



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Mariana Cardoso Silvério

**EFEITO DO USO DE OPIOIDES NO PROCESSO DE CONSOLIDAÇÃO DA
MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL EM RATAS**

Florianópolis

2021

MARIANA CARDOSO SILVÉRIO

EFEITO DO USO DE OPIOIDES NO PROCESSO DE CONSOLIDAÇÃO DA
MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL EM RATAS

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima

Coorientador: Dr. Felipe Vanz

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silvério, Mariana Cardoso
EFEITO DO USO DE OPIOIDES NO PROCESSO DE CONSOLIDAÇÃO
DA MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL EM RATAS / Mariana Cardoso
Silvério ; orientadora, Thereza Christina Monteiro de
Lima, coorientador, Felipe Vanz, 2021.
65 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Condicionamento aversivo
contextual. 3. Consolidação de memórias. 4. Ratas Wistar. 5.
Opioides. I. Christina Monteiro de Lima, Thereza. II.
Vanz, Felipe. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

“Efeito do uso de opioides no processo de consolidação da memória aversiva contextual em ratas”

Por

Mariana Cardoso Silvério

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Lucas de Oliveira Alvares
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Geison de Souza Izídio
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima
Orientadora

Florianópolis, 2021.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Lucio Ely Ribeiro Silvério e Imara Cardoso Silvério.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo incansável apoio, cuidado e amor. Por me entenderem, estarem sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis e motivarem esta caminhada na pós-graduação. Amo vocês!

Agradecimento especial a minha orientadora, Thereza, pelo seu sim, ensinamento e pelas palavras de compreensão e incentivo.

Ao meu coorientador, Felipe Vanz, por todo direcionamento na minha pesquisa, ajuda e conhecimento compartilhado. Obrigada!

Aos amigos e colegas de departamento, pelos desabafos, angústias e alegrias compartilhadas. Em especial, a Ana Cláudia, companheira de laboratório, pelo apoio e momentos de descontração tão necessários durante esse processo.

A doutoranda Jaqueline Franzen, pela ajuda nos experimentos, incentivo e pelo exemplo de dedicação nessa área de estudo.

A Universidade Federal de Santa Catarina e os professores do Departamento de Farmacologia, que contribuíram diretamente em minha formação acadêmica. Ao CNPq pelo financiamento para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos meus queridos amigos e amigas que se fizeram presente mesmo de longe, nos momentos de alegrias e frustrações, com palavras de apoio e incentivo, por toda a compreensão e suporte emocional.

A Deus, pela saúde e perseverança em continuar.

Nesses tempos de pandemia e negativismo do valor da ciência, parabéns aos pesquisadores que se mantem resilientes e firmes no seu trabalho. Viva a Universidade Pública e de qualidade.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram, através de palavras, pensamentos ou orações, na minha formação e no meu crescimento pessoal. Deixo aqui meu muito obrigado!

“If you can't fly then run, if you can't run then walk, if you can't walk then crawl, but whatever you do you have to keep moving forward.”

(Martin Luther King Jr.)

RESUMO

Duas importantes linhas de pesquisa da atualidade dedicam-se ao estudo do papel dos opioides nos transtornos de estresse e nas memórias aversivas. Dados da literatura têm demonstrado que a resposta ao estresse envolve a ativação do sistema opioide em regiões cerebrais associadas à regulação do estresse e ao processamento da memória aversiva. No entanto, o papel do sistema opioide na consolidação de memórias aversivas ainda não está claro. Além disso, os dados obtidos da literatura são baseados quase que exclusivamente no uso de animais machos. A hipótese deste trabalho é que a administração intraperitoneal de um agonista opioide, prejudica a consolidação de uma memória aversiva contextual em ratas. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar essas questões utilizando a morfina (agonista opioide) e a naltrexona (antagonista opioide) em ratas submetidas a um protocolo de condicionamento aversivo contextual (CAC). Nossos resultados mostraram que a administração sistêmica de morfina 1,0 mg/kg, imediatamente após a sessão de condicionamento forte, mas não 6 h após, reduz a expressão da resposta de congelamento, sugerindo que a ativação de receptores opioides prejudica a consolidação da memória. O efeito da morfina foi prevenido pela administração prévia de uma dose sub-efetiva de naltrexona (10 mg/kg). A administração isolada de naltrexona nas doses de 1,0 e 5,0 mg/kg, imediatamente após a sessão de condicionamento fraco, foi capaz de atenuar a resposta de congelamento, indicando que a naltrexona foi capaz de prejudicar a consolidação da memória. Em conjunto, as evidências experimentais desse trabalho indicam que os receptores opioides regulam a consolidação de memórias aversivas contextuais em ratas com intensidade e especificidade variadas.

Palavras-chave: Condicionamento aversivo contextual. Consolidação de memórias. Ratas Wistar. Morfina. Naltrexona.

ABSTRACT

Two important fields of current research are dedicated to the study of the role of opioids in stress disorders and aversive memories. Literature data have shown that the stress response involves the activation of the opioid system in brain regions associated with stress reduction and aversive memory processing. However, the role of the opioid system in consolidating aversive memories remains unclear. Furthermore, data obtained from the literature are based almost exclusively on the use of male animals. The working hypothesis is that the intraperitoneal administration of an agonist opioid impairs the consolidation of aversive contextual memory in female rats. Thus, the present study aimed to investigate these issues using morphine (agonist opioid) and naltrexone (antagonist opioid) in female rats submitted to contextual aversive conditioning (CAC) protocol. Our results showed that systemic administration of 1.0 mg/kg morphine immediately after a strong conditioning session, but not 6 h later, reduces the expression of the freezing response, suggesting that activation of opioid receptors impairs memory consolidation. The effect of morphine was prevented by prior administration of a sub-effective dose of naltrexone (10 mg/kg). The isolated administration of naltrexone at doses of 1.0 and 5.0 mg/kg, immediately after a session of weak conditioning, was able to attenuate the freezing response, indicating that naltrexone was able to impair memory consolidation. Taken together, the experimental evidence from this work indicates that opioid receptors regulate the consolidation of contextual aversive memories in female rats with varying intensity and specificity.

Keywords: Contextual aversive conditioning. Memory consolidation. Female Wistar rats. Morphine. Naltrexone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das etapas de aquisição e consolidação de uma memória.....	11
Figura 2. Representação gráfica do paradigma de condicionamento aversivo.....	22
Figura 3. Protocolo geral do condicionamento aversivo utilizado.....	23
Figura 4. Protocolo de reinstalação utilizado.....	24
Figura 5. Efeito da administração sistêmica de morfina imediatamente após um CAC forte.....	28
Figura 6. Efeito da administração sistêmica de morfina 6 horas após um CAC forte.....	29
Figura 7. Efeito da administração sistêmica de morfina no protocolo de reinstalação da memória aversiva contextual.....	30
Figura 8. Efeito da administração sistêmica de naltrexona imediatamente após um CAC fraco.....	31
Figura 9. Efeito da administração sistêmica de naltrexona no protocolo de reinstalação da memória aversiva contextual.....	32
Figura 10. Efeito do pré-tratamento com dose sub-efetiva de naltrexona sobre o prejuízo de consolidação da memória pela morfina.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Receptores opioides e seus ligantes endógenos.....	05
Tabela 2. Efeitos da morfina e naloxona em paradigmas de aprendizado aversivo.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC: Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA: Análise de variância
BLA: Amígdala basolateral
Ca²⁺: Cálcio
CAC: Condicionamento aversivo contextual
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
CPF: Córtex pré-frontal medial
CREBs: Proteínas de ligação a elementos responsivos a cAMP
CRH: Hormônio liberador de corticotrofina
d: dia
D1: Receptor dopaminérgicos do tipo 1
D2: Receptor dopaminérgicos do tipo 2
dOR: Receptores delta
DG: Giro denteado
DSM-IV: Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais - Quarta Edição
EC: Estímulo condicionado
EI: Estímulo incondicionado
EN: Estímulo neutro
EPM: Erro padrão da média
FAM: Familiarização
GABA: Ácido gama-amino-butírico
GPCR: Receptores acoplados à proteína G
h: Horas
HPA: Eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal
HPC: Hipocampo
HPCd: Hipocampo dorsal
HPCv: Hipocampo ventral
Hz: Hertz
IP: Administração de drogas via intraperitoneal
KG: Kilogramas
κOR: Receptores kappa
LTP: Potenciação de longa duração
mA: Miliampères
MAP: Proteína-quinases ativadas por mitógenos
mOR: Receptores mu-opioide
MOR: Morfina
mg: Miligramas
mRNA: RNA mensageiro
NAL: Naltrexona
N-BNI: Nor-binaltorfimina
NIH: Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos
nmol: Nanomoles
nOR: Receptores nociceptina/orfanina
PAG: Substância cinzenta periaquedutal
PENK: Proencefalina
p.ex: Por exemplo

POMC: Pró-opiomelanocortina
PTKs: Tirosinas quinases
RVM: Bulbo rostral ventromedial
s: Segundos
SNS: Sistema nervoso simpático
TEPT: Transtorno de estresse pós-traumático

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	04
1.1 Sistema Opioide.....	04
1.2 O processamento de memórias.....	06
1.3 Fases de processamento da memória.....	09
1.3.1 Aquisição.....	09
1.3.2 Consolidação.....	10
1.3.3 Evocação.....	12
1.4 Opioides e as memórias emocionais.....	13
1.5 Estudo das memórias aversivas.....	16
2. HIPÓTESE.....	18
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo Geral.....	18
3.2 Obejetivos Específicos.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Animais.....	19
4.2 Drogas.....	20
4.3 Procedimentos comportamentais.....	20
4.3.1 Aparatos experimentais.....	20
4.3.2 Protocolo geral de condicionamento aversivo contextual (CAC).....	21
4.3.3 Protocolo de reinstalação da memória aversiva contextual.....	24
4.4 Delineamento experimental.....	24
4.4.1 Experimento 1: Efeito da administração sistêmica de morfina imediatamente após um CAC forte.....	24
4.4.2 Experimento 2: Efeito da administração sistêmica de morfina 6 horas após um CAC forte.....	25
4.4.3 Experimento 3: Efeito da administração sistêmica de morfina imediatamente após um CAC forte no protocolo de reinstalação da memória aversiva contextual.....	25
4.4.4 Experimento 4: Efeito da administração sistêmica de naltrexona imediatamente após um CAC fraco.....	26
4.4.5 Experimento 5: Efeito da administração sistêmica de naltrexona imediatamente	

após um CAC forte no protocolo de reinstalação da memória aversiva contextual..	26
4.4.6 Experimento 6: Efeito do pré-tratamento com naltrexona sobre o prejuízo de consolidação da memória induzido pela morfina.....	26
4.5 Análises Estatísticas.....	27
5. RESULTADOS.....	27
5.1 Experimento 1: Efeito da administração sistêmica de morfina imediatamente após um CAC forte.....	27
5.2 Experimento 2: Efeito da administração sistêmica de morfina 6 h após o CAC forte.....	28
5.3 Experimento 3: Efeito da administração sistêmica de morfina imediatamente após um CAC forte no protocolo de reinstalação.....	29
5.4 Experimento 4: Efeito da administração sistêmica de naltrexona imediatamente após um CAC fraco.....	30
5.5 Experimento 5: Efeito da administração sistêmica de naltrexona imediatamente após um CAC forte no protocolo de reinstalação.....	31
5.6 Experimento 6: Efeito do pré-tratamento com dose sub-efetiva de naltrexona sobre o prejuízo de consolidação da memória pela morfina.....	32
6. DISCUSSÃO.....	33
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL.....	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMA OPIOIDE

O ópio e seus derivados são utilizados há séculos para fins medicinais e recreativos. O termo opioide engloba todas as substâncias naturais, semissintéticas ou sintéticas que interagem com os receptores opioides e produzem ações semelhantes às da morfina (DUARTE, 2005; MCDONALD; LAMBERT, 2013).

O ópio, substância original desse grupo farmacológico, é extraído da papoula, nome popular do *Papaver somniferum*, uma das muitas espécies da família das Papaveráceas, e é constituído por pelo menos 25 alcaloides, sendo a morfina 10% dos alcaloides do ópio (DUARTE, 2005).

Acredita-se que o primeiro relato do uso e cultivo da papoula data de 5.000 anos e foi deixado pelos Sumérios (DUARTE, 2005). Durante séculos, o ópio foi utilizado para o alívio da dor, para controlar a tosse e tratar diarreia. No entanto, o isolamento da morfina ocorreu em 1805, pelo farmacêutico alemão Friedrich W Serturmer, que nomeou o composto de morfina em homenagem ao deus grego dos sonhos, *Morpheus* (LAW; LOH, 2013).

Snyder e colegas, em 1973, foram pioneiros ao confirmar a existência de receptores opioides, publicando dados que demonstram as ligações específicas dos opioides, e fornecendo a primeira evidência de receptores distintos para essas drogas (DUARTE, 2005; LAW; LOH, 2013).

Foram identificados os receptores mOR (μ , mu), κ OR (κ , kappa), dOR (δ , delta) opioide e receptores nociceptina/orfanina (nOR, ORL), que junto com os opioides endógenos (endorfinas, encefalinas, dinorfina e nociceptina) fazem parte do sistema opioide (BODNAR, 2018; MCDONALD; LAMBERT, 2014).

Os receptores opioides fazem parte da superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCR) que após sua ativação, modulam as atividades de múltiplos efetores celulares (LAW; LOH, 2013).

Os ligantes endógenos, encefalina, β -endorfina e dinorfina apresentam perfis distintos quanto a sua seletividade a determinado receptor (LAW; LOH, 2013). São derivados de três genes independentes, conhecidos como pró-opiomelanocortina (POMC), pró-encefalina (PENK) e pró-dinorfina, em que são processados a β -endorfina, a met-encefalina e a leu-encefalina, a dinorfina e a nociceptina,

respectivamente (BALI; RANDHAWA; JAGGI, 2015).

Em geral, a β -endorfina liga-se aos receptores opioides mOR e dOR, enquanto a dinorfina se liga preferencialmente aos receptores κ OR e a encefalina aos receptores mOR e dOR. Outros peptídeos, como a nociceptina/orfanina e a endomorfina, possuem respectivas afinidades para receptores nOR e mOR (**Tabela 1**) (TORRES-BERRIO; NAVA-MESA, 2019).

A morfina, droga que será utilizada como ferramenta farmacológica neste trabalho, tem seus principais efeitos mediados por meio dos receptores mOR, e apresenta menor seletividade para κ OR e nOR. É considerado um analgésico potente com propriedades sedativas e ansiolíticas, podendo causar euforia, disforia e alucinação, e tem como principal efeito adverso a depressão respiratória (TRIVEDI; SHAIKH; GWINNUT, 2007).

Tabela 1. Receptores opioides e seus ligantes endógenos.

Receptores opioides	Ligantes endógenos
<i>MOR, μ</i>	β -endorfina Endomorfina 1 e 2
<i>KOR, κ</i>	Dinorfina A
<i>DOR, δ</i>	Met-encefalina Leu-encefalina
<i>NOR, ORL1</i>	Nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ)

Fonte: Elaborado pela autora.

A naloxona e seu derivado de ação mais longa, a naltrexona, são antagonistas dos receptores opioides que não apresentam nenhuma atividade intrínseca nesses receptores, com maior seletividade para os receptores mOR. A naltrexona tem sido utilizada para tratar a dependência de opioides e álcool e em alguns casos de obesidade mórbida (TRIVEDI; SHAIKH; GWINNUT, 2007).

Todos os quatro subtipos de receptores opioides se associam às proteínas G inibitórias, provocando uma série de alterações cujo desfecho consiste na redução da excitabilidade das células neuronais que, por sua vez, resulta na transmissão reduzida de neurotransmissão de impulsos nociceptivos e compartilham essas vias comuns: (1) fechamento dos canais de cálcio sensíveis à voltagem, nas terminações nervosas pré-sinápticas, (2) estimulação do efluxo de potássio levando à hiperpolarização e, assim, redução do potencial de ação nos neurônios pós-sinápticos e (3) redução da produção de AMPc via inibição da adenilato ciclase

(MCDONALD; LAMBERT, 2014).

No contexto da analgesia, os receptores μ -opioides estão localizados pré-sinápticamente nos neurônios aferentes primários do corno dorsal da medula espinhal, onde inibem a liberação de glutamato e, portanto, a transmissão de estímulos nociceptivos (MCDONALD; LAMBERT, 2014).

Os principais efeitos analgésicos dos opioides são provocados pela ativação central dos receptores opioides, enquanto os efeitos colaterais comuns, incluindo redução da motilidade gastrointestinal, retenção urinária e prurido, são regulados pela ativação de receptores opioides localizados periféricamente (MCDONALD; LAMBERT, 2014).

