). A latência para P1 é apresentada na inserção da figura. ANOVA de um fator com repetição para cada valor de P1 e P4, seguido pelo teste HSD de Tukey.  $P \leq 0.05$ .



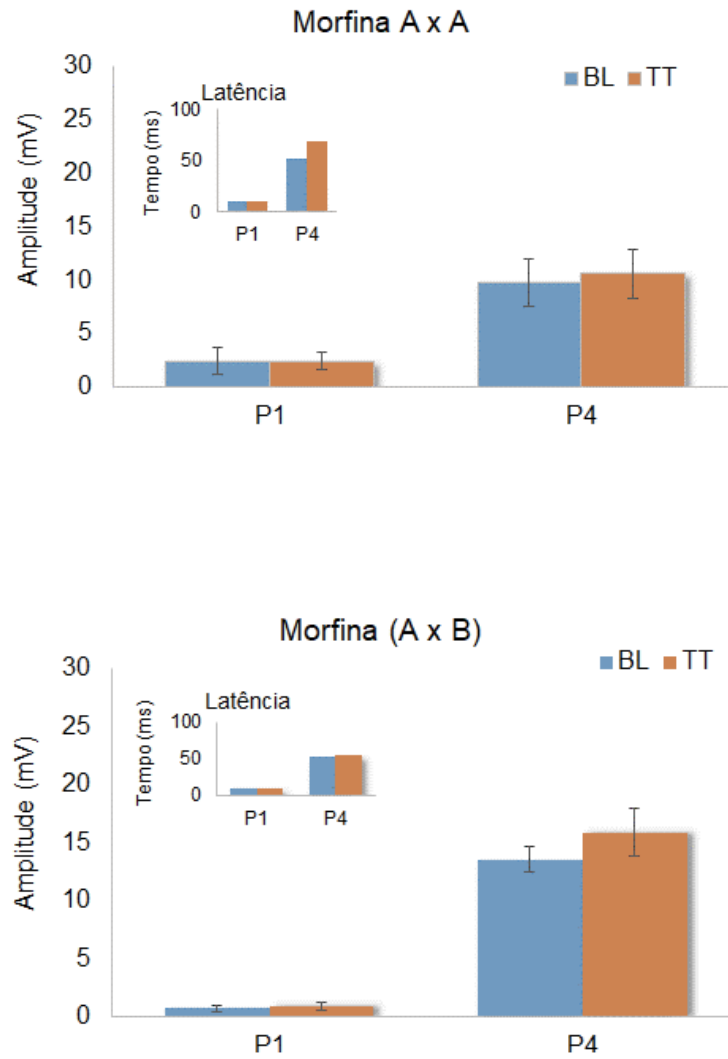
Fonte: Paliarin e Nobre 2020.

**Figura 13.** A figura apresenta os potenciais evocados auditivos (PEAs) registrados no córtex prélimbico de ratos submetidos ao condicionamento com morfina. Foram tomadas as medidas basais (BL - três sessões). Posteriormente, os animais foram condicionados e testados no mesmo contexto do condicionamento (A), ou em um contexto diferente (B, abaixo) (n=8). As amplitudes foram determinadas para os picos dos componentes P1 (mesencefálico) e P4 (cortical).



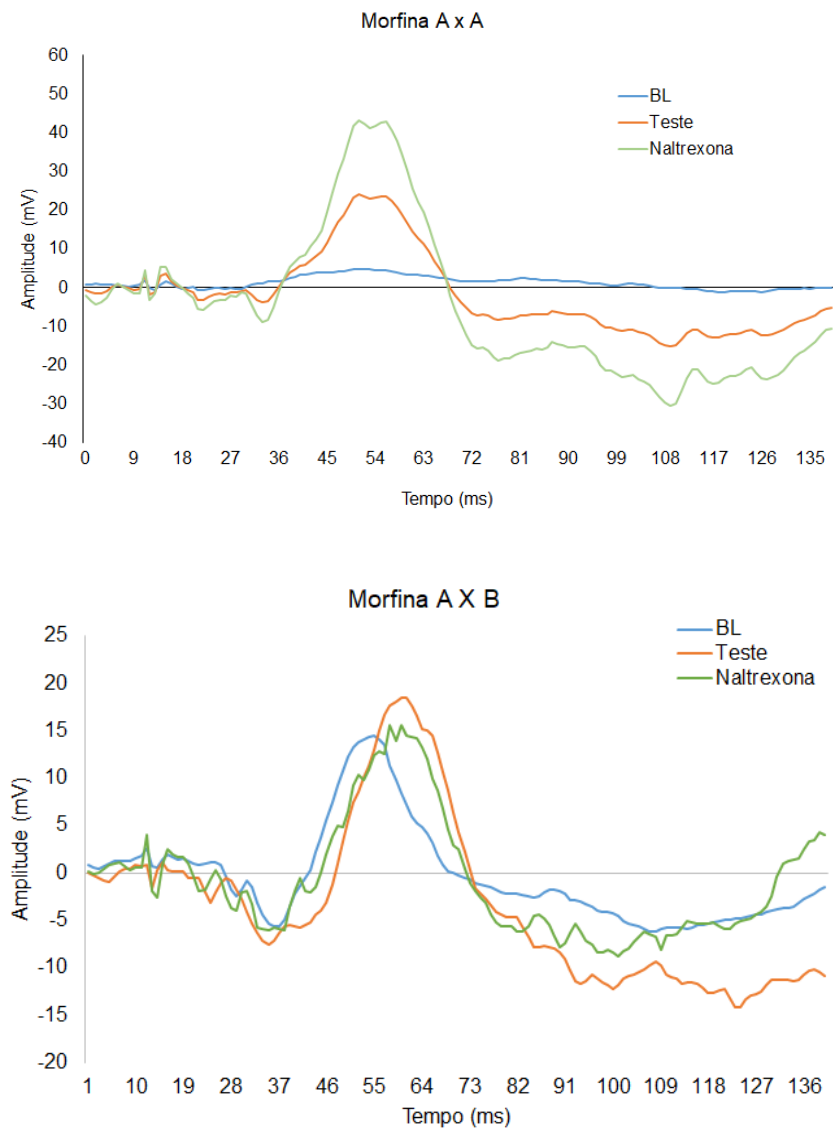
Fonte: Paliarin e Nobre 2020.

**Figura 14.** Média ± EPM dos PEAs evocados no córtex prélimbico de ratos testados antes (linha basal tomada no contexto A – BL), e depois condicionados e testados com morfina (TT) no mesmo contexto (acima). Um grupo independente de animais foi submetido ao mesmo tratamento, mas testado posteriormente em um contexto diferente daquele do condicionamento (B) (n=8). A latência para P1 é apresentada na inserção da figura. ANOVA de um fator com repetição para cada valor de P1 e P4, seguido pelo teste HSD de Tukey.  $P \leq 0.05$ .



Fonte: Paliarin e Nobre 2020.

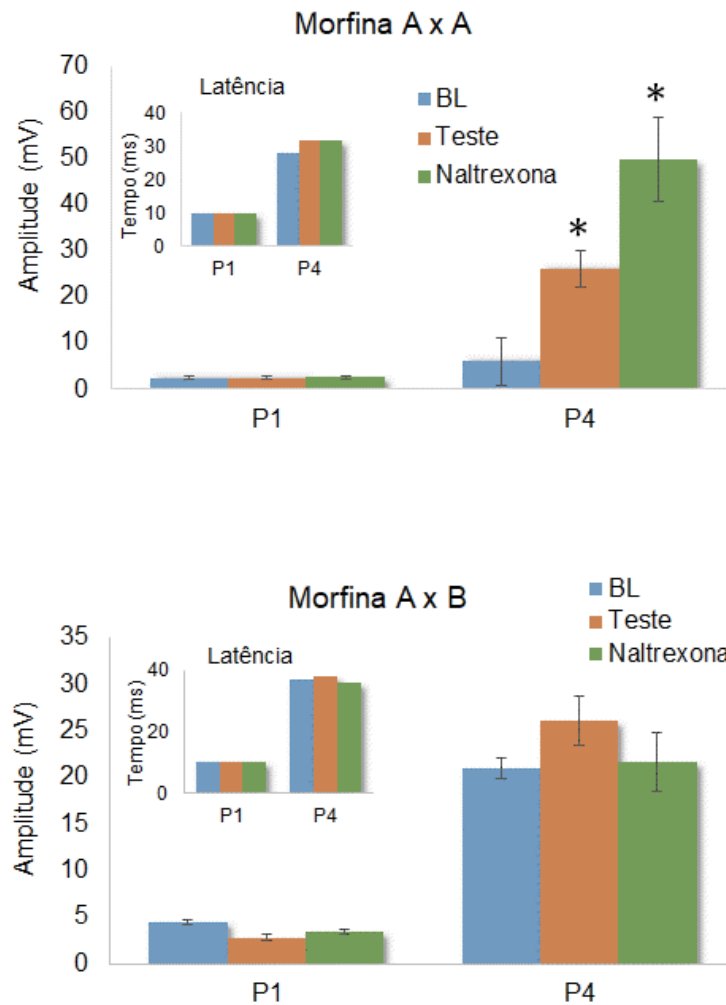
**Figura 15.** A figura apresenta os potenciais evocados auditivos (PEAs) registrados no córtex prélimbico de ratos submetidos ao condicionamento com morfina. Foram tomadas as medidas basais (BL – três sessões). Posteriormente, os animais foram condicionados e testados no mesmo contexto do condicionamento (A), ou em um contexto diferente (B, abaixo) após uma injeção de morfina e, posteriormente durante a abstinência de morfina precipitada por naltrexona. Foram utilizados 2 grupos independentes, com n=8, por grupo. As amplitudes foram determinadas para os picos dos componentes P1 (mesencefálico) e P4 (cortical).



Fonte: Paliarin e Nobre 2020.

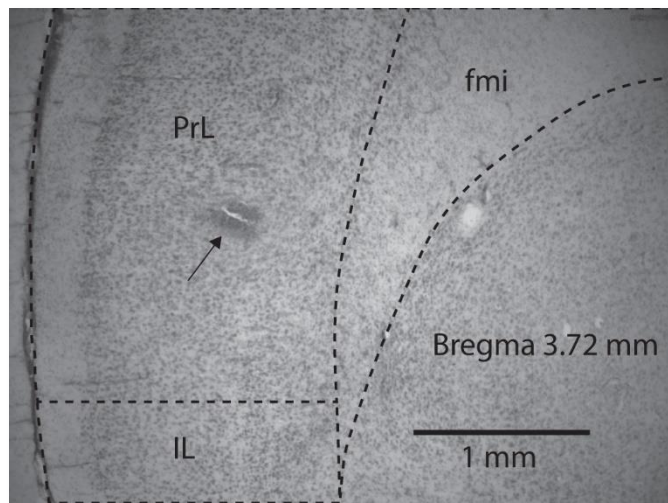


**Figura 16.** Média ± EPM dos PEAs evocados no córtex prélimbico de ratos testados antes (linha basal tomada no contexto A – BL), e depois condicionados e testados com morfina (TT) no mesmo contexto (acima). Posteriormente, os mesmos animais foram submetidos a abstinência precipitada por naltrexona e testados no mesmo contexto. Um grupo independente de animais foi submetido ao mesmo tratamento, sendo testados em um contexto diferente daquele do condicionamento (B) (n=8 para dois grupos independentes de animais). A latência para P1 é apresentada na inserção da figura. ANOVA de um fator com repetição para cada valor de P1 e P4, seguido pelo teste HSD de Tukey.  $P \leq 0.05$ .



Fonte: Paliarin e Nobre 2020.

**Figura 17.** Fotomicrografia de um sítio representativo de inserção do eletrodo bipolar no córtex pré-límbico (PrL). Fmi: fórcex minor, IL: córtex infra-límbico.



Fonte: Paliarin e Nobre 2020.



## 5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento da dependência de uma droga de abuso se caracteriza principalmente pela ocorrência de uma síndrome de abstinência em consequência da interrupção abrupta de seu consumo crônico (KOOB, 2000, 2006). Em humanos, esta síndrome é composta por sintomas somáticos (náuseas, distúrbios gastrintestinais, constipação, tremores e dores abdominais) e afetivos (disforia, agitação, irritabilidade e ansiedade) (JAFFE, 1990). Em animais de laboratório, os sintomas somáticos incluem perda de peso, diarreia, *wet dog shakes*, saltos, constrições abdominais, ereção peniana, ranger de dentes e hiperalgesia (GOLD et al., 1994b; MALDONADO; NEGUS; KOOB, 1992; MCNALLY; AKIL, 2001). Os sintomas que denunciam alterações tipo emocionais, por sua vez, incluem elevação do limiar de auto estimulação elétrica intracraniana, redução na atividade locomotora e resposta operante por alimento, além de aversão condicionada ao lugar (GRACY; DANKIEWICZ; KOOB, 2001; WALKER et al., 2003).

Dentre os fatores que contribuem para a transição do uso recreativo para o uso compulsivo de opiáceos, assim como de outras drogas de abuso, está sua característica reforçadora positiva, encontrada nos estágios iniciais de sua utilização e, posteriormente, por sua característica reforçadora negativa, em indivíduos que administram a droga de forma crônica, período no qual a droga é consumida como forma de aliviar os sintomas desagradáveis gerados a cada vez que seu consumo é interrompido (KOOB; WALL; BLOOM, 1989; SCHULTEIS; KOOB, 1996). Sugere-se que diferentes tipos de receptores opioides podem estar envolvidos nesses dois processos. Como exemplo, a ativação de receptores  $\mu$  ou  $\alpha$  induz preferência condicionada por lugar, enquanto a ativação de receptores  $\kappa$  ou o bloqueio de receptores  $\mu$  promove aversão condicionada por lugar (AZAR; JONES; SCHULTEIS, 2003; CONTARINO et al., 2002; KOOB et al., 1986; SANTE; NOBRE; BRANDÃO, 2000; WHITE; HWANG; HOLTZMAN, 2005).

No presente trabalho, para realização do teste de preferência condicionada ao lugar, a morfina foi administrada no contexto que, durante a tomada da preferência basal, não foi inicialmente preferida pelos animais. Foram utilizadas duas doses baixas de morfina, 10 e 20 mg/kg. Os dados mostram que a administração de ambas as doses induziu efetivamente

a preferência condicionada. Entretanto, a taxa de preferência foi notadamente maior nos animais que recebem a menor dose (10 mg/kg). Estudos anteriores com animais de laboratório utilizando o mesmo procedimento identificaram consistentemente a eficiência da morfina 10 mg/kg para induzir a preferência condicionada em camundongos (DO COUTO et al., 2010; KOBRIN et al., 2016) e ratos (MILEKIC et al., 2006; MUELLER; PERDIKARIS; STEWART, 2002). De fato, esta preferência induzida pela dose de 10 mg/kg de morfina pode persistir por até 12 semanas, sem que haja exposição adicional a droga; desde que um cronograma diário de extinção não seja utilizado (MUELLER; PERDIKARIS; STEWART, 2002). Uma vez que 10 mg/kg de morfina foi capaz de induzir forte preferência condicionada ao contexto, esta dose foi utilizada para o condicionamento ao lugar no teste de aversão condicionada induzida pela abstinência de morfina precipitada pelo antagonista opioide naltrexona. Como esperado, a aversão condicionada ao local foi encontrada na medida em que os animais evitaram consistentemente o contexto anteriormente preferido. Resultados semelhantes também foram encontrados em diversos outros estudos (KARIMI et al., 2011; ROBLES et al., 2014; WHITE; HWANG; HOLTZMAN, 2005). Além disso, os sintomas comportamentais de abstinência foram claramente notados principalmente diarreia, piloereção e maior reatividade comportamental ao toque. Portanto, os resultados obtidos nos testes de preferência e aversão condicionada ao lugar informaram a eficácia das doses de morfina utilizadas nesses modelos, fornecendo uma base para a condução dos outros experimentos.

Na segunda parte de nosso estudo, avaliamos alguns sintomas de tolerância aos efeitos da morfina evocada pelo contexto associado aos efeitos da droga. Cinco variáveis foram utilizadas a saber: velocidade, distância percorrida, ambulação, levantamentos, tempo e imobilidade, também avaliou-se o tempo de permanência no centro de uma arena monitorada eletronicamente (contexto A), na qual uma capa de acrílico com faixas brancas e pretas montadas nas laterais, fez o papel de contexto B. De fato, além de ser um modelo experimental bastante utilizado na investigação das propriedades reforçadoras das drogas em geral (TZSCHENTKE, 1998), e servir como ferramenta na avaliação dos efeitos de *priming* de uma droga sobre a recaída, após um treino de extinção (PARKER; MCDONALD, 2000), a utilização deste procedimento permite também avaliar a tolerância aos efeitos de uma droga evocados pelo contexto (BARDO; NEISEWANDER; MILLER, 1986). Em nosso estudo, as diferenças no comportamento motor de animais do grupo

controle foram relacionadas à inexperiência no novo ambiente no qual o comportamento do tipo “ansioso” ocorre frequentemente após a exposição subsequente a um novo ambiente não conhecido. De fato, como o teste de campo aberto representa uma situação inescapável, sugere-se que ele deveria ser tomado como uma ferramenta para medir a emocionalidade, em oposição ao comportamento de novidade (BARDO; DONOHEW; HARRINGTON, 1996). Corroborando a essa suposição, nesse grupo, o tempo gasto no centro do campo aberto no contexto B foi maior do que no contexto A. Além de aumentos de velocidade, a suposição acima também é validada pelo consequente aumento na distância percorrida, movimentos ambulatorios, frequência de levantamentos e tempo de imobilidade. Deve-se notar que, em oposição aos aumentos na ambulação, na frequência de elevação e no tempo de imobilidade, a velocidade e a distância percorrida mostraram habituação ao longo dos registros. Esses dados estão alinhados com a afirmação de que a exposição a novos ambientes suscita dois tipos de comportamento emocional: uma resposta de fuga ativa que frequentemente progride para a imobilidade.

Os efeitos de ambas as doses de morfina foram capazes de reduzir a velocidade, independentemente do contexto do teste. Em relação ao comportamento de ratos desafiados com 40 mg/kg de morfina e testados em um contexto familiar, a tolerância comportamental foi alcançada para todas as outras medidas, exceto ambulação e tempo na parte central. Alterações na velocidade podem ser devidas aos efeitos sedativos/analgésicos da morfina, mas o aumento na frequência da ambulação exclui essa suposição. Aumentos na ambulação também podem ser causados por uma interferência do condicionamento. Como exemplo, sugeriu-se que a preferência condicionada ao contexto e a atividade locomotora condicionada refletem as propriedades recompensadoras de drogas (BINDRA, 1968; VEZINA; STEWART, 1987). De qualquer forma, o impacto da morfina na velocidade média não parece influenciar o surgimento de outros comportamentos motores devido à competição comportamental e vice-versa. Devido a sua conhecida ação ansiolítica, espera-se que aumentos na atividade motora também tenham impacto no tempo gasto no centro do aparato, que é considerado um índice de ansiedade (PRUT; BELZUNG, 2003). Assim, supõe-se que a dose de 40 mg/kg de morfina aumenta a ambulação e o tempo de permanência no centro do campo aberto basicamente em função de suas propriedades ansiogênicas. Apesar das divergências quanto à manipulação experimental, dados comparáveis foram

encontrados no estudo de (HOLLAIS et al., 2014), em que medidas comportamentais foram avaliadas durante a exposição em campo aberto de camundongos fêmeas.

Há muito tempo se propõe que a aprendizagem é importante no desenvolvimento da tolerância à morfina (SIEGEL, 1975). De acordo com essa teoria, a tolerância resulta (pelo menos em parte) da associação pavloviana resultante das reações sistêmicas de uma determinada droga e as pistas ambientais que precedem essas reações de maneira confiável. Quando expostos a um ambiente familiar relacionado a drogas, os indivíduos frequentemente aparentam respostas opostas condicionadas aos efeitos da droga (MACRAE; SCOLES; SIEGEL, 1987; SIEGEL, 1975). Assim, a ação geral da overdose de morfina sobre o sistema nervoso central, experienciada no contexto associado as pistas contextuais relacionadas aos seus efeitos, pode ser neutralizada por respostas compensatórias contrárias aos efeitos da droga, como forma de atenuar estes mesmos efeitos. Essa suposição pode ser endossada observando os dados obtidos com grupos de ratos condicionados e desafiados com doses semelhantes de morfina (10 e 40 mg/kg, respectivamente), mas testados em um ambiente distinto daquele do condicionamento. Apesar da influência da overdose de morfina na velocidade média permanecer a mesma, os aumentos na ambulação e no tempo do centro do campo aberto foram significativos. Apesar da semelhança descrita, esses dados foram acompanhados por uma intensificação na frequência de levantamentos, um aspecto do comportamento de roedores que diminui de forma inversa a aumentos graduais na dose de morfina (HECHT; SCHIØRRING, 1979; HOLLAIS et al., 2014; PATTI et al., 2005). Portanto, os aumentos nessa medida refletem uma intensificação dos efeitos da morfina induzidos pelo próprio contexto, e essa intensificação parece estar diretamente correlacionada aos efeitos da overdose de morfina, conforme verificado no estudo no grupo pré-tratado com morfina a 80 mg/kg.

À medida que a associação entre as pistas preditivas e as reações sistêmicas aos efeitos da droga é reforçada por repetidos emparelhamentos, seria esperado que seu efeito se restringisse à medida que a resposta condicional compensatória à droga se tornasse mais forte. Tal efeito diminuído de uma droga (em função de experiências repetidas) define tolerância. No entanto, a tolerância é reduzida se o efeito do medicamento for desafiado em um novo ambiente. Neste estudo, os efeitos da morfina na dose de 80 mg/kg no comportamento dos ratos foram intensificados discretamente em animais que experienciaram

seus efeitos em um novo ambiente, conforme determinado pelo tempo de imobilidade e pelo tempo gasto no centro da arena de campo aberto durante os testes. Esses dados estão de acordo com trabalhos anteriores, que enfatizam a influência do ambiente familiar na tolerância aos efeitos de drogas (MACRAE; SCOLES; SIEGEL, 1987; SIEGEL, 1975; SIEGEL et al., 1982).

As aplicações práticas de medida de potencial evocado auditivo têm sido usadas para propósitos clínicos. Biacabe e colaboradores (2001) publicaram uma revisão com o objetivo de descrever a anatomia funcional de estruturas auditivas do tronco encefálico nas quais são gerados potenciais evocados auditivos (BAEP, *brainstem auditory evoked potential*), e propuseram sua aplicação clínica para a identificação de neurinomas acústicos (tumores) ou lesões, diagnóstico precoce de problemas auditivos em crianças, e para pacientes que não respondem a testes audiométricos tradicionais. Em laboratório, resultados obtidos por (NOBRE; SANDNER; BRANDÃO, 2003) mostraram que microinjeções de semicarbazida, um inibidor da síntese de GABA, diretamente no núcleo central do colículo inferior eliciam a resposta de congelamento e aumento na amplitude dos potenciais evocados (amplitude da onda P1) associado a uma redução na amplitude da resposta de sobressalto. A inibição das funções GABAérgicas nesta estrutura, por meio da semicarbazida, parece afetar também a reatividade dos neurônios do colículo inferior a estímulos auditivos. Brandão e colaboradores (2001) verificaram que a microinjeção unilateral de glutamato no colículo, em uma dose que causa o comportamento de congelamento – em ratos com eletrodos implantados bilateralmente – produziu um aumento ipsilateral dos potenciais registrados nessa região, sugerindo que o aumento da estimulação aversiva promove um aumento na reatividade dos neurônios do colículo aos estímulos auditivos. A medida dos potenciais evocados auditivos (PEA) também é utilizada em estudos para análise de alterações neuronais associadas ao uso agudo ou contínuo de drogas como o diazepam (CABRAL et al., 2009) e o álcool (KOOB et al., 2002). Cumpre notar também que o colículo inferior é um importante componente do sistema sensorial auditivos do tronco cerebral, particularmente por sua capacidade de atuar como “gatilho” sensorio-motor para os estímulos auditivos (MELO et al., 2010; NOBRE; CABRAL; BRANDÃO, 2010). Esta região envia informações para os centros motores que participam da modulação e expressão de comportamentos específicos relacionados à importância biológica dos sons (CASSEDAY; COVEY, 1996), e apresenta um padrão eletrofisiológico característico que



pode ser alterado pela exposição a estímulos auditivos, condicionados ou incondicionados (NOBRE, 2013; NOBRE; CABRAL; BRANDÃO, 2010).

Algumas evidências sugerem que a dependência física produzida por opiáceos se deve à sua interação com receptores opióides na matéria cinzenta periaquedutal (MCP), no hipotálamo lateral e no *locus coeruleus*, já que a administração de naloxona ou metilnaloxonium nessas áreas precipita sintomas somáticos de abstinência em animais submetidos ao tratamento crônico com morfina (BOZARTH; WISE, 1984; KOOB; MALDONADO; STINUS, 1992; LANE-LADD et al., 1997; MALDONADO; NEGUS; KOOB, 1992). Por outro lado, o componente afetivo/emocional da retirada de opioides parece ser mediado pelo núcleo *accumbens* (KOOB; WALL; BLOOM, 1989; STINUS; LE MOAL; KOOB, 1990), amígdala (CABRAL et al., 2009; GRACY; DANKIEWICZ; KOOB, 2001; SCHULTEIS et al., 2000; STINUS; LE MOAL; KOOB, 1990) e pelo córtex pré-frontal medial (BISHOP et al., 2011, p. 2011; DAGLISH et al., 2001). Nesse sentido, sabe-se que o tratamento com morfina promove uma reorganização das conexões sinápticas prosencefálicas (ROBINSON; KOLB, 1999), particularmente no córtex pré-frontal medial (ROBINSON; KOLB, 2004). Esta região encefálica tem grande importância no controle cognitivo e memória de trabalho, e no controle e orientação do comportamento motivado. O uso e, sobretudo, o abuso de drogas como os opiáceos, dos quais a morfina é o maior representante, leva a uma distorção na representação de metas e objetivos, promovendo então a expressão de uma resposta não adaptativa. Sugere-se que o fundamento do problema repousa na perturbação causada pela droga nos mecanismos corticais de controle (*top-down*) que cognitivamente se impõem sobre os mecanismos incondicionados diencefálicos e mesencefálicos (*bottom-up*) (SHENG, 2001). Como exemplo, estudos utilizando a técnica de neuroimagem mostraram grande ativação metabólica do córtex pré-frontal medial durante a fissura por cocaína (GOLDSTEIN; VOLKOW, 2002).

Vários relatos sugerem que os sintomas de abstinência de abuso de drogas, incluindo opiáceos, aumentam em um ambiente emparelhado com o efeito de uma droga, quando comparado com um ambiente alternativo (BAKER; AZORLOSA, 1996; BUCCAFUSCO; SHUSTER, 2009; KELSEY; ARANOW; MATTHEWS, 1990; LITTLE et al., 2005; MCNALLY; AKIL, 2001). Essa é uma questão importante, dado que as pistas contextuais emparelhadas com o efeito de drogas não apenas contribuem para os sintomas de

abstinência, mas também para a recaída. A natureza fisiológica desses fenômenos comportamentais tem sido investigada há muito tempo, principalmente nos seus domínios atencional e cognitivo tardios. No entanto, os efeitos centrais do abuso de drogas sobre os componentes precoces da informação sensorial permanecem pouco explorados. Portanto, para avançar nesta questão, na terceira parte deste estudo, examinamos as possíveis alterações eletrofisiológicas produzidas em ratos previamente treinados com doses baixas de morfina em um ambiente específico (e posteriormente familiar) e testados em um contexto novo. Latência e amplitude dos PEAs foram as variáveis registradas.

Nossos resultados mostram que a latência não foi afetada por injeções *s.c.* de solução salina ou morfina, independente do contexto do teste. O efeito da exposição aos contextos A e B sobre os PEAs dos animais controle foram semelhantes. Por outro lado, uma dose aguda de morfina aumentou a amplitude dos PEAs. A amplitude destes potenciais não foi alterada significativamente 24 horas após nos animais testados no contexto de condicionamento, mas foi aumentada significativamente no ambiente não pareado com a droga e seus efeitos.

Em um estudo anterior, uma injeção intravenosa de morfina emparelhada com um estímulo condicionado auditivo foi capaz de aumentar os potenciais evocados corticais (STEIN; LYNCH; RUCHKIN, 1977), mostrando que a morfina pode induzir respostas condicionadas. Analogamente a este estudo, Beck e O'Brien (1983), utilizando um paradigma de condicionamento clássico, encontraram um aumento na resposta eletrofisiológica condicionada (aumento da amplitude dos componentes corticais de latência longa, mas não dos componentes de latência curta) em ratos dependentes de morfina durante o teste. Até onde sabe-se, o presente estudo é o primeiro a investigar o surgimento de respostas compensatórias condicionadas eletrofisiológicas no tronco cerebral induzidas por morfina em ratos expostos a um ambiente não familiar.

Se considerarmos que os aumentos na amplitude dos PEAs são um sintoma de abstinência evocado pela perda de tolerância promovida pela exposição a um ambiente não familiar, nossa suposição não se adequa a hipótese atual de que os sintomas de abstinência de uma droga são aumentados no ambiente a ela associado, quando comparado com um ambiente alternativo (BAKER; AZORLOSA, 1996; BUCCAFUSCO; SHUSTER, 2009; KELSEY; ARANOW; MATTHEWS, 1990; LITTLE et al., 2005; MCNALLY; AKIL,

2001). No entanto, 24 de abstinência de morfina, após quatro dias de uma única dose diária de 10 mg/kg, não são capazes de induzir a abstinência, exceto, talvez, quando confrontadas com um antagonista de opiáceos, como relatado em outros estudos (GELLERT; HOLTZMAN, 1979; MCNALLY; AKIL, 2001; PARKER et al., 2002). Assim, a natureza real dos aumentos nos potenciais do campo coliculares evocados por pistas contextuais deve pertencer a outro domínio. No entanto, é sabido que os comportamentos defensivos integrados no colículo inferior são modulados indiretamente por mecanismos opioides (ÁVILA et al., 2008; CARDOSO et al., 1992), principalmente através da modulação de receptores GABA<sub>A</sub> (CALVO; COIMBRA, 2006; TONGJAROENBUANGAM et al., 2006). Além disso, em relação à retirada do abuso de drogas, também foram observados déficits inibitórios no processamento precoce de potenciais evocados após exposição aguda ou crônica ao álcool (FREEDMAN et al., 1987), maconha (PATRICK; STRUVE, 2000), e cocaína (BOUTROS et al., 2000).

Como o desejo (HUNT; BARNETT; BRANCH, 1971) e a recaída no uso de drogas (O'BRIEN et al., 1992) são muitas vezes precipitados pela exposição a sinais associados a drogas e podem ocorrer após um longo período em abstinência, este estudo tem implicações importantes, pois o surgimento de tais alterações, na ausência de sintomas manifestos de abstinência, pode ser um indicador dos estágios iniciais do desenvolvimento da dependência de drogas. Entretanto, a natureza das mudanças farmacológicas subjacentes a esse fenômeno e como e com quais estruturas os neurônios do CIC se associam para gerar respostas condicionadas contextuais são questões a serem investigadas.

Hipotetiza-se é que um dos alvos para o futuro estudos é o receptor GABA<sub>A</sub>. A recuperação aprendida dos PEA registrados no CIC pode ser devida a um aumento no tônus emocional, como o que é alcançado com a modulação GABA<sub>A</sub> nessa região do mesencéfalo. Como exemplo, no CI, verificou-se que a liberação de GABA é inibida pela morfina, um efeito imitado pelo peptídeo sintético e pelo receptor  $\mu$ -opioide DAMGO e abolida pelo antagonista naloxona do receptor  $\mu$ -opioide de alta afinidade (TONGJAROENBUNGAM et al., 2004). Além disso, na regulação negativa da CIC dos receptores de opiáceos após a exposição crônica aos seus agonistas, pode ser responsável pela tolerância aos opiáceos (DANG; CHIENG; CHRISTIE, 2012).

Uma questão que permanece é como e com quais estruturas os neurônios da CIC se associam para gerar respostas condicionadas contextuais. Embora isso seja uma questão de investigações futuras, na indução por CI de potenciação a longo prazo (um fenômeno celular subjacente a processos de aprendizado e memória) é facilmente estabelecida *in vivo* por estimulação tetânica em animais pré-tratados com picrotoxina, um antagonista do GABA<sub>A</sub> (HOSOMI et al., 1995). Mais recentemente, foi demonstrado que a estimulação tetânica do lemnisco lateral pode aumentar a amplitude dos potenciais evocados no CIC e essa alteração foi dependente da inibição glicinérgica e GABAérgica (ZHANG; YANG; WU, 2004). Portanto, diferentemente do LTP gerado nas áreas corticais e do hipocampo, nos dois estudos citados acima, a supressão da inibição, como a promovida por infusões de morfina, era um requisito para a indução de LTP. Uma explicação para a codificação das propriedades afetivas dos PEAs induzidos pelo contexto incondicionado aprendido pode depender da transmissão do sinal auditivo através do CIC para o tálamo auditivo e daí para a amígdala (DAVIS; RAINNIE; CASSELL, 1994; JONES; MISHKIN, 1972; MACEDO et al., 2002). Além disso, os mecanismos de aprendizagem e memória relacionados ao processamento e à atribuição de valor a pistas associadas a medicamentos estão sob controle de conexões recíprocas entre o hipocampo e a amígdala (WHITE, 1996). Nesse circuito, a tolerância associativa relacionada aos mecanismos compensatórios aprendidos ocorre provavelmente durante a ativação dos eferentes da área do hipocampo CA1 para os núcleos lateral e basolateral da amígdala, conforme determinado em um estudo recente, onde a reatividade neural induzida pelo contexto a uma injeção de morfina foi avaliada através de um procedimento de imunorreatividade do tipo Fos (MITCHELL; BASBAUM; FIELDS, 2000).

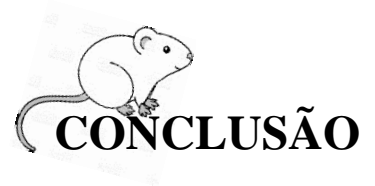
Em geral, estudos no campo da dependência e abstinência de drogas prevêm que a recaída ao uso de drogas pode ser provocada por estímulos condicionados não extintos (BECK; O'BRIEN, 1983). Essa resposta é seguida pelo rearranjo interno dos circuitos corticais e subcorticais quando o sujeito é exposto aos estímulos condicionados. Como exemplo, alguns estudos têm demonstrado alterações na amplitude de potenciais evocados como resultado do condicionamento pavloviano no qual a morfina foi utilizada como estímulo incondicionado (STEIN; LYNCH; RUCHKIN, 1977, p. 19; WILDER; O'BRIEN, 1980). Mais recentemente, aumentos na amplitude dos potenciais de campo eliciados por uma injeção aguda de morfina também foram identificados no córtex visual (KURODA et al., 2009). Os presentes resultados corroboram com estes achados, mostrando que uma

resposta eletrofisiológica é eliciada após o condicionamento, mesmo com o uso de uma dose baixa e regular de morfina em um tratamento de curto prazo. Além disso, essas descobertas sustentam a hipótese de que essas respostas aprendidas podem ser encontradas mesmo nos estágios iniciais da informação sensorial. Dado que a probabilidade de aumento na amplitude dos PEAs diretamente relacionados à retirada da morfina são baixos, uma vez que os sintomas comportamentais não foram claramente identificados, uma explicação para estes resultados é que as alterações na amplitude dos PEAs nos neurônios do CIC surgem como reflexo de tolerância aos efeitos da morfina condicionada pelo contexto. Para investigar a sequência desses eventos, a última parte do estudo foi dedicada a investigar o fenômeno de tolerância condicionada induzida por morfina no processamento tardio (*downstream*) da informação sensorial auditiva, usando os protocolos experimentais de preferência condicionada e registro de PEAs na área cortical prélimbica, na medida em alguns estudos têm sugerido que o déficit no controle motivacional da busca e consumo de drogas é fruto de um descompasso causado pela droga nos mecanismos corticais de controle (*top-down*) que cognitivamente se impõem sobre os mecanismos incondicionados diencefálicos e mesencefálicos (*bottom-up*) (SHENG, 2001), como já informado.