Os receptores opioides estão localizados, com densidades variadas, em todo o sistema nervoso central, periférico e autônomo, assim como em vários tecidos endócrinos, mediando o amplo espectro de funções e comportamentos nos quais esses receptores estão envolvidos (DROLET et al., 2001).

Muitas dessas regiões regulam respostas emocionais, como aprendizagem e memória, destacando-se o hipotálamo, a glândula pituitária e adrenal, a amígdala e o córtex pré-frontal, sugerindo um possível papel mediador desses receptores, em distúrbios de memória induzidos por estresse (TORRES-BERRIO; NAVA-MESA, 2019).

1.2 O PROCESSAMENTO DE MEMÓRIAS

A memória é a capacidade de armazenar informações e acontecimentos passados, através do processo de aprendizagem, que permite que o organismo aja de maneira adequada frente a situações cotidianas e melhor se prepare para acontecimentos futuros, sendo um componente evolutivo essencial para a nossa sobrevivência e determinante da individualidade de cada ser humano (FERRARIS et al., 2021; GALLISTEL, 2020; MCGAUGH, 2013).

O processamento de uma memória compreende um processo dinâmico, que permite que as novas informações adquiridas pelo aprendizado, possam ser armazenadas em uma memória, que pode ser de curto ou longo prazo (DUDAI, 2012). O entendimento a respeito do processamento de memórias demonstra a associação de múltiplos circuitos neurais distintos que se comunicam para a formação de uma memória (YANG; WANG, 2017).

Para que a aprendizagem ocorra é necessário que as experiências permitam modificações fisiológicas duradoras nesses circuitos (MIRY; LI; CHEN, 2021). O conjunto de neurônios em várias regiões do cérebro manifestando essas mudanças eliciadas pela aprendizagem é chamado de engrama (KITAMURA et al., 2017; TONEGAWA et al., 2015). Essa ideia de que a aprendizagem induz modificações em um circuito de células neuronais ou “células do engrama” foi primeiramente descrita por Richard Semon, em 1921, e, atualmente, o conceito de engrama também é descrito como “traço de memória” (MIRY; LI; CHEN, 2021; SEMON, 1921; TONEGAWA et al., 2015).

As memórias são governadas por regiões cerebrais distintas que se correlacionam. Um exemplo que merece destaque é a relação da amígdala com o hipocampo que é fundamental para a associação de memórias com componentes emocionais, sendo o hipocampo relacionado com a formação de memórias declarativas¹ ou episódicas² (PHELPS, 2004; TONEGAWA et al., 2015).

A amígdala recebe informações de várias modalidades sensoriais e interage com vários sistemas de memória no cérebro, por meio de projeções neurais diretas e indiretas, incluindo informações processadas no hipocampo (HPC) e córtex pré-frontal (CPF) (LABAR; CABEZA, 2006; SENN et al., 2014). Os neurônios na amígdala respondem tanto a valências de cunho positivo quanto negativo, e a inativação da amígdala impede a associação entre estímulos neurais e emoção (TONEGAWA et al., 2015).

Nesse sentido, a amígdala media também a liberação de hormônios essenciais para o fortalecimento de memórias induzidas por condições de estresse e de cunho emocionais, por meio do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HPA), como a norepinefrina e a corticosterona (HAMANN et al., 1999; LABAR; CABEZA, 2006; MCGAUGH, 2013).

Evidências suportam a ideia de que a amígdala e o hipocampo funcionam sinergicamente para formar uma memória em que a amígdala estaria exercendo um papel modulatório, que influencia a codificação e armazenamento de memórias episódicas, através da associação desses eventos a emoções, via porção ventral do hipocampo (FANSELOW; DONG, 2010; PHELPS, 2004; YANG; WANG, 2017).

O hipocampo é uma estrutura fundamental para o aprendizado e o

¹ Compreendendo o conhecimento geral de fatos sobre o mundo, nomes e acontecimentos.

² Memória de uma experiência/evento pessoal.

processamento de memórias (KITAMURA et al., 2012). Ao longo de seu eixo longitudinal, o hipocampo pode ser funcionalmente dividido em hipocampo dorsal (HPCd) e ventral (HPCv), e ao longo do eixo transversal em CA1, CA3 e giro denteado (DG), sendo o CA1 a região com maior vazão do hipocampo (YANG; WANG, 2017).

A porção CA1 dorsal recebe informações sensoriais de áreas corticais, enquanto a CA1 ventral se relaciona com estruturas subcorticais, como o córtex pré-frontal medial (mPFC), núcleo *accumbens* (NAc) e amígdala (BANNERMAN et al., 2014; CENQUIZCA; SWANSON, 2007; KISHI et al., 2006). As novas informações que chegam ao hipocampo muitas vezes exigem comportamentos distintos, para isso a região do DG tem um papel importante em organizar as entradas corticais, enquanto CA3 e CA1 transferem esses traços de memória para o neocórtex, onde são processadas para conduzir o comportamento (ALLEGRA et al., 2020; FREDERES et al., 2021).

Moser e Moser (1998) sugeriram que a porção dorsal e a ventral assumiam papéis diferentes, explicando a dualidade das funções do hipocampo, sendo isso comprovado, em seguida, em diversos estudos. A porção dorsal estaria mais relacionada ao aprendizado e ao processamento de memórias, e a porção ventral com aspectos emocionais, como estresse e afeto (FANSELOW; DONG, 2010).

Disfunções e volumes reduzidos do hipocampo são associados com distúrbios de processamento emocional, como o transtorno de estresse pós-traumático e a depressão (BONNE et al., 2008; FANSELOW; DONG, 2010), podendo estar relacionado a processos de aprendizagem e consolidação de memórias (EAGLE et al., 2016).

O clássico estudo de Scoville e Milner (1957) sobre o caso do paciente H.M., demonstrou o papel significativo do hipocampo na consolidação de memórias. O paciente perdeu a maior parte do lobo medial temporal do hipocampo, em uma operação para aliviar sua epilepsia intratável, e o procedimento causou uma amnésia anterógrada e retrógrada, com prejuízos na formação de novas memórias episódicas e nas memórias passadas (FANSELOW; DONG, 2010).

Apesar dos seus papéis também independentes, o hipocampo e a amígdala correlacionam aspectos emocionais com o processamento de memórias, essa associação é responsável pela característica emocional atribuída de uma memória, sendo foco de pesquisas relacionadas a distúrbios com cunho emocional

correlacionados a memória, incluindo o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), a ansiedade e a doença de Alzheimer (MCGAUGH, 2013; YANG; WANG, 2017).

1.3 FASES DE PROCESSAMENTO DA MEMÓRIA

A formação de uma memória envolve várias fases de processamento, denominadas: codificação ou aquisição, consolidação, evocação, reconsolidação, limbo e extinção (GIACHERO, 2013; MERLO et al., 2014). Porém, tendo em vista a hipótese e os objetivos do presente trabalho, se faz necessária uma discussão mais detalhada das três fases iniciais.

1.3.1 AQUISIÇÃO

O primeiro processo que envolve a formação de memórias é a aquisição ou codificação, que é implicada pela percepção e compreensão dos sentidos, que são decodificados nas áreas sensoriais do córtex e combinados no hipocampo em uma experiência (MCGAUGH, 2000). Durante a aquisição, as novas informações se traduzem em um novo traço de memória, ou engrama, que permanece em um estado lábil de duração (FERRARIS et al., 2021). Esse engrama pode então ser consolidado e permitir que uma informação sensorial seja transformada em memórias e, finalmente, em comportamentos adaptativos (HERRY; JOHANSEN, 2014).

O componente emocional relacionado a uma memória desempenha um papel importante na relevância e permanência da informação adquirida (ETKIN; BÜCHEL; GROSS, 2015). As emoções provocam um conjunto de mudanças cognitivas e, a partir da interpretação consciente ou inconsciente de cada indivíduo, uma experiência ganha significado positivo ou negativo em um contexto particular (LABAR; CABEZA, 2006). As interações emoção-memória ocorrem em vários estágios do processamento de informações, desde a codificação inicial e consolidação de memória até a reativação (LABAR; CABEZA, 2006).

1.3.2 CONSOLIDAÇÃO

A evidência empírica para a existência de uma fase de consolidação da memória surge de diversas demonstrações experimentais a respeito de um intervalo de tempo pós-aquisição, durante o qual novas memórias são sensíveis a interferentes (NADER; HARDT, 2009). A consolidação de uma memória transformaria o traço de memória lábil, que é suscetível a alterações (farmacológicas, comportamentais e ambientais), em uma representação mais estável e duradoura, se referindo então a um processo de estabilização da memória, sendo dependente do tempo e de síntese proteica (**Figura 1**) (DUDAI, 2012; FERRARIS et al., 2021).

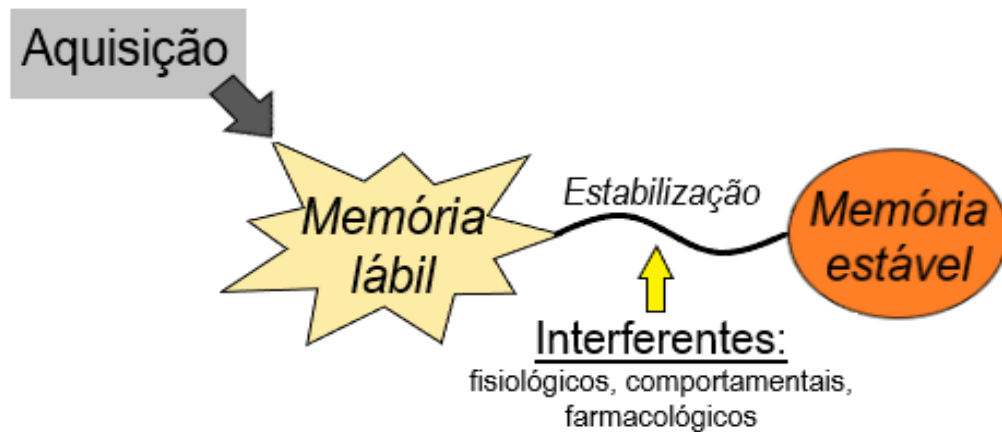
Fatores demonstrados que interferem na consolidação da memória incluem trauma cerebral, terapia eletroconvulsiva, administração de inibidores da síntese proteica (p.ex. anisomicina) e diversos fármacos (ALBERINI, 2005).

O termo “consolidação” é atribuído a Müller & Pilzecker (1900) que foram os primeiros a explorar a noção de que a memória necessita de tempo para se fixar e não seria formada instantaneamente, sendo posteriormente reforçada nos diversos estudos da área.

Anos após Müller & Pilzecker, em 1949, o neurocientista Donald Hebb, buscando elucidar os circuitos neurais envolvidos no aprendizado, propôs que o processo de aprendizagem e a apresentação de estímulos gerava modificações sinápticas em uma rede neuronal, definido como um reforço sináptico, necessário para a retenção da memória desse aprendizado (HEBB, 1949).

Mais tarde, essas ideias foram suportadas por diversos experimentos que demonstraram essas alterações funcionais, conhecidas hoje como potenciação de longa duração (LTP), em circuitos neurais envolvidos no processamento de memórias, que conta com o envolvimento de diferentes receptores e síntese de proteínas (LEDOUX, 2000; MAREN; QUIRK, 2004).

Figura 1. Representação esquemática das etapas de aquisição e consolidação de uma memória.



A consolidação descreve o processo de estabilização da memória, que passaria de um estado lábil para uma representação mais estável, duradoura e insensível a interferentes. Fonte: Elaborado pela autora.

Ademais, Hebb & Gerard (1949) propuseram a teoria de traço duplo da memória, sugerindo que a estabilização da atividade neural reverberante subjacente à memória de curto prazo produz memória de longo prazo. Entretanto, diversos indícios discutem que memória de curto prazo e estágios diferentes da memória de longo prazo não são sequencialmente ligados (MCGAUGH, 2000).

Uma das hipóteses acerca das diferenças entre as memórias de curta duração e de longa duração consiste no entendimento de que memórias de curta duração envolvem modificações covalentes em proteínas pré-existentes e já a formação de memórias de longa duração requer mudanças sinápticas, induzidas pela reverberação de circuitos neurais, resultando na síntese de novas proteínas necessárias para a consolidação da memória (DUDAI, 2004; GOELET et al., 1986; MCGAUGH, 2000, 2013).

São descritos dois tipos de “níveis” de consolidação: consolidação sináptica ou celular e consolidação sistêmica. A consolidação sináptica envolve a ativação de fatores de transcrição e modulação da expressão de genes nos nós sinápticos locais e celulares da rede que codifica a memória, permitindo uma remodelação sináptica responsável por tornar o traço da memória pós-adquirida em um traço estável e duradouro (DUDAI, 2004; FERRARIS et al., 2021). A consolidação sistêmica descreve a reorganização gradual tempo-dependente dos circuitos cerebrais distribuídos que suportam a memória pós-codificação (FERRARIS et al., 2021).

O uso de inibidores da síntese proteica permitiu demonstrar que a

consolidação requer uma cascata de sinalizações moleculares e celulares, iniciados pela experiência, que permitem modificações sinápticas necessárias para estabilizar a memória (ALBERINI, 2005). Essas vias de sinalização envolvem a adenosina monofosfato cíclico (cAMP), cálcio (Ca^{2+}), proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAP), proteínas de ligação a elementos responsivos a cAMP (CREBs) e outras tirosinas quinases (PTKs) (ALBERINI, 2005; DUDAI, 2004; MCGAUGH, 2000).

Inicialmente, acreditava-se que, durante a consolidação sistêmica, a memória se tornava independente do hipocampo (DUDAI, 2004). Referido como modelo padrão da consolidação sistêmica, o hipocampo exerceria um papel temporário de armazenamento da memória enquanto o traço se deslocava gradualmente para o neocórtex para armazenamento de longa duração (DASH; HEBERT; RUNYAN, 2004). Entretanto, com os avanços nos estudos da área, foram propostos diferentes modelos para explicar como a memória é organizada nos circuitos cerebrais.

Uma alternativa ao modelo padrão foi proposta por Nadel & Moscovitch (1997): a teoria de traços múltiplos, que afirma que as informações são armazenadas independentemente de seu contexto, respectivamente, no córtex e no hipocampo, onde cada reativação de uma memória episódica resulta na criação de um novo traço de memória armazenado no hipocampo e dependente da sua participação (DASH; HEBERT; RUNYAN, 2004; NADEL; MOSCOVITCH, 1997).

Outras teorias descritas na literatura também debatem sobre a extensão do papel do hipocampo no armazenamento de memórias de longo prazo e é evidente que a plasticidade cortical e a comunicação entre hipocampo e córtex são fundamentais e podem variar de acordo com a informação que sendo processada (DASH; HEBERT; RUNYAN, 2004; FERRARIS et al., 2021).

1.3.3 EVOCAÇÃO

O termo evocação compreende o processo em que uma memória já consolidada é acessada e assim reativada, geralmente por meio de experiências perceptuais que proporcionam um estímulo que remete a memória anterior (ALBERINI, 2005; SARA, 2000). Em protocolos experimentais, a reativação pode ser induzida pela reexposição às informações associadas no momento do aprendizado.

Como a memória é um processo dinâmico, a evocação induz a sua reativação e pode ou não desestabilizar essa memória e torná-la novamente sensível a

disrupção (ALBERINI, 2005), permitindo a atualização da informação e a expressão na forma de um novo comportamento, modificando o conteúdo da informação, o que pode ser benéfico em uma resposta adaptativa frente a novos contextos de exposição (SARA, 2000). Para a sua persistência e reestabilização pode requerer nova síntese proteica, em um processo denominado reconsolidação (DUDAI, 2012).

1.4 OPIOIDES E AS MEMÓRIAS EMOCIONAIS

Neurônios que expressam peptídeos opioides e receptores estão localizados em estruturas cerebrais envolvidas na resposta ao estresse, como o hipocampo, o eixo HPA, a amígdala, o córtex pré-frontal, o núcleo paraventricular do hipotálamo e *locus coeruleus* (DROLET et al., 2001).

Já está bem caracterizada a promoção da expressão e a liberação de peptídeos opioides frente a uma variedade de estressores que induzem a ativação dos receptores opioides em humanos e roedores e que parecem estar relacionados com efeitos deletérios do estresse na memória (TORRES-BERRIO; NAVA-MESA, 2019).

Evidências demonstraram que a liberação de β -endorfinas na amígdala em resposta ao estresse ajuda a lidar com um estressor ao inibir a superativação do eixo HPA e que a variabilidade genética nesse opioide pode contribuir, pelo menos em parte, para diferenças hereditárias na reatividade e vulnerabilidade ao estresse (BALI; RANDHAWA; JAGGI, 2015; BARFIELD et al., 2013).