Os presentes resultados mostram que os potenciais de campo corticais estão significativamente acentuados nos animais do grupo controle condicionados e testados no mesmo contexto ou em contextos diferentes do contexto de condicionamento; sendo a diferença, neste último, mais significativa. O aumento dos PEAs de animais do grupo controle testados no mesmo ambiente de condicionamento reflete, possivelmente, o efeito de aprendizagem aversiva, já que o estímulo auditivo utilizado (clicks) produz um aumento na resposta de sobressalto (NOBRE; SANDNER; BRANDÃO, 2003); com a novidade do contexto se associando, possivelmente a este efeito, no segundo caso. O tratamento com morfina não produziu qualquer resultado sobre os potenciais evocados corticais. Em verdade, em qualquer dos contextos de teste ( $A \times A$  ou  $A \times B$ ), a amplitude dos potenciais foi similar. Por outro lado, a abstinência precipitada de morfina produziu alterações significativas nos PEAs corticais de animais testados durante a abstinência no mesmo contexto de condicionamento, mas não no contexto não pareado com a droga. Estes resultados apontam para os efeitos particulares da abstinência de morfina induzidos pela exposição as pistas contextuais presentes ao longo do condicionamento. Portanto, se de um lado a exposição ao contexto novo não induz alterações na amplitude ou latência dos PEAs

de animais condicionados com morfina, indicando ausência de tolerância condicionada a nível cortical, por outro a exposição ao contexto associado a droga elicia resposta eletrofisiológica potente.

Estudos eletrofisiológicos envolvendo a análise da modulação tardia da informação sensorial auditiva, e sua associação ao contexto de condicionamento são raros, se existentes. Entretanto, sabe-se que o córtex pré-frontal é um componente importante do circuito neural subjacente ao abuso de diversas substâncias incluindo nicotina, opiáceos e psicoestimulantes (DI CHIARA; NORTH, 1992b; GIACCHINO; HENRIKSEN, 1998; GOEDERS; SMITH, 1983; KOOB; MALDONADO; STINUS, 1992; NISELL; NOMIKOS; SVENSSON, 1995; SORG et al., 1997). Devido a sua importância no controle das funções cognitivas, como antecipação, planejamento e memória, essa área encefálica desempenha um papel na organização e motivação do comportamento relacionado ao uso e abuso de substâncias (DEMINIERE et al., 1989; NISELL; NOMIKOS; SVENSSON, 1995; PIAZZA; LE MOAL, 1996). Outros estudos que têm demonstrado o papel do córtex medial pré-frontal na dependência de opioides sugerem que a sensibilidade desta região aos efeitos desta classe de substâncias se deve à ação de receptores  $\mu$ -seletivos (PALMER et al., 1978; TANAKA; NORTH, 1994; ZIEGLGÄNSBERGER et al., 1982) como, neste trabalho, a morfina. Os resultados aqui obtidos sugerem que o aumento na amplitude dos PEAs corticais no córtex pré-límbico, eliciados pela abstinência precipitada de morfina, pode representar uma ativação desta região em função das pistas contextuais presentes. Como suporte a esta afirmação, foi demonstrado que a inibição da ativação neural do córtex pré-límbico, reduz a busca de heroína após a abstinência forçada em ratos machos adultos (BOSSERT et al., 2011), mostrando que a ativação desses neurônios, como demonstrado imunohistoquimicamente, é uma causa e não uma consequência de procura de drogas.



**CONCLUSÃO**

## 6. CONCLUSÃO

Muitas são as informações obtidas com os experimentos aqui apresentados, ainda que boa parte delas necessite de investigações adicionais, na medida em que poucos trabalhos têm se dedicado a entender os efeitos da tolerância eletrofisiológica evocada pelo contexto associado a efeito de drogas de abuso. O presente estudo mostrou que, apesar da ausência de eventos comportamentais, uma administração a curto prazo de uma dose baixa de morfina pode mudar precocemente o processamento de informações dos estímulos auditivos sensoriais, conforme revelado pelo aumento da amplitude dos PEAs registradas no CIC, considerado o relé mais importante do sistema auditivo ascendente. Além disso, boa parte dos efeitos da morfina resulta em tolerância comportamental e eletrofisiológica. Esses dados indicam que, mesmo na falta de manifestações comportamentais, o aparecimento de potenciais evocados coliculares compensatórios podem sinalizar o primeiro passo no desenvolvimento de dependência de drogas. Investigações futuras sobre esse assunto terão como objetivo analisar componentes afetivos da tolerância à morfina durante a expressão dos PEAs em contextos não familiares, além das bases farmacológicas desse fenômeno. Ainda que tolerância eletrofisiológica condicionada não se desenvolva no processamento tardio da informação sensorial auditiva, os resultados sugerem que os aspectos mediais do córtex pré-frontal, neste trabalho representado pela área prélímbica, codificam os processos associativos relacionados ao conjunto droga/contexto, durante a expressão da abstinência, o que pode indicar a existência de fissura (*craving*) eliciada pelas pistas contextuais que indicam a presença da droga e seus efeitos. De fato, com base nos resultados de estudos utilizando ratos com cocaína, foi proposta uma dicotomia na função do córtex pré-frontal medial, com sua parte prélímbica envolvida na busca de drogas, e sua contraparte infralímbica responsável pela inibição destes processos.





**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAI, S. Brainstem auditory evoked potentials in cattle sedated with xylazine. **Canadian Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 287–290, 2008.

ÁVILA, M. A. V.; RUGGIERO, R. N.; CABRAL, A.; BRANDÃO, M. L.; NOBRE, M. J.; CASTILHO, V. M. Involvement of the midbrain tectum in the unconditioned fear promoted by morphine withdrawal. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 590, n. 1–3, p. 217–223, 2008.

AZAR, M. R.; JONES, B. C.; SCHULTEIS, G. Conditioned place aversion is a highly sensitive index of acute opioid dependence and withdrawal. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 170, n. 1, p. 42–50, 2003.

BAAS, J. M. P.; MILSTEIN, J.; DONLEVY, M.; GRILLON, C. Brainstem Correlates of Defensive States in Humans. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 59, n. 7, p. 588–593, 2006.

BAGRI, A.; SANDNER, G.; DI SCALA, G. Effects of unilateral microinjections of GABAergic drugs into the inferior colliculus on auditory evoked potentials and on audiogenic seizure susceptibility. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 104, n. 1, p. 82–87, 1989.

BAKER, J. D.; AZORLOSA, J. L. The NMDA antagonist MK-801 blocks the extinction of Pavlovian fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 110, n. 3, p. 618–620, 1996.

BAKER, T. B.; MORSE, E.; SHERMAN, J. E. The motivation to use drugs: a psychobiological analysis of urges. **Nebraska Symposium on Motivation. Nebraska Symposium on Motivation**, [s. l.], v. 34, p. 257–323, 1986.

BARDO, M. T.; DONOHEW, R. L.; HARRINGTON, N. G. Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 23–43, 1996.

BARDO, M. T.; NEISEWANDER, J. L.; MILLER, J. S. Repeated testing attenuates conditioned place preference with cocaine. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 89, n. 2, p. 239–243, 1986.

BECK, S. G.; O'BRIEN, J. H. Cortical evoked potential changes during classical conditioning of morphine dependence in rats. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 81, n. 3, p. 528–541, 1983.

BECKER, G.; MURPHY, K. A Theory of Rational Addiction. **Journal of Political Economy**, [s. l.], v. 96, n. 4, p. 675–700, 1988.

BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E. Parsing reward. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 26, n. 9, p. 507–513, 2003.

BIACABE, B.; CHEVALLIER, J. M.; AVAN, P.; BONFILS, P. Functional anatomy of auditory brainstem nuclei: application to the anatomical basis of brainstem auditory evoked potentials. **Auris Nasus Larynx**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 85–94, 2001.

BINDRA, D. Neuropsychological interpretation of the effects of drive and incentive-motivation on general activity and instrumental behavior. **Psychological Review**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 1–22, 1968.

BISHOP, S. F.; LAUZON, N. M.; BECHARD, M.; GHOLIZADEH, S.; LAVIOLETTE, S. R. NMDA receptor hypofunction in the prelimbic cortex increases sensitivity to the rewarding properties of opiates via dopaminergic and amygdalar substrates. **Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 68–80, 2011.

BOSSERT, J. M.; STERN, A. L.; THEBERGE, F. R. M.; CIFANI, C.; KOYA, E.; HOPE, B. T.; SHAHAM, Y. Ventral medial prefrontal cortex neuronal ensembles mediate context-induced relapse to heroin. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 420–422, 2011.

BOUTROS, N.; CAMPBELL, D.; PETRAKIS, I.; KRYSTAL, J.; CAPORALE, M.; KOSTEN, T. Cocaine use and the mid-latency auditory evoked responses. **Psychiatry Research**, [s. l.], v. 96, n. 2, p. 117–126, 2000.

BOUTROS, N. N.; BONNET, K. A.; MILLANA, R.; LIU, J. A Parametric Study of the N40 Auditory Evoked Response in Rats. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 42, n. 11, p. 1051–1059, 1997. a.

BOUTROS, N.; NASRALLAH, H.; LEIGHTY, R.; TORELLO, M.; TUETING, P.; OLSON, S. Auditory evoked potentials, clinical vs. research applications. **Psychiatry Research**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 183–195, 1997. b.

BOZARTH, M. A.; WISE, R. A. Anatomically distinct opiate receptor fields mediate reward and physical dependence. **Science**, [s. l.], v. 224, n. 4648, p. 516–517, 1984.

BRADLEY, R. J.; HARRIS, R. A.; JENNER, P. **International Review of Neurobiology**. [s.l.] : Elsevier, 2005. Google-Books-ID: vyoHiaQaLrEC.

BRAFF, D. L.; GEYER, M. A. Sensorimotor Gating and Schizophrenia: Human and Animal Model Studies. **Archives of General Psychiatry**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 181–188, 1990.

BRANDÃO, M. L.; BORELLI, K. G.; NOBRE, M. J.; SANTOS, J. M.; ALBRECHET-SOUZA, L.; OLIVEIRA, A. R.; MARTINEZ, R. C. Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 29, n. 8, p. 1299–1311, 2005.

BRANDÃO, M. L.; COIMBRA, N. C.; OSAKI, M. Y. Changes in the auditory-evoked potentials induced by fear-evoking stimulations. **Physiology & Behavior**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 365–372, 2001.

BUCCAFUSCO, J. J.; SHUSTER, L. **Contextually Induced Drug Seeking During Protracted Abstinence in Rats**. [s.l.] : CRC Press/Taylor & Francis, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5230/>>. Acesso em: 2 fev. 2020.

CABRAL, A.; RUGGIERO, R. N.; NOBRE, M. J.; BRANDÃO, M. L.; CASTILHO, V. M. GABA and opioid mechanisms of the central amygdala underlie the withdrawal-potentiated startle from acute morphine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 334–344, 2009.

CALVO, F.; COIMBRA, N. C. Interactions between opioid-peptides-containing pathways and GABAA-receptors-mediated systems modulate panic-like-induced behaviors elicited by electric and chemical stimulation of the inferior colliculus. **Brain Research**, [s. l.], v. 1104, n. 1, p. 92–102, 2006.

CARDOSO, S.; MELO, L.; COIMBRA, N.; BRANDÃO, M. Opposite effects of low and high doses of morphine on neural substrates of aversion in the inferior colliculus. **Behavioural Pharmacology**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 489–496, 1992.

CASSEDAY, J. H.; COVEY, E. A neuroethological theory of the operation of the inferior colliculus. **Brain, Behavior and Evolution**, [s. l.], v. 47, n. 6, p. 311–336, 1996.

CHILDRESS, A. R.; MCLELLAN, A. T.; O'BRIEN, C. P. Abstinent Opiate Abusers Exhibit Conditioned Craving, Conditioned Withdrawal and Reductions in both through Extinction. **British Journal of Addiction**, [s. l.], v. 81, n. 5, p. 655–660, 1986.

CHUDASAMA, Y.; MUIR, J. L. Visual attention in the rat: A role for the prelimbic cortex and thalamic nuclei? **Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 115, n. 2, p. 417–428, 2001.

CHUDASAMA, Y.; PASSETTI, F.; RHODES, S. E. V.; LOPIAN, D.; DESAI, A.; ROBBINS, T. W. Dissociable aspects of performance on the 5-choice serial reaction time task following lesions of the dorsal anterior cingulate, infralimbic and orbitofrontal cortex in the rat: differential effects on selectivity, impulsivity and compulsivity. **Behavioural Brain Research**, The Rodent Prefrontal Cortex. [s. l.], v. 146, n. 1, The Rodent Prefrontal Cortex, p. 105–119, 2003.

COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 131–139, 1993.

CONTARINO, A.; PICETTI, R.; MATTHES, H. W.; KOOB, G. F.; KIEFFER, B. L.; GOLD, L. H. Lack of reward and locomotor stimulation induced by heroin in mu-opioid receptor-deficient mice. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 446, n. 1–3, p. 103–109, 2002.

COOPER, M. L.; FRONE, M. R.; RUSSELL, M.; MUDAR, P. Drinking to regulate positive and negative emotions: a motivational model of alcohol use. **Journal of Personality and Social Psychology**, [s. l.], v. 69, n. 5, p. 990–1005, 1995.

COX, W. M.; KLINGER, E. A motivational model of alcohol use. **Journal of Abnormal Psychology**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 168–180, 1988.

DAGLISH, M. R. C.; WEINSTEIN, A.; MALIZIA, A. L.; WILSON, S.; MELICHAR, J. K.; BRITTEN, S.; BREWER, C.; LINGFORD-HUGHES, A.; MYLES, J. S.; GRASBY, P.; NUTT, D. J. Changes in Regional Cerebral Blood Flow Elicited by Craving Memories in

Abstinent Opiate-Dependent Subjects. **American Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 158, n. 10, p. 1680–1686, 2001.

DANG, V. C.; CHIENG, B. C.; CHRISTIE, M. J. Prolonged Stimulation of  $\mu$ -Opioid Receptors Produces  $\beta$ -Arrestin-2-Mediated Heterologous Desensitization of  $\alpha$ 2-Adrenoceptor Function in Locus Ceruleus Neurons. **Molecular Pharmacology**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 473–480, 2012.

DAVIS, M.; RAINNIE, D.; CASSELL, M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 208–214, 1994.

DEMNIERE, J. M.; PIAZZA, P. V.; LE MOAL, M.; SIMON, H. Experimental approach to individual vulnerability to psychostimulant addiction. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 13, n. 2–3, p. 141–147, 1989.

DI CHIARA, G.; NORTH, R. A. Neurobiology of opiate abuse. **Trends in Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 185–193, 1992. a.

DI CHIARA, G.; NORTH, R. A. Neurobiology of opiate abuse. **Trends in Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 185–193, 1992. b.

DO COUTO, B. R.; AGUILAR, M. A.; MANZANEDO, C.; RODRÍGUEZ-ARIAS, M.; MIÑARRO, J. **Reinstatement of Morphine-Induced Conditioned Place Preference in Mice by Priming Injections**. 10. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/np/2003/145960/>>. Acesso em: 2 fev. 2020.

DUARTE, D. F. Uma breve história do ópio e dos opióides. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 135–146, 2005.

DUM, J.; HERZ, A. Opioids and Motivation. **Interdisciplinary Science Reviews**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 180–190, 1987.

DUM, J.; HERZ, A. Opioids and Motivation. **Interdisciplinary Science Reviews**, [s. l.], 2013. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1179/isr.1987.12.2.180?needAccess=true>>. Acesso em: 27 jan. 2020.

ESPERIDIÃO-ANTONIO, V.; MAJESKI-COLOMBO, M.; TOLEDO-MONTEVERDE, D.; MORAES-MARTINS, G.; FERNANDES, J. J.; DE ASSIS, M. B.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Neurobiologia das emoções. [s. l.], n. 35, p. 11, 2008.

EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 1481–1489, 2005.

FENDT, M.; LI, L.; YEOMANS, J. S. Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 156, n. 2, p. 216–224, 2001.

FERREIRA, R. **Alterações no processamento da informação sensorial auditiva induzidas pela abstinência ao álcool em ratos: importância dos mecanismos**

**GABAérgicos e glutamatérgicos do colículo inferior.** 2010. Mestrado em Psicobiologia - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59134/tde-29072010-113212/>>. Acesso em: 9 jan. 2020.

FISHBEIN, D. H.; KRUPITSKY, E.; FLANNERY, B. A.; LANGEVIN, D. J.; BOBASHEV, G.; VERBITSKAYA, E.; AUGUSTINE, C. B.; BOLLA, K. I.; ZVARTAU, E.; SCHECH, B.; EGOROVA, V.; BUSHARA, N.; TSOY, M. Neurocognitive characterizations of Russian heroin addicts without a significant history of other drug use. **Drug and Alcohol Dependence**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 25–38, 2007.

FRANKLIN, K. B. J.; PAXINOS, G.; 1944-. **mouse brain in stereotaxic coordinates.** [s.l.] : Elsevier/Academic Press, 2008. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300125254>>. Acesso em: 8 jan. 2020.

FREEDMAN, R.; WALDO, M.; WALDO, C. I.; WILSON, J. R. Genetic influences on the effects of alcohol on auditory evoked potentials. **Alcohol**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 249–253, 1987.

GELLERT, V. F.; HOLTZMAN, S. G. Discriminative stimulus effects of naltrexone in the morphine-dependent rat. **J Pharmacol Exp Ther**, [s. l.], p. 596605, 1979.

GIACCHINO, J. L.; HENRIKSEN, S. J. Opioid effects on activation of neurons in the medial prefrontal cortex. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 1157–1178, 1998.

GOEDERS, N. E.; SMITH, J. E. Cortical dopaminergic involvement in cocaine reinforcement. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 221, n. 4612, p. 773–775, 1983.

GOLD, L. H.; STINUS, L.; INTURRISI, C. E.; KOOB, G. F. Prolonged tolerance, dependence and abstinence following subcutaneous morphine pellet implantation in the rat. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 253, n. 1, p. 45–51, 1994. a.

GOLD, L. H.; STINUS, L.; INTURRISI, C. E.; KOOB, G. F. Prolonged tolerance, dependence and abstinence following subcutaneous morphine pellet implantation in the rat. **Eur J Pharmacol**, [s. l.], v. 253, n. 1–2, p. 45–51, 1994. b.

GOLDSTEIN, R. Z.; VOLKOW, N. D. Drug Addiction and Its Underlying Neurobiological Basis: Neuroimaging Evidence for the Involvement of the Frontal Cortex. **American Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 159, n. 10, p. 1642–1652, 2002.

GRACY, K. N.; DANKIEWICZ, L. A.; KOOB, G. F. Opiate withdrawal-induced fos immunoreactivity in the rat extended amygdala parallels the development of conditioned place aversion. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 152–160, 2001.

GRÜSSER, S. M.; WRASE, J.; KLEIN, S.; HERMANN, D.; SMOLKA, M. N.; RUF, M.; WEBER-FAHR, W.; HERTA, F.; MANN, K.; BRAUS, D. F.; HEINZ, A. Cue-induced activation of the striatum and medial prefrontal cortex is associated with subsequent relapse in abstinent alcoholics. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 175, n. 3, p. 296–302, 2004.

HALL, R. D.; MARK, R. G. Fear and the modification of acoustically evoked potentials during conditioning. **Journal of Neurophysiology**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 893–910, 1967.

HAMILTON, G. R.; BASKETT, T. F. In the arms of morpheus: the development of morphine for postoperative pain relief. **Canadian Journal of Anesthesia**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 367–374, 2000.

HECHT, A.; SCHIØRRING, E. Behavioral effects of low and high acute doses of morphine in solitary mice. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 73–79, 1979.

HERZ, A. Opioid reward mechanisms: a key role in drug abuse? [s. l.], v. 76, p. 7, 1998.

HEYMAN, G. M. **Addiction: A Disorder of Choice**. [s.l.] : Harvard University Press, 2009. Google-Books-ID: RM\_oWWqv54IC.

HOLDCROFT, A.; POWER, I. Management of pain. **BMJ**, [s. l.], v. 326, n. 7390, p. 635–639, 2003.

HOLLAIS, A. W.; PATTI, C. L.; ZANIN, K. A.; FUKUSHIRO, D. F.; BERRO, L. F.; CARVALHO, R. C.; KAMEDA, S. R.; FRUSSA-FILHO, R. Effects of acute and long-term typical or atypical neuroleptics on morphine-induced behavioural effects in mice. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 255–263, 2014.

HOSOMI, H.; HIRAI, H.; OKADAA, Y.; AMATSU, M. Long-term potentiation of neurotransmission in the inferior colliculus of the rat. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 195, n. 3, p. 175–178, 1995.

HUNT, W. A.; BARNETT, L. W.; BRANCH, L. G. Relapse rates in addiction programs. **Journal of Clinical Psychology**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 455–456, 1971.

HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C.; NESTLER, E. J. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. **Annual Review of Neuroscience**, [s. l.], v. 29, p. 565–598, 2006.

I.P. Pavlov. *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. [s. l.], 1927.

JAFFE, J. H. Trivializing dependence. **British Journal of Addiction**, [s. l.], v. 85, n. 11, p. 1425–1427, 1990.

JENTSCH, J. D.; TAYLOR, J. R. Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 146, n. 4, p. 373–390, 1999.

JONES, B. E.; MOORE, R. Y. Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. **Brain Research**, [s. l.], v. 127, n. 1, p. 23–53, 1977.

JONES, B.; MISHKIN, M. Limbic lesions and the problem of stimulus—Reinforcement associations. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 362–377, 1972.

JONES, B. T.; CORBIN, W.; FROMME, K. A review of expectancy theory and alcohol consumption. **Addiction**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 57–72, 2001.

JOY, B.; MCMAHON, R. P.; SHEPARD, P. D. Effects of acute and chronic clozapine on D-amphetamine-induced disruption of auditory gating in the rat. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 174, n. 2, p. 274–282, 2004.

KALIVAS, P. W.; PETERS, J.; KNACKSTEDT, L. Animal Models and Brain Circuits in Drug Addiction. **Molecular Interventions**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 339, 2006.

KARIMI, S.; KARAMI, M.; SAHRAEI, H.; RAHIMPOUR, M. Reversal effect of intra-central amygdala microinjection of L-arginine on place aversion induced by naloxone in morphine conditioned rats. **Iranian Biomedical Journal**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 92–99, 2011.

KELSEY, J. E.; ARANOW, J. S.; MATTHEWS, R. T. Context-specific morphine withdrawal in rats: Duration and effects of clonidine. **Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 104, n. 5, p. 704–710, 1990.

KILTS, C. D.; SCHWEITZER, J. B.; QUINN, C. K.; GROSS, R. E.; FABER, T. L.; MUHAMMAD, F.; ELY, T. D.; HOFFMAN, J. M.; DREXLER, K. P. G. Neural Activity Related to Drug Craving in Cocaine Addiction. **Archives of General Psychiatry**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 334–341, 2001.

KOBRIN, K. L.; MOODY, O.; ARENA, D. T.; MOORE, C. F.; HEINRICHS, S. C.; KAPLAN, G. B. Acquisition of morphine conditioned place preference increases the dendritic complexity of nucleus accumbens core neurons. **Addiction Biology**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 1086–1096, 2016.

KOOB, G. F. Neurobiology of addiction. Toward the development of new therapies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 909, p. 170–185, 2000.

KOOB, G. F. The neurobiology of addiction: a neuroadaptational view relevant for diagnosis. **Addiction**, [s. l.], v. 101, n. s1, p. 23–30, 2006.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Addiction and the brain antireward system. **Annual Review of Psychology**, [s. l.], v. 59, p. 29–53, 2008.

KOOB, G. F.; MALDONADO, R.; STINUS, L. Neural substrates of opiate withdrawal. **Trends Neurosci**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 186–91, 1992.

KOOB, G. F.; ROBERTS, A. J.; KIEFFER, B. L.; HEYSER, C. J.; KATNER, S. N.; CICCOCIOPPO, R.; WEISS, F. Animal Models of Motivation for Drinking in Rodents with a Focus on Opioid Receptor Neuropharmacology. In: GALANTER, M.; BEGLEITER, H.; DEITRICH, R.; GALLANT, D.; GOTTHEIL, E.; PAREDES, A.; ROTHSCHILD, M.; VAN THEIL, D.; LAGRESSA, D.; ALLEN, J. P.; FULLER, R.; LITTEN, R.; ECKARDT, M.; MCAUL, M.; MONTI, P. (Eds.). **Recent Developments in Alcoholism: Research on Alcoholism Treatment**. Recent Developments in Alcoholism Boston, MA: Springer US, 2002. p. 263–281.



KOOB, G. F.; STINUS, L.; MOAL, M. L.; BLOOM, F. E. Opponent process theory of motivation: Neurobiological evidence from studies of opiate dependence. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, The Neural Basis of Reward and Reinforcement: A Conference in Honour of Peter M. Milner. [s. l.], v. 13, n. 2, The Neural Basis of Reward and Reinforcement: A Conference in Honour of Peter M. Milner, p. 135–140, 1989.

KOOB, G. F.; VACCARINO, F. J.; AMALRIC, M.; BLOOM, F. E. Neurochemical substrates for opiate reinforcement. **NIDA research monograph**, [s. l.], v. 71, p. 146–164, 1986.

KOOB, G. F.; WALL, T. L.; BLOOM, F. E. Nucleus accumbens as a substrate for the aversive stimulus effects of opiate withdrawal. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 98, n. 4, p. 530–534, 1989.

KUNTSCHKE, E.; KNIBBE, R.; GMEL, G.; ENGELS, R. Why do young people drink? A review of drinking motives. **Clinical Psychology Review**, [s. l.], v. 25, n. 7, p. 841–861, 2005.

KURODA, K.; FUJIWARA, A.; TAKEDA, Y.; KAMEI, C. Effects of narcotics, including morphine, on visual evoked potential in rats. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 602, n. 2, p. 294–297, 2009.

LANE-LADD, S. B.; PINEDA, J.; BOUNDY, V. A.; PFEUFFER, T.; KRUPINSKI, J.; AGHAJANIAN, G. K.; NESTLER, E. J. CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 17, n. 20, p. 7890–7901, 1997.

LI, L.; YUE, Q. Auditory gating processes and binaural inhibition in the inferior colliculus. **Hearing Research**, A collection of papers presented at the Symposium on The Inferior Colliculus: From Past To Future. [s. l.], v. 168, n. 1, A collection of papers presented at the Symposium on The Inferior Colliculus: From Past To Future, p. 98–109, 2002.

LITTLE, H. J.; STEPHENS, D. N.; RIPLEY, T. L.; BORLIKOVA, G.; DUKA, T.; SCHUBERT, M.; ALBRECHT, D.; BECKER, H. C.; LOPEZ, M. F.; WEISS, F.; DRUMMOND, C.; PEOPLES, M.; CUNNINGHAM, C. Alcohol withdrawal and conditioning. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 453–464, 2005.

LONG, K. J.; ALLEN, N. Abnormal Brain-Stem Auditory Evoked Potentials Following Ondine's Curse. **Archives of Neurology**, [s. l.], v. 41, n. 10, p. 1109–1110, 1984.

MACEDO, C. E.; CASTILHO, V. M.; DE SOUZA E SILVA, M. A.; BRANDÃO, M. L. Dual 5-HT mechanisms in basolateral and central nuclei of amygdala in the regulation of the defensive behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 189–195, 2002.

MACRAE, J. R.; SCOLES, M. T.; SIEGEL, S. The Contribution of Pavlovian Conditioning to Drug Tolerance and Dependence. **British Journal of Addiction**, [s. l.], v. 82, n. 4, p. 371–380, 1987.

MALDONADO, R.; NEGUS, S.; KOOB, G. F. Precipitation of morphine withdrawal syndrome in rats by administration of mu-, delta- and kappa-selective opioid antagonists. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 31, n. 12, p. 1231–1241, 1992.

MALDONADO, R.; STINUS, L.; GOLD, L. H.; KOOB, G. F. F.: Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, [s. l.], p. 669–677, 1992.

MAXWELL, C. R.; EHRLICHMAN, R. S.; LIANG, Y.; TRIEF, D.; KANES, S. J.; KARP, J.; SIEGEL, S. J. Ketamine Produces Lasting Disruptions in Encoding of Sensory Stimuli. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 316, n. 1, p. 315–324, 2006.

MCBRIDE, D.; BARRETT, S. P.; KELLY, J. T.; AW, A.; DAGHER, A. Effects of Expectancy and Abstinence on the Neural Response to Smoking Cues in Cigarette Smokers: an fMRI Study. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 31, n. 12, p. 2728–2738, 2006.

MCDONALD, R. V.; SIEGEL, S. Intra-Administration Associations and Withdrawal Symptoms: Morphine-Elicited Morphine Withdrawal. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 3–11, 2004.

MCNALLY, G. P.; AKIL, H. Effects of contextual or olfactory cues previously paired with morphine withdrawal on behavior and pain sensitivity in the rat. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 156, n. 4, p. 381–387, 2001.

MEARS, R. P.; KLEIN, A. C.; CROMWELL, H. C. Auditory inhibitory gating in medial prefrontal cortex: Single unit and local field potential analysis. **Neuroscience**, [s. l.], v. 141, n. 1, p. 47–65, 2006.

MELO, L. L.; SANTOS, P.; MEDEIROS, P.; MELLO, R. O.; FERRARI, E. A.; BRANDAO, M. L.; MAISONNETTE, S. S.; FRANCISCO, A.; COIMBRA, N. C. Glutamatergic neurotransmission mediated by NMDA receptors in the inferior colliculus can modulate haloperidol-induced catalepsy. **Brain Res**, [s. l.], v. 1349, p. 41–7, 2010.

MILEKIC, M. H.; BROWN, S. D.; CASTELLINI, C.; ALBERINI, C. M. Persistent Disruption of an Established Morphine Conditioned Place Preference. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 26, n. 11, p. 3010–3020, 2006.

MILLER, E. K.; COHEN, J. D. An Integrative Theory of Prefrontal Cortex Function. **Annual Review of Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 167–202, 2001.

MITCHELL, J. M.; BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. A locus and mechanism of action for associative morphine tolerance. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 47–53, 2000.

MOORE, R. Y.; GOLDBERG, J. M. Ascending projections of the inferior colliculus in the cat. **Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 121, n. 1, p. 109–135, 1963.

MOREIRA, M. B.; MEDEIROS, C. A. De. **Princípios Básicos de Análise do Comportamento**. [s.l.] : Artmed, 2018. Google-Books-ID: 0LdwDwAAQBAJ.

MUELLER, D.; PERDIKARIS, D.; STEWART, J. Persistence and drug-induced reinstatement of a morphine-induced conditioned place preference. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 136, n. 2, p. 389–397, 2002.

NESTLER, E. J. *Addiction: From biology to drug policy*: By Avram Goldstein New York: W. H. Freeman and Company (1994). 321pp. \$22.95. **Cell**, [s. l.], v. 77, n. 2, p. 179–180, 1994.

NESTLER, E. J. Is there a common molecular pathway for addiction? **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 1445–1449, 2005.

NISELL, M.; NOMIKOS, G. G.; SVENSSON, T. H. Nicotine dependence, midbrain dopamine systems and psychiatric disorders. **Pharmacology & Toxicology**, [s. l.], v. 76, n. 3, p. 157–162, 1995.

NOBRE, M. J. Changes on auditory physiology in response to the inactivation of amygdala nuclei in high anxiety rats expressing learned fear. **Physiology & Behavior**, [s. l.], v. 118, p. 80–87, 2013.

NOBRE, M. J.; BRANDÃO, M. L. Abuso de Drogas. In: **Neurobiologia dos Transtornos Mentais**. 1. ed. [s.l.] : Atheneu, 2014. p. 185–210.

NOBRE, M. J.; CABRAL, A.; BRANDÃO, M. L. GABAergic regulation of auditory sensory gating in low- and high-anxiety rats submitted to a fear conditioning procedure. **Neuroscience**, [s. l.], v. 171, n. 4, p. 1152–1163, 2010.

NOBRE, M. J.; RIBEIRO DOS SANTOS, N.; AGUIAR, M. S.; BRANDÃO, M. L. Blockade of mu- and activation of kappa-opioid receptors in the dorsal periaqueductal gray matter produce defensive behavior in rats tested in the elevated plus-maze. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 404, n. 1–2, p. 145–151, 2000.

NOBRE, M. J.; SANDNER, G.; BRANDÃO, M. L. 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. **Hearing Research**, [s. l.], v. 184, n. 1–2, p. 82–90, 2003.

O'BRIEN, C. P.; CHILDRESS, A. R.; MCLELLAN, A. T.; EHRMAN, R. Classical Conditioning in Drug-Dependent Humans. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 654, n. 1, p. 400–415, 1992.

ORANJE, B.; VAN BERCKEL, B. N. M.; KEMNER, C.; VAN REE, J. M.; KAHN, R. S.; VERBATEN, M. N. P50 suppression and prepulse inhibition of the startle reflex in humans: a correlational study. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 45, n. 7, p. 883–890, 1999.

OSSEN, K. K. Projection of the cochlear nuclei on the inferior colliculus in the cat. **The Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 144, n. 3, p. 355–372, 1972.

PALFAI, T. P.; WEAVER, J. College student drinking and meaning in the pursuit of life goals. **Psychology of Addictive Behaviors**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 131–134, 2006.

PALIARIN, F.; INCROCCI, R. M.; NOBRE, M. J. Behavioral and Auditory Electrophysiological Rebound as a Compensatory Response to the Reinforcing Effects of Morphine. **Neuroscience**, [s. l.], v. 392, p. 66–76, 2018.

PALMER, M. R.; MORRIS, D. H.; TAYLOR, D. A.; STEWART, J. M.; HOFFER, B. J. Electrophysiological effects of enkephalin analogs in rat cortex. **Life Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 851–860, 1978.

PARKER, L. A.; CYR, J. A.; SANTI, A. N.; BURTON, P. D. The aversive properties of acute morphine dependence persist 48 h after a single exposure to morphine: Evaluation by taste and place conditioning. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 87–92, 2002.

PARKER, L. A.; MCDONALD, R. V. Reinstatement of both a conditioned place preference and a conditioned place aversion with drug primes. **Pharmacol Biochem Behav**, [s. l.], v. 66, n. 3, p. 559–61, 2000.

PATRICK, G.; STRUVE, F. A. Reduction of Auditory P50 Gating Response in Marijuana Users: Further Supporting Data. **Clinical Electroencephalography**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 88–93, 2000.

PATTI, C. L.; FRUSSA-FILHO, R.; SILVA, R. H.; CARVALHO, R. C.; KAMEDA, S. R.; TAKATSU-COLEMAN, A. L.; CUNHA, J. L. S.; ABÍLIO, V. C. Behavioral characterization of morphine effects on motor activity in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 81, n. 4, p. 923–927, 2005.

PERRY, J. L.; JOSEPH, J. E.; JIANG, Y.; ZIMMERMAN, R. S. **Prefrontal cortex and drug abuse vulnerability: Translation to prevention and treatment interventions**. [s.d.]. Disponível em: <<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0165017310001001?token=94C8CF8DCA859DE0A45734F35039D6CC85BBB0DC5A686DFDEFFBEF87E6A83C671E83C0A742783C2D54DCB06E407D192A>>. Acesso em: 24 jan. 2020.

PERRY, J. L.; JOSEPH, J. E.; JIANG, Y.; ZIMMERMAN, R. S.; KELLY, T. H.; DARNA, M.; HUETTL, P.; DWOSKIN, L. P.; BARDO, M. T. Prefrontal cortex and drug abuse vulnerability: Translation to prevention and treatment interventions. **Brain Research Reviews**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 124–149, 2011.

PETERS, E. N.; HUGHES, J. R. Daily marijuana users with past alcohol problems increase alcohol consumption during marijuana abstinence. **Drug and Alcohol Dependence**, [s. l.], v. 106, n. 2, p. 111–118, 2010.

PIAZZA, P. V.; LE MOAL, M. L. Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, [s. l.], v. 36, p. 359–78, 1996.

PIPER, M. E.; FIORE, M. C.; SMITH, S. S.; JORENBY, D. E.; WILSON, J. R.; ZEHNER, M. E.; BAKER, T. B. Use of the Vital Sign Stamp as a Systematic Screening Tool to Promote Smoking Cessation. **Mayo Clinic Proceedings**, [s. l.], v. 78, n. 6, p. 716–722, 2003.

PRUS, A. J.; JAMES, J. R.; ROSECRANS, J. A. **Conditioned Place Preference**. [s.l.] : CRC Press/Taylor & Francis, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5229/>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, Animal Models of Anxiety Disorders. [s. l.], v. 463, n. 1, Animal Models of Anxiety Disorders, p. 3–33, 2003.