Camundongos com baixos níveis de β -endorfinas exibem aumento de comportamentos ansiosos, sugerindo as ações ansiolíticas das endorfinas (GRISEL et al., 2008). Em acordo com esses relatos, a liberação de encefalina e nociceptina na amígdala e no núcleo *accumbens* tende a produzir efeitos antiestresse (BALI; RANDHAWA; JAGGI, 2015).

O papel dos opioides endógenos na regulação e modulação do eixo HPA, estimulado devido a condições de estresse, é evidenciado em múltiplas linhas de pesquisa (BAILEY et al., 2013; FRIEDMAN, 2000; VALENTINO; VAN BOCKSTAELE, 2008), demonstrando um papel crítico da mediação dos receptores opioides na modulação do estresse e ansiedade associada ao estresse, TEPT, distúrbios relacionados a memória e à depressão (BALI; RANDHAWA; JAGGI, 2015)..

A princípio, situações estressantes agudas, que promovem a ativação do eixo HPA e do sistema nervoso simpático (SNS), principalmente por meio da liberação de adrenalina e noradrenalina, parecem exercer efeitos reforçadores na intensidade e duração de um aprendizado e sua memória referente, facilitando a aquisição ou a recuperação de memórias emocionais em humanos e roedores (MEIR DREXLER et al., 2020; TORRES-BERRIO; NAVA-MESA, 2019).

Em contraste, situações de estresse crônico prejudicam diferentes estágios de processamento de memórias e induz alterações estruturais e funcionais no HPC, como a redução da neurogênese (TORRES-BERRIO; NAVA-MESA, 2019).

Os efeitos do estresse nos processos de aprendizagem e memória dependem de vários fatores, como intensidade e duração do estresse, as características da tarefa de aprendizagem, a fase da memória em que o estressor é aplicado e as diferenças individuais (MEIR DREXLER et al., 2020; TORRES-BERRIO; NAVA-MESA, 2019).

Em geral, a liberação de cortisol em níveis moderados (por meio da interação com a noradrenalina) promove a estabilização de memórias emocionais, mas ao mesmo tempo prejudica a recuperação de memórias previamente consolidadas (MEIR DREXLER et al., 2020). Já níveis muito baixos ou muito altos de estresse podem atrasar a aquisição, prejudicar a recuperação da memória ou afetar a consolidação (TORRES-BERRIO; NAVA-MESA, 2019).

É relevante levar em consideração as diferentes condições endógenas que podem estar implicadas no momento da aquisição de uma memória e como elas podem modular a sua formação e persistência. Um dos fenômenos mais estudados dentro dos mecanismos endógenos que modulam as memórias é conhecido como aprendizagem dependente de estado, em que as informações adquiridas em um determinado estado neuro-humoral no momento da formação da memória requerem um estado semelhante para sua melhor evocação (RADULOVIC; JOVASEVIC; MEYER, 2017).

Em humanos e roedores, a aprendizagem dependente de estado é frequentemente relatada com o uso de psicoestimulantes, como a anfetamina, a cocaína e a cafeína. Os opioides também suportam a dependência de estado, sendo a morfina mais eficaz em promover esse fenômeno (RADULOVIC; JOVASEVIC; MEYER, 2017). Isso pode ser observado com a administração sistêmica pré-treino de β -endorfina que facilita o armazenamento da memória de tarefas aversivas, mas

quando administrada pós-treino induz um efeito amnésico que pode ser evitado pela administração pré-teste de β -endorfina na mesma dose, destacando que o aprendizado pode ser dependente do estado dos peptídeos opiáceos (IZQUIERDO, 1980).

Já foi demonstrado que a liberação de opioides endógenos durante e imediatamente após a sessão de condicionamento, em modelos animais, prejudica o processamento da memória desse episódio e a participação dos receptores opioides na modulação da aquisição do condicionamento aversivo pavloviano é demonstrada através da administração de agonistas de receptores opioides, em que normalmente se observa um prejuízo na aquisição de condicionamento aversivo, enquanto antagonistas de receptores opioides parecem facilitar a aquisição (MCNALLY; WESTBROOK, 2003).

O receptor mOR parece atuar em um sistema de *feedback* negativo que regula o condicionamento do medo pavloviano. Em um estudo com camundongos *knockout* para receptores mOR, a depleção do receptor resultou em significativo déficit da aquisição do medo contextual quando a aquisição foi conduzida em um protocolo de condicionamento de 5 dias, sugerindo que a ativação desses receptores é crítica para o aprendizado aversivo (SANDERS; KIEFFER; FANSELOW, 2005).

Em conjunto, parece que a ativação aumentada do sistema opioide induzida pelo estresse tem efeitos amnésicos, que podem ser prevenidos pelos antagonistas opioides, naltrexona ou naloxona (TORRES-BERRIO; NAVA-MESA, 2019).

Em estudos com humanos, Bryant e colaboradores (2009) demonstraram que a administração aguda de morfina proporciona redução do risco de desenvolvimento de TEPT, ao inibir o desenvolvimento da consolidação da memória relacionada a um evento traumático (BALI; RANDHAWA; JAGGI, 2015; SZCZYTKOWSKI-THOMSON; LEBONVILLE; LYSLE, 2013). Nixon e colegas (2010) documentaram que a morfina reduz o desenvolvimento de TEPT em crianças que sofrem um evento traumático e a redução dos sintomas está positivamente correlacionada com a dosagem de morfina.

Essas evidências sugerem que o sistema opioide exerce um papel importante na modulação do processamento da memória frente a memórias aversivas. Assim, o desenvolvimento de agonistas e/ou antagonistas de componentes do sistema opioide apresenta uma nova abordagem, de potencial terapêutico, em distúrbios de

memória induzidos por estresse.

1.5 ESTUDO DAS MEMÓRIAS AVERSIVAS

Pela ótica da evolução, os estímulos emocionais exercem um papel adaptativo fundamental, sejam eles agradáveis ou aversivos. Estabelecer associações entre diferentes estímulos permite alterações no comportamento em busca de evitar e prever situações de perigo, sendo fundamentais para a sobrevivência da espécie (VAVERKOVÁ; MILTON; MERLO, 2020).

O contexto que permeia as experiências e as percepções vivenciadas é essencial para produzir significado aos eventos e proporcionar pistas que remetem a memória do ocorrido, permitindo moldar expectativas futuras de experiências similares e sendo necessário para a adequação do comportamento (MAREN; PHAN; LIBERZON, 2013). No entanto, sob certas condições, esse sistema de aprendizado adaptativo pode produzir memórias que são persistentes, caracterizadas por percepções imprecisas ou inadequadas, que provocam reações fisiológicas e comportamentais prejudiciais ao indivíduo (DREW; HUCKLEBERRY, 2017; GILMARTIN; BALDERSTON; HELMSTETTER, 2014; MAREN; PHAN; LIBERZON, 2013).

A incapacidade de contextualizar adequadamente as informações tem sido associada a sintomas em vários transtornos psiquiátricos, incluindo distúrbios de ansiedade, depressão, TEPT, fobias, adição e outros, que afetam a qualidade de vida de um número crescente de indivíduos (LIU et al., 2016; MAREN; PHAN; LIBERZON, 2013; VAVERKOVÁ; MILTON; MERLO, 2020).

O TEPT é uma condição crônica debilitante que reflete modificações emocionais e fisiológicas após uma reação inicial a uma experiência traumática. Os indivíduos acometidos exibem recordação persistente de memórias traumáticas (pesadelos, pensamentos intrusivos) e maior evitação de estímulos relacionados ao trauma (hipervigilância e hiperexcitação), embora o evento traumático não esteja mais ocorrendo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000). Estima-se que mais da metade dos pacientes apresentam resistência ao tratamento, resultando em prejuízos sociais, econômicos e funcionais (RODRIGUEZ; HOLOWKA; MARX, 2012). Existem altos níveis de abandono do tratamento e muitos tentam suicídio ou usam drogas ilícitas para evitar sentimentos que remetem ao evento traumático

(BRADY et al., 2010).

Como o TEPT é precipitado por uma experiência traumática, os modelos animais que utilizam, como indução de medo condicionado, choques elétricos, podem simular a indução desse transtorno (FLANDREAU; TOTH, 2018). Parâmetros como a intensidade do estímulo condicionado, o número de tentativas de aquisição, a intensidade e a duração do choque elétrico, podem ser modificados para otimizar o resultado e melhor observar os efeitos desejados na investigação (FLANDREAU; TOTH, 2018).

Entretanto, diversos são os debates sobre a capacidade dos animais de experimentarem e expressarem o sentimento de medo³ em sua magnitude compreendida pelas experiências humanas. LeDoux e Hofmann (2018) argumentam que o autorrelato verbal de medo é o “padrão-ouro” na avaliação de experiências emocionais subjetivas conscientes, como o medo, e já que esse padrão não é uma opção em modelos animais, determinar se os organismos não humanos têm experiência subjetiva de medo ainda é um desafio para a pesquisa pré-clínica e deve ser discutido com cautela.

Evidências convergentes de modelos experimentais em roedores e trabalhos em humanos elucidaram que as estruturas cerebrais (como a amígdala, o córtex pré-frontal e o hipocampo) são críticas para o aprendizado de extinção e a retenção da memória de extinção, processos explorados como alternativas de tratamento para o TEPT (RABER et al., 2019). Com isso, observou-se um aumento na validade translacional das pesquisas utilizando condicionamento aversivo, já que se tornou possível comprovar o envolvimento dessas regiões cerebrais na expressão de respostas defensivas e/ou de medo nos modelos experimentais utilizados (GRECO; LIBERZON, 2016).

A identificação das consequências negativas e prolongadas na saúde e qualidade de vida dos indivíduos com TEPT gera a necessidade de pesquisar novas alternativas de tratamento e prevenção para os desfechos relacionados a situações traumáticas (HOLBROOK et al., 2010).

Logo, a perspectiva da interrupção ou supressão dessas memórias parece ser benéfica para o indivíduo e é de grande apelo clínico. Para isso, modelos animais,

³ O termo “medo” é definido como o “estado emocional provocado pela consciência que se tem diante do perigo; aquilo que provoca essa consciência” (In.: Dicio, Dicionário Online de Português. Porto: 7Graus, 2020).

apesar de suas limitações em mimetizar a fisiopatologia humana, são utilizados nas pesquisas pré-clínicas, na busca de elucidar os mecanismos envolvidos no processamento de memórias aversivas, principalmente através de protocolos experimentais de aprendizagem associativa.

No contexto da memória aversiva, diversos estudos apontam diferenças entre sexos no que diz respeito ao processamento de memórias traumáticas, ansiedade e medo, destacando-se a necessidade de estudos em modelos animais fêmeas, que são historicamente sub-representadas na pesquisa científica (BEERY, ZUCKER, 2011; JOEL, MCCARTHY, 2017).

Neste âmbito, o protocolo de condicionamento aversivo contextual (CAC) é um dos testes mais empregados para estudar aprendizagem e memória emocional, produzindo conhecimento necessário para investigar a neurobiologia que apoia o aprendizado emocional e a expressão do medo (CAREAGA; GIRARDI; SUCHECKI, 2016; GILMARTIN; BALDERSTON; HELMSTETTER, 2014). Esse paradigma é explorado nesse trabalho como ferramenta para compreender a dinâmica da consolidação de memórias aversivas em fêmeas.

O presente projeto propõe elucidar o papel dos opioides no contexto de consolidação de memórias aversivas, contribuindo assim, a longo prazo, para a construção de saberes a respeito do processamento de memórias aversivas e a sua possível intervenção terapêutica em fêmeas.

2. HIPÓTESE

Considerando o exposto acima, a hipótese deste trabalho é que a administração intraperitoneal de um agonista opioide, prejudica a consolidação de uma memória aversiva contextual em ratas.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito da administração intraperitoneal da morfina e da naltrexona na etapa de consolidação da memória aversiva contextual em ratas, utilizando protocolos de condicionamento de diferentes intensidades.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar se a administração intraperitoneal de morfina, um agonista de receptores opioides que apresenta maior seletividade para o receptor mOR, prejudica a consolidação da memória aversiva, utilizando o protocolo de CAC forte;
- Avaliar se a administração intraperitoneal de naltrexona, um antagonista de receptores opioides, potencializa a consolidação da memória aversiva, utilizando o protocolo de CAC fraco;
- Avaliar se a administração prévia de uma dose sub-efetiva de naltrexona é capaz de prevenir o efeito da morfina no protocolo de CAC forte;
- Utilizar o protocolo de reinstalação da memória aversiva contextual como ferramenta para sustentar a hipótese do trabalho;
- Identificar se há diferenças sexuais a partir da comparação dos resultados obtidos com ratas (presente estudo) com os dados de ratos da literatura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Ratas Wistar (90 dias, 180-240g) foram mantidas sob condições padrões de laboratório, com ciclo claro/escuro 12 h/12 h (luzes acesas, via temporizador, às 7 h da manhã), temperatura controlada de 22 ± 1 °C e livre acesso à ração e à água filtrada. Todos os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo e de acordo com o padrão internacional de bem-estar animal e com a legislação vigente e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo CEUA/UFSC nº 2018170919 (**Anexo A**).

Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno medindo 41 x 34 x 16 cm em número máximo de 5 animais por caixa, mantidas dentro de estantes ventiladas (Alesco®). A ventilação e temperatura foram controladas por sistemas de ar-condicionado e de exaustão de ar. A manutenção dos animais, bem como os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Neurofarmacologia sala 307, Departamento de Farmacologia, CCB, UFSC. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados.

4.2 Drogas

A morfina (MOR; 0,3; 1,0; 3,0 mg/kg, Merck KGaA, Alemanha), um agonista opioide, o cloridrato de naltrexona (NAL; 1,0; 5,0; 10 mg/kg, Uninaltrex, Brasil), um antagonista opioide, foram dissolvidos em solução de NaCl a 0,9%. As doses do agonista e do antagonista foram determinadas de acordo com estudos anteriores realizados no nosso laboratório e de dados da literatura (INTROINI; MCGAUGH; BARATTI, 1985; IZQUIERDO, 1979; PORTO et al., 2015).

As drogas foram administradas por via intraperitoneal (IP). Da mesma forma, a solução de NaCl a 0,9% foi administrada aos grupos controle.

4.3 Procedimentos comportamentais

4.3.1 Aparatos experimentais

O condicionamento aversivo contextual foi realizado em uma caixa retangular (35 x 20 x 30 cm) que possui uma parede frontal, paredes laterais e posterior e um teto com abertura de acrílico. O piso da caixa é composto por barras de aço inoxidável de 3 mm de diâmetro e 9 mm de espaçamento, estando conectado a um gerador de choques elétricos (Insight, Brasil). Essa caixa foi denominada como Contexto A ou contexto pareado, e foi utilizada para a avaliação das respostas defensivas pareadas ao choque.

Uma segunda caixa quadrada (25 x 25 x 32 cm), denominada como Contexto B, foi utilizado para a sessão de reinstalação da memória aversiva contextual. Confeccionada em acrílico cinza, com tampa superior de acrílico e piso composto por barras de aço inoxidável de 5 mm de diâmetro com espaçamento entre as barras de 10 mm e conectada a um gerador de choques elétricos (Insight, Brasil).

Foram efetuadas modificações nas paredes do Contexto B para diferenciar do ambiente do Contexto A. Na parede posterior do Contexto B foram adicionadas faixas pretas com 1,5 cm de largura na disposição vertical com espaçamento de 1 cm entre cada faixa, a caixa de condicionamento foi colocada sob uma superfície preta e uma parede móvel foi colocada na posição frontal ao Contexto B. Este contexto foi utilizado para a aplicação de um único estímulo elétrico nas patas dos animais, sendo que o experimento foi executado em uma sala diferente daquela

utilizada para os experimentos no Contexto A.

4.3.2 Protocolo geral de condicionamento aversivo contextual (CAC)

O Condicionamento Aversivo Contextual (CAC) é um tipo de condicionamento Pavloviano, devido ao clássico estudo de Ivan Pavlov (1927). As contribuições do estudo se deram através de seus experimentos com cães, em que um sinal sonoro (estímulo neutro) sinalizava ao cão que ele estava prestes a receber alimento (estímulo incondicionado). Após sessões de treinamento, ao toque do sino, o cão de Pavlov começou a manifestar um aumento de salivação, representando uma resposta perante um estímulo anteriormente neutro (toque sonoro). Com isso, foi estabelecida uma associação entre o estímulo neutro e o estímulo incondicionado em que ambos produziam a mesma resposta no animal (PAVLOV, 1927; POWELL; BUCHANAN; HERNANDEZ, 1991; TAN et al., 2017).