RACHLIN, H. Self and Self-Control. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 818, n. 1, p. 85–97, 1997.

RAGOZZINO, M. E.; DETRICK, S.; KESNER, R. P. Involvement of the Prelimbic–Infralimbic Areas of the Rodent Prefrontal Cortex in Behavioral Flexibility for Place and Response Learning. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 19, n. 11, p. 4585–4594, 1999.

RANDALL, C. K.; KRAEMER, P. J.; BARDO, M. T. Morphine-Induced Conditioned Place Preference in Prewaning and Adult Rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 217–222, 1998.

ROBINSON, T. E.; KOLB, B. Morphine alters the structure of neurons in the nucleus accumbens and neocortex of rats. **Synapse**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 160–162, 1999.

ROBINSON, T. E.; KOLB, B. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. **Neuropharmacology**, Frontiers in Addiction Research: Celebrating the 30th Anniversary of the National Institute on Drug Abuse. [s. l.], v. 47, Frontiers in Addiction Research: Celebrating the 30th Anniversary of the National Institute on Drug Abuse., p. 33–46, 2004.

ROBLES, C. F.; MCMACKIN, M. Z.; CAMPI, K. L.; DOIG, I. E.; TAKAHASHI, E. Y.; PRIDE, M. C.; TRAINOR, B. C. Effects of kappa opioid receptors on conditioned place aversion and social interaction in males and females. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 262, p. 84–93, 2014.

ROTH, J.; BENDAYAN, M.; ORCI, L. Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein A-gold complex. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, [s. l.], v. 26, n. 12, p. 1074–1081, 1978.

SANTE, A. B.; NOBRE, M. J.; BRANDÃO, M. L. Place aversion induced by blockade of mu or activation of kappa opioid receptors in the dorsal periaqueductal gray matter. **Behavioural Pharmacology**, [s. l.], v. 11, n. 7–8, p. 583–589, 2000.

SCHULTEIS, G.; AHMED, S. H.; MORSE, A. C.; KOOB, G. F.; EVERITT, B. J. Conditioning and opiate withdrawal. **Nature**, [s. l.], v. 405, n. 6790, p. 1013–1014, 2000.

SCHULTEIS, G.; KOOB, G. F. Reinforcement processes in opiate addiction: A homeostatic model. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 1437–1454, 1996.

SCHULTEIS, G.; MARKOU, A.; GOLD, L. H.; STINUS, L.; KOOB, G. F. Relative sensitivity to naloxone of multiple indices of opiate withdrawal: a quantitative dose-response analysis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 271, n. 3, p. 1391–1398, 1994.

SHENG, M. Molecular organization of the postsynaptic specialization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 98, n. 13, p. 7058–7061, 2001.

SHERGILL, S. S.; BRAMMER, M. J.; WILLIAMS, S. C. R.; MURRAY, R. M.; MCGUIRE, P. K. Mapping Auditory Hallucinations in Schizophrenia Using Functional Magnetic Resonance Imaging. **Archives of General Psychiatry**, [s. l.], v. 57, n. 11, p. 1033–1038, 2000.

SHIPPENBERG, T. S. RECENT ADVANCES IN ANIMAL MODELS OF DRUG ADDICTION. [s. l.], p. 18, 2002.

SIEGEL, S. Evidence from rats that morphine tolerance is a learned response. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, [s. l.], v. 89, n. 5, p. 498–506, 1975.

SIEGEL, S. Drug Tolerance, Drug Addiction, and Drug Anticipation. **Current Directions in Psychological Science**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 296–300, 2005.

SIEGEL, S.; HINSON, R. E.; KRANK, M. D.; MCCULLY, J. Heroin “overdose” death: contribution of drug-associated environmental cues. **Science**, [s. l.], v. 216, n. 4544, p. 436–437, 1982.

SIEGEL, S.; RAMOS, B. M. C. Applying laboratory research: Drug anticipation and the treatment of drug addiction. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 162–183, 2002.

SINHA, R.; FUSE, T.; AUBIN, L.-R.; O’MALLEY, S. S. Psychological stress, drug-related cues and cocaine craving. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 152, n. 2, p. 140–148, 2000.

SINHA, R.; LI, C.-S. R. Imaging stress- and cue-induced drug and alcohol craving: association with relapse and clinical implications. **Drug and Alcohol Review**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 25–31, 2007.

SOLOMON, R. L.; CORBIT, J. D. An opponent-process theory of motivation: I. Temporal dynamics of affect. **Psychological Review**, [s. l.], v. 81, n. 2, p. 119–145, 1974.

SORG, B. A.; DAVIDSON, D. L.; KALIVAS, P. W.; PRASAD, B. M. Repeated daily cocaine alters subsequent cocaine-induced increase of extracellular dopamine in the medial prefrontal cortex. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 281, n. 1, p. 54–61, 1997.

STEIN, E. A.; LYNCH, J. J.; RUCHKIN, D. S. Evoked potential changes during classical conditioning of morphine in the awake, freely behaving rat. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 55, n. 3, Part 1, p. 505–519, 1977.

STEIN, L.; BELLUZZI, J. D. Brain endorphins: possible mediators of pleasurable states. In: USDIN, E.; BUNNEY, W. E.; KLINE, N. S. (Eds.). **Endorphins in Mental Health Research**. London: Palgrave Macmillan UK, 1979. p. 375–389.

STEWART, J.; DE WIT, H.; EIKELBOOM, R. Role of unconditioned and conditioned drug effects in the self-administration of opiates and stimulants. **Psychological Review**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 251–268, 1984.

STEWART, J.; WISE, R. A. Reinstatement of heroin self-administration habits: morphine prompts and naltrexone discourages renewed responding after extinction. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 108, n. 1, p. 79–84, 1992.

STINUS, L.; LE MOAL, M.; KOOB, G. F. Nucleus accumbens and amygdala are possible substrates for the aversive stimulus effects of opiate withdrawal. **Neuroscience**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 767–773, 1990.

SZCZEPANIAK, W. S.; MØLLER, A. R. Evidence of decreased GABAergic influence on temporal integration in the inferior colliculus following acute noise exposure: a study of evoked potentials in the rat. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 196, n. 1–2, p. 77–80, 1995.

TANAKA, E.; NORTH, R. A. Opioid actions on rat anterior cingulate cortex neurons in vitro. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 14, n. 3 Pt 1, p. 1106–1113, 1994.

TONGJAROENBUANGAM, W.; JONGKAMONWIWAT, N.; PHANSUWAN-PUJITO, P.; CASALOTTI, S. O.; FORGE, A.; DODSON, H.; GOVITRAPONG, P. Relationship of opioid receptors with GABAergic neurons in the rat inferior colliculus. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. 1987–1994, 2006.

TONGJAROENBUNGAM, W.; JONGKAMONWIWAT, N.; CUNNINGHAM, J.; PHANSUWAN-PUJITO, P.; DODSON, H. C.; FORGE, A.; GOVITRAPONG, P.; CASALOTTI, S. O. Opioid modulation of GABA release in the rat inferior colliculus. **BMC Neuroscience**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 31, 2004.

TZSCHENTKE, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 56, n. 6, p. 613–672, 1998.

UMEOKA, E. H. L.; GARCIA, S. B.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L. L. K.; GARCIA-CAIRASCO, N. Functional characterization of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis of the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain. **Brain Research**, [s. l.], v. 1381, p. 141–147, 2011.

VEZINA, P.; STEWART, J. Morphine conditioned place preference and locomotion: the effect of confinement during training. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 93, n. 2, 1987. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00179944>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

WALKER, J. R.; CHEN, S. A.; MOFFITT, H.; INTURRISI, C. E.; KOOB, G. F. Chronic opioid exposure produces increased heroin self-administration in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, [s. l.], v. 75, n. 2, p. 349–54, 2003.

WEISS, F. Neurobiology of craving, conditioned reward and relapse. **Current Opinion in Pharmacology**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 9–19, 2005.

WEXLER, B. E.; GOTTSCHALK, C. H.; FULBRIGHT, R. K.; PROHOVNIK, I.; LACADIE, C. M.; ROUNSAVILLE, B. J.; GORE, J. C. Functional Magnetic Resonance Imaging of Cocaine Craving. **American Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 158, n. 1, p. 86–95, 2001.

WHITE, D.; HWANG, M.; HOLTZMAN, S. Naltrexone-induced conditioned place aversion following a single dose of morphine in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 81, n. 3, p. 451–458, 2005.

WHITE, N. M. Addictive drugs as reinforcers: multiple partial actions on memory systems. **Addiction (Abingdon, England)**, [s. l.], v. 91, n. 7, p. 921–949; discussion 951-965, 1996.

WIKLER, A. Recent progress in research on the neurophysiologic basis of morphine addiction. **The American Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 105, n. 5, p. 329–338, 1948.

WILDER, M. B.; O'BRIEN, J. H. Evoked potential conditioning using morphine as the unconditioned stimulus in rats. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 539–553, 1980.

WILSON, S. J.; SAYETTE, M. A.; DELGADO, M. R.; FIEZ, J. A. Instructed smoking expectancy modulates cue-elicited neural activity: A preliminary study. **Nicotine & tobacco research : official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 637–645, 2005.

WOOLLARD, H. H.; WEDDELL, G.; HARPMAN, J. A. Observations on the neurohistological basis of cutaneous pain. **Journal of Anatomy**, [s. l.], v. 74, n. Pt 4, p. 413-440.7, 1940.

YANG, Z.; XIE, J.; SHAO, Y.-C.; XIE, C.-M.; FU, L.-P.; LI, D.-J.; FAN, M.; MA, L.; LI, S.-J. Dynamic neural responses to cue-reactivity paradigms in heroin-dependent users: An fMRI study. **Human Brain Mapping**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 766–775, 2009.

ZHANG, J.; YANG, Z.; WU, S. M. Immunocytochemical analysis of spatial organization of photoreceptors and amacrine and ganglion cells in the tiger salamander retina. **Visual Neuroscience**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 157–166, 2004.

ZIEGLGÄNSBERGER, W.; FRENCH, E. D.; MERCURI, N.; PELAYO, F.; WILLIAMS, J. T. Multiple opiate receptors on neurons of the mammalian central nervous system. In vivo and in vitro studies. **Life Sciences**, [s. l.], v. 31, n. 20–21, p. 2343–2346, 1982.





## Behavioral and Auditory Electrophysiological Rebound as a Compensatory Response to the Reinforcing Effects of Morphine

Francieli Paliarin,<sup>a,c</sup> Roberta Monteiro Incrocci<sup>a,c</sup> and Manoel Jorge Nobre<sup>a,b,c,\*</sup>

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

<sup>b</sup> Departamento de Psicologia, Uni-FACEF, 14401-135 Franca, SP, Brazil

<sup>c</sup> Instituto de Neurociências e Comportamento-INeC, Campus USP, 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil

**Abstract**—Auditory-evoked potentials (AEPs) can be modified by associative learning, where the appearance of learned compensatory responses (CCRs) may result in the emergence of drug withdrawal symptoms and relapse. Although CCRs' influence on later attentive and cognitive domains has been extensively examined, contextual conditioned tolerance occurring in preattentive mechanisms operating at earlier stages of information processing has remained largely unexplored. To extend our knowledge on this subject, compensatory changes on the motor and emotional aspects of behavior evoked by contextual cues were investigated with an electronic open field in morphine-pretreated rats challenged with two morphine overdoses (40 and 80 mg/kg). CCRs influence on the AEPs recorded in the central nucleus of the inferior colliculus (CIC) was analyzed with the help of a field potential recording device and a two-chamber shuttle box placed inside a Faraday cage system. The emergence of electrophysiological CCRs was analyzed by recording AEP latency and amplitude elicited in the central nucleus of the IC (CIC) with the aid of a field potential recording device and a two-chamber shuttle box placed inside a Faraday cage system. Behavioral analysis indicated that CCRs ensue in non-familiar contexts. Electrophysiological data revealed increases in the amplitude of AEPs evoked in a non-familiar context. Our results indicate that behavioral learning responses emerge following Pavlovian conditioning even with the use of low and regular doses of morphine over a short-term treatment. Changes in the CIC electrophysiology may indicate that the development of drug dependence occurs covertly in the early stages of sensory information processing. © 2018 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** morphine, compensatory response, inferior colliculus, electrophysiology, auditory-evoked potentials.

### INTRODUCTION

In drug-dependent subjects, the drug-related context has the ability to evoke drug craving, greatly contributing to relapse following a withdrawal period (Breese et al., 2005). Regarding opiates, just a few drug-paired trials can potentially become signals for impending drug use. For drugs with this characteristic, the probability for an association between drug effects and the context or contextual cues where drug intake occurs is very large. These learned behaviors can be conceptualized as conditioned compensatory responses (CCRs) in nature and develop through classical (or Pavlovian) conditioning. As an example, a conditioned compensatory hyperalgesic

response can be learned by exposure to a previous drug-paired environment (Siegel, 1975). Therefore, it is expected that someone who experiences a drug outcome in a non-usual environment may be more vulnerable, since cues that normally accompanied drug administration to counteract the effects of the drug are absent.

The physical nature of CCRs has been studied extensively. Most of these studies report the activation of prefrontal cortex sub-regions in response to the use of several abused drugs like alcohol (Grüsser et al., 2004; Sinha and Li, 2007), cocaine (Kilts et al., 2001; Sinha et al., 2000; Wexler et al., 2001), tobacco (McBride et al., 2006; Wilson et al., 2005), and opiates (Childress et al., 1986; Daghli et al., 2001; Yang et al., 2009). However, although CCRs' influence on later attentive and cognitive processes has been extensively examined, contextual conditioned tolerance occurring in preattentive mechanisms operating at earlier stages of information processing has remained largely unexplored. From these mechanisms stand out the mesencephalic

\*Correspondence to: M. J. Nobre, Laboratório de Psicobiologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14090-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Fax: +55 1636024830.

E-mail address: [mjnes@usp.br](mailto:mjnes@usp.br) (M. J. Nobre).

Abbreviations: AEPs, auditory-evoked potentials; CCRs, conditioned compensatory responses; PPI, prepulse inhibition.

auditory system, which modulates several preattentive processes, such as auditory sensory gating (Boutros et al., 1997). In this system, the inferior colliculus (IC), a midbrain region reputed to be one of the most important structures, occupies a strategic position (Casseday and Covey, 1996). Sound localization and the prepulse inhibition (PPI) of the startle reflex (Braff and Geyer, 1990; Fendt et al., 2001; Li and Yue, 2002) are highly modulated in the IC (Li and Yue, 2002). In addition, mismatch negativity (Patel et al., 2012) and auditory hallucinations elicited during a psychotic outbreak are accompanied by IC neural activation (Shergill et al., 2000). It has been suggested that abnormalities in this circuit led to overflow higher brain functions with innocuous information (Oranje et al., 1999).

Since cognitive and motor components of later preattentive mechanisms can become under control of drug-related environmental cues, it is possible that early preattentive mechanisms may also remain under control of environmental stimuli over time. In this context, in our laboratory, it was established that auditory-evoked potentials (AEPs) can be modified through associative learning (Nobre, 2013). Therefore, considering the information above, to extend our knowledge on the influence of the opioid system on the early stages of auditory information, the present study sought to test the hypothesis that electrophysiological CCRs arise following a short-term treatment with low-reinforcing doses of the opiate morphine. To achieve this goal, we try to establish whether sub chronic low doses of morphine could be able to induce contextual tolerance to an acute higher dose due to the Pavlovian association. For such purpose, compensatory changes on the motor and emotional aspects of behavior evoked by contextual cues were investigated with an electronic open field in morphine-pretreated rats following two morphine overdoses (40 and 80 mg/kg). The emergence of electrophysiological CCRs was analyzed by recording AEP latency and amplitude elicited in the central nucleus of the IC (CIC) with the aid of a field potential recording device and a two-chamber shuttle box placed inside a Faraday cage system. In this experiment, the CIC was chosen for AEP investigation due to its main role in the processing of ascending auditory stimuli (Aitkin et al., 2004). Morphine overdoses were not used at this time to avoid the appearance of behavioral effects since the main point under investigation is whether, in the absence of overt symptoms, an electrophysiological rebound could be noted, following morphine treatment.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Animals and housing conditions

In this study, we used one-hundred and two male Wistar rats from the campus of Ribeirão Preto, University of São Paulo. The animals were 7 weeks old, weighing  $200 \pm 10$  g, at the beginning of the experiments. They were provided with food and water *ad libitum* and maintained in a colony in a temperature-controlled room ( $24 \pm 1$  °C) under a 12:12-h light–dark cycle (lights on at 7 a.m.).

### Ethical compliances

We hereby declare that all experimental procedures were reviewed and approved by the Committee on Animal Research and Ethics (CEUA) of the University of São Paulo (protocol no. 08.1.1547.53.3). Moreover, the experiments were conducted in agreement with the recommendations of the US National Institute of Health: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23). The number of animals used was the minimum required to allow for the reliability of the results. In keeping with accepted practice, every effort was made to minimize animal stress and suffering.

### Drugs

Drugs used were the voltage-gated Na<sup>+</sup> channels blocker lidocaine (10 mg/kg – Lidostesim, Densply, Brasil), the  $\alpha 2$  adrenergic receptor agonist xylazine (10 mg/kg – Calmiun, Agener, Brasil), the benzodiazepine diazepam (20 mg/kg, Roche, Brasil), the selective NMDA receptor antagonist ketamine (60 mg/kg – Cetamin, Syntec, Brasil), the nonsteroidal anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic drug flunixin (2.5 mg/kg – Banamine (meglumine salt), MSD, Brasil) and the opiate agonist morphine (10, 40 and 80 mg/kg). Isotonic saline was used to control drug effects. Morphine was obtained in a commercial form (Dimorf, Cristália, Brasil). It was dissolved in physiological saline solution (0.9% sodium chloride), to obtain the required concentrations in a volume of 1 ml/kg body weight. The solution was cleaned with a syringe filter (Whatman GD/XP filter nylon 0.45 mm, Maidstone, UK). Solutions were prepared freshly immediately before use. Doses were chosen on the basis of previous studies (Avila et al., 2008; Cabral et al., 2009; Cardoso et al., 1992; Gellert and Holtzman, 1979; Parker et al., 2002; Vezina and Stewart, 1987; White et al., 2005).