Apesar do CAC ser comumente chamado de condicionamento pavloviano, antes do relato clássico de Pavlov, outros pesquisadores já exploravam essas ideias em relação ao condicionamento aversivo e empregavam em modelos animais (VINCENT, 1915), em que a aprendizagem e a memória resultam da mudança da função e da estrutura dos neurônios e de sua força sináptica de interconexão (TAN et al., 2017).

Esse paradigma permite a compreensão em nível de processos comportamentais frente a eventos aversivos, em que estímulos condicionados neutros (por exemplo, um contexto) se associam a estímulos incondicionados aversivos (por exemplo, um choque elétrico) para produzir uma resposta condicionada (por exemplo, congelamento no lugar) (**Figura 2**) (DUNSMOOR; MURPHY, 2015; FANSELOW et al., 1991; LANDEIRA-FERNANDEZ et al., 2006).

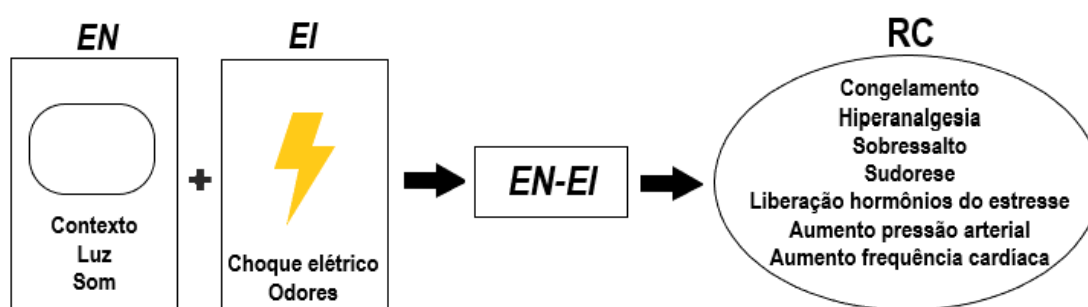
Os animais devem primeiramente formar uma representação do contexto ambiental (câmara de condicionamento) para que a aprendizagem contextual ocorra e assim à medida que o animal aprende que um estímulo condicionado prediz o estímulo incondicionado, o estímulo condicionado é capaz de elicitar respostas condicionadas ao contexto, como comportamento de congelamento em ratos, que é correlacionado com o nível de aprendizado gerado pela experiência aversiva (EIPPERT et al., 2008; MAREN; PHAN; LIBERZON, 2013).

Exemplos de respostas condicionadas comumente expressadas incluem

comportamentos defensivos (por exemplo, congelamento), autonômicos (por exemplo, frequência cardíaca e pressão arterial) e endócrinas (por exemplo, liberação de hormônios), bem como alterações na sensibilidade à dor e expressão reflexa (por exemplo, respostas de sobressalto) (CAMPOS et al., 2013; LEDOUX, 2000).

Os mecanismos neurais que subsidiam a aprendizagem do condicionamento de medo incluem contribuições corticais e subcorticais, sendo a amígdala basolateral (BLA) essencial para a integração dos estímulo incondicionado (p.ex. dor) e as entradas sensoriais neutras (estímulo condicionado) (DREW; HUCKLEBERRY, 2017).

Figura 2. Representação gráfica do paradigma de condicionamento aversivo.



Associação entre um estímulo emocionalmente neutro (EN; p. ex.: contexto, luz, som) com um estímulo incondicionado biologicamente relevante (EI; p. ex.: choque elétrico nas patas, odores, componente apetitivo). Após o pareamento EN-EI, o EN passa agora a ser interpretado como um estímulo condicionado (EC) capaz de induzir a expressão de respostas condicionadas (RC; p.ex.: mudanças na atividade autonômica, analgesia e comportamento de congelamento). Fonte: Elaborado pela autora.

Desse modo, as informações sensoriais dos estímulos convergem na amígdala, levando a um aumento na plasticidade sináptica de tal forma que o próprio estímulo condicionado evoca a atividade da amígdala que leva a comportamentos por meio de suas conexões com o hipotálamo, tronco cerebral e outras áreas envolvidas na resposta (DUNSMOOR; MURPHY, 2015; LEDOUX, 2000).

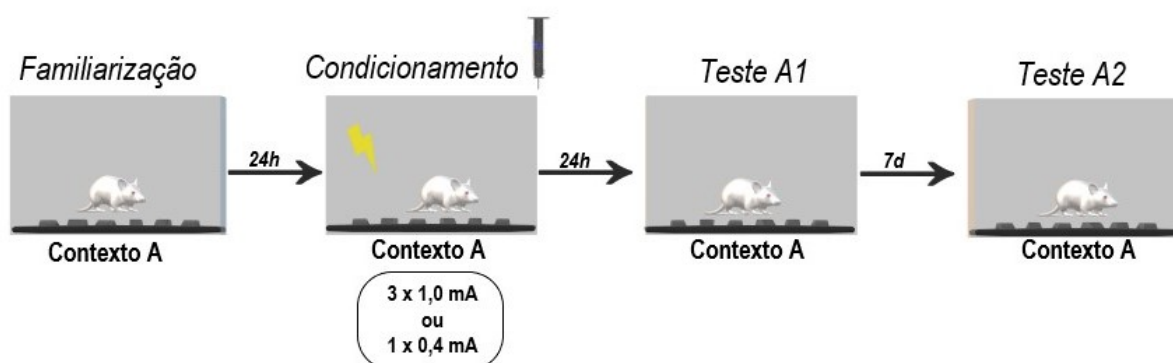
A partir do CAC é possível estudarmos as seguintes etapas da memória: (1) o processo de aquisição, através da exposição de estímulos neutros e estímulos incondicionados, apresentados em um tempo próximo um do outro; (2) a fase de consolidação da memória, em que é possível intervir experimentalmente com o uso de agentes amnésicos ou reforçadores, durante um período de tempo limitado conhecido como “janela da consolidação”, cuja a memória é suscetível a

interferentes; e a evocação, pelo processo de treinamento após a extinção (DUDAI, 2012; LABAR; CABEZA, 2006; TAN et al., 2017).

Inicialmente, o protocolo consistiu em uma sessão de familiarização (FAM), dentro da qual o animal pôde explorar livremente o Contexto A por 3 min, retornando a sua caixa moradia no término da sessão. Após 24 h, o animal retornou ao Contexto A (estímulo condicionado, EC), para a sessão de condicionamento. Após 30 s iniciais de exposição ao Contexto A (período pré-choque), cada grupo experimental foi submetido a um dos dois diferentes protocolos de CAC, utilizando diferentes intensidades de choque elétrico nas patas (EI; estímulo incondicionado): CAC fraco = 1 choque nas patas de 0,4 mA ou CAC forte = 3 choques nas patas de 1,0 mA (60 Hz, por 3 s, com um intervalo de 30 s entre cada choque). Após o condicionamento, os animais permaneceram no Contexto A por mais 30 s (período pós-choque) antes de retornarem ao biotério setorial.

Para avaliar os efeitos do tratamento farmacológico sobre a consolidação da memória aversiva contextual, os animais foram reexpostos ao Contexto A 1 e 8 dias após um dos protocolos de CAC descritos anteriormente, na ausência do estímulo incondicionado (Testes A1 e A2, respectivamente) (**Figura 3**). Todas as sessões de teste duraram 3 min. As drogas foram administradas por via intraperitoneal imediatamente, 15 min ou 6 h após a sessão de condicionamento.

Figura 3. Protocolo geral do condicionamento aversivo utilizado.



Protocolo geral utilizado para investigar os efeitos das drogas na etapa de consolidação de uma memória aversiva contextual. A seringa indica o momento da administração farmacológica (imediatamente, 15 min ou 6 h após a sessão de condicionamento). Os animais foram reexpostos ao Contexto A (1 e 8 dias após CAC) para a realização do Teste A1 e A2.

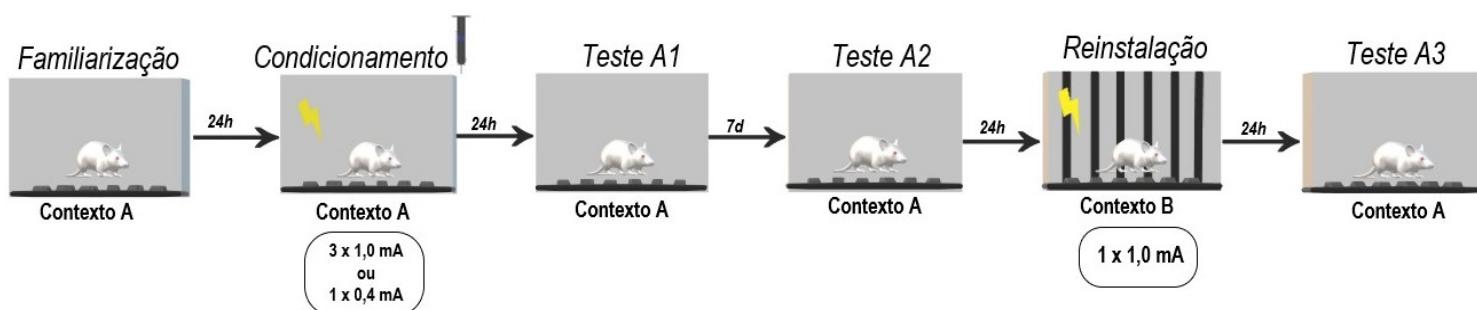
Nesse trabalho foi considerado o tempo de congelamento (expresso na forma de porcentagem de tempo) como um índice de retenção da memória. Esse

comportamento é caracterizado pela ausência de movimentos, exceto os necessários para respiração (BLANCHARD; BLANCHARD, 1969). As sessões experimentais foram gravadas por câmera de vídeo e avaliadas manualmente.

4.3.3 Protocolo de reinstalação da memória aversiva contextual

O protocolo de reinstalação foi realizado conforme Franzen; Giachero & Bertoglio (2019). Resumidamente, 24 h após o Teste A2, os animais foram alocados no Contexto B para a administração de um único estímulo elétrico (1 mA, 60 Hz, por 3 s). Vinte quatro horas após esta sessão (denominada aqui de sessão de reinstalação), os animais foram reexpostos ao Contexto A para a realização do Teste A3 (Figura 4).

Figura 4. Protocolo de reinstalação utilizado.



Protocolo utilizado para investigar os efeitos das drogas na etapa de consolidação de uma memória aversiva contextual. A seringa indica o momento da administração farmacológica (imediatamente, 15 min ou 6 h após a sessão de condicionamento). No Contexto B os animais receberam um choque de 1,0 mA. Nota-se as diferenças na caixa do Contexto B em relação a caixa do Contexto A. Os animais foram reexpostos ao Contexto A (1, 8 e 10 dias após CAC) para a realização do Teste A1, A2 e A3.

4.4 Delineamento experimental

4.4.1 Experimento 1: Efeito da administração sistêmica de morfina imediatamente após um CAC forte

Para investigar se a administração de morfina poderia prejudicar a consolidação da memória aversiva contextual em ratas, 40 ratas foram alocadas aleatoriamente em quatro grupos ($n = 10/\text{grupo}$) com base no tratamento (veículo ou MOR 0,3, 1,0 ou 3,0 mg/kg) realizado imediatamente após a sessão de

condicionamento forte (CAC forte). Após, foram realizados os testes A1 (24 h após a sessão) e teste A2 (7 dias após o condicionamento).

4.4.2 Experimento 2: Efeito da administração sistêmica de morfina 6 horas após um CAC forte

Com o objetivo de investigar se o efeito da morfina sobre a memória aversiva contextual era limitado a janela temporal de consolidação, 20 ratas foram alocadas aleatoriamente em dois grupos (n = 10/grupo) de acordo com o tratamento (veículo ou MOR 1,0 mg/kg) realizado 6 h após a sessão de condicionamento forte, em um protocolo de CAC forte (CAC forte). O teste A1 foi realizado 24 h após a sessão de condicionamento.

4.4.3 Experimento 3: Efeito da administração sistêmica de morfina imediatamente após um CAC forte no protocolo de reinstalação da memória aversiva contextual

A queda acentuada na % de tempo de congelamento entre as sessões de teste é uma característica das ratas do grupo controle (mas não dos ratos) no protocolo de condicionamento aversivo contextual (FRANZEN; GIACHERO; BERTOGLIO, 2019). Assim, este fenômeno pode mascarar o efeito de uma droga amnésica nos testes subsequentes ao Teste A1. Para controlar essa possibilidade e, assim, sustentar a nossa hipótese de que a morfina 1,0 mg/kg prejudica a consolidação da memória aversiva contextual, nós realizamos o protocolo de reinstalação da memória.

Para isso, 20 ratas foram alocadas de modo aleatório em 2 grupos (n = 10/grupo) de acordo com o tratamento (veículo ou MOR 1,0 mg/kg) administrado imediatamente após o condicionamento forte (CAC forte). O Teste A1 e o Teste A2 foram realizados no dia 1 e 7 após a sessão de condicionamento. Para a sessão de reinstalação, os animais foram dispostos no Contexto B, 24 h após TA2, para a administração de um estímulo elétrico lembrete (1 choque de 1 mA), sendo novamente expostos ao Contexto A, 24 h após, para avaliação da resposta de congelamento (Teste A3).

4.4.4 Experimento 4: Efeito da administração sistêmica de naltrexona imediatamente após um CAC fraco

Para investigar se o bloqueio de receptores opioides poderia potencializar a consolidação da memória aversiva contextual em ratas, nós utilizamos um protocolo de CAC fraco (1 choque de 0,4 mA). Para este protocolo, 40 ratas foram alocadas aleatoriamente em quatro grupos (n = 10/grupo) com base no tratamento (veículo ou NAL 1,0, 5,0 ou 10,0 mg/kg) realizado imediatamente após a sessão de condicionamento fraco (CAC fraco). Após, foram realizados os testes A1 (24 h após a sessão) e teste A2 (7 dias após o condicionamento).

4.4.5 Experimento 5: Efeito da administração sistêmica de naltrexona imediatamente após um CAC forte no protocolo de reinstalação da memória aversiva contextual

Para esse experimento, 20 ratas foram alocadas de modo aleatório em 2 grupos (n = 10/grupo) de acordo com o tratamento (veículo ou NAL 5,0 mg/kg) administrado imediatamente após o condicionamento de CAC forte. O Teste A1 e o Teste A2 foram realizados no dia 1 e 7 após a sessão de condicionamento. Para a sessão de reinstalação, os animais foram dispostos no Contexto B, 24 h após TA2, para a administração de um estímulo elétrico lembrete (1 choque de 1 mA), sendo novamente expostos ao Contexto A, 24 h após, para avaliação da resposta de congelamento (Teste A3).

4.4.6 Experimento 6: Efeito do pré-tratamento com naltrexona sobre o prejuízo de consolidação da memória induzido pela morfina

Para verificar se o efeito observado com a administração da morfina pode ser prevenido pela administração prévia de uma dose sub-efetiva do antagonista naltrexona, 32 ratas foram alocadas aleatoriamente em 2 grupos (n = 16/grupo) de acordo com o pré-tratamento (veículo ou NAL 10 mg/kg) realizado imediatamente após a sessão de condicionamento forte (CAC forte). Quinze minutos depois, cada grupo foi novamente dividido em dois outros grupos (n = 8/grupo) baseado no tratamento (veículo ou MOR 1 mg/kg). Os animais foram reexpostos ao Contexto A

24 h após a sessão de condicionamento para o TA1 e 7 dias após o condicionamento para a realização do TA2. Adicionalmente, 24 h após o TA2, os animais seguiram para o protocolo de reinstalação (1 choque de 1,0 mA) no Contexto B, sendo o TA3 realizado 24 h após sessão de reinstalação.

4.5 Análises Estatísticas

Para testar a normalidade e determinar a homogeneidade dos dados comportamentais, estes foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e ao teste de Levene. Uma vez comprovada a distribuição normal dos dados, a porcentagem do tempo de congelamento nos contextos A e B foi expressa como média \pm erro padrão da média (EPM), sendo avaliada por análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas (fatores independentes: tratamento farmacológico e reexposição ao contexto A) nos experimentos 1 e 4; teste *t* de Student para os experimentos 2, 3 e 5; ou ANOVA de duas vias de medidas repetidas (fatores independentes: pré-tratamento farmacológico, tratamento farmacológico e reexposição ao contexto A) foi utilizada no experimento 6. O teste de Tukey foi usado como teste *post hoc* para múltiplas comparações e o nível de significância estatística foi estabelecido em $P < 0,05$ para comparação de grupos, sendo * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e **** $P < 0,0001$.

Todos os resultados foram analisados pelo programa Statistica® 10.0 (StatSoft, EUA) e para a confecção dos gráficos foi utilizado o GraphPad Prism® 7 (GraphPad Prism, EUA).

5. RESULTADOS

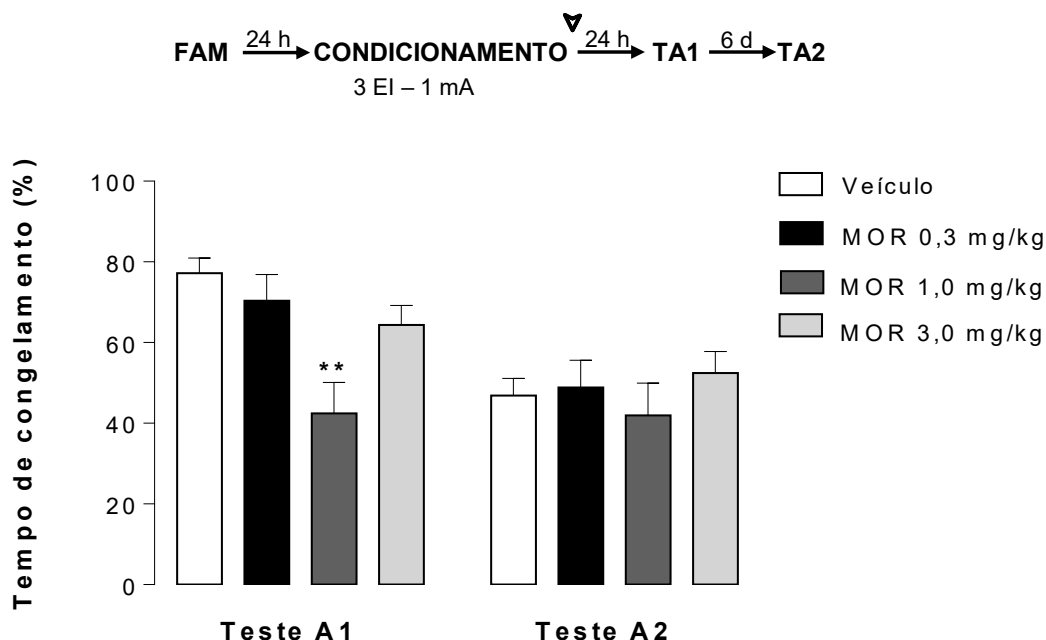
5.1 Experimento 1: Efeito da administração sistêmica de morfina imediatamente após um CAC forte

A ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do tratamento ($F_{(1.881, 16.93)} = 6,393$; $P = 0,0094$), mas não demonstrou efeito significativo na reexposição ao Contexto A ($F_{(2.41, 21.69)} = 0,5885$; $P = 0,5940$) e nenhuma interação entre os fatores ($F_{(9,27)} = 0,90038$; $P = 0,5358$) foi encontrada. Como representado na **Figura 5**, o teste *post hoc* de Tukey demonstrou que o grupo tratado com morfina na dose de 1,0

mg/kg apresentou menor tempo de congelamento no Teste A1 em comparação com o grupo veículo (Teste A1: $P = 0,0083$).

Esse resultado indica que a ativação de receptores opioides leva ao prejuízo da consolidação de uma memória aversiva contextual forte em ratas no protocolo experimental proposto.

Figura 5. Efeito da administração sistêmica de morfina imediatamente após um CAC forte.



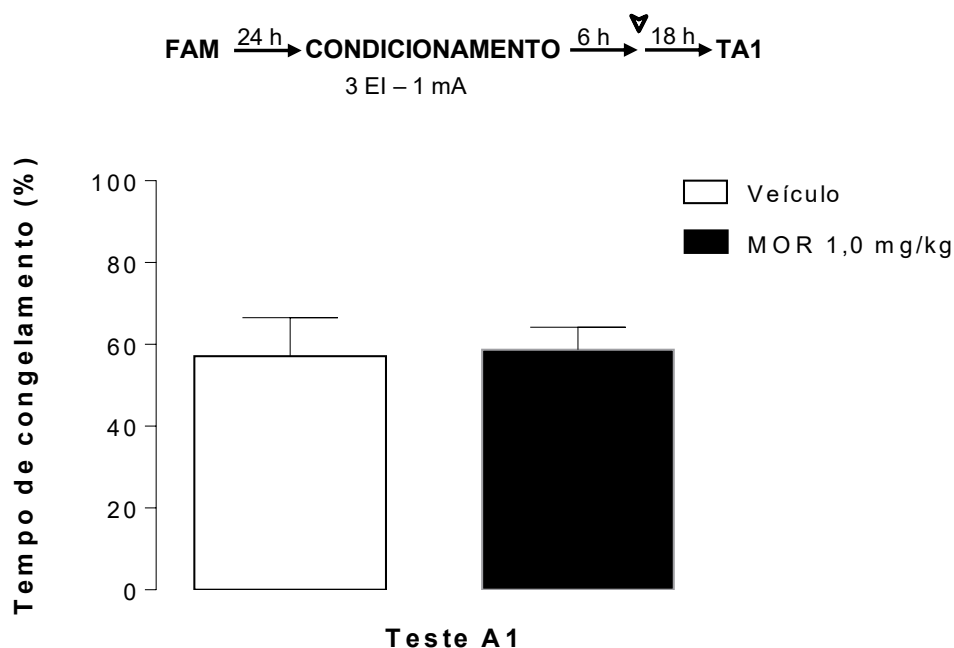
A seta indica o local e o momento do tratamento. Os gráficos mostram a % do tempo de congelamento quando os animais foram testados no contexto pareado (Testes A1 e A2; 1 e 7 dias após o CAC, respectivamente). Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 10$ /grupo) e o teste estatístico utilizado foi a ANOVA de medidas repetidas. ** $P < 0,01$, quando comparado ao grupo veículo.

5.2 Experimento 2: Efeito da administração sistêmica de morfina 6 h após o CAC forte

O teste t de Student não mostrou qualquer efeito do tratamento sobre o tempo de congelamento durante o Teste A ($t_{(18)} = 0,1478$, $P = 0,8841$). Como mostrado na **Figura 6**, não houve diferenças estatísticas entre o grupo controle e o grupo tratado com morfina 1,0 mg/kg.

Esses resultados sugerem que o efeito da morfina sobre a memória aversiva contextual é limitado à janela temporal de consolidação.

Figura 6. Efeito da administração sistêmica de morfina 6 horas após um CAC forte.



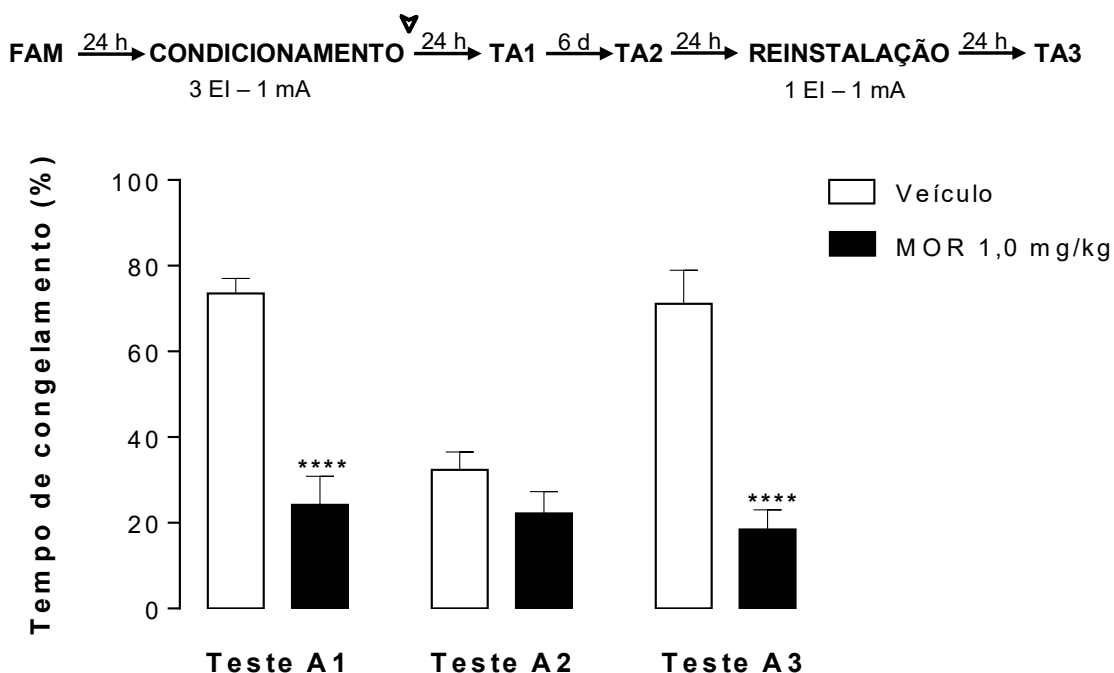
A seta indica o local e o momento do tratamento. Os gráficos mostram a % do tempo de congelamento quando os animais foram testados no contexto pareado (Testes A1) 1 dia após o CAC. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 10/\text{grupo}$) e o teste estatístico utilizado foi a teste t de Student.

5.3 Experimento 3: Efeito da administração sistêmica de morfina imediatamente após um CAC forte no protocolo de reinstalação

O teste t de Student mostrou efeito do tratamento sobre o tempo de congelamento durante o Teste A1 ($t(18) = 6,518$, $P < 0.0001$) e não demonstrou efeito significativo na reexposição ao Contexto A, 8 dias após o condicionamento ($t(18) = 1,56$, $P = 0,1361$), conforme observado na **Figura 7**. Após a sessão de reinstalação (Teste A3), o grupo que recebeu morfina 1,0 mg/kg apresentou níveis de congelamento inferiores ao grupo veículo ($t(18) = 5,777$, $P < 0.0001$).

Em conjunto, nossos resultados mostraram que o grupo controle reinstalou a memória, ou seja, voltou a expressar níveis de congelamento comparáveis aos apresentados no TA1, e que o grupo que recebeu morfina voltou a apresentar menores níveis de congelamento (TA3: VEI vs MOR 1,0 mg/kg). Este resultado vai ao encontro de um prejuízo de consolidação da memória induzido pela morfina.

Figura 7. Efeito da administração sistêmica de morfina no protocolo de reinstalação da memória aversiva contextual.



A seta indica o local e o momento do tratamento. Os gráficos mostram a % do tempo de congelamento quando os animais foram testados no contexto pareado (Testes A1; A2 e A3, 1; 7 e 9 dias após o CAC, respectivamente). Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 10/\text{grupo}$) e o teste estatístico utilizado foi o teste t de Student. **** $P < 0,0001$, quando comparado ao grupo veículo.

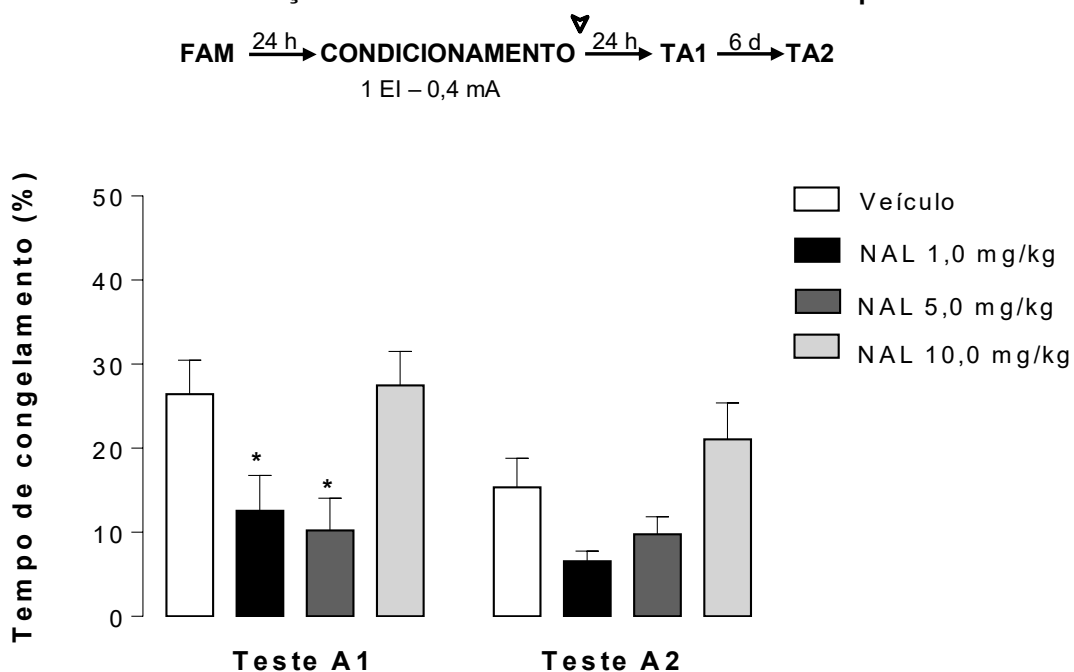
5.4 Experimento 4: Efeito da administração sistêmica de naltrexona imediatamente após um CAC fraco

A ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do tratamento ($F_{(1,978, 17.8)} = 6,884$; $P = 0,0062$) e demonstrou efeito significativo na reexposição ao contexto A ($F_{(2,094, 18.85)} = 5,782$; $P = 0,0103$) e interação entre os fatores ($F_{(9, 27)} = 2,5$; $P = 0,0317$).

Como mostrado na **Figura 8**, os grupos tratados com naltrexona nas doses de 1,0 mg/kg e 5,0 mg/kg apresentaram redução no tempo de congelamento quando comparados ao grupo controle no teste A1 pelo teste de Tukey ($P = 0,0489$ e $P = 0,0281$ respectivamente).

Nossos resultados indicam que o bloqueio dos receptores opioides, nas condições experimentais testadas, leva a um prejuízo de consolidação de uma memória aversiva contextual, sugerindo que a ativação endógena desses receptores (ou de algum deles) modula positivamente este processo.

Figura 8. Efeito da administração sistêmica de naltrexona imediatamente após um CAC fraco.



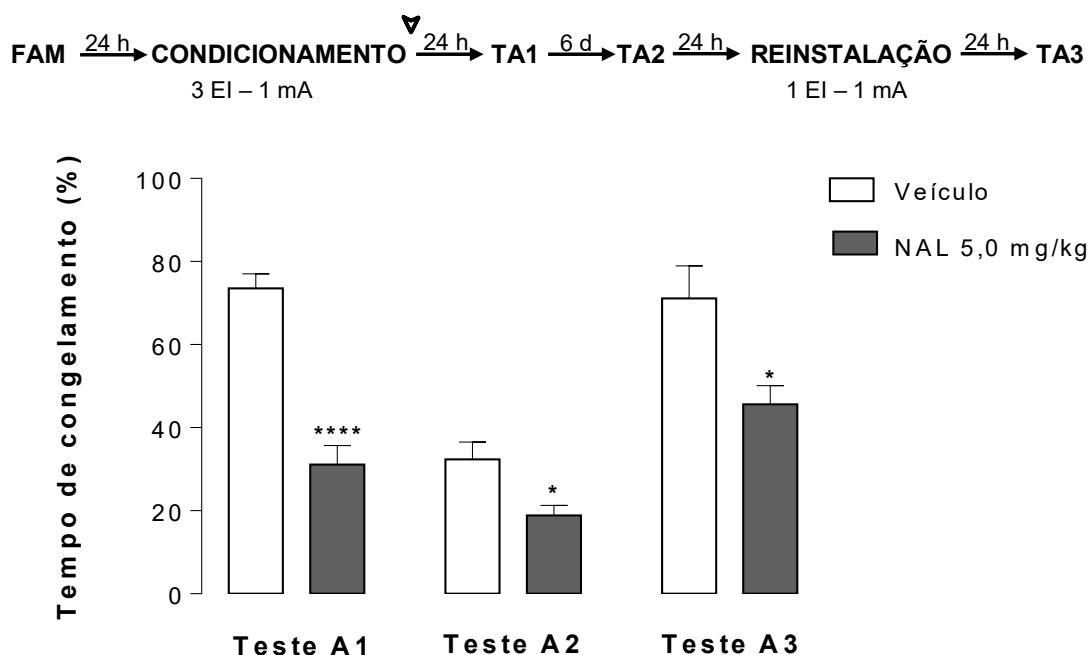
A seta indica o local e o momento do tratamento. Os gráficos mostram a % do tempo de congelamento quando os animais foram testados no contexto pareado (Testes A1 e A2; 1 e 7 dias após o CAC, respectivamente). Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 10/\text{grupo}$) e o teste estatístico utilizado foi a ANOVA de medidas repetidas. $*P < 0,05$, quando comparado ao grupo veículo.