### Experimental apparatuses, methodology and measures

*Experiment 1. Behavioral contextual conditioned tolerance.* In the present experiment, we used ninety-two Wistar rats. The contextual conditioned tolerance paradigm is based on the well-known phenomenon of classical (or Pavlovian) conditioning where it is previously assumed that behavioral (and pharmacological) tolerance to a drug dosage ensues in the context where the drug is usually ingested (Siegel, 1975; Siegel and Hinson, 1982). For this analysis, an electronic open-field (50 cm × 50 cm × 50 cm) with transparent walls was employed (context A). Two sets of 24 infrared beams were mounted into the walls to record the behavioral activity of the animals. Data were fed into a PC and later analyzed by a software (Activity Monitor, Insight, Brasil). A black/white Plexiglas striped square-like cover that fits the interior walls of the open-field was used to change the original context A into context B. Tests on B were performed with a white light bulb (40 W) placed 60 cm above the open-field.

**Conditioning:** Initially, the animals were divided into two groups, placebo or morphine. After three days of habituation to the conditions of the animal-house training began. Each animal was exposed to a single daily injection of isotonic saline or 10 mg/kg of morphine for 4 days. At this stage, drug conditioning was performed always in the context A. Data recorded were grouped into two classes: motor (velocity, traveled distance, ambulation, rearing, and immobility) and emotional-like (time spent in the center of the open field). The sessions lasted 40 min, recorded in eight blocks of 5 min each.

**Test of tolerance:** On the next two days, the animals were challenged with an overdose of 40 or 80 mg/kg of morphine and behaviors were recorded. After an injection of morphine or placebo (*s.c.*), the animals were placed into the apparatus. Two were the conditions of test: rats previously conditioned in the A context were tested in the same context with an overdose of morphine (40 or 80 mg/kg) (A × A) or, rats previously conditioned in the A context were tested in the context B with an overdose of morphine (A × B). Ten animals died due to overdose effects. Most of the deaths occurred when rats were challenged with morphine overdose in the context B (two animals challenged with the dose of 40 mg/kg of morphine and five animals challenged with the dose of 80 mg/kg of morphine). However, dead also occurred in the group challenged with 80 mg/kg of morphine and tested in the context A (three animals). Of the remaining, six groups were formed: saline A × A ( $n = 20$ ), saline A × B ( $n = 20$ ), morphine 40 A × A ( $n = 10$ ), morphine 40 A × B ( $n = 10$ ), morphine 80 A × A ( $n = 10$ ) and morphine 80 A × B ( $n = 12$ ).

**Experiment 2. Electrophysiological tolerance to contextual cues.** Thirty animals were used ( $\pm 220$  g). Before experiments, they were maintained for three days in the sectorial animal house of the laboratory of neuropsychopharmacology to acclimate.

**Implant surgery.** The animals underwent surgical implantation of electrode assemblies. They were intraperitoneally anesthetized with a mix of 60 mg/kg ketamine/10 mg/kg xylazine (Agener, Brazil) and fixed in a digital stereotaxic frame. Lidocaine (20 mg/ml) was injected around the surgical field as a local complement to general anesthesia. For 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 central nucleus of the inferior colliculus (CIC) (−8.6 mm posterior,  $\pm 1.5$  mm lateral, −4.0 mm deep, relative to *bregma*) (Paxinos and Watson, 2008). The assembly was fixed to the skull by means of acrylic resin and the three stainless steel screws.

**Experimental box.** An experimental cage (external dimensions: 19 cm × 9 cm × 9 cm; internal dimensions: 16 cm × 6 cm × 7 cm) located inside a Faraday

insulated system and surrounded by a ventilated plywood sound-attenuating chamber (64 × 60 × 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 7.5 W red LED, positioned at a hole in the top of the chamber, was switched on during test sessions. A loudspeaker, located 10 cm behind the cage, delivered continuous background noise (55 dB sound pressure level). 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-inch microphone and a type 2636 measuring amplifier DK-2580 (Bruel and Kjaer, Naerum, Denmark). Acoustic stimuli were delivered via two piezoelectric speakers (12  $\Omega$ , 200 W, LeSon, Brazil) mounted on the lateral walls of the sound-insulating chamber, 15 cm from the experimental cage. The animals were previously habituated to the behavioral restraining of the experimental cage, that 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.

**Measuring AEPs.** The very small electrical voltage AEPs were obtained across electrodes unilaterally implanted in the CIC. These AEPs occur in response to a repetitive stimulus along a specific brainstem auditory pathway and reflects neuronal activity in the auditory complex, mainly in the cochlear nucleus, superior olive, and IC (Long and Allen, 1984). 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 100 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 (that going through a hole in the roof of the Faraday cage) linked to a double-brush electric swivel (SL2C, Plastics-One, USA). The output of the amplifier was connected to an analog/digital converter (CAD 12/36) plugged into a microcomputer. The evoked-potential signals 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 AEP 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 200 ms after termination of the sound stimulus. During the experiments, the animals were monitored via a video-camera system placed in the experimental room. Peak amplitudes were defined as the maximum amplitude measured between N1 and the end of P1 (Brandão et al., 2005; Nobre et al., 2003). The positive peak P1 is considered an early component of the IC response. Its amplitude is measured



peak to peak, with peak latency between 5 and 10 ms (Hall and Mark, 1967). This way of analysis is comparable to that observed in previous studies of our and other laboratories using similar protocols (Nobre et al., 2003, 2010; Szczepaniak and Møller, 1995a, b). 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). AEP data were stored on a computer hard disc and transferred to Microsoft Excel (Microsoft Corp., Mountain View, CA, USA) tables for off-line visualization and analysis. The AEP elicited from the CIC were recorded from the ventrocaudal portions of the nucleus.

**Experimental procedure.** This experiment was sought to determine the influence of drug-paired context cues on the expression of morphine tolerance of a physiological response. For this, we joined a behavioral place preference procedure with an electrophysiological recording of CIC field potentials. Thus, the conditioned place preference apparatus previously described in experiment 1 was allocated inside the Faraday cage. A previous study has been pointed out the usefulness of a sedative when measuring brainstem AEPs to control the influence of motor responses on peak latencies (Arai, 2008; Greene and Thurmon, 1988). To test this assumption, four rats were submitted to an intramuscular injection of xylazine (5 mg/kg, 0.1 ml) immediately before data recording. Xylazine was able to decrease the motor response and improve AEP waveforms. However, despite the low dosage, xylazine also showed to interfere with AEP amplitude but not latency (data not showed). Therefore, the experiments were performed as usual.

**Preconditioning:** Baseline amplitudes of AEPs were determined in a drug-free state, with the animals confined in the context A. Three measures were taken, and the mean amplitude and latency were used as the basal AEP value. This procedure was repeated for four days. Experiments were initiated with 30 animals and finished with 21 (saline = 10 animals, morphine = 11 animals). This difference was due to death (three animals) or problems with electrodes (high impedance, tissue necrosis or error on electrode location – six animals).

**Conditioning:** In general, drug conditioning was performed like the experiment 3. The main difference was that AEPs were recorded with the animals experiencing drug effects in a specific context (A), in the absence of morphine overdoses. AEPs were recorded 15 minutes after placebo or morphine injection. Four conditioning sessions were performed.

**Postconditioning:** Test session was performed 24 h after conditioning in the same way as a baseline and in the absence of drug effects. Sessions were randomly conducted in both contexts (A and B). Overall, each animal was tested eight times along eight days (three days of baseline, four days of drug/context conditioning, and 1 day of the test).

**Histology.** Upon completion of the experiments, the animals were deeply anesthetized with an overdose of

mixed diazepam/ketamine (20/150 mg/kg, respectively) and perfused intracardially with PBS (0.1 M) followed by a paraformaldehyde solution (4%). Brains were removed and maintained in paraformaldehyde for 4 hours, and later immersed in sucrose solution (30%). After 7 days, the brains were frozen. Serial 60- $\mu$ m 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).

## Statistical analysis

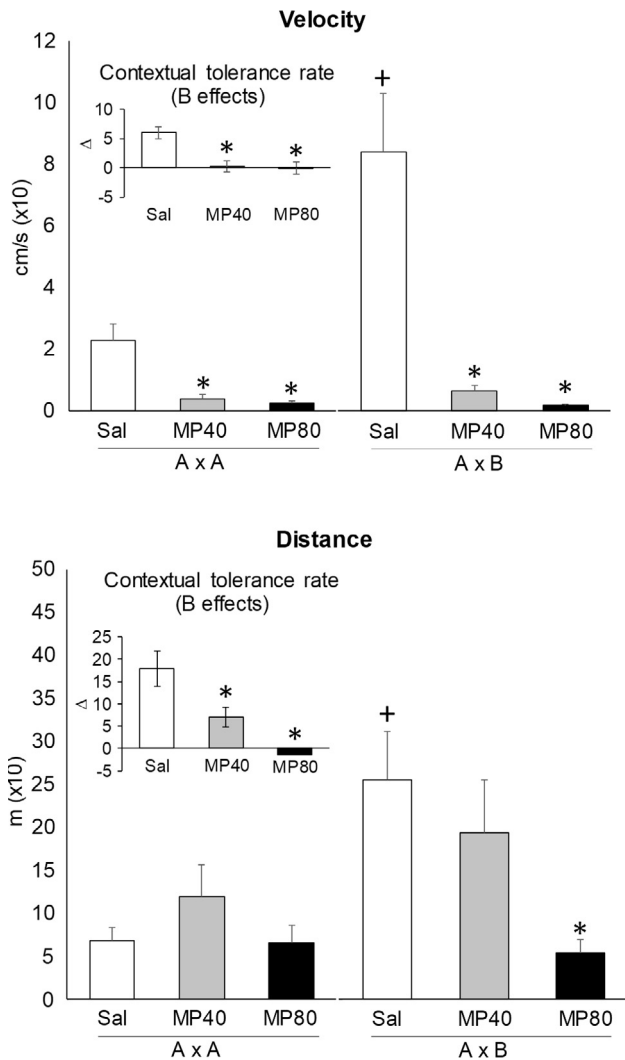
**Behavioral contextual conditioned tolerance.** Data from contextual conditioned tolerance experiments were analyzed with a Two-way ANOVA (saline/morphine  $\times$  context A/B) for each variable in the study (velocity, distance, ambulation, rearing, time of immobility, and time spent in the center of the open field). When necessary Tukey–Kramer HSD test was used ( $P \leq 0.05$ ). Changes in preference rate were evaluated with one-way ANOVA.

**Electrophysiological tolerance to contextual cues.** The waves of the AEPs were labeled and evaluated as in previous works (Bagri et al., 1989; Brandão et al., 2005; Nobre, 2013). Data used for statistical analysis were the mean latency and AEP amplitude recorded during baseline session, the latency and AEPs recorded after an acute placebo or morphine injection (first conditioning trial – CD1), and those recorded in the absence of drug effects, during the confinement in the context A or B. The effects of morphine-induced electrophysiological tolerance of AEP latency and amplitude were analyzed by a two-way RM ANOVA in a treatment (vehicle/morphine)  $\times$  moment of test (baseline/CD1/A  $\times$  A/A  $\times$  B) design. If necessary, two-way RM ANOVA was followed by Duncan's Multiple Range Test (MRT) to specify differences between pairs of means. Post-hoc analysis was performed with Tukey–Kramer HSD test. The effects of treatments on the latency for the first negative wave (N1) were determined by a two-way RM ANOVA followed by Tukey test as well. For all comparisons, the level of significance level was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Behavioral contextual conditioned tolerance

Independent groups of rats were used. Statistically significant differences were noted on the variables velocity ( $F_{1,3} = 19,54$ ;  $P < 0.0001$ ) and distance traveled ( $F_{1,3} = 9,99$ ;  $P < 0.001$ ) (Fig. 1), ambulation ( $F_{1,3} = 13,26$ ;  $P < 0.005$ ) and rearing ( $F_{1,3} = 15,01$ ;  $P < 0.0001$ ) (Fig. 2). The time of immobility ( $F_{1,3} = 14,00$ ;  $P < 0.0005$ ) and the time spent in the center of the open-field was also significantly affected ( $F_{1,3} = 18,1$ ;  $P < 0.0001$ ) (Fig. 3). Post-hoc analysis pointed out the enhancement on the performance of control rats when exposed to context B. Except for immobility, only the higher dose of morphine changes

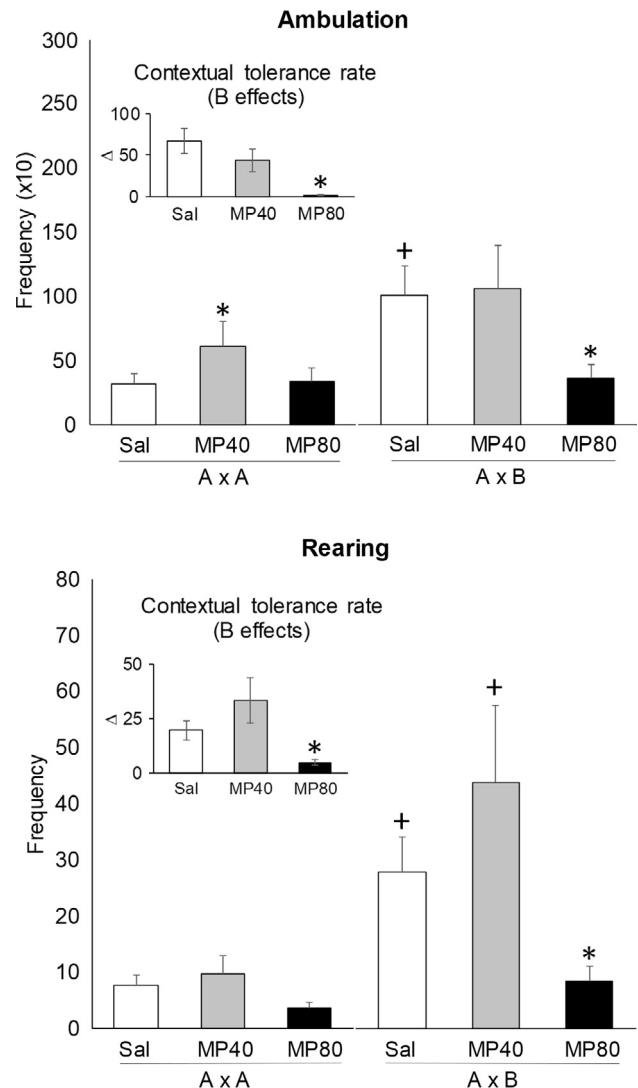


**Fig. 1.** Behavioral tolerance to contextual cues induced by 10 mg/kg of morphine (MP) as determined by two MP overdoses (40 and 80 mg/kg). Variables collected were divided into motor (velocity, distance, ambulation and rearing and time of immobility) and emotional-like (time spent in the center of the open-field arena). Figures present changes in **velocity** (cm/s) and **distance** traveled (m) of rats trained in context A and tested with an MP overdose in the same context, or rats trained in context A and tested with an MP overdose in context B. Six independent groups were used: Sal A × A ( $n = 20$ ), Sal A × B ( $n = 20$ ), MP40 A × A ( $n = 10$ ), MP40 A × B ( $n = 10$ ), MP80 A × A ( $n = 10$ ), MP80 A × B ( $n = 12$ ). \*Significant difference between MP versus control (Sal) group data within the same trial (A × A or A × B). <sup>+</sup>A significant difference between the data recorded during the A × A versus A × B trials within the same treatment (Sal, MP40 or MP80). Two-way RM ANOVA with Tukey–Kramer post-hoc ( $^*P \leq 0.05$ ). Insets depict tolerance rate for the two MP overdoses (one-way ANOVA).

significantly all the measures in the study, as determined by one-way ANOVA comparisons ( $P < 0.05$ ).

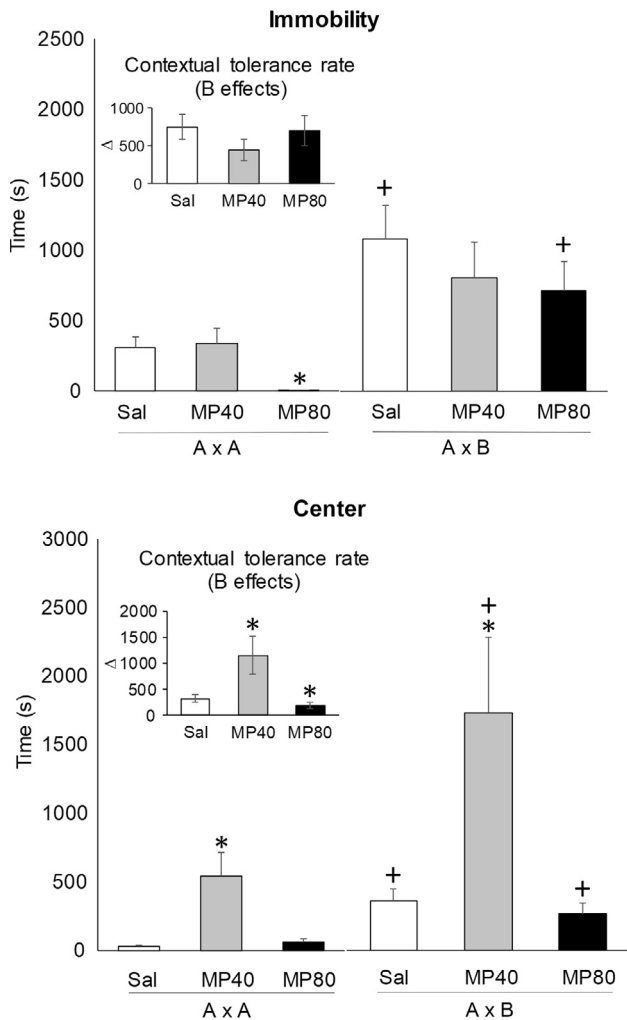
### Electrophysiological tolerance to contextual cues

A photomicrograph of a representative site injection and the location of electrode tips in the CIC are shown in Fig. 4(A and B, respectively). A representation of the effects of the treatments on mean AEP waves is shown in Fig. 5. Two-way ANOVA revealed that AEP amplitude



**Fig. 2.** Behavioral tolerance to contextual cues induced by 10 mg/kg of morphine (MP) as determined by two MP overdoses (40 and 80 mg/kg). Variables collected were divided into motor (velocity, distance, ambulation and rearing and time of immobility) and emotion-like cues (time spent in the center of the open-field arena). Figures present changes in the frequency of **ambulation** and **rearing** of rats trained in context A and tested with an MP overdose in the same context, or rats trained in context A and tested with an MP overdose in context B. Six independent groups were used: Sal A × A ( $n = 20$ ), Sal A × B ( $n = 20$ ), MP40 A × A ( $n = 10$ ), MP40 A × B ( $n = 10$ ), MP80 A × A ( $n = 10$ ), MP80 A × B ( $n = 12$ ). \*Significant difference between MP versus control (Sal) group data within the same trial (A × A or A × B). <sup>+</sup>A significant difference between the data recorded during the A × A versus A × B trials within the same treatment (Sal, MP40 or MP80). Two-way RM ANOVA with Tukey–Kramer post-hoc ( $^*P \leq 0.05$ ). Insets depict tolerance rate for the two MP overdoses (one-way ANOVA).

differs significantly between treatments ( $F_{1,3} = 16.90$ ;  $P = 0.005$ ) (Fig. 6). Furthermore, AEP amplitude was notably influenced by contextual cues ( $F_{1,19} = 5.89$ ;  $p = 0.001$ ), as revealed by significant interaction between factors ( $F_{3,19} = 5.89$ ;  $p = 0.001$ ). Overall, an acute morphine injection (first conditioning day – CD1) was able to increase AEP amplitude. The effect of conditioning on AEPs during the test of tolerance was clearly dependent on environmental cues being like



**Fig. 3.** Behavioral tolerance to contextual cues induced by 10 mg/kg of morphine (MP) as determined by two MP overdoses (40 and 80 mg/kg). Variables collected were divided into motor (velocity, distance, ambulation and rearing and time of immobility) and emotion-like cues (time spent in the center of the open-field arena). Figures present changes in the variables related to emotionality (time of **immobility** and time spent in the **center** of the open-field) of rats trained in context A and tested with an MP overdose in the same context, or rats trained in context A and tested with an MP overdose in context B. Six independent groups were used: Sal A × A ( $n = 20$ ), Sal A × B ( $n = 20$ ), MP40 A × A ( $n = 10$ ), MP40 A × B ( $n = 10$ ), MP80 A × A ( $n = 10$ ), MP80 A × B ( $n = 12$ ). \*Significant difference between MP versus control (Sal) group data within the same trial (A × A or A × B). + A significant difference between the data recorded during the A × A versus A × B trials within the same treatment (Sal, MP40 or MP80). Two-way RM ANOVA with Tukey–Kramer post-hoc ( $P \leq 0.05$ ). Insets depict tolerance rate for the two MP overdoses (one-way ANOVA).

morphine itself on context B ( $F_{3,19} = 7,19$ ;  $p = 0.005$ ). Latency was not affected by treatments.