5.5 Experimento 5: Efeito da administração sistêmica de naltrexona imediatamente após um CAC forte no protocolo de reinstalação

O teste t de Student mostrou efeito do tratamento com NAL 5,0 mg/kg sobre o tempo de congelamento durante o Teste A1 ($t(18) = 7,321$, $P < 0,0001$) e na reexposição ao contexto A (Teste A2 ($t(18) = 2,817$, $P = 0,0114$), conforme observado na **Figura 9**. Após a sessão de reinstalação (Teste A3), o grupo que recebeu naltrexona 5,0 mg/kg continuou apresentando menores níveis de congelamento comparado ao grupo veículo ($t(18) = 2,814$, $P = 0,0115$).

Esse resultado sustenta a nossa hipótese de que a naltrexona, na dose de 5 mg/kg, prejudica a consolidação da memória aversiva contextual em ratas.

Figura 9. Efeito da administração sistêmica de naltrexona no protocolo de reinstalação da memória aversiva contextual.



A seta indica o local e o momento do tratamento. Os gráficos mostram a % do tempo de congelamento quando os animais foram testados no contexto pareado (Testes A1; A2 e A3, 1; 7 e 9 dias após o CAC, respectivamente). Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 10$ /grupo) e o teste estatístico utilizado foi o teste *t* de Student. * $P < 0,05$; **** $P < 0,0001$, quando comparado ao grupo veículo.

5.6 Experimento 6: Efeito do pré-tratamento com dose sub-efetiva de naltrexona sobre o prejuízo de consolidação da memória pela morfina

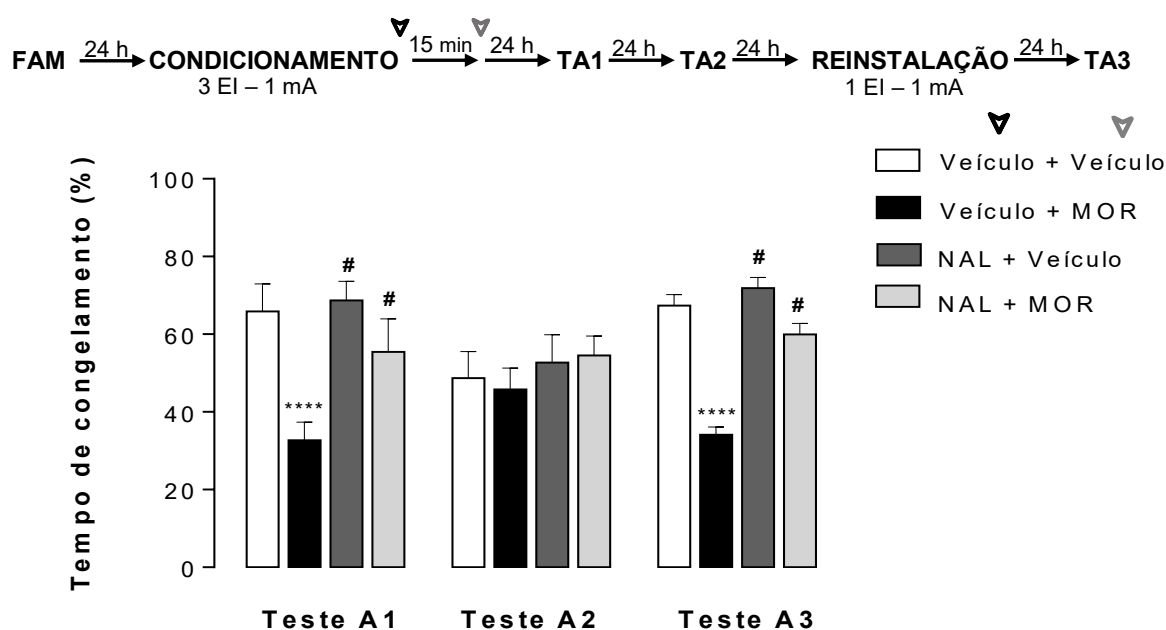
A ANOVA de duas vias de medidas repetidas mostrou uma interação significativa entre o pré-tratamento, o tratamento e a reexposição ao contexto A ($F(6,49) = 3,567$, $P = 0,0060$) sobre o tempo de congelamento nos Testes A1 e A3.

Como mostrado na **Figura 10**, o grupo tratado com morfina apresentou níveis de congelamento inferiores ao grupo Veículo + Veículo nos testes A1 e A3 ($P < 0,0001$). Por outro lado, o efeito da morfina não foi mais observado quando os animais foram pré-tratados com uma dose sub-efetiva de naltrexona de 10 mg/kg (NAL + MOR vs Veículo + Veículo = Teste A1: $P = 0,3524$; Teste A2: $P = 0,7864$; Teste A3: $P = 0,6360$).

Portanto, a administração de uma dose sub-efetiva de naltrexona foi capaz de prevenir o prejuízo de consolidação da memória induzido pela morfina na dose de 1,0 mg/kg, indicando que o efeito da morfina foi mediado pela ativação de receptores

opioides.

Figura 10. Efeito do pré-tratamento com dose sub-efetiva de naltrexona sobre o prejuízo de consolidação da memória pela morfina.



A seta indica o local e o momento do tratamento. Os gráficos mostram a % do tempo de congelamento quando os animais foram testados no contexto pareado (Testes A1; A2 e A3, 1; 7 e 9 dias após o CAC, respectivamente). Os valores são expressos como média \pm EPM ($n = 8/\text{grupo}$) e o teste estatístico utilizado foi a ANOVA de duas vias de medidas repetidas. **** $P < 0,0001$ quando comparado ao grupo Veículo + Veículo; # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo Veículo + MOR.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho estudamos o efeito da administração intraperitoneal da morfina (agonista opioide) e da naltrexona (antagonista opioide) na etapa de consolidação de uma memória aversiva contextual em ratas.

Foi demonstrado que uma única administração de morfina 1,0 mg/kg, imediatamente após a sessão de condicionamento forte, é capaz de diminuir a resposta de congelamento, sugerindo que a morfina prejudicou a consolidação da memória.

Esta sugestão foi sustentada por dois outros experimentos. No primeiro deles, mostramos que não houve diferença significativa quando a mesma dose de morfina (1,0 mg/kg) foi administrada somente 6 h após a sessão de condicionamento forte, período que está presumivelmente fora da janela de consolidação. No segundo experimento, mostramos que o efeito da administração da morfina 1,0 mg/kg

imediatamente após o condicionamento forte, continuou presente após o protocolo de reinstalação da memória (acessado no Teste A3).

Vale ressaltar que a ausência de efeito da morfina no Teste A2 pode ser explicada pela queda acentuada no tempo de congelamento do grupo veículo, uma característica das ratas quando são reexpostas ao contexto (FRANZEN; GIACHERO; BERTOGLIO, 2019), justificando, assim, a necessidade do uso desta ferramenta quando o foco do estudo são as ratas.

Por fim, o efeito da morfina não foi mais observado quando as ratas foram pré-tratadas com uma dose sub-efetiva de naltrexona (10 mg/kg) no protocolo estudado, assim como observado em outros estudos (IZQUIERDO, 1979; PORTO et al., 2015), sugerindo que o prejuízo de consolidação da memória aversiva induzido pela morfina está relacionado com a ativação de receptores opioides do tipo μ ou mOR.

O prejuízo na consolidação de memórias aversivas induzida por agonistas opioides é bem relatado na literatura para ratos. Por exemplo, a administração de morfina 10 mg/kg após a sessão de treino prejudica a persistência da memória de medo contextual em ratos (PORTO et al., 2015). Em outro estudo, a administração sistêmica de morfina 3,0 mg/kg, imediatamente após a sessão de treino, prejudicou a retenção da memória aversiva (INTROINI; MCGAUGH; BARATTI, 1985). Perfil semelhante de resultado foi obtido com a administração sistêmica de morfina 1,0 mg/kg em uma tarefa de esQUIVA inibitória (IZQUIERDO, 1979).

Pesquisas anteriores demonstram um papel dos receptores opioides nos paradigmas de aprendizagem contextual e aversivas. Por exemplo, a deleção do receptor mOR resulta em aquisição prejudicada de aprendizagem do medo em camundongos (SANDERS; KIEFFER; FANSELOW, 2005) e uma injeção de morfina na amígdala resulta no comprometimento do condicionamento do medo contextual (WESTBROOK; GOOD; KIERNAN, 1997). Assim, tem sido sugerido na literatura que o sinal opioidérgico, que é ativado por meio do condicionamento, estaria atuando no sentido de modular negativamente as memórias aversivas (EIPPERT et al., 2008).

Nesse contexto, é possível observar que, nos paradigmas propostos para estudo de memórias aversivas, não houve diferença expressiva nos achados da literatura sobre a influência da morfina na consolidação da memória aversiva em ratos com os achados encontrados no presente estudo com ratas (PORTO et al., 2015; SZCZYTKOWSKI-THOMSON; LEBONVILLE; LYSLE, 2013; ZARRINDAST et

al., 2013).

Os mecanismos pelos quais os agonistas opioides modulam o processamento de memórias aversivas, em especial a etapa de consolidação da memória, ainda não estão elucidados. Porém, evidências sugerem que a resposta ao estresse também envolve a ativação do sistema opioide em regiões do cérebro associadas à regulação do estresse e ao processamento da memória (TORRES-BERRIO; NAVA-MESA, 2019). Além disso, o sistema opioide é caracterizado por mediar a analgesia induzida por estressores leves e por modular a ativação do eixo HPA (CONTET et al., 2006).

Neste sentido, em condições de estresse, a ação dos opioides endógenos, como as endorfinas, liberados na região da amígdala, estaria relacionada à atividade “anti-estresse”, mediada principalmente pelo receptor mOR e pela inibição do eixo HPA (VALENTINO; VAN BOCKSTAELE, 2015; BALI; RANDHAWA; JAGGI, 2015). Assim, a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), induzida pelo estresse, desencadeia a liberação de endorfina (através do aumento da expressão do gene POMC na glândula pituitária), que, por sua vez, tende a inibir a superativação do eixo HPA (CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005; NAKAGAWASAI et al., 1999). Além disso, durante o estresse agudo as endorfinas parecem servir como um mecanismo de alerta, aumentando o aprendizado de medo para evitar a exposição ao estresse (BALI; RANDHAWA; JAGGI, 2015).

Outras hipóteses de como os opioides estariam envolvidos na modulação do aprendizado de medo contextual sugerem o envolvimento de várias estruturas cerebrais, circuitos e sistemas de neurotransmissores, bem como complexas interações entre o estresse e as vias do sistema opioide associadas à memória contextual. A distribuição regional dos receptores opioides em áreas que regulam as respostas emocionais, aprendizagem e memória, incluindo o hipotálamo, a amígdala e o córtex pré-frontal, também suportam o possível papel mediador dos opioides em distúrbios de memória induzidos por estresse (CONTET et al., 2006; TORRES-BERRIO; NAVA-MESA, 2019).

Os receptores opioides também são encontrados em alta densidade nas vias dopaminérgicas no corpo estriado e no núcleo *accumbens*, onde há uma interação próxima entre os opioides e a neurotransmissão dopaminérgica (UKAI; HUI, 2002). Algumas pesquisas buscam compreender a possível relação entre o sistema opioide endógeno e o sistema dopaminérgico no processamento de memórias, reforçadas

em evidências que demonstraram que agonistas dopaminérgicos seletivos dos receptores D1 e D2 antagonizam os efeitos da morfina no prejuízo da consolidação da memória e os antagonistas D1 e D2 potencializaram os efeitos da morfina, indicando o envolvimento de receptores dopaminérgicos na consolidação de memórias aversivas mediada pela morfina (CASTELLANO et al., 1994).

Em relação ao uso do antagonista opioide, a naltrexona, observamos que a administração intraperitoneal de naltrexona 1,0 ou 5,0 mg/kg, imediatamente após um CAC fraco, reduziu o tempo de congelamento das ratas. Esse resultado sugere que a naltrexona induziu um prejuízo de consolidação da memória. Adicionalmente, confirmamos, através do protocolo de reinstalação, que o efeito da naltrexona 5,0 mg/kg foi duradouro.

Em contraste com os nossos achados, alguns estudos têm demonstrado que a administração de naloxona intra-amígdala (2,5 nmol) ou sistêmica (0,4 mg/kg), após a sessão de treinamento, demonstrou facilitar o desempenho de ratos em paradigmas aversivos, sugerindo que este antagonista opioide facilita a consolidação da memória aversiva (GALLAGHER; KAPP, 1978; INTROINI-COLLISON; NAGAHARA; MCGAUGH, 1989; IZQUIERDO, 1979).

Com o objetivo de investigar os efeitos da naltrexona na memória de curto e longo prazo, Nava-Mesa e colaboradores (2013) observaram que a administração sistêmica de naltrexona, durante o pré-treinamento de uma tarefa de reconhecimento de objetos em ratos submetidos a estresse agudo de contenção, previne os efeitos do estresse agudo em prejudicar o reconhecimento de objetos de curto prazo, mas altas doses de naltrexona prejudicaram a facilitação da memória de longo prazo induzida pelo estresse, sugerindo efeitos diferenciais do sistema opioide em memórias de curto e longo prazo após exposição ao estresse.

Por outro lado, a administração intraperitoneal dos antagonistas seletivos κ -opioide, MR 2266 e MR 1452, quando administrados antes do choque, reduz os níveis de congelamento, assim como a administração intracerebroventricular do antagonista κ -opioide, nor-binaltorfimina (N-BNI) reduz o condicionamento (FANSELOW et al., 1991; FANSELOW; CALCAGNETTI; HELMSTETTER, 1989).

Reforçando essa descoberta, o condicionamento aversivo aumenta a expressão de mRNA do receptor κ OR na amígdala basolateral, enquanto o antagonismo de κ OR na BLA diminuiu o medo condicionado de ratos no paradigma de susto potencializado pelo medo (do inglês, "*fear-potentiated startle*"), sugerindo

que o comportamento motivado de forma aversiva parece diferir em função do tipo de receptor opioide que fundamenta sua modulação (KNOLL et al., 2011).

Com esses achados, é possível sugerir que os antagonistas opioides exercem efeitos diferentes na modulação do processamento da memória dependendo da permeabilidade da droga nas diferentes regiões cerebrais, seletividade pelo receptor e da dose estudada.

O envolvimento de neurônios GABAérgicos nos efeitos exercidos pelos antagonistas opioides (naloxona ou naltrexona) na consolidação da memória foi investigado em camundongos testados em uma tarefa de esquiva inibitória (do inglês "*inhibitory avoidance task*"). Foi demonstrado que baixas doses de naloxona ou naltrexona e dos antagonistas GABA, picrotoxina ou bicuculina (que não tiveram efeito sobre a retenção da memória quando administrados isoladamente), produziram potencialização da consolidação da memória aversiva quando administrados juntos após o treinamento. Além disso, o tratamento com muscimol, um agonista GABAA, atenuou os efeitos de ambos os antagonistas opioides, sugerindo que os antagonistas opioides podem influenciar a consolidação da memória em camundongos ao interagir com o sistema GABAérgico (CASTELLANO et al., 1989).

Adicionalmente, em modelos animais, a administração de naloxona em conjunto com a administração de anfetamina e nicotina potencializam o efeito facilitador da consolidação da memória aversiva contextual, esses resultados sugerem que a naloxona causa facilitação da memória por meio da associação com mecanismos dopaminérgicos e beta-adrenérgicos centrais e exercendo influência inibitória nos opioides endógenos (IZQUIERDO; GRAUDENZ, 1980).

A maioria dos dados presentes na literatura corrobora com a ideia de que os agonistas opioides prejudicam a consolidação da memória, com efeitos amnésicos, e que antagonistas opioides, como a naltrexona e a naloxona, poderiam prevenir os efeitos deletérios do estresse na recuperação da memória, atuando preferencialmente nos receptores mOR no hipocampo, e exibindo ações mais complexas (**Tabela 2**) (TORRES-BERRIO; NAVA-MESA, 2019).

Em humanos, diversas linhas de pesquisa documentam o papel dos opioides em distúrbios relacionados com uma adaptação inapropriada ao estresse e a memória, como ansiedade associada ao estresse, o TEPT e a depressão (BAILEY et al., 2013; BALI; RANDHAWA; JAGGI, 2015; SZCZYTKOWSKI-THOMSON;

LEBONVILLE; LYSLE, 2013).

Em relação ao TEPT, por exemplo, já foi demonstrado que a administração de agonistas μ -opioides, após um evento traumático, reduz o risco de desenvolvimento de TEPT (BALI; RANDHAWA; JAGGI, 2015), reduzindo também a severidade dos sintomas relacionados, instigando o uso desses agentes como estratégia preventiva (BRYANT et al., 2009; STODDARD et al., 2009) ou propondo que estes agonistas μ -opioides podem proporcionar uma intervenção precoce no processo de consolidação da memória necessária para o desenvolvimento de TEPT (SZCZYTKOWSKI-THOMSON; LEBONVILLE; LYSLE, 2013).

Esse trabalho corrobora com o descrito acima, tendo em vista que a administração intraperitoneal de morfina apresentou prejuízo na consolidação de uma memória aversiva no protocolo estudado, fornecendo evidência de que a possível ativação dos receptores opioides desempenha um efeito inibitório sobre a consolidação da memória em ratas.

Nosso achado em fêmeas é importante porque as descobertas atuais apoiam um crescente corpo evidências de que os efeitos do estresse nos sistemas cerebrais envolvidos na aprendizagem são sexualmente dimórficos (MILNER et al., 2013). No contexto da memória aversiva, diversos estudos apontam diferenças entre sexos no que diz respeito ao processamento de memórias traumáticas, ansiedade e medo (FARRELL; SENGELAUB; WELLMAN, 2013; GLOVER; JOVANOVIC; NORRHOLM, 2015; MANZANO-NIEVES et al., 2018; MCLEAN; ANDERSON, 2009; MILAD et al., 2009).

Diferenças sexuais já eram relatadas na década de 30, e apontavam que animais fêmeas proporcionavam resultados mais “variáveis” que machos, produzindo uma diferença estatística não confiável e sugerindo o uso de modelos animais machos para resultados mais fidedignos (MCNEMAR; STONE, 1932). Na década de 70, John Archer demonstrou diferentes comportamentos observados entre os dois sexos nos paradigmas estudados e sugeriu que as discrepâncias são devido a adoção de diferentes estratégias de enfrentamento e não especificamente se correlacionam com diferenças na reatividade emocional dos animais (ARCHER, 1977).

Várias justificativas se baseiam na ideia de que os ciclos hormonais femininos comprometem a homogeneidade das populações de estudo e não geram dados confiáveis e representativos, apesar de existirem poucas evidências para sugerir que

tais variações tornem os modelos femininos inadequados (BANGASSER; WIERSIELIS, 2018; BECKER; PRENDERGAST; LIANG, 2016; BEERY; ZUCKER, 2011; JOEL; MCCARTHY, 2017; KOKRAS; DALLA, 2014; SHANSKY, 2019). Entretanto, a sub-representação de modelos animais em fêmeas na neurociência ainda é um fato relevante, com pesquisadores usando um número desproporcionalmente alto de machos em pesquisas científicas. A proporção, em um estudo realizado em 2011, chega a ser de 5,5 estudos em machos para cada 1 estudo realizado com fêmeas (BEERY; ZUCKER, 2011). Outra análise, no campo da psicofarmacologia, mostrou que 50 a 60% das pesquisas utilizavam apenas animais machos (JOEL; MCCARTHY, 2017).

Esses dados são preocupantes tendo em vista o maior relato de distúrbios neuropsiquiátricos ocorrendo no sexo feminino, em que há evidências que demonstram a existência de viés de gênero na frequência, gravidade ou resposta ao tratamento, mostrando que diversos distúrbios afetam mulheres e homens de maneira diferente (BANGASSER et al., 2018; JOEL; MCCARTHY, 2017). Os dados de prevalência de TEPT, por exemplo, mostram o dobro de mulheres com a referida patologia (GRADUS, 2017; SHANSKY, 2015).

Novamente, fica a discussão se essa maior prevalência de TEPT (assim como de outras psicopatologias, tais como ansiedade e depressão; MIRZAEI et al., 2019) em mulheres se deve não só ao fator gênero em si, mas a maior procura das mulheres por ajuda, como em tantas outras patologias (HUNT et al., 2011), até por uma questão sociocultural, especialmente em países em desenvolvimento (JAYACHANDRAN, 2015).

Como a ciência básica precede implicações clínicas, a exclusão de modelos animais fêmeas e a crença de que achados comportamentais em animais machos são traduzidos igual e diretamente para fêmeas, certamente, compromete a compreensão atual de como tratar doenças em humanos da maneira mais eficaz (SHANSKY, 2019). Um marco histórico nesse sentido foi, em 2014, a atenção voltada ao desenvolvimento de políticas para garantir que a pesquisa pré-clínica financiada pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH) considere animais machos e fêmeas em estudos pré-clínicos em todas as aplicações futuras (a menos que a inclusão específica do sexo seja injustificada, com base em exceções rigorosamente definidas), considerando a inclusão do sexo como uma variável biológica (CLAYTON; COLLINS, 2014).

Tabela 2. Efeitos da morfina e naloxona em paradigmas de aprendizado aversivo.

Referência	Sexo	Intervenção	Paradigma experimental	Respostas
IZQUIERDO, 1979	Ratas Wistar	Morfina (1 mg/kg IP) Naloxona (0,2; 0,4; ou 0,8 mg/kg, IP)	<i>Shuttle Avoidance Conditioning¹</i> <i>Habituation of a rearing response to a tone²</i>	- Morfina teve um efeito amnésico próprio e antagonizou a influência facilitadora da naloxona - Naloxona (0,4 mg/kg) no Shuttle Avoidance e Naloxona (0,8 mg/kg) no Habituation facilitou a consolidação da memória.
IZQUIERDO, 1980	Ratas Wistar	β-endorfina (2 µg/kg, IP) Naloxona (0,8 ou 1,6 mg/kg, IP)	<i>Shuttle Avoidance Conditioning</i> <i>Habituation of a rearing response to a tone</i>	- β-endorfina não apresentou efeito na aquisição, mas prejudicou a evocação. - Naloxona prejudicou a aquisição do Shuttle Avoidance (0,8 mg/kg) e no Habituation (1,6 mg/kg).
MCNALLY; WESTBROOK, 2003	Ratos Wistar	Naloxona (2,5 mg/kg ou 5,0 mg/kg SC)	<i>Contextual Fear Conditioning</i>	Naloxona (2,5 mg/kg), antes da sessão de extinção, prejudica a extinção do medo condicionado.
SZCZYTKOWSKI- THOMSON; LEBONVILLE; LYSLE, 2013	Ratos Sprague Dawley	Morfina (7,5 mg/kg ou 15 mg/kg SC)	<i>Stress-enhanced fear learning (SEFL)³</i>	- Administração repedita de morfina (7,5 mg/kg) reduziu congelamento e atenuou aprendizagem de medo. - Única dose de morfina (15 mg/kg) 48 horas após o estressor atenuou a resposta de medo.
ZARRINDAST et al., 2013	Ratos Wistar	Morfina (7,5 mg/kg IP)	<i>Passive avoidance task⁴</i>	- Aquisição da memória foi prejudicada nos animais que receberam uma dose de 7,5 mg/kg de morfina 0, 30 min e 1h antes do treinamento.
PORTO et al., 2015	Ratos Wistar	Morfina (3,0 ou 10,0 mg/kg, IP) Naloxona (1 mg/kg, IP)	<i>Contextual Fear Conditioning</i>	- Injeção de morfina (10 mg/kg,) 12 h após o treinamento reduz o congelamento ao contexto em animais testados 7 e 14 dias após o treinamento. - Prejuízo da morfina (10 mg/kg) na persistência da memória aversiva foi prevenido pela naloxona.

¹ Tarefa de evitação associativa motivada pelo medo, o animal deve aprender a prever a ocorrência de um evento aversivo (choque) a partir da apresentação de um estímulo específico (tom), a fim de evitar o evento aversivo movendo-se para um compartimento diferente.

² Apresentação de 20 tons em intervalos variáveis de 10-40 s. As respostas de elevação ao tônus (ficar sobre as patas traseiras enquanto realiza movimentos de orientação com a cabeça) são contabilizadas.

³ Modelo animal de PTSD que usa choques elétricos nas patas não sinalizados e imprevisíveis para mimetizar e induzir trauma.

⁴ Teste de medo agravado usado para avaliar o aprendizado e a memória em modelos de roedores de distúrbios do SNC. Neste teste, os sujeitos aprendem a evitar um ambiente no qual um estímulo aversivo (como um choque no pé) foi aplicado anteriormente. Fonte: Elaborado pela autora.

Portanto, assumir que os resultados realizados em machos são representativos às fêmeas proporciona um viés de sexo que prejudica a extrapolação desses resultados em cuidados na saúde feminina. Destaca-se a necessidade de incluir o sexo como uma variável biológica, aumentando o interesse e a conscientização sobre essas questões com o objetivo de melhorar a qualidade de vida de mulheres e homens (BEERY; ZUCKER, 2011; CLAYTON; COLLINS, 2014).

Logo, a influência do sexo no papel modulador dos opioides no estresse também merece atenção especial, pois nota-se que a grande maioria dos estudos que relacionaram o uso de opioides em distúrbios como o TEPT e no processamento de memórias aversivas foram realizados com animais machos. A este respeito, Milner e colaboradores (2013) correlacionaram os efeitos diferenciais do estresse crônico na memória de mulheres e homens à densidade e ao tráfego de receptores mOR no hipocampo. Os resultados demonstraram que o estresse crônico diminuiu diferencialmente as células com receptores mOR em homens, sem qualquer efeito significativo em mulheres.

Alguns estudos sugerem que os hormônios ovarianos, especialmente estrogênio, alteram os níveis de encefalina no hipocampo em mulheres, também alterando a ligação do receptor mOR em todo o hipocampo (BALI; RANDHAWA; JAGGI, 2015). Além disso, foi relatado que o estrogênio exerce uma influência inibitória no condicionamento contextual do medo em ratas adultas (CHANG et al., 2009; GUPTA et al., 2001; MILAD; GRAHAM, 2014). Ademais, foi demonstrado que o bloqueio de estrogênio pela administração de anticoncepcionais hormonais em ratas prejudica a extinção da memória aversiva contextual, mas não exerce efeitos sobre a aquisição dessa memória (MILAD; GRAHAM, 2014).

O presente estudo não investigou os efeitos das fases do ciclo estral das ratas sobre o processamento mnemônico, pois outras análises nesse contexto mostraram que os ratas fêmeas, durante seu ciclo estral, exibiram níveis mais baixos de respostas de congelamento contextual do que os ratos machos, mas não há diferenças adicionais entre os diferentes estágios do ciclo ovariano nas fêmeas (CHANG et al., 2009).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Corroborando a primeira parte da nossa hipótese, o presente estudo mostrou que uma única administração intraperitoneal de morfina 1,0 mg/kg, quando administrada imediatamente após o condicionamento, reduziu os níveis de congelamento em fêmeas, indicando um prejuízo na consolidação da memória aversiva contextual. Este achado vai ao encontro dos achados da literatura que utilizaram animais machos.

Por outro lado, a administração intraperitoneal de naltrexona 1,0 e 5,0 mg/kg também induziu prejuízo na consolidação da memória aversiva contextual em ratas. Esse resultado se mostrou contrário à maioria dos relatos da literatura, bem como, a segunda parte da nossa hipótese. Acreditamos que este resultado se deve às diferenças encontradas nas doses utilizadas, no sexo e/ou nas condições experimentais determinadas, o que deve ser melhor explorado.

Portanto, os presentes achados sugerem o envolvimento de receptores opioides na consolidação da memória aversiva contextual e o potencial uso de agonistas e antagonistas desses receptores para modular negativamente as memórias aversivas. Entretanto, mais investigações são necessárias para uma melhor compreensão deste efeito quanto aos mecanismos e vias envolvidos nessa modulação.

Adquirir uma melhor caracterização dos fatores que envolvem o sistema opioide e o seu processamento e a manutenção de memórias é fundamental para entender como associações aversivas podem persistir em transtornos como o TEPT e como os opioides podem vir a ser aliados com potencial terapêutico para os indivíduos acometidos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERINI, C. M. Mechanisms of memory stabilization: Are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes?. **Trends in Neurosciences**, v. 28, n. 1, p. 51–56, 2005.

ALLEGRA, M. et al. Differential relation between neuronal and behavioral discrimination during hippocampal memory encoding. **Neuron**, v. 108, n. 6, p. 1103–1112, 2020.

ARCHER, J. Sex differences in the emotional behaviour of laboratory mice. **British Journal of Psychology**, v. 68, n. 1, p. 125–131, 1977.

BAILEY, C. R. et al. Recent progress in understanding the pathophysiology of post-traumatic stress disorder. **CNS Drugs**, v. 27, n. 3, p. 221–232, 2013.

BALI, A.; RANDHAWA, P. K.; JAGGI, A. S. Stress and opioids: Role of opioids in modulating stress-related behavior and effect of stress on morphine conditioned place preference. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 51, p. 138–150, 2015.

BANGASSER, D. A. et al. Sex differences in stress regulation of arousal and cognition. **Physiology and Behavior**, v. 187, p. 42–50, 2018.

BANGASSER, D. A.; WIERSIELIS, K. R. Sex differences in stress responses: a critical role for corticotropin-releasing factor. **Hormones**, v. 17, p. 5–13, 2018.

BANNERMAN, D. M. et al. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 181–192, 2014.

BARFIELD, E. T. et al. β -Endorphin modulates the effect of stress on novelty-suppressed feeding. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, n. 19, p. 1–7, 2013.

BECKER, J. B.; PRENDERGAST, B. J.; LIANG, J. W. Female rats are not more variable than male rats: A meta-analysis of neuroscience studies. **Biology of Sex Differences**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2016.

BEERY, A. K.; ZUCKER, I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 565–572, 2011.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Crouching as an index of fear. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 67, n. 3, p. 370–375, 1969.

BODNAR, R. J. Endogenous opiates and behavior. **Peptides**, v. 101, p. 167–212, 2018.

BONNE, O. et al. Reduced posterior hippocampal volume in posttraumatic stress disorder. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 69, n. 7, p. 1087–1091, 2008.

BRADY, K. T. et al. Comorbid substance abuse and posttraumatic stress disorder. **The American Journal on Addictions**, v. 3, n. 2, p. 160–164, 2010.

BRYANT, R. A. et al. A study of the protective function of acute morphine administration on subsequent posttraumatic stress disorder. **Biological Psychiatry**, v. 65, n. 5, p. 438–440, 2009.

CAMPOS, A. C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, p. 101–111, 2013.

CAREAGA, M. B. L.; GIRARDI, C. E. N.; SUCHECKI, D. Understanding posttraumatic stress disorder through fear conditioning, extinction and reconsolidation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 71, p. 48–57, 2016.

CASTELLANO, C. et al. Effects of naloxone and naltrexone on memory consolidation in CD1 mice: Involvement of GABAergic mechanisms. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 32, n. 2, p. 563–567, 1989.

CASTELLANO, C. et al. The effects of morphine on memory consolidation in mice involve both D1 and D2 dopamine receptors. **Behavioral and Neural Biology**, v. 61, p. 156–161, 1994.

CENQUIZCA, L. A.; SWANSON, L. W. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. **Brain Research Reviews**, v. 56, n. 1, p. 1–26, 2007.

CHANG, Y. J. et al. Estrogen modulates sexually dimorphic contextual fear extinction in rats through estrogen receptor β . **Hippocampus**, v. 19, n. 11, p. 1142–1150, 2009.

CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress response. **Annual Review of Physiology**, v. 67, p. 259–284, 2005.

CLAYTON, J. A.; COLLINS, F. S. NIH to balance sex in cell and animal studies. **Nature**, v. 509, n. 7500, p. 282–283, 2014.

CONTET, C. et al. Dissociation of analgesic and hormonal responses to forced swim stress using opioid receptor knockout mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 8, p. 1733–1744, 2006.

DASH, P. K.; HEBERT, A. E.; RUNYAN, J. D. A unified theory for systems and cellular memory consolidation. **Brain Research Reviews**, v. 45, n. 1, p. 30–37, 2004.

DREW, M. R.; HUCKLEBERRY, K. A. Modulation of aversive memory by adult hippocampal neurogenesis. **Neurotherapeutics**, v. 14, n. 3, p. 646–661, 2017.

DROLET, G. et al. Role of endogenous opioid system in the regulation of the stress response. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 25, n. 4, p. 729–741, 2001.

DUARTE, D. F. Opium and opiates: a brief history. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 55, n. 1, p. 135–146, 2005.

DUDAI, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? **Annual Review of Psychology**, v. 55, n. 1, p. 51–86, 2004.

DUDAI, Y. The restless engram: Consolidations never end. **Annual Review of Neuroscience**, v. 35, p. 227–247, 2012.

DUNSMOOR, J. E.; MURPHY, G. L. Categories, concepts, and conditioning: how humans generalize fear. **Trends in cognitive sciences**, v. 19, n. 2, p. 73–7, 2015.

EAGLE, A. L. et al. Role of hippocampal activity-induced transcription in memory consolidation. **Reviews in the Neurosciences**, v. 27, n. 6, p. 559–573, 2016.

EIPPERT, F. et al. Blockade of endogenous opioid neurotransmission enhances acquisition of conditioned fear in humans. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 21, p. 5465–5472, 2008.