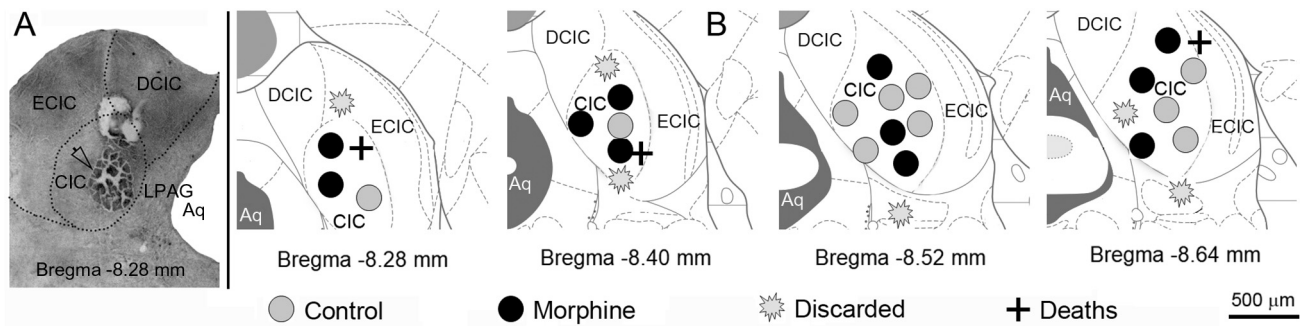
## DISCUSSION

To assess the emergence of contextual tolerance to morphine effects, we trained independent groups of rats to experience the reinforcing effects of 10 mg/kg of morphine and later tested the animals under one of two acute morphine overdoses in the same context where they were previously conditioned (A) or in a different

context (B). Six variables were analyzed: velocity, distance traveled, ambulation, rearing and time of immobility were allocated to the motor aspects of behavior; the time spent in the center of the open field was related to the emotional domain. In control animals, changes in motor behavior were clearly related to environmental cues, since exposure to the non-paired context (B) enhanced those measures when compared to the A context. These differences may be due to the inexperience of the inescapable novel test environment where novelty-induced anxiety ensues following exposure to a new untrained setting. In fact, because the open field test represents an inescapable situation, it has been suggested that it should be used as a tool to measure not only novelty behavior but also emotionality (Bardo et al., 1996). Corroborating this assumption, in this group, the time spent in the center of the open field in context B was higher than in context A but similar to that recorded on the first day of conditioning (data not showed). Besides increases in velocity, the statement above is also validated by the consequent increases of the distance traveled, mean photobeam interruptions (ambulation), the frequency of rearing behavior and on the time of immobility. In contrast, velocity and distance traveled showed habituation during the trials. These data are in line with the statement that exposure to new environments elicits two related types of emotional behavior: an active escape response that frequently progresses to immobility.

The effects of both doses of morphine were to reduce velocity, no matter the context of the test. Regarding the behavior of rats challenged with 40 mg/kg of morphine and tested in a familiar context, behavioral tolerance was achieved for all the other measures except ambulation and time spent at the center. Changes in velocity could be due to morphine sedative/analgesic effects, but the enhancement of the frequency of ambulation rules out this assumption. Increases in ambulation could also be due to interference of conditioning. As an example, it has been suggested that both CPP and conditioned locomotor activity reflect the rewarding properties of drugs (Bindra, 1968; Vezina and Stewart, 1987). In any case, the impact of morphine on mean velocity does not seem to influence the appearance of other motor behaviors due to behavioral competition, and vice versa. Given that the well-known anti-anxiety action of morphine, it is expected that increases on motor activity also impacts the time spent in the center of the apparatus, which is regarded as an index of anxiolysis (Prut and Belzung, 2003). Thus, we argue that 40 mg/kg morphine dose increases ambulation and time spent in the center of the open field, basically as a function of its anxiety-like properties. Despite dissimilarities regarding gender status and experimental manipulation, comparable data were found in the study of Hollais et al. (2014), where behavioral measures were evaluated during open-field exposure of female mice.

It has long been proposed that learning is important in the development of morphine tolerance (Siegel, 1975). In accordance with this theory, tolerance results (at least in part) from the Pavlovian association between the systemic reactions of a given drug and the environmental



**Fig. 4.** The arrow in the photomicrograph (A) depicts a representative site of placement of the bipolar electrode in the central nucleus of the inferior colliculus (CIC). The remaining drawings (B) provide the localization of electrode tips. From the total number of animals used ( $n = 31$ ), nine were discarded due to death (three animals). The other six animals were removed from the experiments due to technical problems. ECIC: external cortex of the inferior colliculus, DCIC: dorsal cortex of the inferior colliculus, LPAG: lateral periaqueductal gray, Aq: Aqueductus Sylvii.

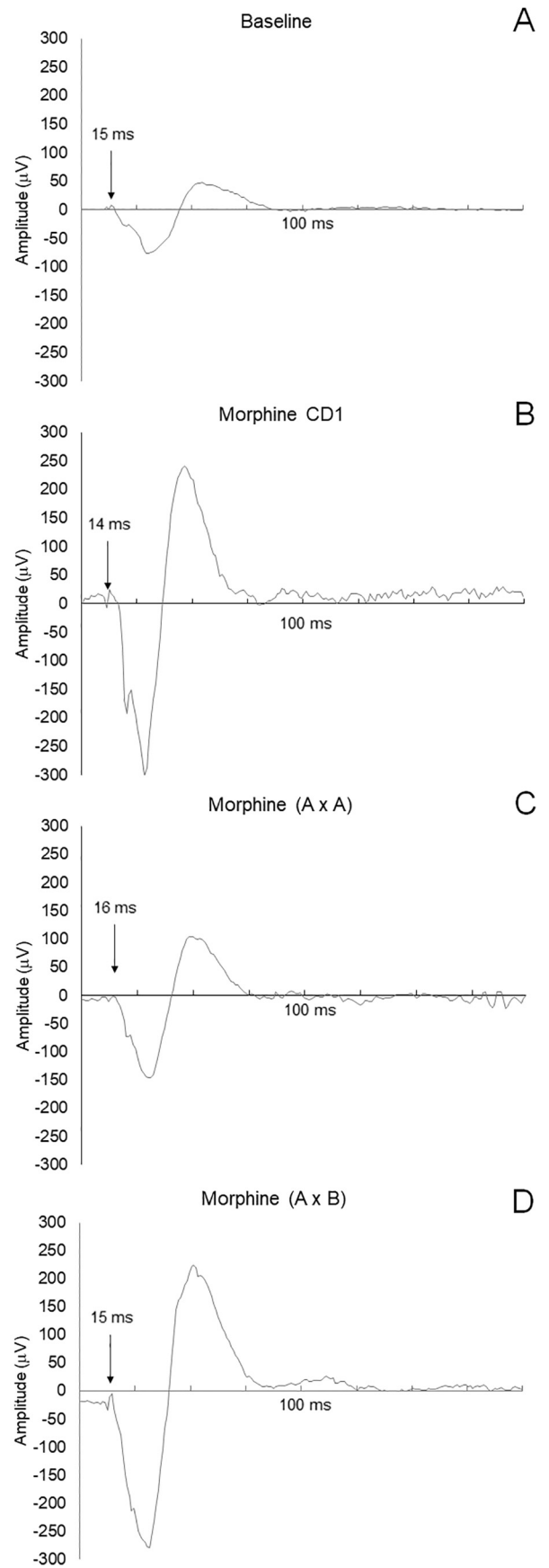
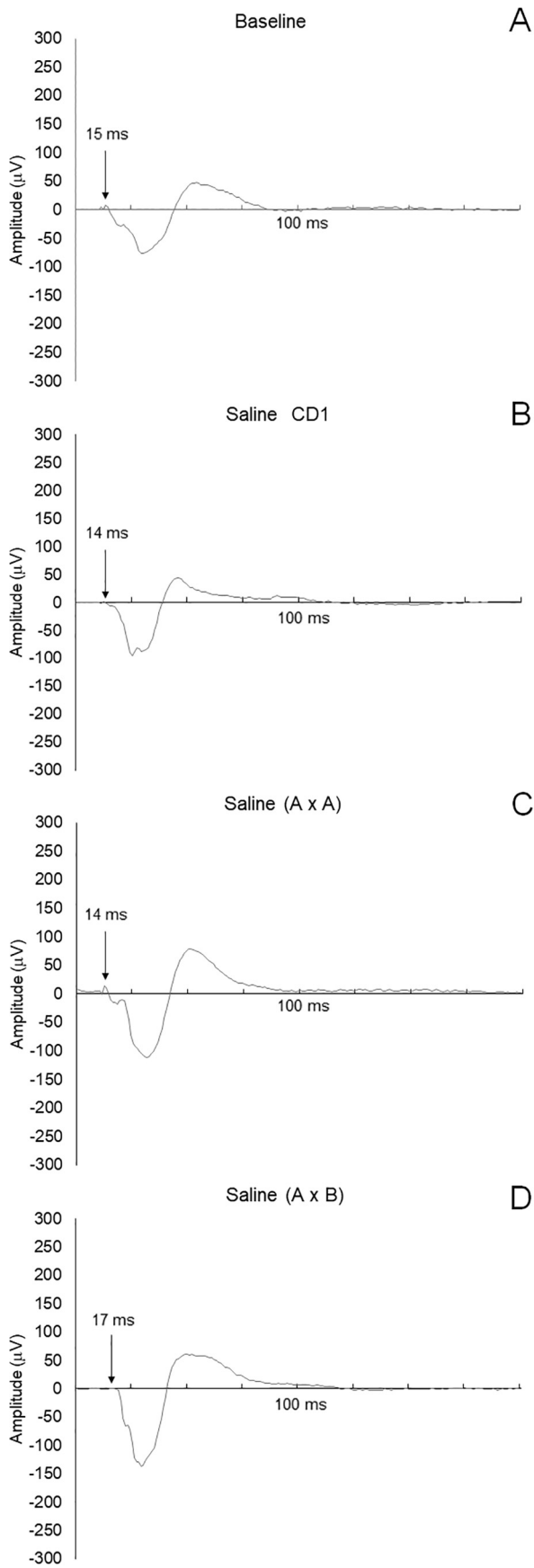
cues that reliably precede these reactions. When exposed to a familiar drug-related environment, subjects will often evidence conditional responses that oppose the drug effects (MacRae et al., 1987; Siegel, 1978, 1975). Thus, the overall central nervous system action of morphine overdose experienced in the context of the usual predrug cues could be counteracted by opposed anticipatory drug-CCRs expected to attenuate the drug effect. This assumption can be endorsed by paying attention to the data obtained with groups of rats conditioned and challenged with similar morphine doses (10 and 40 mg/kg, respectively) but tested in a distinct environment from that of conditioning. Despite the influence of a morphine overdose on mean velocity, distance, and ambulation leading to these factors remaining the same, increases in the time of immobility and in the time spent at the center of the open-field test arena was significant. Notwithstanding the described similarity, these data were accompanied by an intensification of rearing behavior frequency, an aspect of rodent behavior that gradually decreases following increasing morphine dosage (Hecht and Schjørring, 1979; Hollais et al., 2014; Patti et al., 2005). Therefore, increases on this measure may result from an intensification of morphine effects induced by the context itself, and this intensification is supposed to be directly correlated with a morphine overdose.

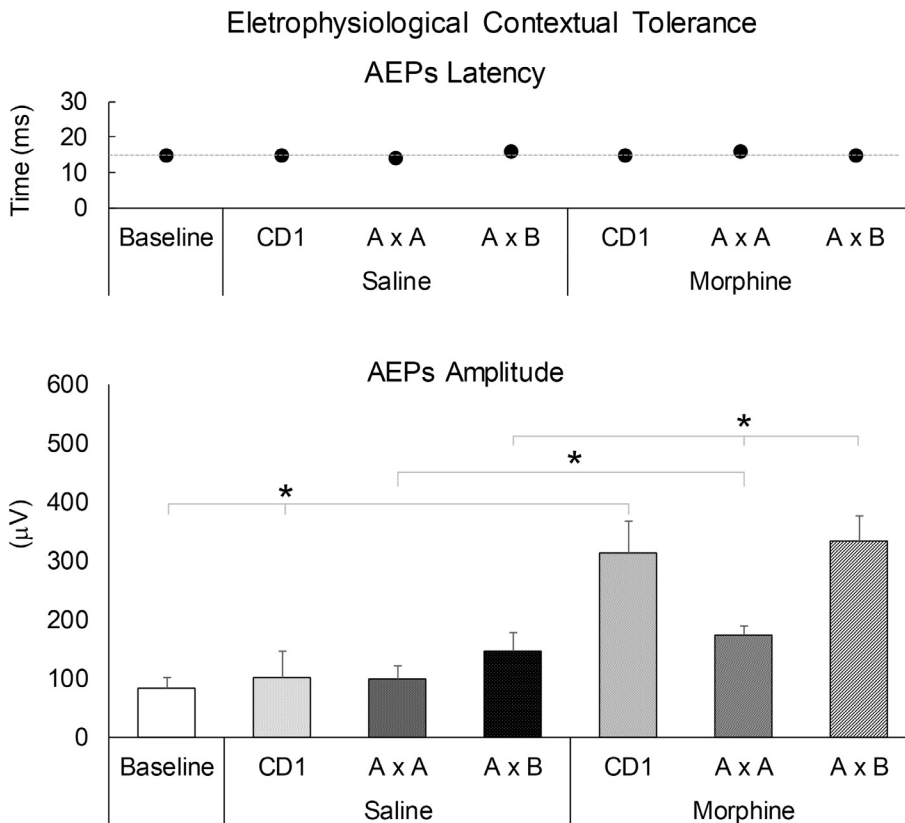
As the association between drug-predictive cues and the systemic reactions of the drug being strengthened by repeated pairings, the drug's effect would be expected to become restricted as the drug-compensatory conditional response grows stronger. Such a decreased effect of a drug (as a function of repeated experiences with the drug), defines tolerance. However, tolerance is broken down if the drug effect is challenged in a new context. In our study, the effects of morphine at a dose of 80 mg/kg on rat behavior were quietly intensified in animals facing a new environment, as determined by the time of immobility and the time spent in the center of the open-field test arena. These data agree with previous reports, which emphasize the influence of a familiar environment on the tolerance of drug effects (MacRae et al., 1987; Siegel, 1978, 1975). In addition, several reports have pointed out that drug abuse withdrawal symptoms, including opioid withdrawal, are increased to a greater level in a drug-paired environ-

ment than in an alternative environment (Baker and Azorlosa, 1996; Buccafusco and Shuster, 2009; Kelsey et al., 1990; Little et al., 2005; McNally and Akil, 2001). This is an important question given that drug-paired cues not only contribute to withdrawal symptoms but also to relapse. The physiological nature of this behavioral phenomenon has long been investigated, mainly regarding later attentional and cognitive domains. Nonetheless, the central effects of drug abuse on earlier components of sensory information remain poorly explored. To further this issue, the last part of our study was designed to examine possible electrophysiological changes elicited in rats previously trained with morphine at low doses in a particular (and later familiar) environment and tested in an unusual context. Latency and the amplitude of AEPs were the variables recorded. Latency was affected in no way by s.c. saline or morphine injections no matter the context of the test. The effects of contexts A and B on AEPs of control rats were similar. Conversely, an acute dose of morphine increased AEP amplitude. Twenty-four hours following drug discontinuance, AEP was not changed in the familiar context but was increased in a strange setting.

In an earlier study, an intravenous injection of morphine paired with an auditory conditioned stimulus was able to increase cortical evoked potentials (Stein et al., 1977), showing that morphine can induce conditioned responses. Analogous to our report, Beck and O'Brien (1983), using a classical conditioning paradigm, found an increase in the conditioned electrophysiological response (increased amplitude of cortical long-latency components, but not of short-latency ones) in morphine-dependent rats during morphine training. To the best of our knowledge, our study is the first report to investigate the emergence of morphine-induced auditory electrophysiological CCRs in rats following exposure to a non-familiar environment. However, if we consider that increases in AEP amplitude are a physiological withdrawal symptom evoked by loss of tolerance promoted by exposure to a non-familiar environment, our assumption will not match the current hypothesis that drug withdrawal is increased in a drug-paired environment, compared to an alternative environment (Baker and Azorlosa, 1996; Buccafusco and Shuster, 2009; Kelsey et al., 1990; Little et al., 2005; McNally and Akil,







**Fig. 6.** AEP rebounds in response to morphine-paired contextual cues. The figure presents the mean  $\pm$  SEM of latency (top) and the amplitude of the AEPs recorded in the CIC (bottom). Two independent groups were used as follows: saline ( $n = 10$ ) and morphine 10 mg/kg ( $n = 11$ ). CD1: first conditioning trial. A  $\times$  A: the amplitude of AEPs recorded in the drug-paired context. A  $\times$  B: the amplitude of AEPs evoked in the non-drug paired context. Two-way RM ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test (MRT) ( $P \leq 0.05$ ).

2001). Yet, 24 h of morphine withdrawal, following four days of a single daily treatment with morphine at a dose of 10 mg/kg, was not able to induce withdrawal, except perhaps when challenged with an opiate antagonist (Gellert and Holtzman, 1979; McNally and Akil, 2001; Parker et al., 2002). Thus, the real nature of the increases in CIC field potentials elicited in morphine-pretreated rats facing a new context must belong to another domain.

Overall, studies in the field of drug dependence and withdrawal predict that relapse to drug use may be elicited by nonextinguished conditioned stimuli (Beck and O'Brien, 1983). This response is followed by internal rearrangement of cortical and subcortical circuits when the subject is exposed to the conditioned stimuli. As an example, classical studies have shown changes in evoked potential amplitudes during Pavlovian association using morphine as an unconditioned stimulus (Stein et al., 1977; Wilder and O'Brien, 1980). More recently, increases in the amplitude of field potentials evoked by an acute injection of morphine were also verified for the

visual cortex (Kuroda et al., 2009). Our study matches these findings, showing that an electrophysiological learning response emerges following Pavlovian conditioning even with the use of a low and regular dose of morphine during a short-term treatment. Moreover, our findings support the idea that these learning responses can be found in the early stages of sensory information. Given that the likelihood of increases in the amplitude of AEPs being directly related to morphine withdrawal is low, since behavioral symptoms were not clearly identified, one explanation for our results is that changes in the amplitude of AEPs of CIC neurons emerge as a context-induced hidden learned CCR. Because craving (Hunt et al., 1971) and relapse to drug seeking in humans (O'Brien et al., 1992) is often precipitated by exposure to drug-associated cues and can occur after prolonged abstinence, our study has important implications considering that the emergence of such changes, in the absence of any overt withdrawal symptoms, may be an indicator of the early stages of the development of drug dependence. However, the nature of the pharmacological changes underlying

this phenomenon and how and with what structures do CIC neurons associate to generate contextual conditioned responses are questions to be investigated.

We hypothesize that one of the targets for future studies is the GABA<sub>A</sub> receptor. As an example, in IC slices, GABA release was found to be inhibited by opioid agonists, an effect abolished by the non-selective opioid receptor antagonist naloxone (Tongjaroenbungam et al., 2004). Moreover, in the IC induction of long-term potentiation (a cellular phenomenon underlying learning and memory processes) is easily established in vivo by tetanic stimulation in animals pretreated with picrotoxin, a GABA<sub>A</sub> antagonist (Hosomi et al., 1995). One explanation for the encoding of the affective properties of the context-induced AEP unconditioned learned rebound may rely on the transmission of the auditory signal through the CIC to the auditory thalamus and from there to the amygdala (Davis et al., 1994; Jones and Mishkin, 1972; Macedo et al., 2002). Moreover, learning and memory mechanisms related to the processing and assigning

**Fig. 5.** The figure depicts representative click-evoked AEP waves recorded in the CIC of control (saline,  $n = 10$ ) and experimental animals (morphine 10 mg/kg,  $n = 11$ ). (A) Baseline AEP amplitude. (B) The acute effects of saline or morphine injections (first conditioning day). (C) The amplitude of AEPs evoked in the drug-paired context). (D) The amplitude of AEPs evoked in the non-drug paired context. Amplitudes were determined as the peak between N1 and P1 components. Arrows indicate the latency for the first negative peak (N1).

value to drug-associated cues are under control of reciprocal connections between the hippocampus and amygdala (White, 1996). In this circuit, associative tolerance related to learned compensatory mechanisms probably occurs throughout activation of efferents from the hippocampal CA1 area to the lateral and basolateral nuclei of the amygdala, as determined in a recent study, where the context-induced neural reactivity to a morphine injection was evaluated through a Fos-like immunoreactivity procedure (Mitchell et al., 2000).

## CONCLUSION

Our results indicate that behavioral learning responses emerge following an acute challenge with a morphine overdose, even with the use of low and regular doses of morphine, over a short-term treatment. In addition, despite the absence of overt behavioral events, short-term administration of a low dose of morphine can change early information processing of sensory auditory stimuli, as revealed by the increase in the AEP amplitude recorded in the CIC, the most important relay of the ascending auditory system. This compensatory response can be evoked in a context-dependent manner, seems to occur in the absence of major behavioral manifestations and may signal the first step in the development of drug dependence. We argue that this change of CIC electrophysiology may indicate that the development of drug dependence occurs covertly and involves neural adjustments in the early stages of sensory information processing. For the reasons above, future studies on this subject will aim to analyze the affective components of the electrophysiological rebound evoked by morphine tolerance during AEP expression in familiar and non-familiar contexts and the pharmacological basis of this phenomenon, initially focusing on the GABA<sub>A</sub> receptor neurotransmission.

## FUNDING SOURCES

This study was supported by FAPESP (Proc. no. 2014/23690-5). M.J. Nobre is the recipient of a Productivity Research Grant from CNPq (303144/2015-7). F. Paliaryn holds a master fellowship from CNPq (140901/2016-7), and R.M. Incrocci holds a master fellowship from CAPES. We gratefully acknowledge the financial support provided by these foundations, without which the present study could not have been completed. We declare that the sponsors have not been involved in or influenced the design, collection, analysis or interpretation of study data, nor the writing of the report or the decision to submit it for publication.

## REFERENCES

- Aitkin L, Nelson J, Farrington M, Swann S (2004) The morphological development of the inferior colliculus in a marsupial, the northern quoll (*Dasyurus hallucatus*). *J Comp Neurol* 343:532–541.
- Arai S (2008) Brainstem auditory evoked potentials in cattle sedated with xylazine. *Can J Vet Res* 72:287–290.
- Avila MA, Ruggiero RN, Cabral A, Brandão ML, Nobre MJ, Castilho VM (2008) Involvement of the midbrain tectum in the unconditioned fear promoted by morphine withdrawal. *Eur J Pharmacol* 590:217–223.
- Bagri A, Sandner G, Di Scala G (1989) Effects of unilateral microinjections of GABAergic drugs into the inferior colliculus on auditory evoked potentials and on audiogenic seizure susceptibility. *Exp Neurol* 104:82–87.
- Baker JD, Azorlosa JL (1996) The NMDA antagonist MK-801 blocks the extinction of Pavlovian fear conditioning. *Behav Neurosci* 110:618–620.
- Bardo MT, Donohew RL, Harrington NG (1996) Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behav Brain Res* 77:23–43.
- Beck SG, O'Brien JH (1983) Cortical evoked potential changes during classical conditioning of morphine dependence in rats. *Exp Neurol* 81:528–541.
- Bindra D (1968) Neuropsychological interpretation of the effects of drive and incentive-motivation on general activity and instrumental behavior. *Psychol Rev* 75:1–22.
- Boutros N, Nasrallah H, Leighty R, Torello M, Tueting P, Olson S (1997) Auditory evoked potentials, clinical vs. research applications. *Psychiatry Res* 69:183–195.
- Braff DL, Geyer MA (1990) Sensorimotor gating and schizophrenia: human and animal model studies. *Arch Gen Psychiatry* 47:181–188.
- Brandão 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.
- Breese GR, Chu K, Dayas CV, Funk D, Knapp DJ, Koob GF, Le DA, O'Dell LE, Overstreet DH, Roberts AJ, Sinha R, Valdez GR, Weiss F (2005) Stress enhancement of craving during sobriety: a risk for relapse. *Alcohol Clin Exp Res* 29:185–195.
- Buccafusco JJ, Shuster L (2009) Contextually Induced drug seeking during protracted abstinence in rats, Chapter 10.
- Cabral A, Ruggiero RN, Nobre MJ, Brandão ML, Castilho VM (2009) GABA and opioid mechanisms of the central amygdala underlie the withdrawal-potentiated startle from acute morphine. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 33:334–344.
- Cardoso SH, Melo L, Coimbra NC, Brandão ML (1992) Opposite effects of low and high doses of morphine on neural substrates of aversion in the inferior colliculus. *Behav Pharmacol* 3:489–495.
- Casseday JH, Covey E (1996) A neuroethological theory of the operation of the inferior colliculus. *Brain Behav Evol* 47:311–336.
- Childress AR, McLellan AT, O'Brien CP (1986) Abstinence opiate abusers exhibit conditioned craving, conditioned withdrawal and reductions in both through extinction. *Br J Addict* 81:655–660.
- Daglish MR, Weinstein A, Malizia AL, Wilson S, Melichar JK, Britten S, Brewer C, Lingford-Hughes A, Myles JS, Grasby P, Nutt DJ (2001) Changes in regional cerebral blood flow elicited by craving memories in abstinent opiate-dependent subjects. *Am J Psychiatry* 158:1680–1686.
- Davis M, Rainnie D, Cassell M (1994) Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends Neurosci* 17:208–214.
- Fendt M, Li L, Yeomans JS (2001) Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex. *Psychopharmacology* 156:216–224.
- Gellert VF, Holtzman SG (1979) Discriminative stimulus effects of naltrexone in the morphine-dependent rat. *J Pharmacol Exp Ther* 211:596–605.
- Grüsser SM, Wrase J, Klein S, Hermann D, Smolka MN, Ruf M, Weber-Fahr W, Flor H, Mann K, Braus DF, Heinz A (2004) Cue-induced activation of the striatum and medial prefrontal cortex is associated with subsequent relapse in abstinent alcoholics. *Psychopharmacology* 175:296–302.
- Greene SA, Thurmon JC (1988) Xylazine – a review of its pharmacology and use in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther* 11:295–313.
- Hall RD, Mark RG (1967) Fear and the modification of acoustically evoked potentials during conditioning. *J Neurophysiol* 30:893–910.

- Hecht A, Schiørring E (1979) Behavioral effects of low and high acute doses of morphine in solitary mice. *Psychopharmacology* 64:73–79.
- Hollais AW, Patti CL, Zanin KA, Fukushima DF, Berro LF, Carvalho RC, Kameda SR, Frussa-Filho R (2014) Effects of acute and long-term typical or atypical neuroleptics on morphine-induced behavioural effects in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 41:255–263.
- Hosomi H, Hirai H, Okada Y, Amatsu M (1995) Long-term potentiation of neurotransmission in the inferior colliculus of the rat. *Neurosci Lett* 195:175–178.
- Hunt WA, Barnett LW, Branch LG (1971) Relapse rates in addiction programs. *J Clin Psychol* 27:455–456.
- Jones B, Mishkin M (1972) Limbic lesions and the problem of stimulus-reinforcement associations. *Exp Neurol* 36:362–377.
- Kelsey JE, Aranow JS, Matthews RT (1990) Context-specific morphine withdrawal in rats: duration and effects of clonidine. *Behav Neurosci* 104:704–710.
- Kilts CD, Schweitzer JB, Quinn CK, Gross RE, Faber TL, Muhammad F, Ely TD, Hoffman JM, Drexler KP (2001) Neural activity related to drug craving in cocaine addiction. *Arch Gen Psychiatry* 58:334–341.
- Kuroda K, Fujiwara A, Takeda Y, Kamei C (2009) Effects of narcotics, including morphine, on visual evoked potential in rats. *Eur J Pharmacol* 602:294–297.
- Li L, Yue Q (2002) Auditory gating processes and binaural inhibition in the inferior colliculus. *Hear Res* 168:98–109.
- Little HJ, Stephens DN, Ripley TL, Borlikova G, Duka T, Schubert M, Albrecht D, Becker HC, Lopez MF, Weiss F, Drummond C, Peoples M, Cunningham C (2005) Alcohol withdrawal and conditioning. *Alcohol Clin Exp Res* 29:453–464.
- Long KJ, Allen N (1984) Abnormal brain-stem auditory evoked potentials following Ondine's curse. *Arch Neurol* 41:1109–1110.
- Macedo CE, Castilho VM, de Souza e Silva MA, Brandão ML (2002) Dual 5-HT mechanisms in basolateral and central nuclei of amygdala in the regulation of the defensive behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Res Bull* 59:189–195.
- MacRae JR, Scoles MT, Siegel S (1987) The contribution of Pavlovian conditioning to drug tolerance and dependence. *Br J Addict* 82:371–380.
- McBride D, Barrett SP, Kelly JT, Aw A, Dagher A (2006) Effects of expectancy and abstinence on the neural response to smoking cues in cigarette smokers: an fMRI study. *Neuropsychopharmacology* 31:2728–2738.
- McNally GP, Akil H (2001) Effects of contextual or olfactory cues previously paired with morphine withdrawal on behavior and pain sensitivity in the rat. *Psychopharmacology* 156:381–387.
- Mitchell JM, Basbaum AI, Fields HL (2000) A locus and mechanism of action for associative morphine tolerance. *Nat Neurosci*:47–53.
- 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, Sandner G, Brandão 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.
- Nobre MJ, Cabral A, Brandão ML (2010) GABAergic regulation of auditory sensory gating in low- and high-anxiety rats submitted to a fear conditioning procedure. *Neuroscience* 171:1152–1163.
- O'Brien CP, Childress AR, McLellan AT, Ehrman R (1992) Classical conditioning in drug-dependent humans. *Ann N Y Acad Sci* 654:400–415.
- Oranje B, van Berckel BN, Kemner C, van Ree JM, Kahn RS, Verbaten MN (1999) P50 suppression and prepulse inhibition of the startle reflex in humans: a correlational study. *Biol Psychiatry* 45:883–890.
- Parker LA, Cyr JA, Santi AN, Burton PD (2002) The aversive properties of acute morphine dependence persist 48 h after a single exposure to morphine: evaluation by taste and place conditioning. *Pharmacol Biochem Behav* 72:87–92.
- Patel CR, Redhead C, Cervi AL, Zhang H (2012) Neural sensitivity to novel sounds in the rat's dorsal cortex of the inferior colliculus as revealed by evoked local field potentials. *Hear Res* 286:41–54.
- Patti CL, Frussa-Filho R, Silva RH, Carvalho RC, Kameda SR, Takatsu-Coleman AL, Cunha JLS, Abílio VC (2005) Behavioral characterization of morphine effects on motor activity in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 81:923–927.
- Paxinos G, Watson G (2008) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier.
- Prut L, Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463:3–33.
- Shergill SS, Brammer MJ, Williams SC, Murray RM, McGuire PK (2000) Mapping auditory hallucinations in schizophrenia using functional magnetic resonance imaging. *Arch Gen Psychiatry* 57:1033–1038.
- Siegel S (1975) Evidence from rats that morphine tolerance is a learned response. *J Comp Physiol Psychol* 89:498–506.
- Siegel S (1978) Pavlovian conditioning analysis of morphine tolerance. *NIDA Res Monogr*:27–53.
- Siegel S, Hinson RE, Krank MD, McCully J (1982) Heroin "overdose" death: contribution of drug-associated environmental cues. *Science* 216:436–437.
- Sinha R, Fuse T, Aubin LR, O'Malley SS (2000) Psychological stress, drug-related cues and cocaine craving. *Psychopharmacology* 152:140–148.
- Sinha R, Li CS (2007) Imaging stress- and cue-induced drug and alcohol craving: association with relapse and clinical implications. *Drug Alcohol Rev* 26:25–31.
- Stein EA, Lynch JJ, Ruchkin DS (1977) Evoked potential changes during classical conditioning of morphine in the awake, freely behaving rat. *Exp Neurol* 55:505–519.
- Szczepaniak WS, Møller AR (1995a) Evidence of decreased GABAergic influence on temporal integration in the inferior colliculus following acute noise exposure: a study of evoked potentials in the rat. *Neurosci Lett* 196:77–80.
- Szczepaniak WS, Møller AR (1995b) Effects of L-baclofen and D-baclofen on the auditory system: a study of click-evoked potentials from the inferior colliculus in the rat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104:399–404.
- Tongjaroenbungam W, Jongkamonwiwat N, Cunningham J, Phansuwan-Pujito P, Dodson HC, Forge A, Govitrapong P, Casalotti SO (2004) Opioid modulation of GABA release in the rat inferior colliculus. *BMC Neurosci* 5:31.
- Vezina P, Stewart J (1987) Morphine conditioned place preference and locomotion: the effect of confinement during training. *Psychopharmacology* 93:257–260.
- Wexler BE, Gottschalk CH, Fulbright RK, Prohovnik I, Lacadie CM, Rounsaville BJ, Gore JC (2001) Functional magnetic resonance imaging of cocaine craving. *Am J Psychiatry* 158:86–95.
- White D, Hwang M, Holtzman S (2005) Naltrexone-induced conditioned place aversion following a single dose of morphine in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 81:451–458.
- White NM (1996) Addictive drugs as reinforcers: multiple partial actions on memory systems. *Addiction* 91:49–65.
- Wilder MB, O'Brien JH (1980) Evoked potential conditioning using morphine as the unconditioned stimulus in rats. *Exp Neurol* 67:539–553.
- Wilson S, Sayette M, Delgado M, Fiez J (2005) Instructed smoking expectancy modulates cue-elicited neural activity: a preliminary study. *Nicotine Tob Res* 7:637–645.
- Yang Z, Xie J, Shao Y-C, Xie C-M, Fu L-P, Li D-J, Fan M, Ma L, Li S-J (2009) Dynamic neural responses to cue-reactivity paradigms in heroin-dependent users: an fMRI study. *Hum Brain Mapp* 30:766–775.