ETKIN, A.; BÜCHEL, C.; GROSS, J. J. The neural bases of emotion regulation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 11, p. 693–700, 2015.

FANSELOW, M. S. et al. Differential effects of selective opioid peptide antagonists on the acquisition of Pavlovian fear conditioning. **Peptides**, v. 12, n. 5, p. 1033–1037, 1991.

FANSELOW, M. S.; CALCAGNETTI, D. J.; HELMSTETTER, F. J. Modulation of appetitively and aversively motivated behavior by the kappa opioid antagonist MR2266. **Behavioral Neuroscience**, v. 103, n. 3, p. 663–672, 1989.

FANSELOW, M. S.; DONG, H.-W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 1–25, 2010.

FARRELL, M. R.; SENGELAUB, D. R.; WELLMAN, C. L. Sex differences and chronic stress effects on the neural circuitry underlying fear conditioning and extinction. **Physiology & Behavior**, v. 122, p. 208–215, 2013.

FERRARIS, M. et al. The nucleus reuniens, a thalamic relay for cortico-hippocampal interaction in recent and remote memory consolidation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 125, p. 339–354, 2021.

FLANDREAU, E. I.; TOTH, M. Animal models of PTSD: A critical review. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 38, p. 47–68, 2018.

FRANZEN, J. M.; GIACHERO, M.; BERTOGLIO, L. J. Dissociating retrieval-dependent contextual aversive memory processes in female rats: Are there cycle-dependent differences?. **Neuroscience**, v. 406, p. 542–553, 2019.

FREDES, F. et al. Ventro-dorsal hippocampal pathway gates novelty-induced contextual memory formation. **Current Biology**, v. 31, n. 1, p. 25–38.e5, 2021.

FRIEDMAN, M. J. What might the psychobiology of posttraumatic stress disorder teach us about future approaches to pharmacotherapy?. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 61, n. 7, p. 44–51, 2000.

GALLAGHER, M.; KAPP, B. S. Manipulation of opiate activity in the amygdala alters memory processes. **Life Sciences**, v. 23, n. 19, 1978.

GALLISTEL, C. R. The physical basis of memory. **Cognition**, p. 104533, 2020.

GIACHERO, M. **Interacción entre un evento traumático y las fases de procesamiento de una memoria emocional: modulación farmacológica**. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba, 2013.

GILMARTIN, M. R.; BALDERSTON, N. L.; HELMSTETTER, F. J. Prefrontal cortical regulation of fear learning. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 8, p. 455–464, 2014.

GLOVER, E. M.; JOVANOVIĆ, T.; NORRHOLM, S. D. Estrogen and extinction of fear memories: Implications for posttraumatic stress disorder treatment. **Biological Psychiatry**, v. 78, n. 3, p. 178–185, 2015.

GOELET, P. et al. The long and the short of long-term memory - A molecular framework. **Nature**, v. 322, n. 6078, p. 419–422, 1986.

GRADUS, J. L. Prevalence and prognosis of stress disorders: A review of the epidemiologic literature. **Clinical Epidemiology**, v. 9, p. 251–260, 2017.

GRECO, J. A.; LIBERZON, I. Neuroimaging of Fear-Associated Learning. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 320–334, 2016.

GRISEL, J. E. et al. Influence of β -Endorphin on anxious behavior in mice: Interaction with EtOH. **Psychopharmacology**, v. 200, n. 1, p. 105–115, 2008.

GUPTA, R. R. et al. Estrogen modulates sexually dimorphic contextual fear conditioning and hippocampal long-term potentiation (LTP) in rats. **Brain Research**, v. 888, n. 2, p. 356–365, 2001.

HAMANN, S. B. et al. Amygdala activity related to enhanced memory for pleasant stimuli. **Nature Neuroscience**, v. 2, p. 289–293, 1999.

HEBB, D. O. The organization of behavior. **New York: Wiley**, 1949.

HERRY, C.; JOHANSEN, J. P. Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 12, p. 1644–1654, 2014.

HOLBROOK, T. L. et al. Morphine use after combat injury in Iraq and post-traumatic stress disorder. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 2, p. 110–117, 2010.

HUNT, K. et al. Do women consult more than men? A review of gender and consultation for back pain and headache. **Journal of Health Services Research and Policy**, v. 16, n. 2, p. 108–117, 2011.

INTROINI-COLLISON, I. B.; NAGAHARA, A. H.; MCGAUGH, J. L. Memory enhancement with intra-amygdala post-training naloxone is blocked by concurrent administration of propranolol. **Brain Research**, v. 476, n. 1, p. 94–101, 1989.

INTROINI, I. B.; MCGAUGH, J. L.; BARATTI, C. M. Pharmacological evidence of a central effect of naltrexone, morphine, and β -endorphin and a peripheral effect of met- and leu-enkephalin on retention of an inhibitory response in mice. **Behavioral and Neural Biology**, v. 6, n. 44, p. 434–446, 1985.

IZQUIERDO, I. Effect of naloxone and morphine on various forms of memory in the rat: Possible role of endogenous opiate mechanisms in memory consolidation. **Psychopharmacology**, v. 66, n. 2, p. 199–203, 1979.

IZQUIERDO, I. Effect of β -endorphin and naloxone on acquisition, memory, and retrieval of shuttle avoidance and habituation learning in rats. **Psychopharmacology**, v. 69, n. 1, p. 111–115, 1980.

IZQUIERDO, I.; GRAUDENZ, M. Memory facilitation by naloxone is due to release of dopaminergic and beta-adrenergic systems from tonic inhibition. **Psychopharmacology**, v. 67, n. 3, p. 265–268, 1980.

JAYACHANDRAN, S. The Roots of gender inequality in developing countries. **Annual Review of Economics**, v. 7, n. 1, p. 63–88, 2015.

JOEL, D.; MCCARTHY, M. M. Incorporating sex as a biological variable in neuropsychiatric research: where are we now and where should we be? **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 2, p. 1–7, 2017.

KISHI, T. et al. Topographical projection from the hippocampal formation to the amygdala: A combined anterograde and retrograde tracing study in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 496, n. 3, p. 349–368, 2006.

KITAMURA, T. et al. Hippocampal function is not required for the precision of remote place memory. **Molecular Brain**, v. 5, n. 1, p. 1–8, 2012.

KITAMURA, T. et al. Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. **Science**, v. 356, n. 6333, p. 73–78, 2017.

KNOLL, A. T. et al. Kappa opioid receptor signaling in the basolateral amygdala regulates conditioned fear and anxiety in rats. **Biological Psychiatry**, v. 70, n. 5, p. 425–433, 2011.

KOKRAS, N.; DALLA, C. Sex differences in animal models of psychiatric disorders. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 20, p. 4595–4619, 2014.

LABAR, K. S.; CABEZA, R. Cognitive neuroscience of emotional memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 54–64, 2006.

LANDEIRA-FERNANDEZ, J. et al. Immediate shock deficit in fear conditioning: Effects of shock manipulations. **Behavioral Neuroscience**, v. 120, n. 4, p. 873–879, 2006.

LAW, P. Y.; LOH, H. H. Opioid receptors. **Encyclopedia of Biological Chemistry**, p. 354–358, 2013.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 23, p. 155–184, 2000.

LEDOUX, J. E.; HOFMANN, S. G. The subjective experience of emotion: a fearful view. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 19, p. 67–72, 2018.

LIU, Y. et al. Memory consolidation reconfigures neural pathways involved in the suppression of emotional memories. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–12, 2016.

MANZANO-NIEVES, G. et al. Early life stress impairs contextual threat expression in female, but not male, mice. **Behavioral Neuroscience**, v. 132, n. 4, p. 247–257, 2018.

MAREN, S.; PHAN, K. L.; LIBERZON, I. The contextual brain: Implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 417–428, 2013.

MAREN, S.; QUIRK, G. J. Neuronal signalling of fear memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 11, p. 844–852, 2004.

MCDONALD, J.; LAMBERT, D. Opioid receptors. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**, v. 15, n. 5, p. 219–224, 2014.

MCDONALD, J.; LAMBERT, D. G. Opioid mechanisms and opioid drugs. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 14, n. 11, p. 505–509, 2013.

MCGAUGH, J. L. Memory - A century of consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248–251, 2000.

MCGAUGH, J. L. Making lasting memories: Remembering the significant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 2, p. 10402–10407, 2013.

MCLEAN, C. P.; ANDERSON, E. R. Brave men and timid women? A review of the gender differences in fear and anxiety. **Clinical Psychology Review**, v. 29, n. 6, p. 496–505, 2009.

MCNALLY, G. P.; WESTBROOK, R. F. Opioid receptors regulate the extinction of pavlovian fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 117, n. 6, p. 1292–1301, 2003.

MCNEMAR, Q.; STONE, C. P. Sex differences in rats on three learning tasks. **Journal of Comparative Psychology**, v. 14, n. 1, p. 171–180, 1932.]

MEIR DREXLER, S. et al. Stress modulation of fear and extinction in psychopathology and treatment. **Neuroforum**, v. 26, n. 3, p. 133–141, 2020.

MERLO, E. et al. Reconsolidation and extinction are dissociable and mutually exclusive processes: Behavioral and molecular evidence. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 7, p. 2422–2431, 2014.

MILAD, M. R. et al. Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. **Neuroscience**, v. 164, n. 3, p. 887–895, 2009.

MILAD, M. R.; GRAHAM, B. M. Blockade of estrogen by hormonal contraceptives impairs fear extinction in female rats and women. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 4, p. 371–378, 2014.

MILNER, T. A. et al. Stress differentially alters mu opioid receptor density and trafficking in parvalbumin-containing interneurons in the female and male rat hippocampus. **Synapse**, v. 67, n. 11, p. 757–772, 2013.

MIRY, O.; LI, J.; CHEN, L. The quest for the hippocampal memory engram: from theories to experimental evidence. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 14, p. 1–11, 2021.

MIRZAEI, M. et al. Prevalence of depression, anxiety and stress among adult population: Results of yazd health study. **Iranian Journal of Psychiatry**, v. 14, n. 2, p. 137–146, 2019.

MÜLLER, G. E.; PILZECKER, A. Experimentelle beiträge zur lehre von gedächtniss. **Zeitschrift für Psychologie und Physiologie der Sinnesorgane**, v. 1, p. 1–288, 1900.

NADEL, L.; MOSCOVITCH, M. Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 7, n. 2, p. 217–227, 1997.

NADER, K.; HARDT, O. A single standard for memory: The case for reconsolidation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 224–234, 2009.

NAKAGAWASAI, O. et al. Changes in beta-endorphin and stress-induced analgesia in mice after exposure to forced walking stress. **Methods and Findings in Experimental & Clinical Pharmacology**, v. 21, n. 7, p. 471–476, 1999.

NIXON, R. D. V. et al. Predictors of posttraumatic stress in children following injury: The influence of appraisals, heart rate, and morphine use. **Behaviour Research and Therapy**, v. 48, n. 8, p. 810–815, 2010.

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

PHELPS, E. A. Human emotion and memory: Interactions of the amygdala and hippocampal complex. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 14, n. 2, p. 198–202, 2004.

PORTO, G. P. et al. Effect of morphine on the persistence of long-term memory in rats. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 10, p. 1747–1753, 2015.

POWELL, D. A.; BUCHANAN, S. L.; HERNANDEZ, L. L. Classical (Pavlovian) conditioning models of age-related changes in associative learning and their neurobiological substrates. **Progress in Neurobiology**, v. 36, p. 201–228, 1991.

RABER, J. et al. Current understanding of fear learning and memory in humans and animal models and the value of a linguistic approach for analyzing fear learning and memory in humans. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 105, p. 136–177, 2019.

RADULOVIC, J.; JOVASEVIC, V.; MEYER, M. A. A. Neurobiological mechanisms of state-dependent learning. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 45, p. 92–98, 2017.

RODRIGUEZ, P.; HOLOWKA, D. W.; MARX, B. P. Assessment of posttraumatic stress disorder-related functional impairment: A review. **The Journal of Rehabilitation Research and Development**, v. 49, n. 5, p. 649, 2012.

SANDERS, M. J.; KIEFFER, B. L.; FANSELOW, M. S. Deletion of the mu opioid receptor results in impaired acquisition of Pavlovian context fear. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 84, n. 1, p. 33–41, 2005.

SARA, S. J. Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. **Learning and Memory**, v. 7, n. 2, p. 73–84, 2000.

SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 11–21, 1957.

SEMON, R. W. **The Mneme**. London: Allen & Unwin Ltd., The Macmillan company, 1921.

SENN, V. et al. Long-range connectivity defines behavioral specificity of amygdala neurons. **Neuron**, v. 81, n. 2, p. 428–437, 2014.

SHANSKY, R. M. Challenges for animal models of fear learning. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 60–65, 2015.

SHANSKY, R. M. Animal studies in both sexes. **Science**, v. 364, n. 6443, p. 825–826, 2019.

STODDARD, F. J. et al. Preliminary evidence for the effects of morphine on posttraumatic stress disorder symptoms in one- to four-year-olds with burns. **Journal of Burn Care & Research**, v. 30, n. 5, p. 836–843, 2009.

SZCZYTKOWSKI-THOMSON, J. L.; LEBONVILLE, C. L.; LYSLE, D. T. Morphine prevents the development of stress-enhanced fear learning. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 3, p. 672–677, 2013.

TAN, Z. H. et al. Pavlovian conditioning demonstrated with neuromorphic memristive devices. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

TONEGAWA, S. et al. Memory engram cells have come of age. **Neuron**, v. 87, n. 5, p. 918–931, 2015.

TORRES-BERRIO, A.; NAVA-MESA, M. O. The opioid system in stress-induced memory disorders: From basic mechanisms to clinical implications in post-traumatic stress disorder and Alzheimer's disease. **Progress in NeuroPsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 88, p. 327–338, 2019.

TRIVEDI, M.; SHAIKH, S.; GWINNUT, C. Pharmacology of opioids. **Anaesthesia Tutorial of the Week**, p. 118–124, 2007.

UKAI, M.; HUI, P. L. Endomorphins 1 and 2 induce amnesia via selective modulation of dopamine receptors in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 446, n. 1–3, p. 97–101, 2002.

VALENTINO, R. J.; VAN BOCKSTAELE, E. Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. **European Journal of Pharmacology**, v. 583, n. 2–3, p. 194–203, 2008.

VALENTINO, R. J.; VAN BOCKSTAELE, E. Endogenous opioids: The downside of opposing stress. **Neurobiology of Stress**, v. 1, n. 1, p. 23–32, 2015.

VAVERKOVÁ, Z.; MILTON, A. L.; MERLO, E. Retrieval-dependent mechanisms affecting emotional memory persistence: reconsolidation, extinction, and the space in between. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 14, p. 1–12, 2020.

VINCENT, S. B. The white rat and the maze problem: The introduction of a visual control. **Journal of Animal Behavior**, v. 5, n. 1, p. 1–24, 1915.

WESTBROOK, R. F.; GOOD, A. J.; KIERNAN, M. J. Microinjection of morphine into the nucleus accumbens impairs contextual learning in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 111, n. 5, p. 996–1013, 1997.

YANG, Y.; WANG, J.-Z. From structure to behavior in basolateral amygdala-hippocampus circuits. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 11, p. 1–8, 2017.

ZARRINDAST, M. R. et al. The time profile of morphine effect on different phases of inhibitory avoidance memory in rat. **Archives of Iranian Medicine**, v. 16, n. 1, p. 34–37, 2013.

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES MU-OPIOIDES NO HIPOCAMPO DORSAL DE RATAS NAS ETAPAS DE CONSOLIDAÇÃO E RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL.", protocolada sob o CEUA nº 2018170919 (ID 001549), sob a responsabilidade de **Thereza Christina Monteiro de Lima** e equipe; Mariana Cardoso Silvério - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 10/03/2020.

We certify that the proposal "ROLE OF DORSAL HIPPOCAMPUS MU-OPIOID RECEPTORS IN CONTEXTUAL AVERSIVE MEMORY CONSOLIDATION AND RECONSOLIDATION IN FEMALE RATS.", utilizing 462 Heterogenics rats (462 females), protocol number CEUA 2018170919 (ID 001549), under the responsibility of **Thereza Christina Monteiro de Lima** and team; Mariana Cardoso Silvério - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 03/10/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **12/2019** a **02/2021** Área: **Farmacologia**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **90 a 110 dias**

N: **462**

Linhagem: **Rattus norvegicus/Wistar**

Peso: **180 a 240 g**

Local do experimento: Laboratório de neurofarmacologia - CCB- UFSC- Sala 307.

Florianópolis, 12 de março de 2020

Maurício Laterça Martins

Presidente pro tempore da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina