

BEATRIZ MONFERRARI MARTINS

**MODULAÇÃO QUIMIOGENÉTICA DO SISTEMA DE RECOMPENSA EM RATOS
SUBMETIDOS AO TESTE DE PREFERÊNCIA CONDICIONADA AO LUGAR**

BRASÍLIA, 2026

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

BEATRIZ MONFERRARI MARTINS

**MODULAÇÃO QUIMIOGENÉTICA DO SISTEMA DE RECOMPENSA EM RATOS
SUBMETIDOS AO TESTE DE PREFERÊNCIA CONDICIONADA AO LUGAR**

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília**

Orientador: Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior Coorientadora:

Dra. Aline Caron Leivas Leite

BRASÍLIA

2026

BEATRIZ MONFERRARI MARTINS

**MODULAÇÃO QUIMIOGENÉTICA DO SISTEMA DE RECOMPENSA EM RATOS
SUBMETIDOS AO TESTE DE PREFERÊNCIA CONDICIONADA AO LUGAR**

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília**

Aprovada em __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior (CFS/IB/UnB) - Orientador

Dra. Aline Caron Leivas Leite (UnB) - Coorientadora

Prof. Dr. Maurício Homem de Mello (FAR/FS/UnB)

Profa. Dra. Lilian dos Anjos Carneiro (Unieuro)

Profa. Dra. Luana Cristina Camargo (PPB/IP/UnB)

AGRADECIMENTOS

À minha família que vibra e festeja cada notícia. Especialmente, agradeço à minha mãe por tudo! Desde sempre acreditou – e acredita – em mim, não importando o tamanho do desafio. Você é meu exemplo e minha maior companheira. Ao Jackson que me incentiva, apoia e sempre coloca na minha cabeça as coisas que “são para mim”. Vocês me deram todo o apoio, acolhimento, entendimento e suporte em todas as etapas e não existem palavras para agradecer a grandeza disso!

Ao Lucas que é esse grande companheiro de vida, que lidou com todos os estresses inerentes de uma pesquisa (amplificados pelo meu drama), me dando todo apoio, suporte e soluções óbvias. Cada conversa, entendimento e planejamento foram e são essenciais para mim. Aos meus sogros e todos os membros dessa “segunda família” que me acolheram desde sempre!

À Let e Isa, na categoria “família que o coração escolhe”, que são essa presença constante e essencial. A vida pessoal, acadêmica e profissional é muito melhor e mais fácil com vocês! Agradeço também ao Henrique, primeiro sobrinho do grupo, que uniu a gente ainda mais! Se eu escrever mais, as 3 choram.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Maior, que é essa enciclopédia ambulante e uma fonte quase inesgotável de conhecimentos gerais. Seus ensinamentos vão além da pesquisa e guiam, mesmo sem perceber. À minha coorientadora Aline, que vivenciou a “pesquisa de bancada” comigo em todas as fases com toda a sua bagagem no tema. Aos colegas do Laboratório NeuroComp, Maria Camila e João Bicca, que vivenciaram o dia a dia da pesquisa com seus (muitos) desafios, vitórias e crescimento. Aos estagiários, em especial Arthur Koller.

Aos colaboradores: Laboratório NeuroPharma da Profa. Dra. Márcia Mortari, por todos os ensinamentos e insumos imprescindíveis; ao Laboratório de Reprodução Animal da Profa. Dra. Carolina Lucci e com carinho especial à Juliana Lis, pela amizade e seus muitos ensinamentos; ao Laboratório Neurovirologia Molecular, em especial ao Julys; ao médico veterinário Dr. Rafael Andrade, ao biotério da FM e ao biotério da UniEVANGÉLICA de Anápolis.

Às professoras doutoras Djane, Verônica e Júlia. Vocês são um enorme exemplo tanto no âmbito acadêmico/profissional quanto no âmbito pessoal. Obrigada pelo acolhimento, reconhecimento e direcionamento que sempre tiveram comigo.

Às amigadas que sempre se fazem presente de alguma forma e melhoram a vida, em especial: Milena Arcoverde, Letícia Leal, Vitória Ferreira, Marcela Souza, Mariana Bicalho, Pedro Coelho e Jéssica Weschenfelder.

À Yallen, minha psicóloga, que acompanhou tudo, me ouviu e me ajudou em todos os âmbitos e, certamente, me fortaleceu.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (PPGCS – FS – UnB). Aos professores que compartilharam seus conhecimentos nessa jornada do Mestrado. À Fundação de Apoio à Pesquisa (FAPDF) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro do projeto. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Por fim e muito importante, aos animais que foram sujeitos dessa pesquisa.

Resumo

O Transtorno por Uso de Substâncias (TUS) é um problema de saúde global, caracterizado pelo uso recorrente e compulsivo de certas substâncias, apesar das consequências adversas. A neurobiologia do TUS envolve alterações do sistema mesocorticolímbico, também conhecido como sistema de recompensas, em particular das vias dopaminérgicas. O entendimento dos mecanismos subjacentes a este sistema, bem como o impacto do reforço ambiental intrinsecamente ligado ao quadro, é fundamental para o desenvolvimento de terapias mais eficazes. Nesse cenário, a quimiogenética, com o desenvolvimento da técnica de receptor desenhado que se ativa exclusivamente por uma droga desenhada (*Designer receptor exclusively activated by designer drugs* - DREADDs), possibilita a neuromodulação de circuitos, de maneira temporária, reversível e atóxica, em populações celulares geneticamente definidas, o que agrega ao método uma precisão sem precedentes para o estudo de sistemas e vias neurais específicas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos comportamentais da modulação quimiogenética da via mesolímbica no paradigma de preferência condicionada ao lugar (*conditioning place preference* - CPP). CPP em ratos Wistar. Foram utilizados dois vetores virais, ambos expressando receptores inibitórios com tropismo para neurônio e interneurônio, respectivamente, direcionados às regiões do núcleo *accumbens* e da área tegmental ventral. Os animais foram submetidos ao aparato de CPP mediante ativação dos receptores por *Clozapine N – oxide* (CNO) 5 mg/Kg *i.p.* Adicionalmente, o teste de CPP foi realizado com o fármaco cetamina 10 mg/Kg *i.p.* O delineamento experimental foi separado nas fases de habituação, condicionamento e teste, com pequenas variações entre os grupos de acordo com o protocolo cirúrgico e dados da literatura. As análises estatísticas foram feitas com o *software GraphPad Prisma*. A modulação do sistema mesolímbico, de maneira isolada, por ambos os vetores, não demonstrou alteração comportamental relevante, tampouco o grupo controle do fármaco ativador CNO demonstrou gerar preferência, ao passo que cetamina demonstrou preferência, quando comparado aos dados da linha de base dos sujeitos experimentais em recortes temporais específicos. A análise histológica comprovou a expressão nos alvos cirúrgicos. Os resultados demonstram que a modulação feita pela quimiogenética não é suficiente para ativar o sistema de recompensa e, desta forma, pode associar a citada metodologia a testes envolvendo substâncias de abuso, a fim de identificar a possibilidade de modular um sistema previamente ativado. A preferência gerada pela cetamina 10 mg/Kg não foi uniforme, sendo necessários mais testes para firmar sua padronização. Os achados proporcionam base para pesquisas que mimetizem o estado neuronal de pacientes do TUS, com intuito de desenvolver alvos terapêuticos farmacológicos mais precisos no tratamento.

Palavras-chave: Dependência; condicionamento clássico; DREADDs; cetamina.

Abstract

Substance Use Disorder (SUD) is a global health problem, characterized by the recurrent and compulsive use of certain substances, despite adverse consequences. The neurobiology of SUD involves alterations in the mesocorticolimbic system, also known as the reward system, particularly the dopaminergic pathways. Understanding the mechanisms underlying this system, as well as the impact of environmental reinforcement intrinsically linked to the condition, is fundamental for the development of more effective therapies. In this scenario, chemogenetics, with the development of the Designer receptor exclusively activated by designer drugs (DREADDs) technique, enables the neuromodulation of circuits, in a temporary, reversible, and non-toxic manner, in genetically defined cell populations, which adds unprecedented precision to the method for the study of specific neural systems and pathways using the conditioned place preference (CPP) test. The test quantifies the preference the subject develops by associating the administration of the substance with environmental cues, reflecting the motivation for seeking and associative learning, based on the time spent in the conditioned environment. The objective of the present work was to evaluate the behavioral effects of chemogenetic modulation of the mesolimbic pathway in the CPP paradigm in Wistar rats. Two viral vectors were used, both expressing inhibitory receptors with tropism for neurons and interneurons, respectively, targeted to the nucleus *accumbens* and ventral tegmental area. The animals were subjected to the CPP apparatus upon activation of the receptors by CNO 5 mg/Kg *i.p.* Additionally, the CPP test was performed with the drug ketamine 10 mg/Kg *i.p.* The experimental design was divided into habituation, conditioning, and testing phases, with slight variations between groups according to the surgical protocol and literature data. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software. Modulation of the mesolimbic system, in isolation, by both vectors, did not show relevant behavioral alteration, nor did the control group of the activating drug Clozapine N-oxide (CNO) demonstrate preference generation, while ketamine demonstrated preference when compared to the baseline data of the experimental subjects at specific time points. Histological analysis confirmed expression at the surgical targets. The results demonstrate that the modulation performed by chemogenetics is not sufficient to activate the reward system and, therefore, can associate the mentioned methodology with tests involving substances of abuse, in order to identify the possibility of modulating a previously activated system. The preference generated by ketamine 10 mg/Kg was not uniform, requiring further testing to establish its standardization. The findings provide a basis for research that mimics the neuronal state of SUD patients, with the aim of developing more precise pharmacological therapeutic targets for treatment.

Key words: Dependence; conditioning-place-preference; DREADDs; ketamine.

Lista de figuras

Figura 1 A – Transformação da Tirosina a Dopamina e B – Reciclagem de vesículas. (Template Biorender).....	23
Figura 2 Vias dopaminérgicas. Vermelho - Via nigroestriatal; Azul – Via mesolímbica; Verde – Via mesocortical e Roxo – Via tuberoinfundibular. (Template Biorender).....	24
Figura 3 A – CNO e B – clozapina. (National Library of Medicine, a e b).....	33
Figura 4 Esquema do plasmídeo: promotor (verde), gene do receptor (azul) e gene da proteína de marcação (vermelho). Feita no Biorender.	34
Figura 5 Esquematização da utilização da técnica DREADD. Vetor Adenovírus com material genético contendo promotor (verde), gene do receptor (azul) e gene da proteína de marcação (vermelho); infusão do material na célula-alvo, internalização do material genético. Feita no Biorender.	35
Figura 6 Estrutura química da CET C13H16ClNO. (National Library of Medicine, c).	38
Figura 7 Aparato experimental: A – Aparato com livre acesso e B – Aparato com barreira. Fonte própria.....	45
Figura 8 Cronograma Experimento 1: Controle CNO; Grupo 1 n = 4. Feita no Biorender.	47
Figura 9 Tempo gasto no CC por sessão. A e E – sessão completa; B e F – recorte dos 10 minutos iniciais; C e G – recorte dos 15 minutos iniciais; e D e H – recorte dos 15 minutos finais. As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por Teste Wilcoxon pareado.	48
Figura 10 A – Distância percorrida, em metros, por sessão e B – Duração da exploração, em segundos, por sessão. Resultados apresentados como média ± erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por One-way ANOVA repeated measures.	49
Figura 11 Tempo total de imobilidade, em segundos, por sessão. As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por One-way ANOVA repeated measures	49
Figura 12 Duração do grooming, em segundos, por sessão. Resultado apresentado como média ± erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por Oneway ANOVA repeated measures.....	50
Figura 13 Frequência de Tremor por sessão. Resultado apresentado como média ± erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por One-way ANOVA repeated measures.....	50
Figura 14 Cronograma Experimento 2: Cetamina; Grupos CET 3 e CET 5 n = 8. Feita no Biorender.	52
Figura 15 Tempo gasto no CC por sessão grupo CET 3. A e E – sessão completa; B e F – recorte dos 10 minutos iniciais; C e G – recorte dos 15 minutos iniciais; e D e H – recorte dos 15 minutos finais. As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por Teste t pareado (A, B, C, E, F e G) e Teste Wilcoxon pareado (D e H). Símbolo de significância estatística * p < 0,05.	53
Figura 16 Tempo gasto no CC por sessão grupo CET 5. A e E – sessão completa; B e F – recorte dos 10 minutos iniciais; C e G – recorte dos 15 minutos iniciais; e D e H – recorte dos 15 minutos finais. As comparações entre sessões do mesmo grupo foram	

feitas por Teste t pareado (A, B, C, E, F e G) e Teste Wilcoxon pareado (D e H). Símbolo de significância estatística * $p < 0,05$	54
<i>Figura 17 Distância percorrida, em metros, por sessão dos grupos CET 3 e CET 5, com seus recortes temporais, todos tratados com CET 10 mg/Kg i.p. A – grupo CET 3 (sessão inteira); B – grupo CET 3 (recorte dos 15 minutos iniciais); C – grupo CET 3 (recorte dos 15 minutos finais), D – grupo CET 5 (sessão inteira); E – grupo CET 5 (recorte dos 15 minutos iniciais); e F – grupo CET 5 (recorte dos 15 minutos finais). Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por One-way ANOVA repeated measures (B, D e E); e Teste Friedman ANOVA (A, C e F). Símbolo de significância estatística * $p < 0,05$.</i>	55
Figura 18 Track plot animal do grupo CET 3. A – Padrão de locomoção Teste 1; B – padrão de locomoção Teste 2.....	56
<i>Figura 19 Duração da exploração, em segundos, por sessão. A – grupo CET 3 e B – grupo CET 5. Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por One-way ANOVA repeated measures. Símbolo de significância estatística $p < 0,05$.</i>	56
<i>Figura 20 Tempo total de imobilidade, em segundos, por sessão. A – grupo CET 3 e B – grupo CET 5. As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por A – One-way ANOVA repeated measures e B – Teste Friedman. Símbolo de significância estatística $p < 0,05$.</i>	57
<i>Figura 21 Duração do grooming, em segundos, por sessão. A – grupo CET 3 e B – grupo CET 5. Resultados apresentados como média ± erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por A – One-way ANOVA repeated measures e B – Teste Friedman.....</i>	57
Figura 22 Frequência de Tremor por sessão. A – grupo CET 3 e B – grupo CET 5. Resultado apresentado como média ± erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas pelo Teste Friedman.	58
Figura 23 Média do tempo gasto no CC por sessão Experimento 2. A – grupo CET 3; B – grupo CET 5. Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (SEM). As comparações entre as médias de cada sessão do mesmo grupo foram feitas por One-way ANOVA repeated measures (A) e Teste Friedman (B).....	59
Figura 24 Correlação de Tempo e Distância vs. Score de Ataxia dos grupos CET 3 e CET 5 juntos. A – Correlação Tempo no CC do Teste 1 com o score de Ataxia, coeficiente $r = 0,7658$; B – Correlação Tempo no CC do Teste 2 com o score de Ataxia, coeficiente $r = 0,5787$; C – Correlação Distância percorrida no Teste 1 com o score de Ataxia, coeficiente $r = 0,6112$; D – Correlação Distância percorrida no Teste 2 com o score de Ataxia, coeficiente $r = 0,4797$. Coeficiente de correlação de Pearson.	60
Figura 25 A) Diestro e B) Proestro.....	61
Figura 27 Alvos da infusão viral; A - NAc e B - VTA com angulação de 10°. Fonte Paxinos & Watson, (2007).....	63
Figura 28 A – vírus 1 e B – vírus 2. Fonte Fishell; B. Roth.	64
Figura 26 Cronograma Experimento 3 – Fase Cirúrgica. Cirurgia de infusão dos vetores virais hDlx.hM4d e CaMKIIa.hM4d nos alvos NAc e VTA. Grupos NAc-hDlx e NAc-CaMK n = 6 e grupos VTA-hDlx e VTA-CaMK n = 4. Feito no Biorender.....	66

Figura 29 Expressão do vetor AAV1.hDlx.hM4D(Gi)-dTomato.Fishell5 no NAc. Em azul núcleos celulares e em vermelho células que expressaram o receptor. A, B e C são a representação de diferentes animais do grupo NAc-hDlx com aumento de 4x.	68
Figura 30 Expressão do vetor AAV8.CaMKIIa.hM4D(Gi)-mCherry no NAc. Em azul núcleos celulares e em vermelho células que expressaram o receptor. A e B são a representação de diferentes animais do grupo NAc-CaMK com aumento de 4x.	69
Figura 31 Corte horizontal para evidenciar estrutura da Comissura Anterior (ponto vermelho). Fonte Gaidica, (2006).	70
Figura 32 Representação gráfica, em vermelho, da expressão dos grupos com alvo no NAc. Fonte Gaidica, (2006) modificado.	71
Figura 33 Expressão do vetor AAV1.hDlx.hM4D(Gi)-dTomato.Fishell5 na VTA. Em azul núcleos celulares e em vermelho células que expressaram o receptor. A – aumento de 4x, B e C – aumento de 10x, e D – aumento de 20x. São a representações de diferentes animais do grupo VTA hDlx.	72
Figura 34 Expressão do vetor AAV8.CaMKIIa.hM4D(Gi)-mCherry na VTA. Em azul núcleos celulares e em vermelho células que expressaram o receptor. A – aumento de 4x, B e C – aumento de 10x, e D – aumento de 20x. São a representação de diferentes animais do grupo VTA-CaMK.	73
Figura 35 Representação gráfica, em vermelho, da expressão dos grupos com alvo na VTA. Fonte Gaidica, (2006) modificada.	74
Figura 36 Tempo gasto no CC por sessão grupo NAc-hDlx. A e C – recorte dos 10 minutos iniciais; B e D – recorte dos 15 minutos iniciais. As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por Teste Wilcoxon pareado.	75
Figura 37 Tempo gasto no CC por sessão grupo NAc-CaMK. A e C – recorte dos 10 minutos iniciais; B e D – recorte dos 15 minutos iniciais. As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por Teste Wilcoxon pareado (A e B) e Teste t pareado (C e D). Símbolo de significância estatística * $p < 0,05$	76
Figura 38 Tempo gasto no CC por sessão grupo VTA-hDlx. A e E – sessão completa; B e F – recorte dos 10 minutos iniciais; C e G – recorte dos 15 minutos iniciais; e D e H – recorte dos 15 minutos finais. As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por Teste t pareado.	77
Figura 39 Tempo gasto no CC por sessão grupo VTA-CaMK. A e E – sessão completa; B e F – recorte dos 10 minutos iniciais; C e G – recorte dos 15 minutos iniciais; e D e H – recorte dos 15 minutos finais. As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por Teste t pareado (A, B, C, E, F e G) e Teste Wilcoxon pareado (D e H).	78
Figura 40 Distância percorrida, em metros, por sessão. A – grupo NAc-hDlx; B – grupo NAc-CaMK; C – grupo VTA-hDlx e D – grupo VTA-CaMK. Resultados apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por One-way ANOVA repeated measures (A, C e D); e Teste Friedman (B).	79
Figura 41 Duração da exploração, em segundos, por sessão. A – grupo NAc-hDlx; B – grupo NAcCaMK; C – grupo VTA-hDlx e D – grupo VTA-CaMK. Resultados apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por One-way ANOVA repeated measures.	80

Figura 42 | Tempo total de imobilidade, em segundos, por sessão. A – grupo NAc-hDlx; B – grupo NAc-CaMK; C – grupo VTA-hDlx e D – grupo VTA-CaMK. As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por Oneway ANOVA repeated measures (A e D); e Teste Friedman (B e C). Símbolo de significância estatística * $p < 0,05$. ..81

Figura 43 | Duração do grooming, em segundos, por sessão. A – grupo NAc-hDlx; B – grupo NAcCaMK; C – grupo VTA-hDlx e D – grupo VTA-CaMK. Resultados apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por One-way ANOVA repeated measures (A e D); e Teste Friedman (B e C).....82

Figura 44 | Frequência de Tremor por sessão. A – grupo NAc-hDlx; B – grupo NAc-CaMK; C – grupo VTA-hDlx e D – grupo VTA-CaMK. Resultados apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por Teste t pareado (A e B); e por One-way ANOVA repeated measures (C e D). Símbolo de significância estatística * $p < 0,05$83

Lista de tabelas

Tabela 1 Níveis de Ataxia	59
-----------------------------------	----

Lista de abreviaturas e siglas

AMPA – α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

AP – ântero-posterior

AAV – *adeno-associated virus*

BLA – *basolateral amygdala* (amígdala basolateral)

cAMP – monofosfato de adenosina cíclico

CAPS – Centros de Atenção Psicossocial

CC – compartimento condicionado

CET – cetamina

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CID-10 – Classificação Internacional de Doenças 10^a revisão

CNO – clozapine N-oxide (N-óxido clozapina)

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CPA – *conditioned place aversion* (aversão condicionada ao lugar)

CPP – *conditioned place preference* (preferência condicionada ao lugar)

CS – *conditioned stimulus* (estímulo condicionante)

DA – dopamina

DAG – diacilglicerol

DAT – Transportador de Dopamina

DREADD – *designer receptors exclusively activated by designer drugs* (receptor desenhado que se ativa exclusivamente por uma droga desenhada)

DSM-V – *Diagnostic and statistical Manual of Mental Disorder 5th edition*

DCZ – descloroclozapina

DV – dorso-ventral

GABA – ácido gama-aminobutírico

GC – *genome copies*

GPCR – *G protein-coupled receptor* (receptor acoplado a proteína G)

HIPP – hipocampo

i.p. – intraperitoneal

IP₃ – Inositol trifosfato

LSD – dietilamida do ácido lisérgico

LTP – *Long-Term Potentiation* (potenciação de longa duração)

MDMA – 3,4-metilenodioximetanfetamina

ML – médio-lateral

Nac – Núcleo *accumbens*

NCC – compartimento não condicionado

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – *phosphate buffered saline*

PFC – córtex pré-frontal

PKA – proteína quinase A

RAPS – Rede de Atenção Psicossocial

s.c. – subcutâneo

SN – *substantia nigra*

SNC – Sistema Nervoso Central

SUS – Sistema Único de Saúde

TH – Tirosina hidroxilase

TUS – Transtorno por Uso de Substâncias (*SUD – substance use disorder*)

UNODC – *United Nations Office on Drugs and Crime* (Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime)

US – *unconditioned stimulus* (estímulo não condicionado)

VGAT – *Vesicular GABA Transporter* (Transportador vesicular de GABA)

VMAT₂ – Transportador Vesicular de Monoaminas

VTA – *ventral tegmental area* (área tegmental ventral)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Conceito	17
1.2 Histórico	19
1.3 Epidemiologia	20
1.4 Fisiologia do Sistema de recompensa	22
1.5 Fisiopatologia do Transtorno por Uso de Substâncias	25
1.5.1 Teoria da dopamina na dependência	25
1.5.2 Tratamentos	29
1.6 A quimiogenética como ferramenta de manipulação neuronal	32
1.7 Teste comportamental de preferência condicionada ao lugar	36
1.8 Cetamina no contexto de CPP	38
2 OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo geral	40
2.2 Objetivos específicos	40
3 METODOLOGIA E RESULTADOS	41
3.1 Sujeitos experimentais	41
3.2 Fármacos e drogas	41
3.3 Análise citológica do ciclo estral	41
3.4 Análise histológica	42
3.5 Análise comportamental e estatística	43
3.6 Teste comportamental	44
3.6.1 Aparato experimental	44
3.7 Experimento 1	47
3.7.1 Resultados	47
3.8 Experimento 2	51
3.8.1 Resultados	53
3.9 Experimento 3	62
3.9.1 Procedimento cirúrgico	62
3.9.2 Protocolo Experimental	65
3.9.2 Resultados	67

4	DISCUSSÃO	84
4.1	Dados vs. Literatura	84
4.1.1	Animais CET	84
4.1.2	Animais submetidos à técnica DREADDs.....	86
4.1.3	Registros comportamentais	90
4.2	Limitações	91
4.2.1	Preferência prévia dos animais	91
4.2.2	Protocolo histologia e registros.....	92
5	CONCLUSÃO.....	93
6	REFERÊNCIAS	94
	ANEXO A – CERTIFICADO CEUA (Experimentos 1 e 3).....	103
	ANEXO B – CERTIFICADO CEUA (Experimento 2).....	104
	APÊNDICE A – PROTOCOLO DAPI EM LÂMINA	105
	APÊNDICE B – PROTOCOLO DAPI <i>FREE-FLOATING</i>	106
	APÊNDICE C – PROTOCOLO HABITUAÇÃO CETAMINA	107
	APÊNDICE D – PROTOCOLO CONDICIONAMENTO CETAMINA.....	115
	APÊNDICE E – PROTOCOLO TESTE CETAMINA	118
	APÊNDICE F – PROTOCOLO HABITUAÇÃO CNO.....	120
	APÊNDICE G – PROTOCOLO CONDICIONAMENTO CNO.....	121
	APÊNDICE H – PROTOCOLO TESTE CNO	123

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Conceito

O transtorno por uso de substâncias (TUS, do inglês *Substance Use Disorder – SUD*), segundo o Manual Diagnóstico e Estatísticos de Transtornos Mentais (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder 5th edition – DSM-V*), envolve alterações comportamentais, cognitivas e fisiológicas, dado o uso contínuo, pelo indivíduo, apesar de vivenciar consequências negativas significativas relacionadas à substância. De acordo com a Classificação Internacional de Doenças 10^a revisão (CID-10), os transtornos mentais e comportamentais devidos ao uso de substâncias psicoativas estão na faixa de F10 a F19, sendo cada número específico conforme a substância (F10 álcool; F11 opioides; F12 *cannabis*; F13 sedativos, hipnóticos ou ansiolíticos; F14 cocaína; F15 cafeína e estimulantes tipo anfetamina; F16 fenciclidina e outros alucinógenos; F17 tabaco; F18 inalantes; e F19 outra substância ou substância desconhecido (Psychiatric Association, 2014).

O diagnóstico dá-se pelo padrão patológico de comportamento relacionado ao uso, conforme relato do próprio indivíduo, de outras pessoas cientes do caso, de observações do clínico e exames biológicos, ao cumprir uma quantidade de critérios por um período de tempo inicial de doze meses, como no Quadro 1. Os critérios diagnósticos são divididos em quatro grupos: I) baixo controle sobre o uso da substância (1-4); II) prejuízo social (5-7); III) uso arriscado (8 e 9); e IV) critérios farmacológicos (10 e 11; Quadro 2). A gravidade do transtorno é baseada nos sintomas relatados, sendo considerado ‘leve’ pela presença de dois ou três sintomas; ‘moderado’ por quatro ou cinco e ‘grave’ por seis ou mais.

Agregado aos sintomas, há uma alteração básica nos circuitos cerebrais que estão ligadas com o reforço do comportamento e produção de memórias. Tais alterações podem persistir após a desintoxicação e seus efeitos comportamentais podem ser exibidos nas recaídas constantes e fissura intensa pela substância quando os indivíduos são expostos a estímulos relacionados a elas (Psychiatric Association, 2014).

INTRODUÇÃO

Quadro 1 | Critérios diagnósticos do Transtorno por Uso de Substâncias. (Psychiatric Association, 2014 modificado).

Critérios diagnósticos do Transtorno por Uso de Substâncias	
1	Consumo da substância em quantidades maiores ou ao longo de um período maior de tempo do que pretendido originalmente
2	Expressar desejo persistente de reduzir ou regular o uso, podendo relatar esforços malsucedidos na tentativa.
3	Gastar muito tempo para obter, usar ou recuperar-se de seus efeitos
4	Fissura
5	Uso recorrente que pode resultar no fracasso em cumprir as principais obrigações no trabalho, na escola, ou no lar
6	Uso contínuo apesar de estar ciente de apresentar um problema sociais ou interpessoais persistentes ou recorrentes causados ou exacerbados por seus efeitos
7	Atividades importantes de natureza social, profissional ou recreativa podem ser abandonadas ou reduzidas devido ao uso
8	Uso recorrente da substância em situações que envolvem risco à integridade física
9	Uso contínuo apesar de estar ciente de apresentar um problema físico ou psicológico persistente ou recorrente que provavelmente foi causado ou exacerbado pela substância
10	Tolerância
11	Abstinência

Para o presente trabalho, serão consideradas as definições do Quadro 2 para os termos referentes à temática. Importante ressaltar que o termo “adição” não é aplicado como termo diagnóstico devida sua conotação potencialmente negativa e vaga, embora seja amplamente utilizado em vários países ao descrever problemas graves relacionados ao uso compulsivo e habitual de substâncias.

Quadro 2 | Conceitos.(Psychiatric Association, 2014 modificado).

Conceitos	
Abstinência	Síndrome que ocorre quando as concentrações de uma substância, no sangue ou nos tecidos, diminuem em um indivíduo que manteve o uso intenso prolongado. Tendência de consumir a substância para alívio dos sintomas.
Fissura	Desejo ou necessidade intensos de usar a droga, com maior probabilidade quando em um ambiente onde a droga foi obtida ou usada anteriormente. É usada como medida de resultado do tratamento porque pode ser um sinal de recaída iminente. Envolve condicionamento clássico, ativação de estruturas cerebrais de recompensa.
Síndrome de retirada	Conjunto de sintomas físicos e psicológicos que surgem quando uma pessoa reduz ou para abruptamente de usar certas substância.
Tolerância	Necessidade de dose acentuadamente maior para obter efeito desejado ou efeito acentuadamente reduzido após o consumo da dose habitual. É variável entre indivíduos, entre substâncias e pode envolver uma variedade de efeitos sobre o SNC, como, por exemplo, tolerância: a depressão respiratória, a sedação, a coordenação motora. Testes laboratoriais podem ser úteis (níveis séricos elevados e pouca evidência de intoxicação sugerem tolerância).
Transtorno por Uso de Substância	Agrupamento de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos dado o uso contínuo, pelo indivíduo, apesar dos problemas significativos relacionados à substância.

INTRODUÇÃO

1.2 Histórico

As primeiras tentativas de abordar a dependência como uma condição de saúde datam do século XVIII, pelo trabalho de dois médicos, Benjamim Rush e Thomas Trotter, que relacionaram à embriaguez e à perda de autocontrole e de equilíbrio. Acreditava-se que o padrão de consumo era, até certo ponto, uma escolha pessoal, mas o hábito poderia se tornar uma necessidade. No século XIX, foram determinados critérios diagnósticos, com base também no consumo de álcool, atribuindo um conjunto de complicações clínicas ao uso abusivo e crônico. Também nesse período, foi formulada a ideia de causas biológicas e genéticas. O então conceito de dependência foi expandido às demais substâncias, como morfina e cocaína. Os primeiros construtos avaliaram características do padrão de consumo, histórico familiar, aspectos de personalidade e psicopatias. Já no século XX, houve a categorização, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em dependência psíquica e física; a primeira refere-se a uma situação em que existe sentimento de satisfação, impulso psíquico para produzir prazer e/ou evitar mal-estar e está associada a fatores que implicam na intoxicação; já a segunda, refere-se ao estado de adaptação com presença de intensos transtornos físicos dada a interrupção da administração da droga (síndrome de retirada ou abstinência), com o alívio desses sintomas pela administração da mesma droga ou de outra com ação farmacológica análoga e está associada a fator de reforço e recaída (Ribeiro & Laranjeira, 2016).

O conceito segue em evolução e, conforme classificação do DSM-V, qualquer padrão de uso de substância psicoativas é sujeito a riscos. O diagnóstico de TUS é estabelecido por um padrão problemático de uso que resulte em comprometimento ou sofrimento clinicamente significativo. A classificação baseia-se em onze critérios (Quadro 1), sendo necessária a presença de pelo menos dois destes em um período de doze meses para a confirmação diagnóstica. Em termos de uma análise conceitual, ainda há discussão para melhor estabelecer as fronteiras de diagnóstico. Entretanto, a terminologia de Transtorno relacionado ao uso foi capaz de distanciar do aspecto moralista e dotado de imprecisões acerca de “dependência” para termos baseados em observações clínicas e evidências científicas (Psychiatric Association, 2014; Ribeiro & Laranjeira, 2016).

INTRODUÇÃO

O TUS é multifatorial com variáveis biológicas e sociais, sendo o tipo de substância usada o principal fator para determinar a velocidade e propensão de transitar de experimentação para transtorno de uso. Os fatores individuais envolvem a parte genética, experiências de exposição durante a infância em qual estágio da vida foi o primeiro contato, aspectos da personalidade e outros transtornos psiquiátricos. Os fatores sociais envolvem suporte familiar e/ou comunitário, desigualdade social, acesso à droga e políticas que as envolvem. Esse caráter polifatorial podem melhor explicar as diferenças entre indivíduos que experienciam substâncias e não desenvolvem a dependência ou a diferença de resposta aos tratamentos propostos e afins (Volkow & Blanco, 2023).

1.3 Epidemiologia

A dependência por substâncias é um tema global, com impactos massivos para os indivíduos, para a sociedade e para os cofres públicos. A condição não tratada aumenta os riscos de morbidade e mortalidade, além de gerar sofrimentos em diferentes âmbitos, como, por exemplo, pessoal, familiar, educacional, profissional e social. Os custos associados a esta condição contabilizam a diminuição da produtividade dos indivíduos e a menor chance de serem empregados, mortalidade prematura, doenças crônicas associadas e os custos de tratamento, e o gasto diretamente relacionado dos sistemas de saúde. Somam-se aqui ainda os custos de justiça criminal e bem-estar de familiares e de demais membros da sociedade (WHO).

No Brasil, os dados do primeiro semestre de 2025 registraram 192 mil atendimentos em Saúde Mental. Este dado reflete um aumento de 20% com relação ao mesmo período do ano de 2023, ano em que se iniciou o fortalecimento da Rede de Atenção Psicossocial (RAPS), uma das maiores em saúde mental do mundo, com investimento avaliado em R\$2,25 bilhões em 2024. Os Centros de Atenção Psicossocial (CAPS), com suas mais de 3.000 unidades pelo território, possuem modalidades direcionadas ao atendimento de todas as pessoas em situações relacionadas ao uso prejudicial de álcool e outras drogas, que pode ser encaminhado de outro nível do sistema de saúde ou pode ser o ponto de início do tratamento (Saúde e Vigilância Sanitária, 2025; Valença, 2025).

INTRODUÇÃO

Especificamente, atendimentos de pacientes com transtornos mentais e comportamentais devido ao uso de drogas e álcool de 2021 do Sistema Único de Saúde (SUS), em todos os seus níveis de atendimento, mostram que mais de 400 mil atendimentos foram realizados a pacientes com transtornos mentais e comportamentais devido ao uso de drogas e álcool, um aumento de mais de 12% em relação ao ano anterior. A faixa etária com o maior número de atendimentos está entre 25 e 29 anos, seguidos pela faixa de 10 a 24 anos. As substâncias relatadas, em ordem decrescente são: álcool, opiáceos, canabinoides, sedativos, hipnóticos, alucinógenos, solventes voláteis e estimulantes, fora os relatos de uso de múltiplas drogas (Queiroz, 2022).

Os números crescentes ao longo dos anos não é uma peculiaridade do Brasil, porém uma tendência mundial. Segundo o Relatório Mundial sobre Drogas 2022, *United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC – Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime)*, cerca de 284 milhões de pessoas, majoritariamente do sexo masculino, na faixa etária entre 15 e 64 anos, usaram drogas em 2020, representando um aumento de 26% do que os dados da última década. O tabaco segue como o mais prevalente, com dados de 1,1 bilhões de usuários em 2019 no mundo (United Nations Office on Drugs and Crime, 2022a; Volkow & Blanco, 2023).

Em primeiro lugar, nas estimativas de droga ilícita mais usada, está a *cannabis*, seguida dos opioides, anfetaminas, cocaína e ecstasy. Ao observar a distribuição mundial, há algumas alterações como na América do Norte, onde a substância mais correlacionada com dependência são os opioides, com estimativa de mais de 107 mil mortes em 2021, sendo a maior parcela de mortes relacionadas ao TUS, seguido por psicoestimulantes e na América do Sul com problemas principalmente relacionados à cocaína. Dados de 2012 ranquearam os países segundo as taxas de uso de álcool, nicotina e de usuários de drogas. Os países com relato de taxas de prevalência do consumo de álcool acima de 77%, são Angola, Gabão, Congo e República Democrática do Congo, ao passo que os países com maiores taxas de fumantes diários, em cerca de 30%, são Rússia, Indonésia e Chile. Os dados para taxas de TUS, entre 2,2 e 3,7%, para uso de substâncias são Estados Unidos da América (3,7%), Canadá, Austrália e Reino Unido (National Institute on Drug Abuse, 2024; United Nations Office on Drugs and Crime, 2022a; Volkow & Blanco, 2023).

INTRODUÇÃO

A análise epidemiológica mostra um aumento progressivo da incidência de TUS, tanto a nível nacional quanto global. A ampla gama de substâncias envolvidas, considerando medicamentos, substâncias lícitas e ilícitas sobrecarrega os sistemas de saúde e gastos públicos relacionados. Com isso, vê-se a necessidade de estudos que identifiquem as bases biológicas do TUS, para entender seus mecanismos e assim desenvolver estratégias terapêuticas direcionadas e políticas públicas mais eficazes.

1.4 Fisiologia do Sistema de recompensa

O sistema de recompensa compreende a circuitaria neurobiológica relacionada com a estratégia de sobrevivência, que abrange motivação para busca de estímulos positivos, como alimentos e sexo, e esquia de estímulos negativos, como ameaças e dor. O funcionamento do sistema tem como ponto-chave o neurotransmissor dopamina (DA), tanto na interação entre regiões que o compõem quanto no desbalanço gerado no cenário de TUS (Volkow & Blanco, 2023).

A DA é um neurotransmissor sintetizado em neurônios dopaminérgicos a partir da tirosina, convertida a dopa por hidroxilação (passo limitante, determinada pela enzima tirosina hidroxilase - TH). A partir disso, esta é descarboxilada pela DOPAdescarboxilase, formando DA como produto final que é acondicionada em vesículas para liberação na fenda sináptica, pelo Transportador Vesicular de Monoaminas (VMAT₂) (Figura 1). Os receptores dopaminérgicos são metabotrópicos e separados em cinco subgrupos – D₁ a D₅ – acoplados a proteína G. D₁ e D₅ são acoplados a proteínas estimulatórias (Gs), que estimulam adelinil ciclase e ativa a proteína quinase A (PKA), responsável por fosforilar diversos tipos de proteína, como, por exemplo, canais voltagem-dependente de sódio, potássio e cálcio e canais ionotrópicos de glutamato e ácido gama-aminobutírico GABA. Os receptores D₂ a D₄ são acoplados a proteínas inibitórias (Gi e Go) que ativam canais de potássio e inibem PKA e canais de cálcio. A DA remanescente na fenda sináptica é recapturada pelo Transportador de DA de volta ao neurônio dopaminérgico, que pode ser reembalada em vesículas ou ser inativada por metabolização de enzimas (Rang et al., 2016a, 2016b).

INTRODUÇÃO

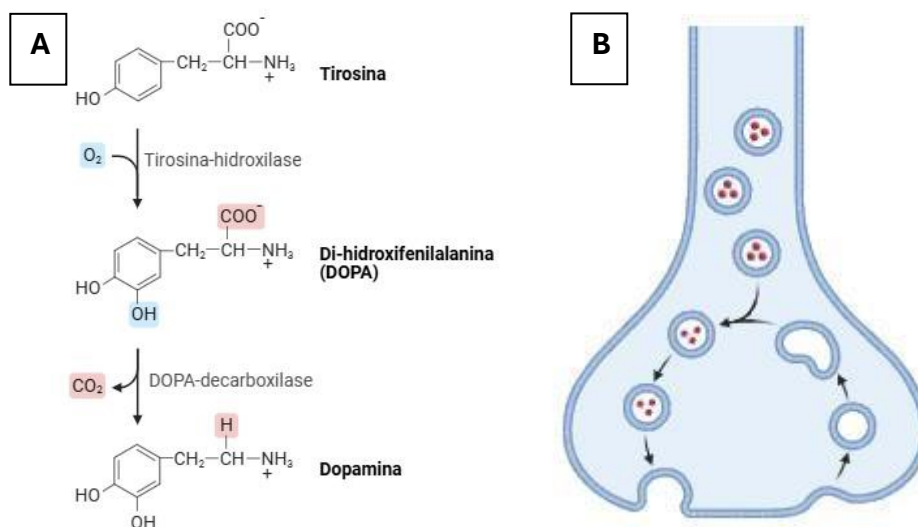


Figura 1 | A – Transformação da Tirosina a Dopamina e B – Reciclagem de vesículas. (Template Biorender)

Compreendendo o sistema nervoso, a dopamina está presente em diferentes vias neurais: 1) via nigroestriatal, que correspondente a 75% da DA do encéfalo que liga a *substantia nigra* (SN) ao corpo estriado; 2) via mesolímbica, que liga a área tegmental ventral (do inglês *ventral tegmental area* – VTA) para o sistema límbico, com ênfase no núcleo *accumbens* (NAc) e núcleo amigdalóide; 3) via mesocortical, que ligam VTA ao córtex frontal e 4) via túbero-infundibular, um grupo de pequenos neurônios que ligam o hipocampo ventral a glândula pituitária (Figura 2). As vias mesolímbica e mesocortical (em conjunto chamada de via mesocorticolímbica, e referida genericamente como Sistema de Recompensas), em termos de aspectos funcionais, são responsáveis pelos efeitos no comportamento e está envolvido no processo da recompensa induzida por drogas (Rang et al., 2016b).

INTRODUÇÃO

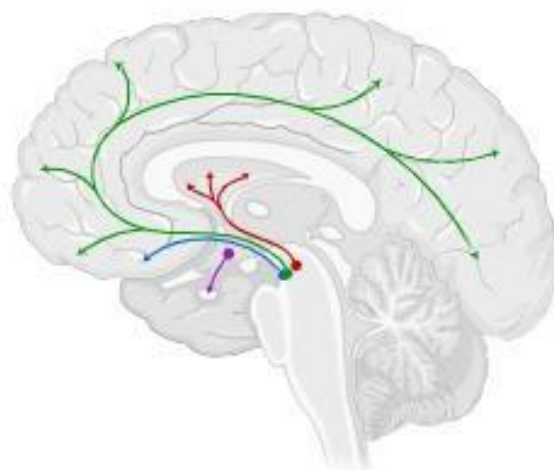


Figura 2 | Vias dopaminérgicas. Vermelho - Via nigroestriatal; Azul – Via mesolímbica; Verde – Via mesocortical e Roxo – Via tuberoinfundibular. (Template Biorender)

Os *inputs* de diferentes neurotransmissores que ocorrem naturalmente no sistema mesolímbico são dados pela endorfina, acetilcolina, anandamida e a DA em si (correlação com mecanismo de ação de opioide, nicotina, *cannabis* e cocaína/anfetaminas, respectivamente) que reforçam comportamentos adaptativos, como, por exemplo, comer, beber, ter relação social e sexual, conquistas intelectuais e esportivas, realização de tarefas, entre outros estímulos. Todos os neurotransmissores agem, direta ou indiretamente, nos neurônios dopaminérgicos da VTA, que liberam DA no NAc e alguns que agem diretamente no NAc (Stahl et al., 2021).

O NAc é, majoritariamente, composto de neurônios espinhosos médios GABAérgicos que expressam receptores D₁ e D₂. É uma estrutura com duas camadas, a parte mais externa, como uma “casca”, é chamada de córtex (NAc shell) e parte mais interna (NAc core). O NAc core recebe *inputs* dopaminérgicos de VTA e SN; aferência glutamatérgica vindas do córtex pré-frontal (PFC), córtex insular, amígdala basolateral (do inglês *basolateral amygdala* – BLA) e hipocampo (HIPP); e aferências GABAérgicas de VTA, ventral *palidum* e parte do PFC. Já o NAc shell recebe input glutamatérgico de regiões corticais, BLA, HIPP e em menor quantidade da VTA, responsável também por inputs dopaminérgicos e GABAérgicos. (para maiores informações visitar revisão Nall et al., 2021).

INTRODUÇÃO

1.5 Fisiopatologia do Transtorno por Uso de Substâncias

1.5.1 Teoria da dopamina na dependência

A teoria da dependência, postulada a mais de 40 anos e ainda aceita, propõe que o circuito responsável pelo reforço e recompensa após uma exposição a algo prazeroso é a via mesolímbica. Embora seja uma simplificação de uma circuitaria complexa, a DA é popularmente conhecida como neurotransmissor do prazer, junto da noção do “sistema de recompensa”. Sua ativação se dá por situações naturais, como supracitado e por drogas de abuso, entretanto a última de maneira mais intensa, rápida e sob demanda (Stahl et al., 2021). As principais classes de drogas utilizadas, no geral, são: opioides (morfina, oxicodona, heroína), agentes depressores SNC (anestésicos, álcool, barbitúricos, cetamina), ansiolíticos (benzodiazepínicos), agentes psicoestimulantes (anfetaminas, cocaína, nicotina, 3,4-metilenodioximetanfetamina – MDMA) e agentes psicotomiméticos (dietilamida do ácido lisérgico – LSD, *cannabis*). As classes diferem em seus mecanismos de ação e o ponto de encontro para serem classificadas como drogas de abuso é com relação ao efeito prazeroso referido pelos sujeitos que às utilizam, que variam em euforia, alteração de humor, alucinações, sedação e, por essas mesmas razões, são propícia o uso repetido (Rang et al., 2016c).

Embora apresentem diferentes mecanismos de ação e, conseqüentemente, diferentes sítios de ligação, todos acarretam em um aumento de DA na referida via, por exemplo, cocaína atua nos terminais nervosos de neurônios dopaminérgicos inibindo a recaptação de DA, o que aumenta seu tempo na fenda sináptica e sua ligação aos receptores pós-sinápticos; anfetaminas atuam no aumento dos níveis de liberação de neurotransmissores, inclusive DA, por alterar o funcionamento de seus respectivos transportadores; e opioides atuam em um mecanismo de desinibição, no qual diminuem os níveis de GABA na VTA, o que aumenta o disparo de neurônios dopaminérgicos no NAc (Rang et al., 2016c; Wise & Jordan, 2021).

O comportamento aprendido é dependente da função dopaminérgica, uma vez que já foi demonstrado que animais com deficiência de DA falham nas tarefas de aprendizado para busca de recompensas no geral e para evitar lugares associados com punições. O padrão de disparo em salvas da DA possibilita a formação de sinalização potencializada de glutamato-GABA, crítica no aprendizado. As alterações a nível sináptico responsáveis por essa característica é chama de Potenciação de Longa Duração (do inglês *Long-Term Potentiation* – LTP), na qual há um aumento da

INTRODUÇÃO

subunidade α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiônico (AMPA), responsiva a glutamato e permeável a cálcio, com consequente aumento da eficiência da sinalização sináptica e, no cenário do sistema de recompensa, se traduz em aumento da resposta do NAc ao glutamato liberado por terminais corticais e límbicos (Volkow et al., 2016; Wise & Jordan, 2021).

A correlação da capacidade de drogas de abuso causarem esse tipo de padrão de disparo é amplamente aceita para dependência, com evidências direta está fortemente ligada à anfetamina, cocaína e opiáceos e em menor nível para nicotina, álcool, *cannabis*, barbitúricos, benzodiazepínicos e cafeína (Wise & Jordan, 2021).

A busca pelos efeitos alcançados com o uso de tais substâncias, com o tempo, se transforma em compulsão, no qual a urgência do uso ultrapassa as demais necessidades e, nessa etapa, se fala em dependência. Pela definição do DSM-V, que traz o uso recorrente de substâncias que cause prejuízo clínico e/ou funcional e a apresentação clínica dividida em leve, moderada e forte, a dependência é, então, o termo usado em referência ao estágio severo com apresentação crônica e característica como perda do controle, compulsão pelo uso apesar da vontade de parar e envolve componentes físicos e psicológicos, como componentes genéticos, componentes ambientais (estresse, acesso a drogas, pressões sociais) e ainda um risco aumentado de susceptibilidade durante o desenvolvimento, majoritariamente envolvendo a adolescência (Rang et al., 2016c; Volkow et al., 2016).

Há três estágios da dependência, divididos por Volkow et al. (2016) com base nos circuitos ativados, sendo eles: 1) compulsão e intoxicação; 2) abstinência e afeto negativo e 3) preocupação e antecipação (ou anseio).

O primeiro estágio é ativado pelo sistema de recompensa com o aumento da liberação de DA. Essa sinalização é crucial para o aprendizado associativo, como o condicionamento clássico, também chamado de Pavloviano, pela associação do estímulo a uma pista ambiental neutra e o condicionamento operante, no qual o comportamento é moldado pelas próprias consequências geradas, que aumenta ou diminui a frequência de manifestação (por reforço e por punição, respectivamente). A repetição de uma experiência, em um determinado contexto, que gere essa sinalização, com o tempo pode acarretar uma liberação de DA antecipada, ao entrar

INTRODUÇÃO

em contato com estímulos/pistas contexto-específicas (ambiente, pessoas, sensações), como um presságio do efeito prazeroso esperado (Volkow et al., 2016).

O ponto crucial dessa neuroplasticidade se dá pela diferença de resposta a uma recompensa natural (comida e sexo, por exemplo) comparada com a resposta por drogas de abuso reforçadas pelo LTP, as quais não atingem o ponto de saciedade da mesma maneira, aumentando ainda mais os níveis de dopamina e da busca e, com isso, aumentam-se também os efeitos negativos em sua ausência. A soma dos fatores elucida a associação da dependência com comportamentos compulsivos (Volkow et al., 2016).

A impulsividade foi descrita como “predisposição para reações rápidas e não planejadas a estímulos internos e externos, sem considerar as consequências negativas dessas reações para si mesmo ou para os outros” e está relacionada com os sentimentos gratificantes iniciais, enquanto a compulsividade se refere “a manifestações de ações perseverantes e repetitivas que são excessivas e inapropriadas” e está relacionada a reduzir a ansiedade proveniente de pensamentos obsessivos. Os indivíduos, geralmente, transitam da impulsividade para compulsividade no decorrer do histórico de uso de substâncias (Koob & Volkow, 2016).

O segundo estágio, abstinência e afeto negativo, é marcado por uma busca direcionada à droga e suas pistas que, após repetições, promove uma habituação do sistema, isto é, a resposta obtida após o uso repetido da droga é mais branda comparada ao primeiro uso, com conseqüente aumento de dose por buscar a mesma sensação positiva uma vez alcançada. Reforços antes alcançados pela prática de atividades diárias perdem espaço e importância e, portanto, perdem motivação. Há também uma adaptação na amígdala, que provoca um comportamento mais reativo ao estresse e a insurgência das emoções negativas que qualificam esta fase.

Essa adaptação dos sistemas e conseqüente mudança comportamental pode ser interpretada como uma mudança no tipo de reforço da droga, que inicialmente se enquadra como reforço positivo – busca pelo bem-estar proporcionado, que aumenta a frequência do comportamento de uso – e passa a reforço negativo – busca por retirada dos sintomas aversivos sentidos na abstinência, pelo aumento da frequência do comportamento de uso, descrito como compulsividade. A disforia resultante dos

INTRODUÇÃO

intervalos de uso da substância se torna, então, a principal motivação para sua busca. O efeito do aumento de DA gera um alívio momentâneo que aprofunda a disforia em sua ausência e, assim, fecha o ciclo vicioso (Koob & Volkow, 2016; Volkow et al., 2016).

O último estágio, preocupação e antecipação, está relacionado com uma sinalização dopaminérgica e glutamatérgica prejudicada no córtex pré-frontal, com danos em funções executivas, como, por exemplo autorregulação, processo de tomada de decisão e monitorização de erro. Tais sintomas corroboram com relatos de pacientes que se comprometem em parar e entendem os riscos e as consequências negativas que são inerentes, entretanto continuam impulsivos (Volkow et al., 2016).

Em suma, a fisiopatologia da dependência se dá por uma dessensibilização do circuito de recompensa que atenua a habilidade de sentir prazer/motivação com as atividades diárias, junto ao fortalecimento da resposta condicionada e da reatividade ao estresse favorecem ao anseio (*craving*) associado a emoções negativas enquanto não saciado. Em paralelo, há o enfraquecimento das regiões que correspondem a funções executivas – processo de tomada de decisão, controle inibitório, autorregulação - que favorecem ao processo denominado como recaída. O processo de virada entre controle comportamental voluntário para uma perturbação no processo de tomada de decisão, aplicado a dependência por drogas, mas também dependências comportamentais, como, vício em jogos de azar (CID-10 F63), compulsão alimentar e dinheiro (Childs et al., 2017; Krupa et al., 2024; Psychiatric Association, 2014; Volkow et al., 2016).

O ponto chave do eixo VTA-NAc no contexto de TUS é a resposta mediante liberação de DA pelo uso de diferentes substâncias, entretanto pacientes do transtorno demonstram uma diminuição paradoxal de DA em resposta a droga, relativo a indivíduos sem dependência, e um aumento em resposta a estímulos pareados com a droga, correlacionado com fissura. Os dois pontos juntos elucidam o contexto dos pacientes em uso crônico que relatam diminuição do prazer associado e compulsão crescente, em vez da esperada potencialização do valor hedônico inicial. Somado a isso, há uma regulação negativa dos receptores D2, que acarreta atividade diminuída nas regiões corticais ligadas ao processo de tomada de decisão (Nall et al., 2021).

INTRODUÇÃO

1.5.2 Tratamentos

Como o TUS é muito diverso, o tratamento depende do diagnóstico específico e do grau de dependência que o paciente apresenta. Faz-se necessária uma avaliação psiquiátrica, que envolva: histórico do uso e efeitos no funcionamento cognitivo, psicológico e fisiológico, história médica e exame físico, história de tratamentos psiquiátricos e a resposta terapêutica obtida, histórico familiar e social, triagem da substância em amostras do sangue, respiração e urina e, se necessário ou permitido, entrar em contato com uma pessoa que possa fornecer mais informações. Em caso de intoxicação aguda, a primeira etapa é a retirada ou recuperação dos efeitos agudos causados pela substância referente (Amaral et al., 2010).

Para pacientes com o transtorno relacionado à álcool, orienta-se administração de soro fisiológico venoso, para reidratação, tiamina e glicose, além de preservação das funções cardíacas e respiratórias durante a eliminação. A agitação é primariamente abordada pela equipe com ações interpessoais, mas caso seja intensa, que coloque o paciente ou a equipe em risco, antipsicóticos potentes e em baixas doses são utilizados. Com relação à abstinência, é indicado o acompanhamento psicossocial pelo encaminhamento ao CAPS e prescrito o uso de beta-bloqueadores ou clonidina (agonista alfa-adrenérgico), antipsicóticos, benzodiazepínicos ou outros agentes GABAérgicos para tratamento dos sintomas como tremores, elevação da pressão arterial, taquicardia, hiperatividade autonômica, desconforto gastrointestinal, ansiedade e, de maneira menos frequente, convulsões e delírio (Amaral et al., 2010). Há evidência do uso de acamprosate, naltrexona e nalmefeno, a depender da severidade (Mateu-Mollá et al., 2025).

Quando a situação for relacionada ao uso de estimulantes, como cocaína e anfetaminas, geralmente é uma intoxicação autolimitada, mas em casos de agitação, delírio persecutório e convulsão, correlacionados com desbalanço dopaminérgico, deve ser tratado em ambiente hospitalar devido ao risco de morte, com benzodiazepínicos e antipsicóticos, embora o uso de antagonista dopaminérgico seja questionável. A importância do histórico nesses casos é primordial, dado o relato de sensibilização. A abstinência é descrita como trifásica, com uma fissura inicial intensa, caracterizada por irritabilidade e agitação, evoluindo para depressão, sonolência, anedonia e exaustão. A segunda fase é, de fato a abstinência, com a volta da fissura com depressão e ansiedade que pode durar até dez semanas, quando inicia a última

INTRODUÇÃO

fase com tendência a normalização do humor, do sono e da ansiedade (Amaral et al., 2010). O tratamento com bupropiona e topiramato (inibidor de canais de sódio voltagem-dependentes, potenciador de receptores GABA_A e antagonista de receptor glutamatérgico AMPA e Kainato) corroboram para manutenção da abstinência (Mateu-Mollá et al., 2025).

Para casos com benzodiazepínicos, por também ser depressor do SNC, se assemelha à intoxicação por álcool, com maior atenção ao risco de depressão respiratória, que pode ocasionar a necessidade de ventilação mecânica. O Flumazenil, antagonista específico, é utilizado no caso de intoxicação, porém com cautela pois pode antecipar a síndrome de abstinência em usuários crônicos pela retirada abrupta do sistema e, em caso do paciente ter utilizado outras drogas/fármacos, como antidepressivo tricíclicos ou cocaína, diminui o limiar de convulsões. Pela síndrome de abstinência aparecer principalmente pela retirada abrupta, o manejo é pela retirada progressiva, planejada e acompanhada, com redução semanal de 20% da dose inicial, reiterando que o desmame inicialmente é mais bem tolerado, quando alcançar metade da dose inicial, a retirada deve ser mais gradual. A sintomatologia envolve ansiedade, insônia, cefaleia, anorexia, náuseas e vômitos, tremores, hipotensão e fraqueza. A terapêutica é com agonistas GABAérgicos, como fenobarbital, Diazepam, lorazepam e alprazolam. Dentre eles, Diazepam possui longa ação e, portanto, escolhido para melhor manejo dos sintomas de abstinência. Não há evidências robustas pela qualidade dos estudos publicados de que agregar outras substâncias seja benéfico no desmame de (Department of Veterans Affairs & Department of Defense, 2021)

No caso de maconha, *cannabis*, os sintomas manejados são os episódios agudos de ansiedade, semelhantes ao ataque de pânico, e sintomas psicóticos, por meio de benzodiazepínicos, e no caso de comportamentos agressivos em detrimento de distorções da realidade, o tratamento é semelhante aos da intoxicação por cocaína. O manejo da abstinência encontra evidências limitadas, entretanto dronabinol demonstrou diminuir sintomas de abstinência e aumento da adesão do tratamento e canabidiol, agonista parcial de receptor 5-HT_{1A}, demonstrou diminuir o uso, porém mediante aumento de abstinência (Mateu-Mollá et al., 2025).

Para casos de opioides, o tratamento é normalmente restrito em casos severos, com superdosagem que ocasione miose, bradicardia, depressão respiratória e estupor,

INTRODUÇÃO

podendo chegar a coma, o tratamento é dado pela naloxona, antagonista do receptor opioide que age por inibição competitiva. A abstinência é seccionada em quatro fases: I – antecipatória (3-4 horas após o uso), classificada pela busca, ansiedade e fissura; II – inicial (8-10 horas após o uso), marcada por ansiedade, inquietação, midríase, sudorese, obstrução nasal e náuseas; III – total (1-3 dias após o uso), com ansiedade severa, inquietação, tremor, piloereção, vômitos e diarreia, espasmos e dor muscular, taquicardia, febre e calafrios; e IV – tardia (até seis meses após o uso), marcada por hipotensão, bradicardia, inapetência, insônia e fissura. O tratamento para fissuras é feito com metadona, agonista de receptor μ -opioide, e clonidina (Amaral et al., 2010). O uso de N-acetilcisteína foi correlacionado com diminuição de sintomas depressivos, contribuindo para o tratamento e o uso de naloxona com morfina se mostrou como melhor efetividade terapêutica (Mateu-Mollá et al., 2025).

Para pacientes em uso de tabaco, o tratamento inicial é com base em ações do paciente, com técnicas se ocupar em momentos associados ao ato de fumar e marcar uma data para o início do processo. Ações como tomar água e escovar os dentes quando der vontade e quebra de estímulos associados (diminuir a ingestão de café e bebidas alcoólicas, desfazer-se de isqueiros e evitar ambientes/situações associadas). Somado a essas estratégias, tem-se indicação de acolhimento terapêutico e tratamento medicamentoso com nicotina (adesivo, goma de mascar e patilhas) e vareniclina, agonista parcial de receptores nicotínicos α -4 e β -2, sendo considerada a escolha com maior efetividade em monoterapia farmacológica (Figueiredo & Vianna, 2020; Mateu-Mollá et al., 2025).

Por fim, no caso de solventes, uma classe heterogênea por definição, os sintomas são de depressão do SNC, com o padrão progressivo de euforia-ataxiaconfusão/desorientação-redução do estado de alerta-risco de convulsão/coma e morte. A monitorização cardíaca, dada a ação direta no miocárdio, pode provocar arritmia e o manejo é o mesmo supracitado. Para esta classe, não há consenso acerca de tolerância e síndrome de abstinência (Amaral et al., 2010).

O tratamento, em suma, é multifatorial, dependente do agente causador e da fase sintomatológica que o paciente se encontra. Manejos específicos como antieméticos para náuseas e vômitos, inibidores de recaptção de serotonina para insônias, analgésicos não opioide para dores leves e moderadas, agonistas

INTRODUÇÃO

adrenérgicos para sintomas como taquicardia, ansiedade e tremores e outros formam a politerapia do manejo ao TUS. O encaminhamento para atendimento psicossocial é de suma importância para adesão e sucesso, reconhecendo as elevadas taxas de falha. É importante ressaltar o risco inerentes ao tratamento e o emprego de classes relacionadas com uso abusivo para manejo de sintomas que aparecem em decorrência do uso abusivo.

1.6 A quimiogenética como ferramenta de manipulação neuronal

Com intuito de estudar a neurofisiologia por trás de determinados sistemas e compreender seu funcionamento, bem como as alterações atreladas à neuropatologia de determinados transtornos, houve a necessidade de buscar técnicas mais refinadas e precisas. Esse avanço metodológico possibilitou a manipulação neuronal em animais acordados, que permite uma maior compreensão de função cerebral e sua relação com a expressão do comportamento.

A quimiogenética surge como um termo que engloba técnicas para o controle de populações celulares específicas. Esse controle se dá por meio do uso de vias celulares, proteínas, receptores ou canais iônicos que são alterados para responder a um ligante químico específico. Idealmente, as ferramentas quimiogenética são inertes a ligantes endógenos e, dessa forma, são passivos de serem modulados pela presença do ligante exógeno específico, que não interfere com a sinalização natural do organismo e, portanto, é uma técnica que permite o controle da população celular alvo de maneira reversível, não invasiva e atóxica (Magnus et al., 2019).

O primeiro receptor quimiogenético foi baseado em um receptor acoplado a proteína G (do inglês *G protein-coupled receptor* – GPCR), que são os receptores mais abundantes na superfície das células, caracterizados por 7 domínios transmembrana, um sítio de ligação no domínio extracelular e outro no domínio intracelular que ativa a proteína G, um trímero. A mudança conformacional da fosforilação de GDP para GTP (guanosina difosfato para guanosina trifosfato) libera a subunidade Ga, responsável pelo início de uma cascata de sinalização que pode ser inibitória ou excitatória, pelas vias de segundo mensageiro como monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG) (Cecchetelli & Hempstead, 2021).

INTRODUÇÃO

A partir da ideia de modificar um GPCR, a técnica conhecida como DREADD (do inglês *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs* – receptor desenhado que se ativa exclusivamente por uma droga desenhada) se tornou a forma mais empregada de receptores quimiogénéticos. Próxima ao ideal mencionado da técnica, os receptores são insensíveis a ligantes endógenos, apresentam baixa atividade constitutiva e seu ligante exógeno não apresenta outros efeitos além de ativar os receptores, como a N-óxido de clozapina (do inglês *clozapina-N-oxide* – CNO; um metabólito inerte do fármaco antipsicótico atípico clozapina – Figura 3) e a descloroclozapina (DCZ).

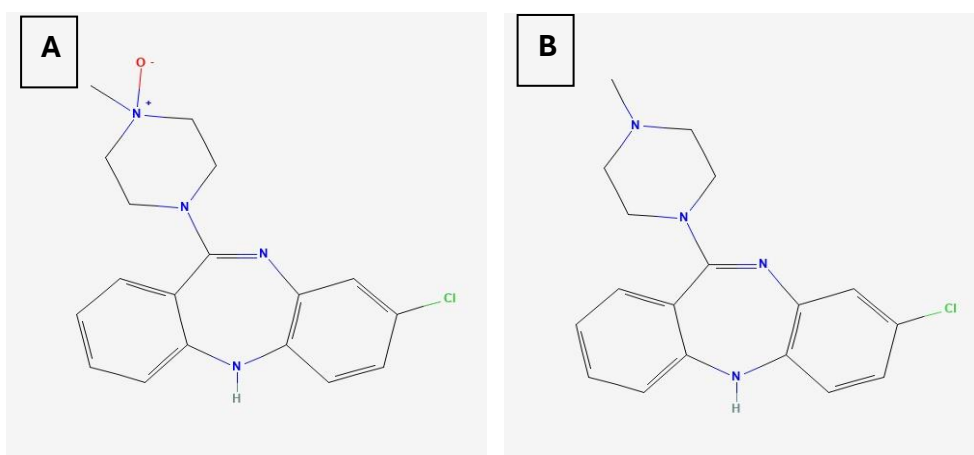


Figura 3 | A – CNO e B – clozapina. (National Library of Medicine, a e b)

As especificidades dos DREADDs variam de acordo com a proteína acoplada, podendo exercer uma sinalização de ativação (Gq e Gs) ou uma sinalização de inibição (Gi). Gq atuam ativando a fosfolipase C, que libera cálcio intracelular e são baseados nos receptores muscarínicos humanos hM3Dq, hM1Dq e hM5Dq, sendo o primeiro o mais utilizado; já os Gs atuam pelo aumento da concentração de cAMP e foi baseado no receptor muscarínico de rato, rM3D. Por fim, Gi que atuam pela inibição da adenilato ciclase (responsável pela conversão de ATP em AMP) o que diminui a produção de cAMP e são baseados nos receptores muscarínicos humanos hM2Di e hM4Di (Science Guides, b). Em suma, a técnica DREADD envolve a infusão de receptor muscarínico acoplado a proteína G, modificado por engenharia genética para responder apenas ao ligante exógeno (Urban & Roth, 2015).

INTRODUÇÃO

A modificação racional favorece o reconhecimento de um ligante exógeno em detrimento de ligantes endógenos abundantes e a subsequente utilização das vias de sinalização dos sistemas neuronais que permitem a ativação de circuitos de maneira direcionada e com a observação dos seus efeitos comportamentais. Para tanto, o procedimento para estudo da circuitaria cerebral pela técnica de DREADDs *in vivo* começa pela determinação do vetor viral, que apreseem: sorotipo do vetor com o plasmídeo contendo promotor, receptor de escolha e um marcador (proteína fluorescente; Figura 4). Os vetores são vírus adeno-associados (do inglês *adenoassociated virus* – AAV) divididos por sorotipos, que apresentam uma preferência celular para transdução, sendo AAV1, AAV2, AAV5, AAV8, AAV9, AAV11 e AAVrg direcionados para células do sistema nervoso central. Os promotores são os responsáveis pelo tropismo do tipo celular que expressará o gene do receptor carregado (Quadro 3), o gene de interesse (excitatório ou inibitório) e a proteína marcadora (Science Guides,a).

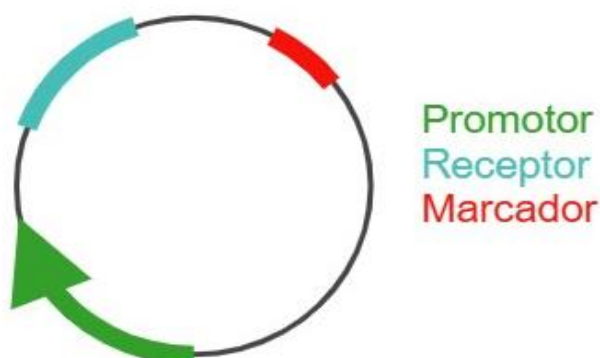


Figura 4 | Esquema do plasmídeo: promotor (verde), gene do receptor (azul) e gene da proteína de marcação (vermelho). Feita no Biorender.

Quadro 3 | Promotores e especificidade celular

Promotor	Especificidade celular
hSyn1 e CaMKIIa	Neurônio
hDlx	Interneurônio
GFAP	Glia
CD68	Microglia
EF1a e CAG	Expressão generalizada

INTRODUÇÃO

A infusão do vetor viral dá-se por cirurgia estereotáxica com alvo específico e, uma vez presente no cérebro, resguardado o período necessário para expressão do receptor, sua ativação se dá pelo CNO por via sistêmica, oral ou intraperitoneal (*i.p.*), a fim de produzir excitação ou inibição neuronal (Figura 5). Como a manipulação está limitada ao período de ação farmacológica do ativador, essa abordagem permite, diferentemente das lesões irreversíveis, a comparação intraindivíduo entre condições com e sem manipulação. Ademais, em relação às lesões reversíveis por microinfusão via cânulas, os DREADDs representam uma estratégia mais simples do ponto de vista metodológico da via de administração (Guarino et al., 2020).

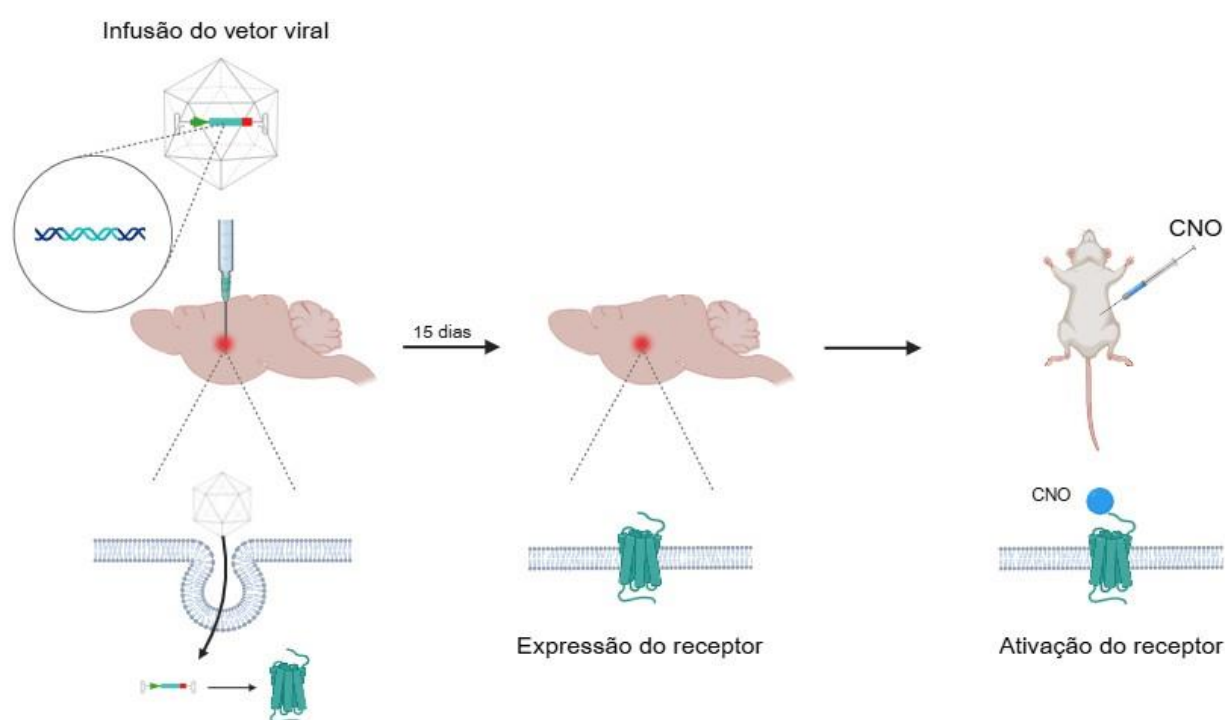


Figura 5 | Esquemática da utilização da técnica DREADD. Vetor Adenovírus com material genético contendo promotor (verde), gene do receptor (azul) e gene da proteína de marcação (vermelho); infusão do material na célula-alvo, internalização do material genético. Feita no Biorender.

As aplicações do uso de DREADDs na pesquisa são diversificadas e crescentes. Inclui propostas na terapêutica de diabetes, doença de Parkinson, distúrbios metabólicos e inflamatórios, depressão, estresse pós-traumático, crises convulsivas refratárias ao tratamento e abuso de substâncias. Nos avanços científicos, DREADDs já foram expressos em diversas espécies, incluindo primatas não humanos

INTRODUÇÃO

sem aparentar toxicidade e com correlato comportamental advindo da modulação neuronal (para maiores informações visitar revisão: Roth B. L., 2016).

1.7 Teste comportamental de preferência condicionada ao lugar

O teste comportamental de preferência condicionada ao lugar (*Conditioning Place Preference – CPP*) é um método utilizado para mensurar efeitos recompensadores/reforçadores ou aversivos de estímulos incluindo, alimentos palatáveis, interação social e substâncias (drogas e outros), além de acessar também seu respectivo potencial de abuso. Já foi demonstrado em diferentes espécies como planárias, *Caenorhabditis elegans*, drosófilas, roedores, primatas e humanos (Correia et al., 2026). Os estudos envolvendo drogas de abuso já foram demonstrados com cocaína, morfina e psicoestimulantes em roedores e primatas (Badanich et al., 2006; Bae et al., 2022; Barros et al., 2013; Borges et al., 2015; Cam et al., 2025; Campbell et al., 2000; Frankowska et al., 2021; Ghasemian et al., 2022, 2024; Guerin et al., 2021; Jamali et al., 2021; Jung et al., 2016; Kashefi et al., 2019; Mucha & Iversen, 1984; Mueller & Stewart, 2000) e com cocaína e anfetamina em humanos (Amirteymori et al., 2023; Angrist et al., 1987; Childs & de Wit, 2009; Childs & De Wit, 2013; Ezzati et al., 2024; Pelloux et al., 2004; Shipman et al., 2006).

O teste é baseado na associação de uma pista contextual (estímulo condicionante, do inglês *conditioned stimulus – CS*) com o tratamento alvo de pesquisa (estímulo não condicionado, do inglês *unconditioned stimulus – US*) cuja administração elicithe sintomas hedônicos ou aversivos que produzirá uma resposta condicionada ao lugar, sendo o compartimento então caracterizado como CS+, chamado de compartimento condicionado (CC) neste trabalho. O outro compartimento, que é pareado com salina, substância controle ou o veículo utilizado para o tratamento alvo é chamado de CS-, sendo o compartimento não condicionado (NC) neste trabalho. No caso de um tratamento que se espere aversão, o teste é nomeado de aversão condicionada ao lugar (*Conditioning Place Aversion – CPA*; (Bardo & Bevins, 2000; Correia et al., 2026; Tzschentke, 2007; Yates et al., 2021).

Este método é dividido em três etapas, sendo elas: habituação, condicionamento e teste. Primeiramente, o sujeito experimental é exposto ao aparato,

INTRODUÇÃO

com livre acesso a todos os compartimentos – que podem ser dois (CC e NC) ou três (CC, NC e neutro, para interligar os principais) – pelo tempo estabelecido no protocolo. Essa fase serve para que se obtenha uma linha de base comportamental do animal e para elucidar eventuais preferências prévias, além disso a fase é geralmente repetida nos primeiros dias para eliminar o viés de novidade do aparato. A segunda etapa é o condicionamento do US com seu respectivo compartimento CC, que pode ser aleatório (modelo não enviesado; no qual o sujeito não apresenta preferência prévia) ou no compartimento inverso ao que o animal demonstre preferência prévia (modelo enviesado; no qual o sujeito apresenta preferência prévia; no caso de CPA, é pareado com o compartimento inicialmente preferido), para que o dado extraído reflita de fato uma preferência/aversão da substância testada e não um reforço à escolha prévia do animal. Nessa etapa, o animal fica restrito ao compartimento durante o período de condicionamento. Por fim, a etapa de teste, no qual o animal é novamente exposto ao aparato com livre acesso e é medido o tempo gasto em cada espaço. Alguns protocolos incorporam uma etapa de resistência a extinção, deixando o sujeito experimental sem manipulação por um período de tempo e repetindo o teste ou uma etapa de extinção propriamente dita, com a repetição de teste sem a administração da substância afim de mensurar o tempo necessário para quebrar a associação feita.

O resultado do CPP é expresso na forma de índice de preferência, calculado a partir do tempo gasto em cada compartimento no dia do teste, podendo ou não ser relativo ao tempo basal do animal durante a habituação. Rossi & Reid, (1976) utilizaram morfina e salina para parear dois compartimentos diferentes e utilizaram, como índice de preferência, o tempo gasto em cada espaço. Há diferentes formas de utilizar o dado temporal para cálculo do índice de preferência CPP, como: 1) medir a diferença do tempo gasto no CC na habituação e no teste; 2) comparar o tempo gasto no CC em relação ao NC durante a habituação e durante o teste. O intuito da análise no CPP é observar se houve um aumento estatisticamente significativo no tempo gasto em CC após as sessões de condicionamento (ou da diminuição, no caso de CPA). Tipicamente, drogas de abuso, como a cocaína, produzem CPP e drogas que estão relacionadas com efeitos aversivos, como o cloreto de lítio, produzem CPA, além disso, em animais dependentes, o período de abstinência demonstra-se como um CPA (Prus et al., 2009; Rossi & Reid, 1976; Yates et al., 2021).

INTRODUÇÃO

O protocolo basal de CPP pode variar a depender do aparato utilizado (dois ou três compartimentos e quais as pistas utilizadas, como visuais, táteis e olfatórias), do tempo de cada sessão (que depende do tempo necessário para efeito - farmacocinética da substância), do número de sessões necessárias para que haja associação (que varia com o tipo de substância) e, se houver etapa de resistência ou extinção. Apesar destas variações observadas no teste considerando a densa literatura que o utiliza, a característica base de associação das pistas do ambiente com o tratamento se mantém.

1.8 Cetamina no contexto de CPP

A Cetamina (CET; Figura 6) é um antagonista não competitivo do receptor Nmetil-D-aspartato (NMDA), além de interagir com receptores opioides, monoaminérgicos, muscarínicos e canais de cálcio sensíveis a voltagem. É utilizada como anestésico geral de ação rápida, hipnótico e analgésico profundo e potencial alucinógeno. Há relatos de uso em doses baixas na terapêutica de depressão e também como droga de abuso ("*Special K*" ou em mistura com cocaína chamada "*CK*", "*Calvin Klein*" e "*pink cocaine*"), pela variedade de sintomas causados, como alucinações, desorientação, insônia, disforia, estado dissociativo e episódios psicóticos. O uso prolongado pode gerar dependência e tolerância, com casos de Síndrome de Retirada relatados. Sua absorção é rápida com biodisponibilidade em torno de 93% e, após metabolismo de primeira passagem, 17% do composto é absorvido. A eliminação é majoritariamente renal (85-95%) e via bile e fezes. A metabolização é via D-alquilização em norcetamina, que é a responsável pela ação anestésica (Al-Garni et al., 2026; National Library of Medicine, c).

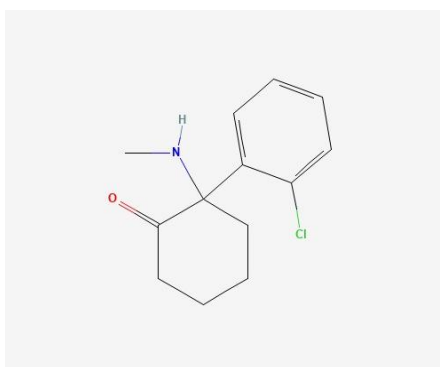


Figura 6 | Estrutura química da CET C₁₃H₁₆ClNO. (National Library of Medicine, c).

INTRODUÇÃO

Segundo o relatório da UNODC (2022), a cetamina não está sob controle internacional e é usado como anestésico em muitos países. No referido documento, está na classificação de *New Psychoactive Substances* (NPS – Novas substâncias psicoativas) e foi a substância que teve o maior crescimento no intervalo de 2016-2020, sendo a mais comumente mencionada em 56 de 77 países e também a mais comum em respostas de questionário online no intervalo de 2014 a 2021, apresentando uma queda de 2020 para 2021. Em dados extraídos de fluidos orais em festivais de música eletrônica no Brasil, cetamina foi encontrada a mais encontrada em 29,4% das amostras (United Nations Office on Drugs and Crime, 2022b).

A CET já foi usada em diferentes trabalhos de CPP, pelo método enviesado e não enviesado, com diferentes combinações variando as quantidades de sessões de condicionamento e diferentes doses e vias (*i.p.* e subcutânea – *s.c.*), dentre elas se encontram: 5; 10; 14; e 31,6 mg/Kg (Botanas et al., 2015; de la Peña et al., 2012; R. Guo et al., 2016; Y. Guo et al., 2018; Li et al., 2018; van der Kam et al., 2009).

Considerando a complexidade do TUS pelo seu acometimento de diferentes circuitos neurais, é de suma importância entender como se dá a ativação do circuito e sua correlação com o comportamento. Para isso, novas tecnologias não invasivas, não tóxicas, reversíveis e mais direcionadas ganham espaço, como a quimiogenética. Com estas informações, o objetivo do presente trabalho foi analisar a modulação do NAc e da VTA com ferramentas da quimiogenética via DREADDs por meio da análise de comportamento no contexto da preferência de lugar condicionada a um estímulo (CPP). e padronizar o teste utilizando cetamina em ratos Wistar.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos comportamentais da modulação quimiogénica na via mesolímbica no teste CPP em ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a expressão dos receptores inseridos no vírus AAV1-hDlxhM4d(Gi)-dTomato-Fishell-5 nas regiões NAc e VTA;
- Verificar a expressão dos receptores inseridos no vírus AAV8-CaMKIIahM4d(Gi)-mCherry nas regiões NAc e VTA;
- Avaliar o efeito comportamental da ativação de ambos os receptores pelo fármaco CNO no teste CPP, nos diferentes grupos;
- Avaliar o efeito comportamental da CETAMINA no teste CPP.

METODOLOGIA E RESULTADOS

3 METODOLOGIA E RESULTADOS

3.1 Sujeitos experimentais

Quarenta ratos (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas adultos da linhagem Wistar foram adquiridos de um biotério localizado em Anápolis, Goiás, Brasil. Os animais foram alojados em grupos de quatro indivíduos por caixa, com acesso ad libitum a alimento e água. O ambiente experimental foi mantido sob um ciclo claro/escuro de 12:12 horas (iluminação das 6:00 às 18:00 e escuro das 18:00 às 6:00), com temperatura controlada a 23,4 °C e umidade relativa de aproximadamente 80%. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), conforme protocolo nº 23106.045613/2024-79 e nº 23106.041055/2025-53 (ANEXOS A e B), garantindo o cumprimento das diretrizes éticas para o uso de animais em pesquisa (Princípios Éticos na Experimentação Animal, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Lei Arouca (Lei 11.794/2008).

3.2 Fármacos e drogas

A cetamina (Vetnil 10% - 60 mg/Kg), dexmedetomidina (Dexdomitor 0,25 mg/Kg), atipamezol (Antisedan 2,5 mg/Kg), Clozapina N-óxido 5 mg/Kg (CNO – Combi-Blocks 250 mg 95% diluída em 5% DMSO e solução salina fisiológica 0,9% NaCl), e tiopental de sódio (THIOpentax 2,5% dissolvido em solução salina fisiológica 0,9% NaCl) foram administrados via *i.p.* A lidocaína+epinefrina (Hypocaína 2%+0,005 mg/mL), meloxicam (Maxicam 2% - 2 mg/Kg), e tramadol (5 mg/Kg) foram administrados por via *s.c.* A pomada antibiótica foi aplicada de forma tópica na região da incisão cirúrgica (neomicina e bacitracina).

3.3 Análise citológica do ciclo estral

A citologia das fêmeas, integrantes dos grupos CET 3 e CET 5, foi realizada por meio da lavagem do canal vaginal com solução salina. O material coletado foi analisado com auxílio de microscopia de luz (*Leica® DM2000*) acoplado à câmera digital (*Leica® DFC310 FX*) para identificar os tipos celulares predominantes nas amostras dentre: células epiteliais cornificadas, células epiteliais nucleadas e

METODOLOGIA E RESULTADOS

leucócitos para classificá-las de acordo com as quatro fases do ciclo: diestro; proestro; estro; e metaestro.

O diestro é caracterizado pela predominância de leucócitos de maneira difusa e dura, em média 48 a 72 horas. Na sequência, a fase de proestro possui células epiteliais nucleadas e pequenas, de forma aglomerada com leucócitos mínimos ou ausentes com duração de 10 a 14 horas. É aqui que se inicia a fase de estro, correspondente à ovulação e receptividade sexual, caracterizada pela densa presença de células epiteliais cornificadas anucleadas e de forma aglomerada. Após o estro, se inicia o metaestro com aumento da população de leucócitos, com menor duração em comparação aos demais, de 6 a 8 horas.

O período do ciclo estral de ratas é de 5 dias na média (5 ± 1 dias) e, portanto, foi feita a análise em dias três dias sequenciais para determinar o início da contagem e foi feita uma estimativa na extensão do experimento. Anterior ao início da fase de habituação de cada grupo e ao final do protocolo experimental, foram feitas novas análises para confirmar as estimativas afim de correlacionar a ativação do sistema de recompensas por substâncias relacionadas ao TUS e identificar se há alterações sexo-específicas (V. K. et al., 2025).

3.4 Análise histológica

Com o objetivo de confirmar o alvo cirúrgico e a expressão dos vetores virais (grupos NAc-hDlx; NAc-CaMK; VTA-hDlx e VTA-CaMK), foram feitas as análises histológicas dos cérebros. Para isto, os animais foram eutanasiados com overdose de tiopental (120 mg/Kg *i.p.*), modulador alostérico positivo dos receptores GABA_A, fármaco barbitúrico de ação ultrarrápida, e perfundidos transcardiacamente com tampão fosfato (do inglês *phosphate buffered saline* – PBS) e formaldeído 4% para fixação dos tecidos e extração do cérebro. Uma vez extraído, o cérebro foi acondicionado em solução formaldeído 4% por 24 horas para pós-fixação para posterior processo de crioproteção utilizando concentrações crescentes de sacarose (10, 20 e 30% diluída em PBS) por no mínimo 24h cada e, por fim, o congelamento instantâneo com isopentano a -80°C . com a peça congelada, foram feitos os cortes

METODOLOGIA E RESULTADOS

histológicos no criostato (MC4000®, *Microtome Cryostat Double Compressor* – *HistoLine Laboratories*).

Os cortes dos animais dos grupos cirúrgicos com alvo no NAc (grupos NAcDlx e NAc-CaMK) foram acondicionados diretamente em lâminas silanizadas (Perfecta® 25x75 mm COD:158105B) e o processamento de marcação nuclear utilizando 4',6'-diamidino-2'-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) também feito diretamente na lâmina, segundo protocolo do APÊNDICE A. Já os cortes dos animais do grupo cirúrgico com alvo na VTA, grupos VTA-hDlx e VTA-CaMK, foram acondicionados em placas de 12 poços imersos no *anti-freezing* e o processamento de DAPI em *free-floating*, segundo protocolo do APÊNDICE B. A mudança de protocolo se deu por uma padronização interna do laboratório.

As lâminas foram analisadas no microscópio epifluorescente (*Leica® DM2000*) acoplado à câmera digital (*Leica® DFC310 FX*) utilizando os filtros A e N2.1 (*Leica® filter cube*). O primeiro filtro foi utilizado para observar a marcação DAPI (excitação/emissão 358nm/461nm) e o segundo para observação dos marcadores dTomato (554nm/581 nm) e mCherry (587nm/610 nm; *DTomato :: Fluorescent Protein Database*; *MCherry :: Fluorescent Protein Database*).

3.5 Análise comportamental e estatística

A análise comportamental dos dados obedeceu a protocolos específicos utilizando o software *AnyMaze* (*Stoelting Co.* – APÊNDICES C a H). Os comportamentos espontâneos foram marcados em função do tempo, bem como a distância percorrida de maneira automatizada, com o corpo do animal de referência. Os comportamentos contabilizados foram autolimpeza (*grooming*), exploração, elevação (*rearing*), escalada (*leg stand*), bocejo e tremor de mandíbula, além de mensurar o nível de ataxia, exclusivos aos grupos CET 3 e CET 5 (uma vez que é efeito da CET).

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software *GraphPad Prism®* 10.6.1 (*San Diego, CA, USA*), considerando valores de $p < 0,05$ como estatisticamente significativos. A normalidade dos dados foi avaliada com o teste *Shapiro-Wilk*.

METODOLOGIA E RESULTADOS

As comparações da variável temporal para obtenção do resultado do CPP foram feitas com Teste T pareado, para dados com distribuição normal, e equivalente não paramétrico, Teste *Wilcoxon*, quando necessário. Foram analisados os dados da sessão comportamental completa (1800 segundos) e de recortes temporais (600s, 900s iniciais e 900s finais) a fim de identificar a existência de uma variação no decorrer do teste. As análises foram feitas de acordo com o modelo enviesado, comparando o tempo gasto no compartimento designado como condicionado – CC – no segundo dia de habituação e os tempos nos dias de testes. Uma vez que a maioria dos animais apresentaram uma preferência prévia significativa, utilizar a própria linha de base proporciona um dado real de eventual mudança comportamental observado após as sessões de condicionamento.

Para análises de comportamento com múltiplas comparações, foram utilizados a análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*) como teste paramétrico e Teste de *Friedman* como equivalente não paramétricos, seguidas pelos testes *post-hoc Tukey* ou *Dunnet*, respectivamente.

Todas as ilustrações do presente trabalho foram criadas utilizando a plataforma *BioRender*.

Parte da redação foi aprimorada com auxílio da ferramenta de inteligência artificial Gemini, utilizada para corrigir aspectos gramaticais, revisar a coerência e coesão textual, sem interferir no conteúdo científico.

3.6 Teste comportamental

3.6.1 Aparato experimental

O aparato de preferência por lugar condicionado (CPP) é constituído por paredes pretas de acrílico (88 cm de largura x 40 cm de profundidade x 30 cm de altura), com uma barreira móvel de 8 cm feita com o mesmo material, dividindo em dois compartimentos (40 cm x 40 cm x 30 cm), o primeiro com padrão de bolas brancas e o segundo com padrão de listras verticais brancas. O piso de aço com duas texturas (liso e rugoso) foram produzidos de maneira que pudessem ser intercambiáveis, cada uma medindo 45 cm x 45 cm. Uma câmera foi montada sobre o aparelho (*fifine® K420 PORTABLE HD WEBCAM1440P/30FPS*). Nos dias de habituação e testes, a barreira

METODOLOGIA E RESULTADOS

foi removida para criar uma configuração de aparato com livre acesso aos dois compartimentos e nos dias de condicionamento, a barreira esteve presente, para que o animal fosse confinado a um dos dois compartimentos, de acordo com o cronograma experimental (Figura 7). A iluminação dos compartimentos foi aferida utilizando um medidor de iluminância (Luxímetro *LUMIX*®) e apresentou valores equivalentes entre as áreas, garantindo a ausência de viés luminoso na escolha dos animais.

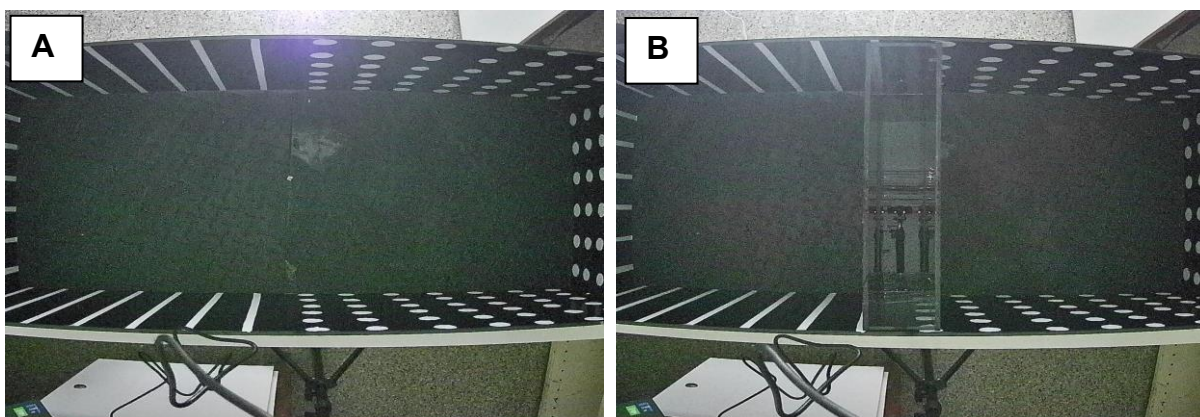


Figura 7 | Aparato experimental: A – Aparato com livre acesso e B – Aparato com barreira. Fonte própria.

O protocolo geral de CPP consiste em três fases principais: habituação, condicionamento e teste. Durante a habituação, a variável tempo de permanência em cada compartimento (listrado ou circular) foi mensurada para averiguar a preferência prévia dos sujeitos e, assim, designar qual seria o compartimento condicionado (CC) e o não condicionado (NC). Pelo método enviesado, de escolha para a presente pesquisa, o compartimento que o animal passa menos tempo naturalmente é o selecionado para ser associado ao tratamento.

Durante a fase de condicionamento, o animal é isolado a um dos compartimentos com seu tratamento (fármaco ou solução salina), em dias alternados, por 30 minutos, iniciando sempre pelo fármaco. Por fim, a fase de teste, com duas sessões em dias diferentes; nas quais o animal tem acesso a todo o aparato novamente e o tempo de permanência em cada lado é contabilizado, bem como os comportamentos manifestados. O primeiro teste foi realizado no dia seguinte ao último dia de condicionamento, no qual animal foi colocado no aparato da mesma maneira que foi feito na fase de habituação. No segundo dia de teste, os animais receberam a

METODOLOGIA E RESULTADOS

dose do tratamento utilizada nos dias de condicionamento antes de serem colocados no aparato, a fim de avaliar os efeitos comportamentais associados ao estado induzido pela droga. Para o Experimento 2 foi feita uma fase extra de teste de extinção, em cinco sessões com acesso a todo o aparato, sem nenhuma administração e em dias consecutivos, como feito na fase de habituação. Os detalhes de cada experimento serão explorados a seguir.

Os resultados obtidos serão apresentados em blocos por Experimento. Inicialmente o cronograma metodológico, seguido dos dados do Teste de CPP e dados comportamentais.

Antes de iniciar qualquer procedimento, todos os animais tiveram sessões de *handling*, que é, por consenso científico, o manuseio/manejo e interação com o animal de maneira segura, ética e minimamente estressante, garantindo tanto o bem-estar do animal quanto a segurança do pesquisador. Durante todo o protocolo experimental, os animais tiveram acompanhamento do veterinário responsável.

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 1

3.7 Experimento 1

Para investigar a característica inerte do CNO na ausência de receptores geneticamente alterados e responsivos ao ligante, o protocolo de CPP foi realizado, seguindo o protocolo geral, com a especificação de 12 dias de condicionamento (seis de CNO e seis de solução salina, em dias alternados). CNO 5 mg/Kg *i.p.* foi administrado imediatamente antes do animal ser posicionado no compartimento menos preferido inicialmente. A representação do protocolo do grupo controle está exemplificada na Figura 8. Os animais desse grupo, $n = 4$, machos, estavam com oito meses.

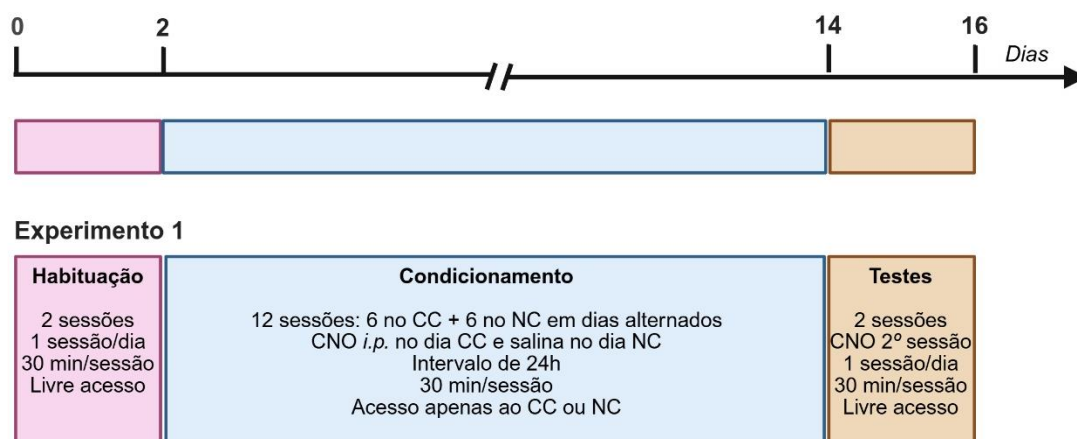


Figura 8 | Cronograma Experimento 1: Controle CNO; Grupo 1 $n = 4$. Feita no Biorender.

3.7.1 Resultados

3.7.1.1 Teste CPP

No Experimento 1, foi demonstrado que o fármaco ativador CNO, na ausência de receptores, não foi capaz de gerar preferência nos sujeitos experimentais em ambos os dias de Teste (Figura 9). Foi feita a análise da sessão experimental inteira (30 minutos – A e E) e em recortes temporais [10 minutos (B e F), 15 minutos iniciais (C e G) e 15 minutos finais (D e H)] e com a sessão do experimento inteira (30 minutos – A e E) e, em nenhuma das análises foi visto uma mudança comportamental.

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 1

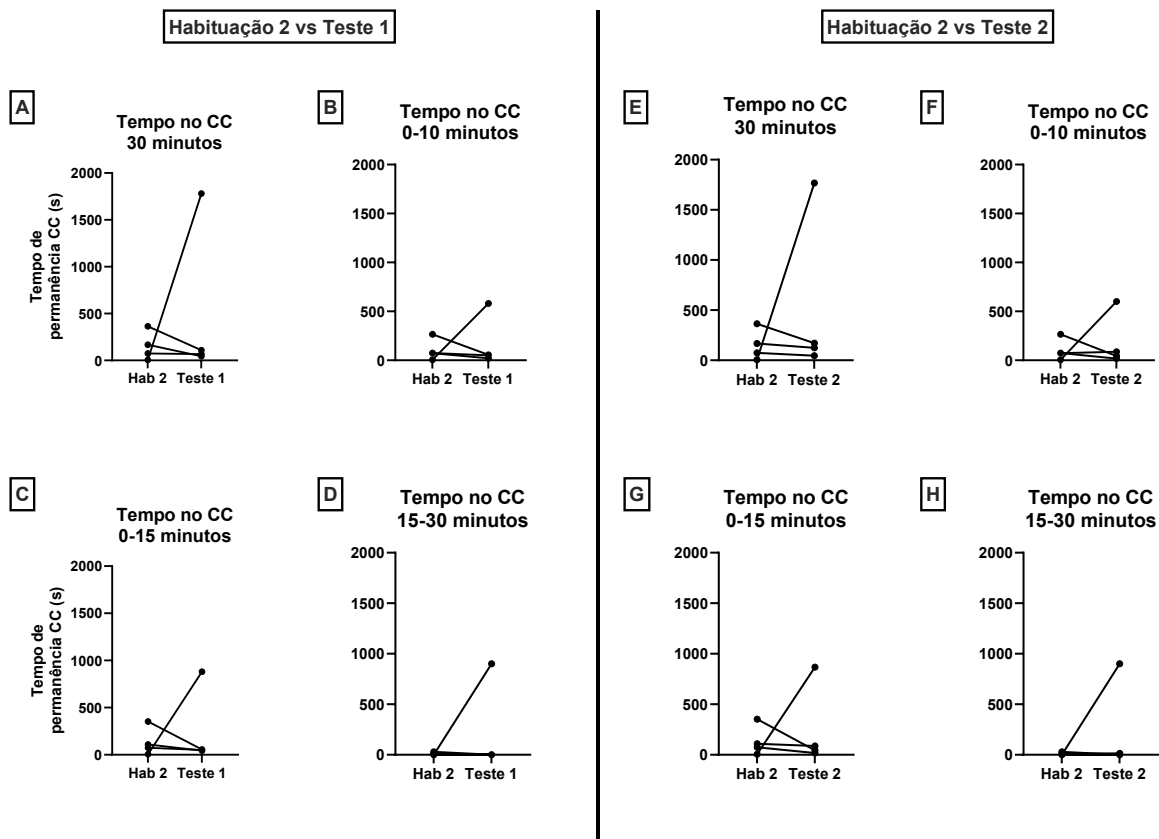


Figura 9 | Tempo gasto no CC por sessão. A e E – sessão completa; B e F – recorte dos 10 minutos iniciais; C e G – recorte dos 15 minutos iniciais; e D e H – recorte dos 15 minutos finais. As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por Teste Wilcoxon pareado.

3.7.1.2 Comportamentos

Foi mensurada a distância percorrida, em metros, de maneira automática e a duração do comportamento de exploração. O tratamento com CNO 5 mg/Kg *i.p.* não apresentou alteração no padrão de locomoção, tampouco no padrão de exploração (Figura 10).

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 1

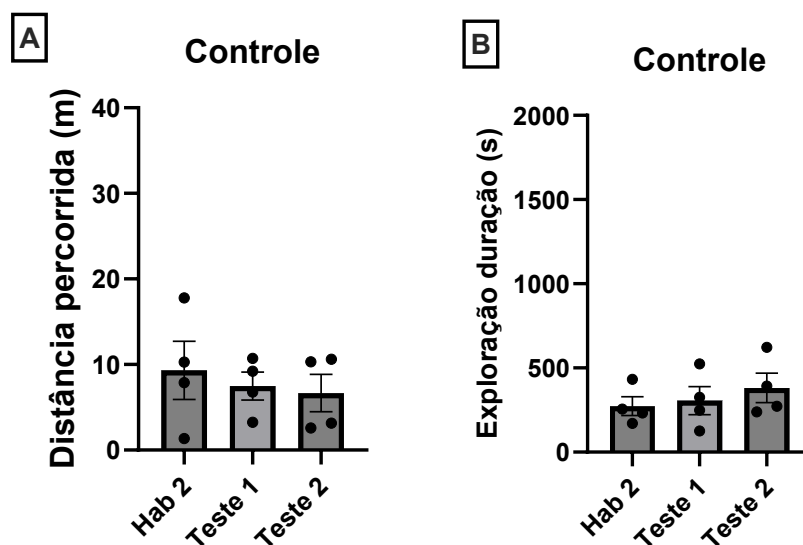


Figura 10 | A – Distância percorrida, em metros, por sessão e B – Duração da exploração, em segundos, por sessão. Resultados apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por One-way ANOVA repeated measures.

O tempo de imobilidade de cada sessão foi analisado com a finalidade de entender a disposição comportamental ao longo do protocolo. O grupo controle se manteve com imobilidade em torno de 80% da sessão, que corrobora o dado de baixa exploração (Figura 11).

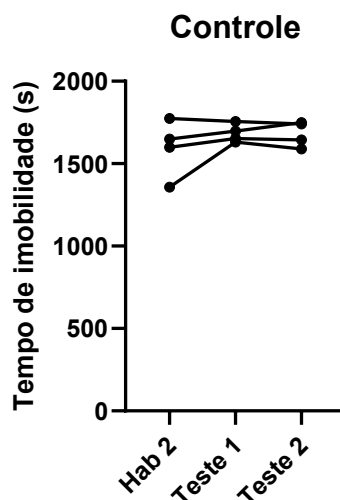


Figura 11 | Tempo total de imobilidade, em segundos, por sessão. As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por One-way ANOVA repeated measures

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 1

Foi contabilizado o comportamento basal de autolimpeza (*grooming*), e, na comparação entre linha de base e os dias de teste, não apresentou alteração (Figura 12).

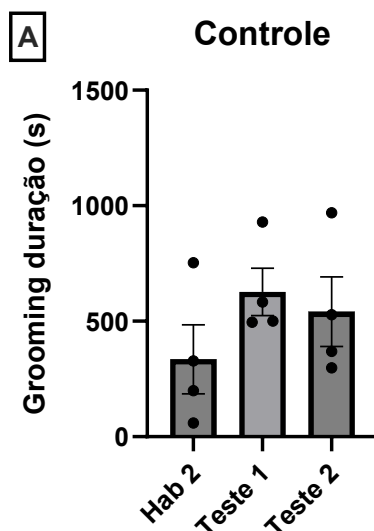


Figura 12 | Duração do grooming, em segundos, por sessão. Resultado apresentado como média \pm erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por Oneway ANOVA repeated measures.

O tremor de mandíbula foi contabilizado por ser um comportamento diferente do padrão de observação geral em roedores. Entretanto, não houve diferença estatística observada após o tratamento com CNO 5 mg/Kg (Figura 13).

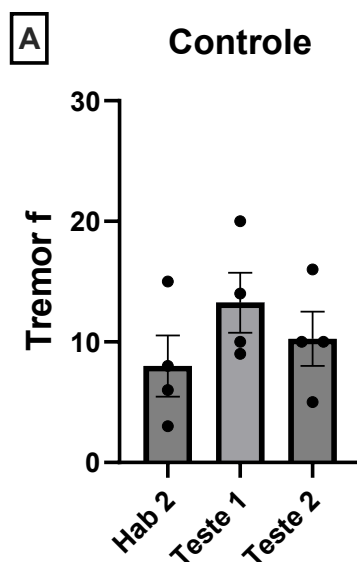


Figura 13 | Frequência de Tremor por sessão. Resultado apresentado como média \pm erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por One-way ANOVA repeated measures

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 2

3.8 Experimento 2

O objetivo do Experimento 2 foi de padronizar o aparato criado com um fármaco capaz de induzir alteração comportamental neste teste com base na literatura. O protocolo de CPP foi realizado com o fármaco CET (10 mg/Kg *i.p.*).

Foi feita uma sessão de habituação extra no início do protocolo. Durante essa habituação, dois sujeitos foram habituados simultaneamente durante 30 minutos, com a finalidade de retirar qualquer aversão prévia. Além disso, o número total de dias de condicionamento foi diferente entre os dois grupos, o grupo CET 3 feito em seis dias (três sessões de CET e três de solução salina, dias alternados) e o grupo CET 5 em 10 dias (cinco de CET e cinco de solução salina). Ambos os grupos tiveram os dois testes previstos no protocolo e a fase de testes de extinção do condicionamento, com cinco sessões ao total. A representação do protocolo está exemplificada na Figura 14. Os animais desses grupos com quatro meses (grupo CET 3) e cinco meses (grupo CET 5), ambos os grupos compostos por machos e fêmeas.

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 2

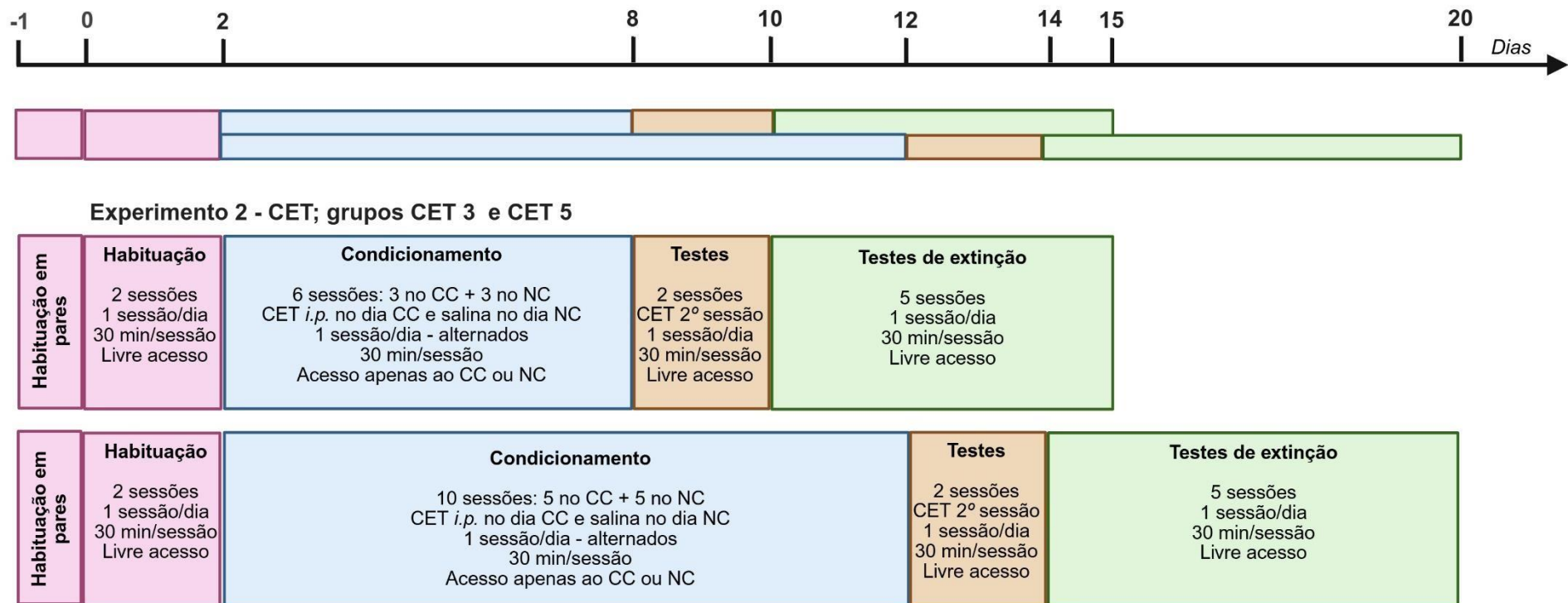


Figura 14 | Cronograma Experimento 2: Cetamina; Grupos CET 3 e CET 5 n = 8. Feita no Biorender.

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 2

3.8.1 Resultados

3.8.1.1 Teste CPP

No Experimento 2, cetamina 10 mg/Kg *i.p.*, grupos CET 3 (3 sessões de condicionamento) e CET 5 (5 sessões), os dados foram analisados da mesma maneira. O grupo CET 3, considerando a sessão inteira, apresentou diferença significativa apenas comparando a linha de base (Habituação) com o Teste 2 (Figura 15). Ao analisar os recortes temporais, em comparação com o Teste 1, apresenta diferença nos recortes 10 e 15 minutos iniciais, enquanto todos os recortes foram estatisticamente diferentes no dia do Teste 2.

Em relação ao grupo CET 5, não houve diferença nas análises do Teste 1 e apresentou no Teste 2, considerando a sessão inteira e o recorte dos 15 minutos finais (Figura 16).

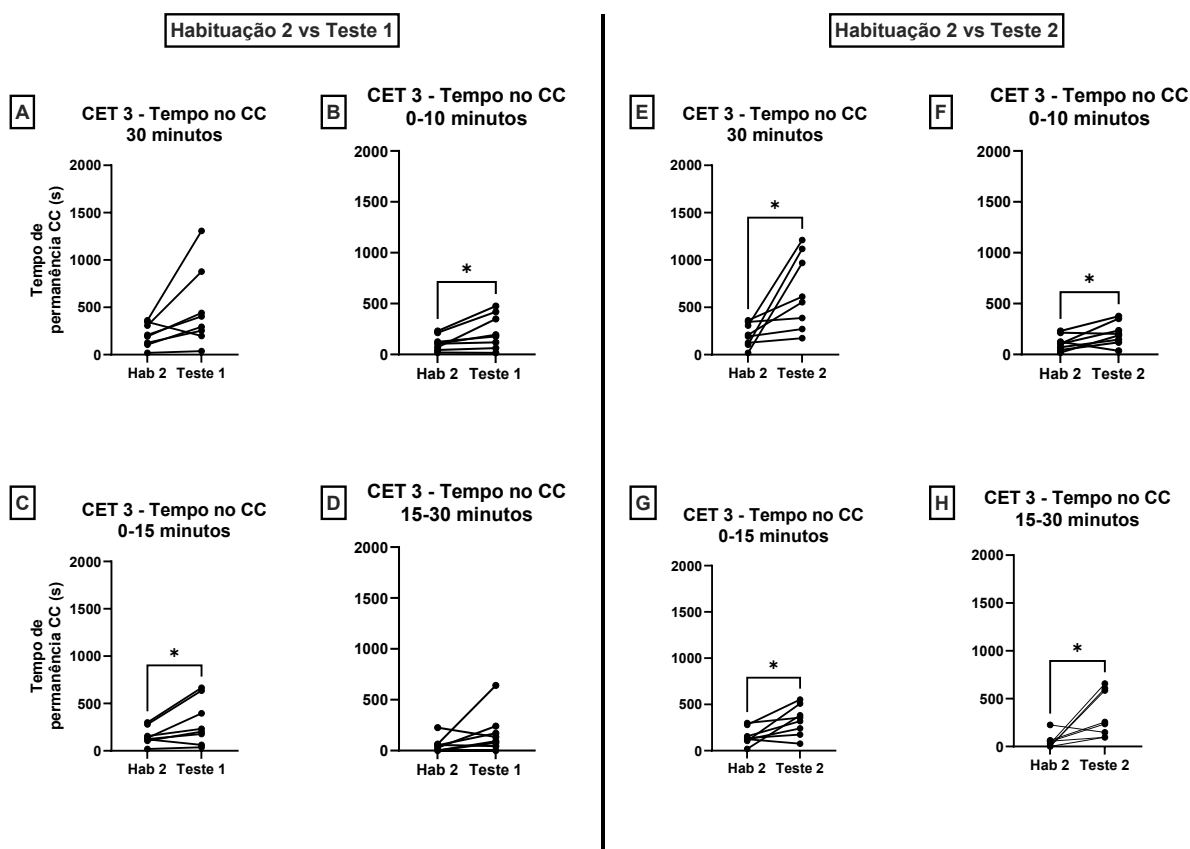


Figura 15 | Tempo gasto no CC por sessão grupo CET 3. A e E – sessão completa; B e F – recorte dos 10 minutos iniciais; C e G – recorte dos 15 minutos iniciais; e D e H – recorte dos 15 minutos finais. As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por Teste *t* pareado (A, B, C, E, F e G) e Teste Wilcoxon pareado (D e H). Símbolo de significância estatística * $p < 0,05$.

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 2

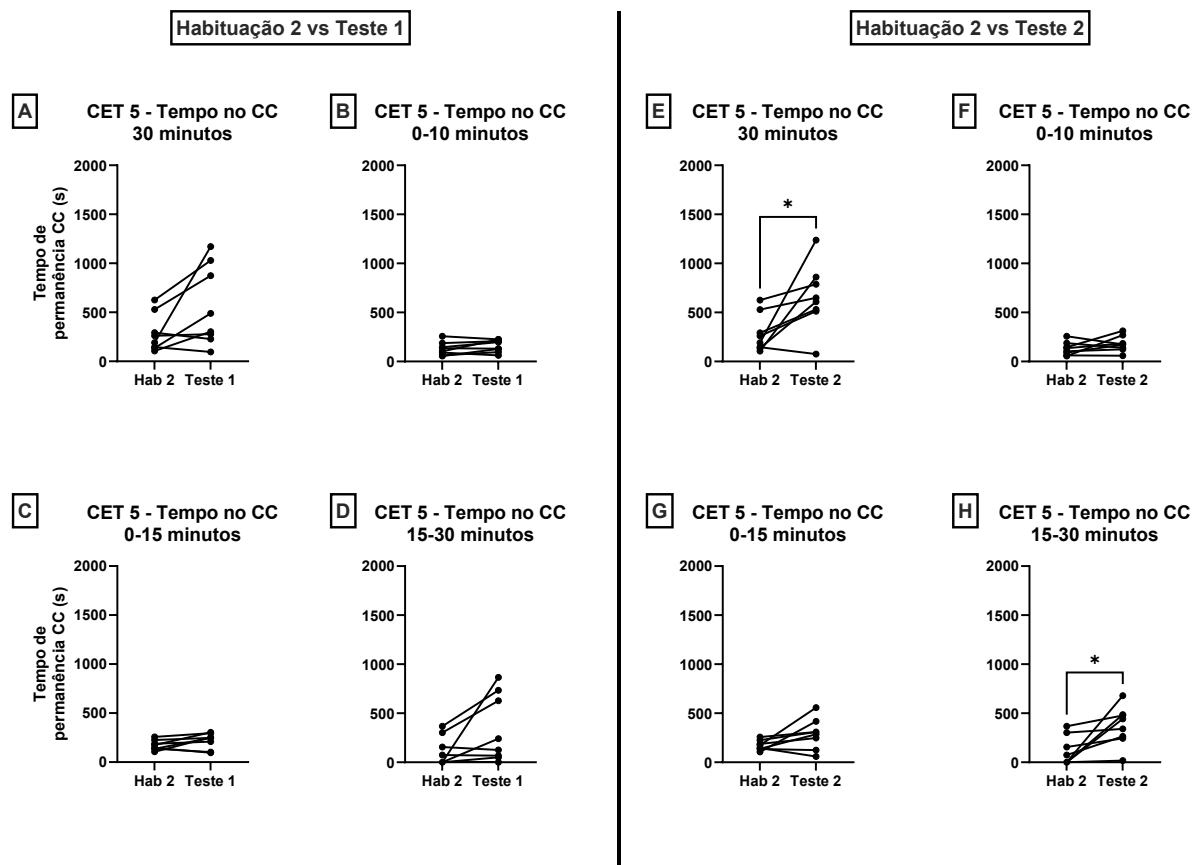


Figura 16 | Tempo gasto no CC por sessão grupo CET 5. A e E – sessão completa; B e F – recorte dos 10 minutos iniciais; C e G – recorte dos 15 minutos iniciais; e D e H – recorte dos 15 minutos finais. As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por Teste *t* pareado (A, B, C, E, F e G) e Teste Wilcoxon pareado (D e H). Símbolo de significância estatística * $p < 0,05$.

3.8.1.2 Comportamentos

A distância percorrida e duração da exploração foram estatisticamente alterados pela CET 10 mg/Kg *i.p.* a comparação da linha de base e do Teste 1 com os dados do Teste 2 demonstram a relatada hiperlocomoção associada à administração (Figura 17).

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 2

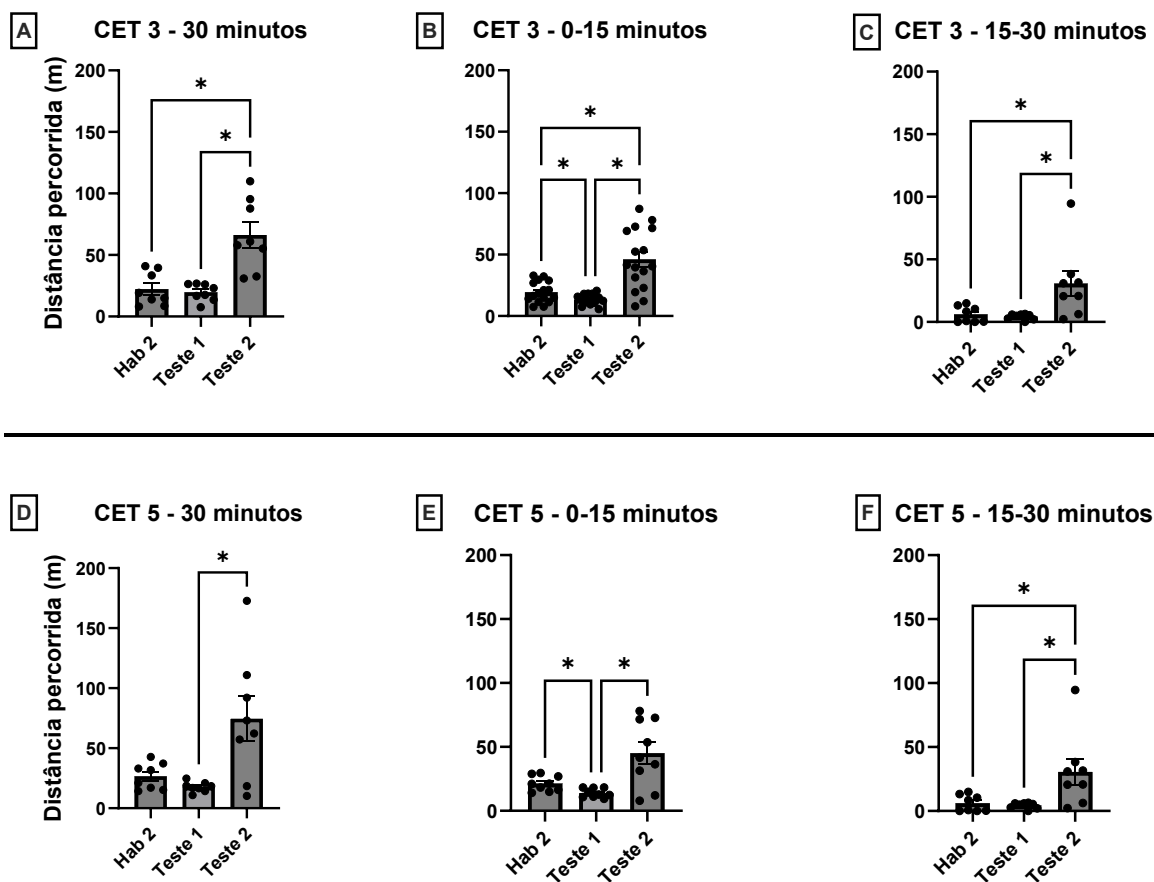


Figura 17 | Distância percorrida, em metros, por sessão dos grupos CET 3 e CET 5, com seus recortes temporais, todos tratados com CET 10 mg/Kg i.p. A – grupo CET 3 (sessão inteira); B – grupo CET 3 (recorte dos 15 minutos iniciais); C – grupo CET 3 (recorte dos 15 minutos finais), D – grupo CET 5 (sessão inteira); E – grupo CET 5 (recorte dos 15 minutos iniciais); e F – grupo CET 5 (recorte dos 15 minutos finais). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por One-way ANOVA repeated measures (B, D e E); e Teste Friedman ANOVA (A, C e F). Símbolo de significância estatística * $p < 0,05$.

A Figura 18 traz o *track plot* representativo dos dados de distância percorrida, ratificando que no Teste 2 os animais dos grupos CET 3 e CET 5 se mantiveram ativos mais da metade da sessão, como também é mostrado pelo tempo de exploração aumentado (Figura 19).

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 2

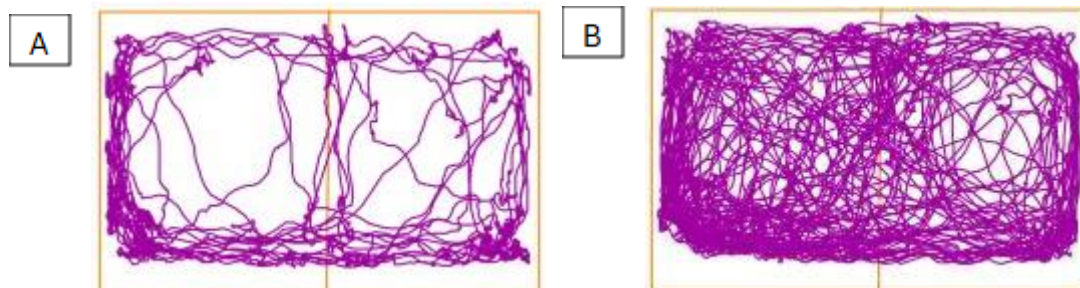


Figura 18 | Track plot animal do grupo CET 3. A – Padrão de locomoção Teste 1; B – padrão de locomoção Teste 2.

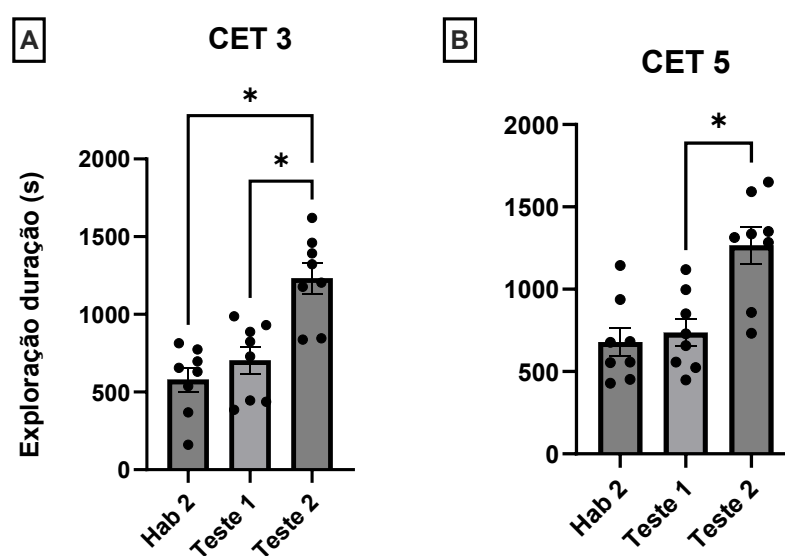


Figura 19 | Duração da exploração, em segundos, por sessão. A – grupo CET 3 e B – grupo CET 5. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por One-way ANOVA repeated measures. Símbolo de significância estatística $p < 0,05$.

O tempo de imobilidade corrobora o dado de aumento de exploração, visto que houve uma diminuição quando se compara o Teste 2 com Habituação e Teste 1 (Figura 20).

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 2

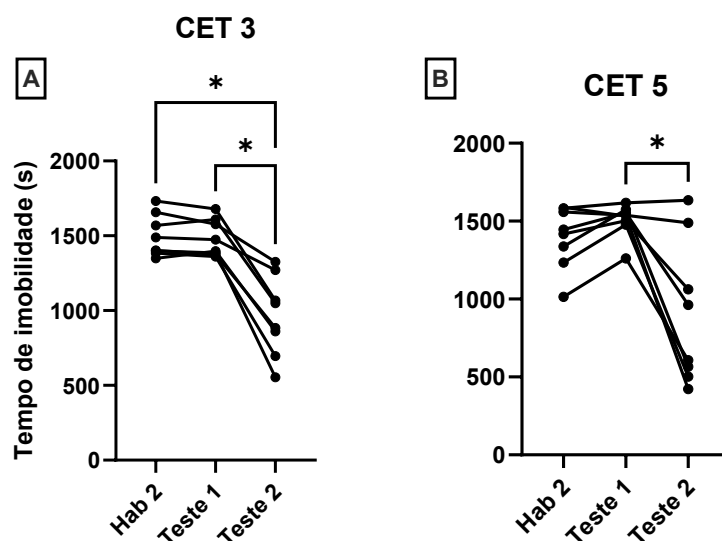


Figura 20 | Tempo total de imobilidade, em segundos, por sessão. A – grupo CET 3 e B – grupo CET 5. As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por A – One-way ANOVA repeated measures e B – Teste Friedman. Símbolo de significância estatística $p < 0,05$.

Foi contabilizado o comportamento basal de autolimpeza (*grooming*), e, na comparação entre linha de base e os dias de teste, não apresentou alteração (Figura 21).

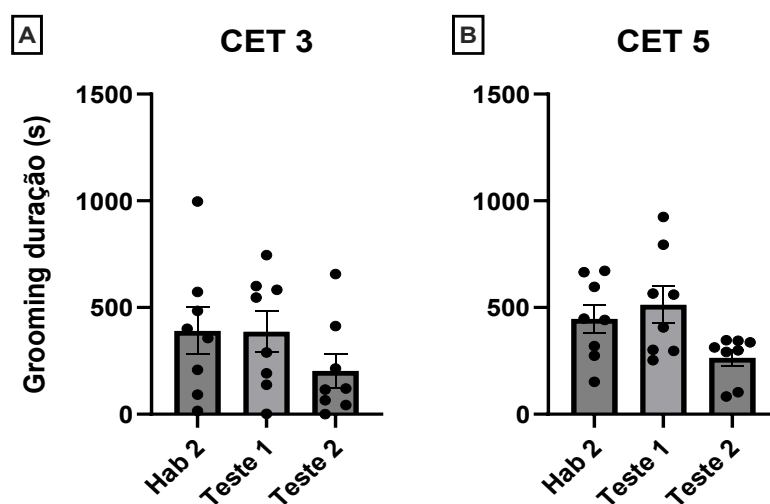


Figura 21 | Duração do grooming, em segundos, por sessão. A – grupo CET 3 e B – grupo CET 5. Resultados apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por A – One-way ANOVA repeated measures e B – Teste Friedman.

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 2

O tremor de mandíbula também não apresentou alteração após o tratamento com CET 10 mg/Kg *i.p.* (Figura 22).

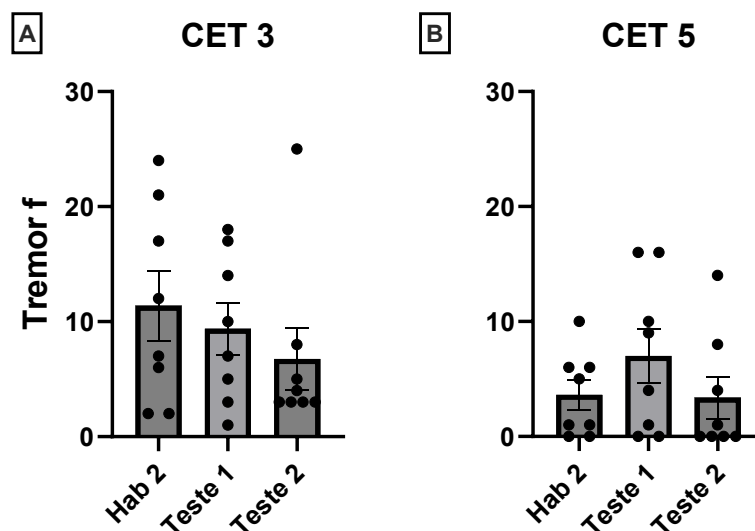


Figura 22 | Frequência de Tremor por sessão. A – grupo CET 3 e B – grupo CET 5. Resultado apresentado como média \pm erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas pelo Teste Friedman.

3.8.1.3 Testes de extinção

Com intuito de avaliar o tempo necessário para quebra de preferência, uma vez instalada, foi incorporado no Experimento 2 a fase de Testes de Extinção, com uma sessão de 30 minutos por dia durante cinco dias. Os gráficos da Figura 23 demonstram as médias do grupo em cada sessão, ao comparar linha de base, dias de testes e testes de extinção. A média geral do tempo de permanência no CC de ambos os grupos aumentou com o passar das sessões, o que vai de encontro ao esperado que seria uma diminuição do tempo no CC após um aumento nos dias de teste (animais condicionados). Os gráficos apresentam uma linha na marca de 900 s, representativo da metade da sessão, mostrando que a maioria das sessões, os resultados de permanência se mantiveram inferiores a 50%. Somado a isso, a diferença estatística observada entre a linha de base e a segunda sessão de extinção do grupo CET 3, isoladamente, não é indicativo de alteração do padrão comportamental.

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 2

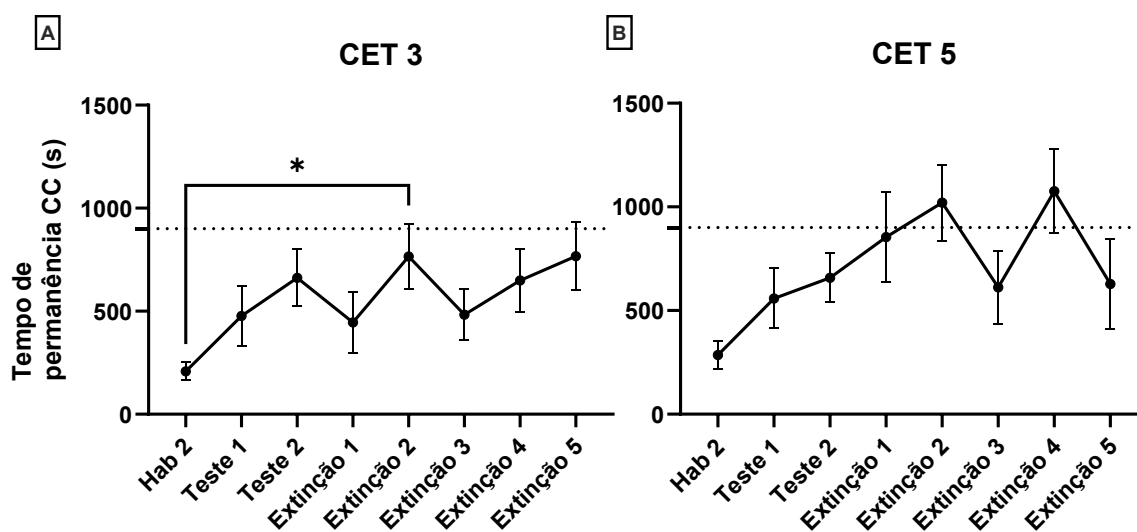


Figura 23 | Média do tempo gasto no CC por sessão Experimento 2. A – grupo CET 3; B – grupo CET 5. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). As comparações entre as médias de cada sessão do mesmo grupo foram feitas por One-way ANOVA repeated measures (A) e Teste Friedman (B).

3.8.1.4 Ataxia

Junto ao aumento de locomoção, os sujeitos dos grupos CET 3 e CET 5, sob efeito de CET 10 mg/Kg apresentaram ataxia ao longo das sessões de condicionamento. Foi realizado um *score* médio baseado na classificação qualitativa representada na Tabela 1.

Tabela 1 | Níveis de Ataxia

Nível	Correlato comportamental
0	Locomoção normal
1	Atraso em um dos membros; movimentos oscilantes
2	Movimentação letárgica e descoordenada, eventuais perdas de postura
3	Locomoção rastejante e descoordenada; impossibilita <i>grooming</i> e elevação/escalada

Os animais foram ranqueados segundo o *score* e este foi correlacionado com o tempo de permanência no CC e com a distância percorrida nos dois dias de teste.

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 2

A correlação *score* com tempo de permanência no CC foi positiva em ambos os dias de teste, com $p < 0,05$ e $r = 0,7658$ e $0,5787$, respectivamente (Figura 24 A e B). A correlação *score* com distância percorrida foi também positiva, com $p < 0,05$ e $r = 0,6112$ considerando a distância percorrida no dia do Teste 1 e $p > 0,05$ e $r = 0,4797$ considerando a distância percorrida no dia do Teste 2 (Figura 24 C e D)

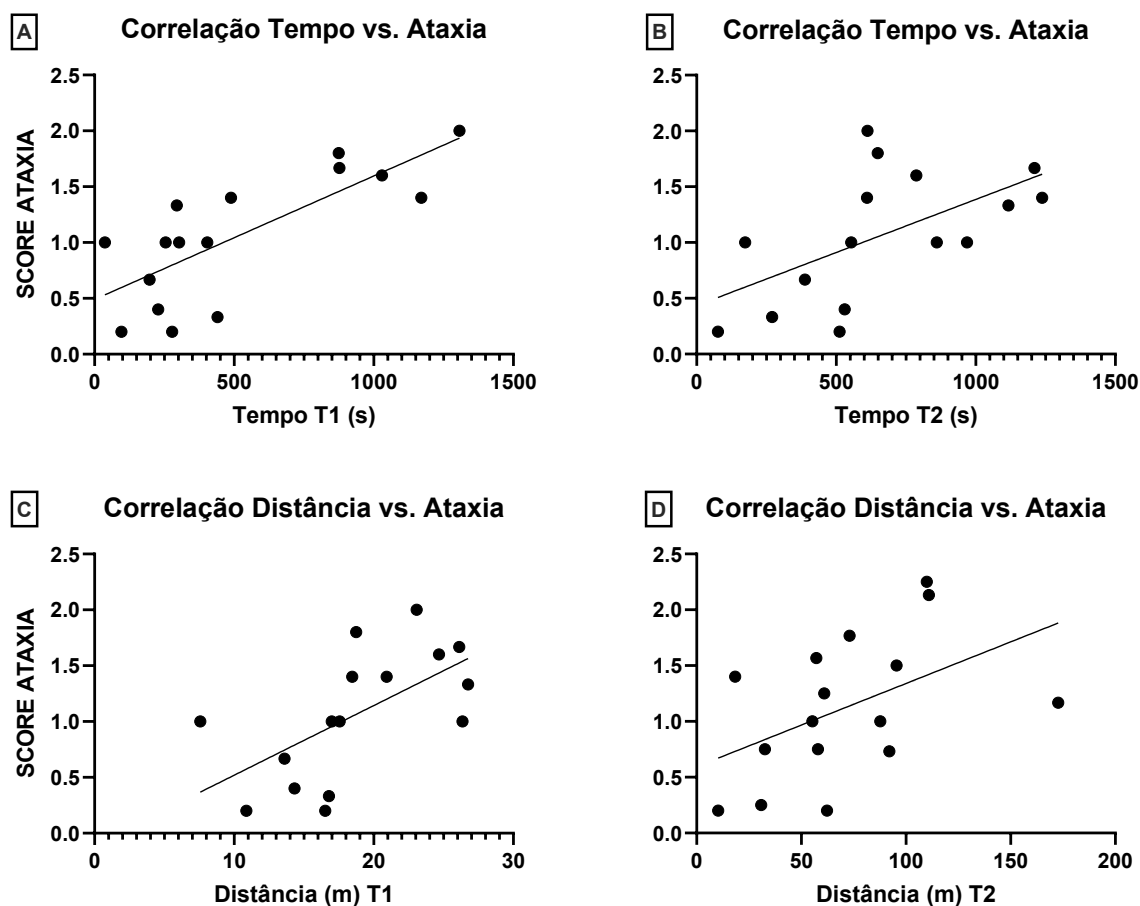


Figura 24 | Correlação de Tempo e Distância vs. Score de Ataxia dos grupos CET 3 e CET 5 juntos. A – Correlação Tempo no CC do Teste 1 com o score de Ataxia, coeficiente $r = 0,7658$; B – Correlação Tempo no CC do Teste 2 com o score de Ataxia, coeficiente $r = 0,5787$; C – Correlação Distância percorrida no Teste 1 com o score de Ataxia, coeficiente $r = 0,6112$; D – Correlação Distância percorrida no Teste 2 com o score de Ataxia, coeficiente $r = 0,4797$. Coeficiente de correlação de Pearson.

3.8.1.5 Citologia

O ciclo estral das fêmeas, parte dos grupos CET 3 e CET 5, foi analisado ao longo do protocolo experimental pelo tipo celular predominante da lavagem do canal vaginal com solução salina. A partir da avaliação inicial (Figura 25), foram tabeladas

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 2

as estimativas de cada fase por toda extensão do protocolo, considerando a média de 5 dias do ciclo.

Com as análises *a priori* da fase de habituação e *a posteriori* dos testes de extinção, as estimativas se confirmaram comprovando que a administração de cetamina 10 mg/Kg *i.p.* não interfere com o ciclo estral. A média de 5 dias por ciclo foi confirmada. Pelo número limitado de fêmeas por grupo, não foi observada alterações comportamentais em relação aos machos.

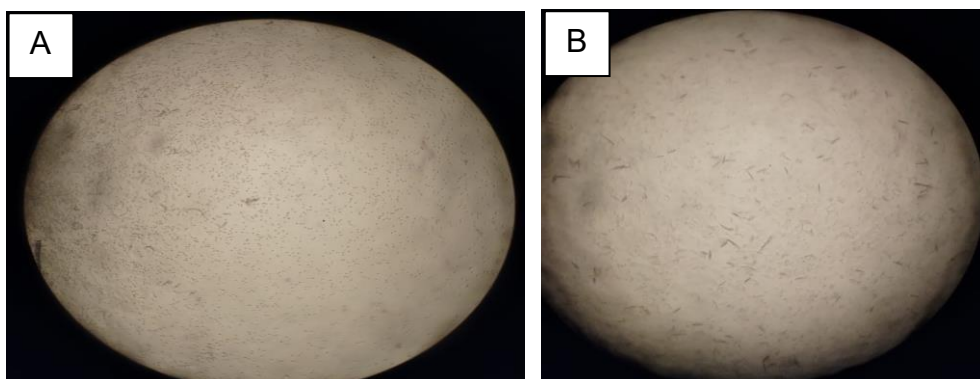


Figura 25 | A) Diestro e B) Proestro

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 3

3.9 Experimento 3

O objetivo do Experimento 3 foi avaliar se a manipulação quimiogénica no contexto do CPP seria capaz de condicionar o comportamento do animal.

3.9.1 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados por via *i.p.*, com cetamina (Vetnil, 10%; 60 mg/kg) e dexmedetomidina (Dexdomitor; 0,25 mg/kg; agonista seletivo do receptor α_2 adrenérgico) e posicionados no aparelho estereotáxico. A área cirúrgica foi preparada com povidona-iodo, seguida da administração *s.c.*, de lidocaína associada à epinefrina (Hypocaína, 2% + 0,005 mg/mL; bloqueador dos canais de sódio voltagemdependentes e agonista adrenérgico para vasoconstrição) no local da incisão. As coordenadas estereotáxicas para o NAc e para a VTA foram determinadas de acordo com Paxinos & Watson (2007): (AP: 1,50, ML: -1,80 e DV: -7,0 e AP: -4,92, ML: - 2,28 e DV: -8,53 com angulação de 10° respectivamente; Figura 27), e uma seringa Hamilton de 10 μ L foi usada para injetar 0,5 μ L do vetor viral no NAc e 0,3 μ L na VTA a uma taxa de 0,5 μ L/3 minutos (bomba de infusão Bonther). Após a inoculação, o animal foi liberado do aparelho estereotáxico e a incisão cirúrgica foi suturada seguindo uma segunda preparação asséptica e pomada antibiótica tópica (neomicina e bacitracina) foi aplicada diariamente por 3 dias. Para analgesia, meloxicam *s.c.* (Maxicam 2% - 2 mg/Kg; anti-inflamatório não esteroide). foi administrado diariamente por 3 dias e uma única dose de tramadol *s.c.* (5 mg/Kg; agonista receptores opióides) foi administrada ao final da cirurgia. Para a recuperação da sedação, foi administrada o medicamento de reversão atipamezol (Antisedan 2,5 mg/Kg; antagonista seletivo do receptor α_2 adrenérgico) *i.p.* Além disso, 1 mL de solução salina *s.c.* foi administrado para reidratação.

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 3

portanto, o pareamento de CNO foi feito no compartimento inicialmente preferido (com a expectativa de uma diminuição do tempo de permanência após as sessões de condicionamento) e para o grupo VTA a inativação pela variação dos tipos neuronais (dopaminérgicos, noradrenérgicos, serotoninérgicos, glutamatérgicos e GABAérgicos) poderia aumentar a liberação de DA ou diminuí-la e pela característica da preferência prévia robusta dos animais, optamos por parear o CNO ao compartimento menos preferido.

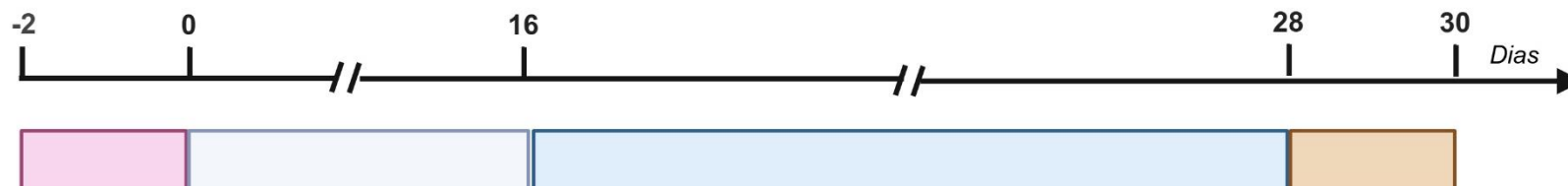
3.9.2 Protocolo Experimental

O protocolo foi adaptado da seguinte maneira: a habituação para determinar a preferência prévia foi feita antes dos animais serem submetidos à cirurgia estereotáxica. Para os grupos com os vetores virais infundidos no núcleo *accumbens* (NAc-hDlx, grupo vetor de interneurônio e NAc-CaMK, grupo vetor de neurônio), a habituação feita foi de 15 minutos e para os grupos com infusão na área tegmental ventral (VTA-hDlx e VTA-CaMK) a duração foi de 30 minutos. Após os 14 dias sem intervenção, foi feita uma sessão de reexposição ao aparato (cinco minutos de duração) com o intuito de refamiliarizar antes do início do condicionamento.

Como mencionado, o modelo de CPP seguido foi enviesado, de modo que o CNO 5 mg/Kg *i.p.* foi administrado no CC e salina, mesmo volume *i.p.* no NC, com exceção do grupo NAc-CaMK, que CNO foi administrado no NC

A representação do protocolo está exemplificada na Figura 26. Os animais estavam com cinco meses (grupos NAc-hDlx e NAc-CaMK) e nove meses (grupos VTA-hDlx e VTA-CaMK), todos machos.

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 3



Experimento 3 - CNO/NAc; grupos NAc-hDlx e NAc-CaMK

Habituação	Cirurgia NAc	Condicionamento	Testes
2 sessões 1 sessão/dia 15 min/sessão Livre acesso	Infusão do vírus NAc vírus hDlx.hM4d vírus CaMKIIa.hM4d 15 dias sem intervenção	12 sessões: 6 no CC + 6 no NC em dias alternados CNO <i>i.p.</i> no dia CC e salina no dia NC Intervalo de 24h 30 min/sessão Acesso apenas ao CC ou NC	2 sessões CNO 2ª sessão 1 sessão/dia 30 min/sessão Livre acesso

Experimento 3 - CNO/VTA; grupos VTA-hDlx e VTA-CaMK

Habituação	Cirurgia VTA	Condicionamento	Testes
2 sessões 1 sessão/dia 30 min/sessão Livre acesso	Infusão do vírus NAc vírus hDlx.hM4d vírus CaMKIIa.hM4d 15 dias sem intervenção	12 sessões: 6 no CC + 6 no NC em dias alternados CNO <i>i.p.</i> no dia CC e salina no dia NC Intervalo de 24h 30 min/sessão Acesso apenas ao CC ou NC	2 sessões CNO 2ª sessão 1 sessão/dia 30 min/sessão Livre acesso

Figura 28 | Cronograma Experimento 3 – Fase Cirúrgica. Cirurgia de infusão dos vetores virais hDlx.hM4d e CaMKIIa.hM4d nos alvos NAc e VTA. Grupos NAc-hDlx e NAc-CaMK $n = 6$ e grupos VTA-hDlx e VTA-CaMK $n = 4$. Feito no Biorender.

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 3

3.9.2 Resultados

3.9.2.1 Expressão celular

Os achados histológicos são referentes ao Experimento 3, com os sujeitos que foram submetidos à cirurgia estereotóxica com alvos em NAc (grupos NAc-hDlx e NAc-CaMK) e VTA (grupos VTA-hDlx e VTA-CaMK). Como os dois vetores possuem proteínas marcadoras que emitem no vermelho, todos os registros mostram em vermelho as células que expressaram o receptor de interesse e em azul os núcleos celulares da marcação com DAPI.

3.9.2.1.1 NAc

A expressão do grupo NAc-hDlx, vetor viral AAV1.hDlx.hM4D(Gi)-dTomato.Fishell5 e alvo no NAc é demonstrada pela Figura 29. A visualização do NAc foi guiada pela presença do terceiro ventrículo e pela comissura anterior (feixe de axônios, círculo azul na imagem com a expressão ao redor em vermelho).

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 3

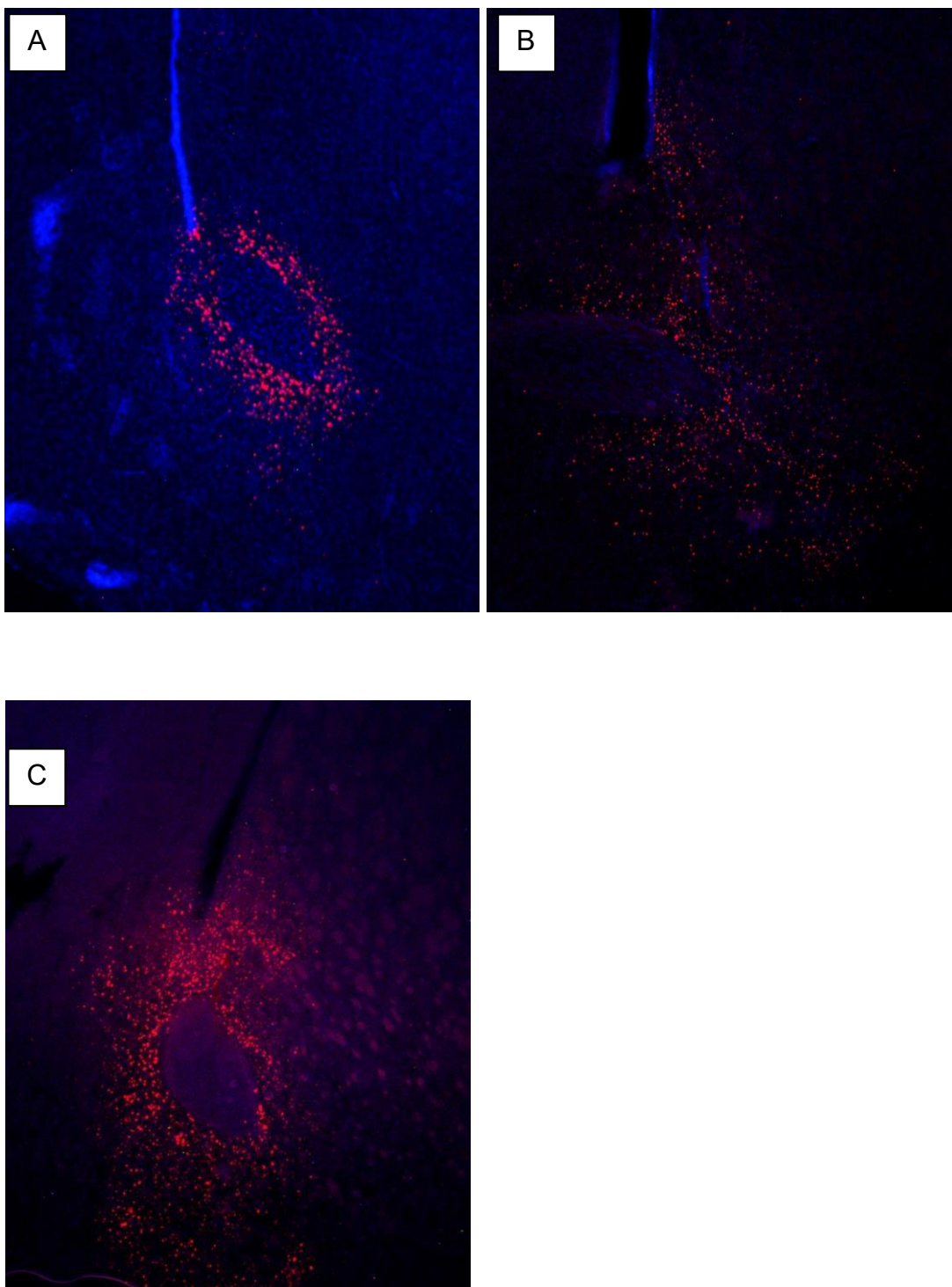


Figura 29 | Expressão do vetor AAV1.hDlx.hM4D(Gi)-dTomato.Fishell5 no NAc. Em azul núcleos celulares e em vermelho células que expressaram o receptor. A, B e C são a representação de diferentes animais do grupo NAc-hDlx com aumento de 4x.

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 3

A expressão do grupo NAc-CaMK, vetor viral AAV8.CaMKIIa.hM4D(Gi)mCherry e alvo no NAc foi identificada da mesma forma (Figura 30).

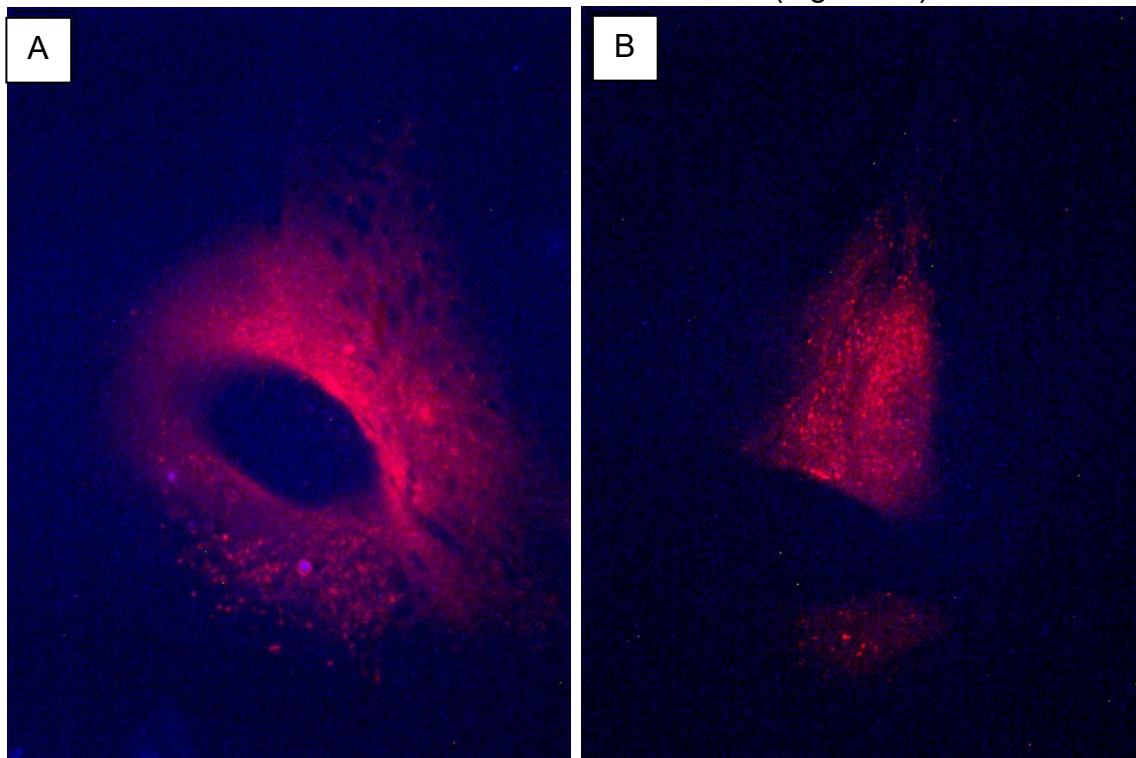


Figura 30 | Expressão do vetor AAV8.CaMKIIa.hM4D(Gi)-mCherry no NAc. Em azul núcleos celulares e em vermelho células que expressaram o receptor. A e B são a representação de diferentes animais do grupo NAc-CaMK com aumento de 4x.

Foi observada a expressão em todos os animais de ambos os grupos. Essa expressão acompanhou a comissura por sua extensão no AP (Figura 31), sendo vista em diferentes cortes compreendendo aproximadamente quatro milímetros. De maneira geral, a representação gráfica da expressão está na Figura 32.

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 3

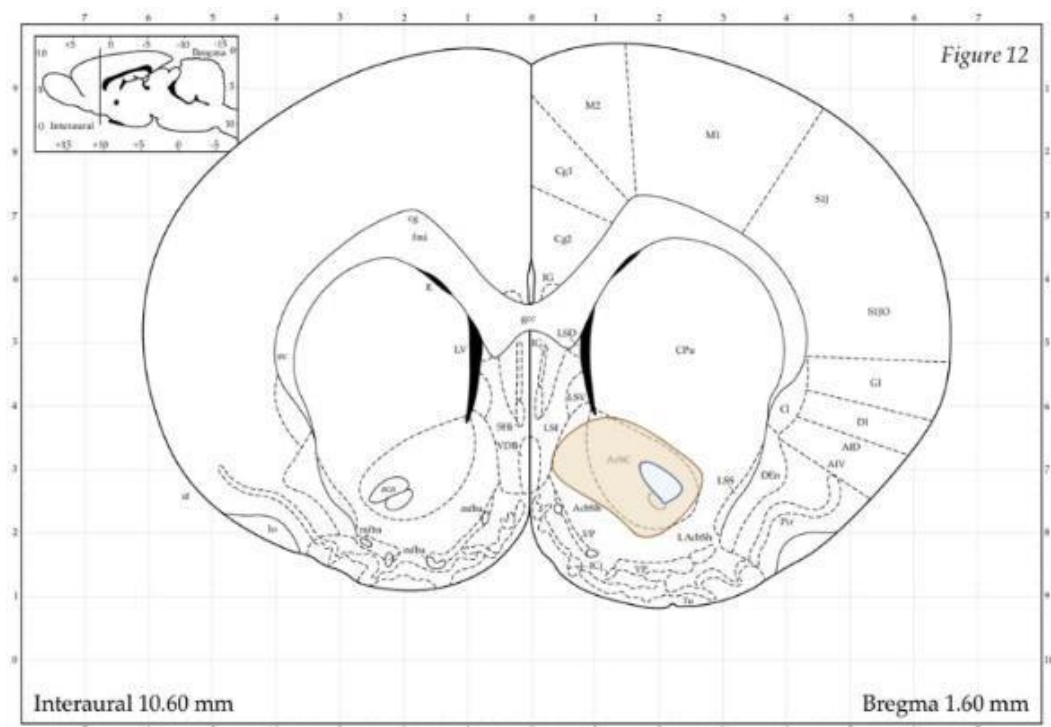


Figura 32 | Representação gráfica, em vermelho, da expressão dos grupos com alvo no NAc. Fonte Gaidica, (2006) modificado.

3.9.2.1.2 VTA

A expressão do grupo VTA-hDlx, vetor viral AAV1.hDlx.hM4D(Gi)dTomato.Fishell5 e alvo na VTA está demonstrada na Figura 33. A visualização da VTA pela menor objetiva do microscópio foi dificultada, entretanto foi possível explorar as expressões nos maiores aumentos

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 3

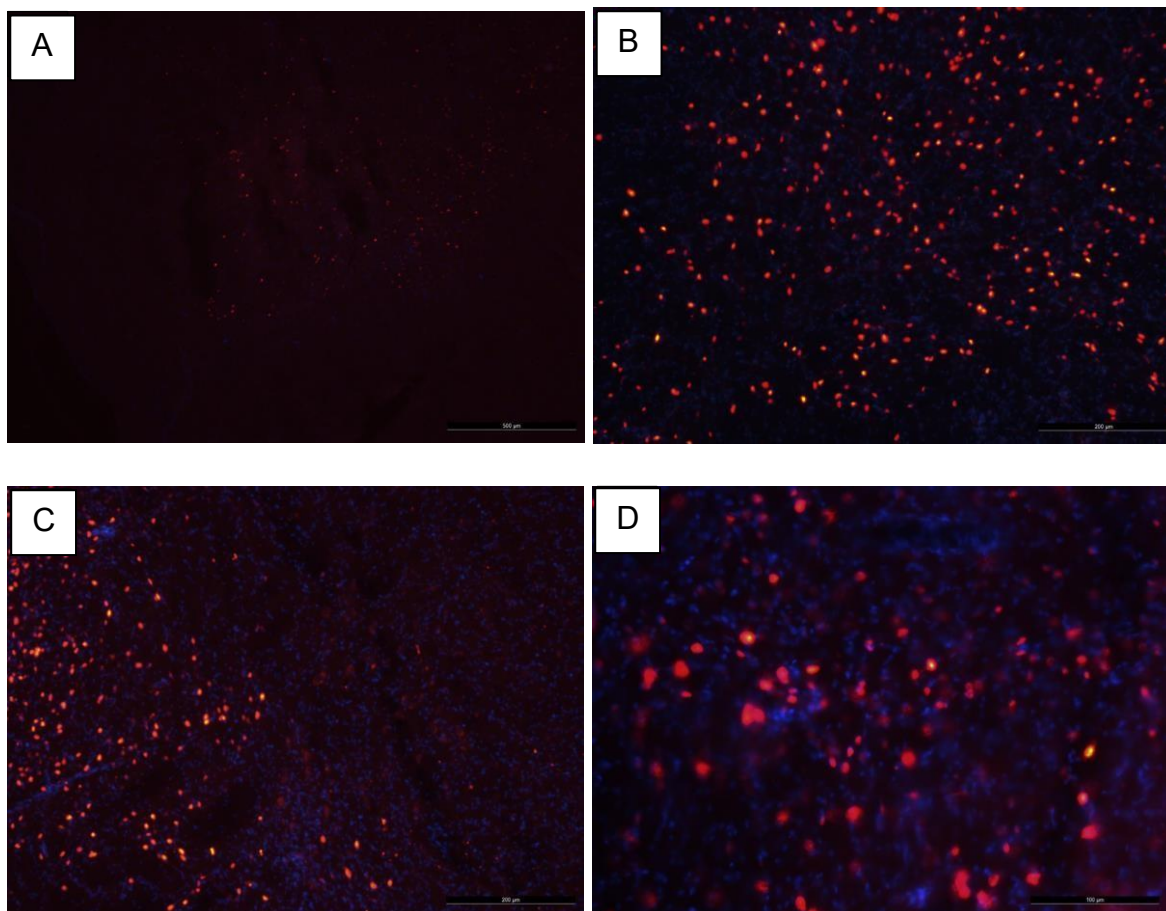


Figura 33 | Expressão do vetor AAV1.hDlx.hM4D(Gi)-dTomato.Fishell5 na VTA. Em azul núcleos celulares e em vermelho células que expressaram o receptor. A – aumento de 4x, B e C – aumento de 10x, e D – aumento de 20x. São as representações de diferentes animais do grupo VTA hDlx.

A expressão do grupo VTA-CaMK, vetor viral AAV8.CaMKIIa.hM4D(Gi)mCherry e alvo na VTA foi identificada da mesma forma (Figura 34).

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 3

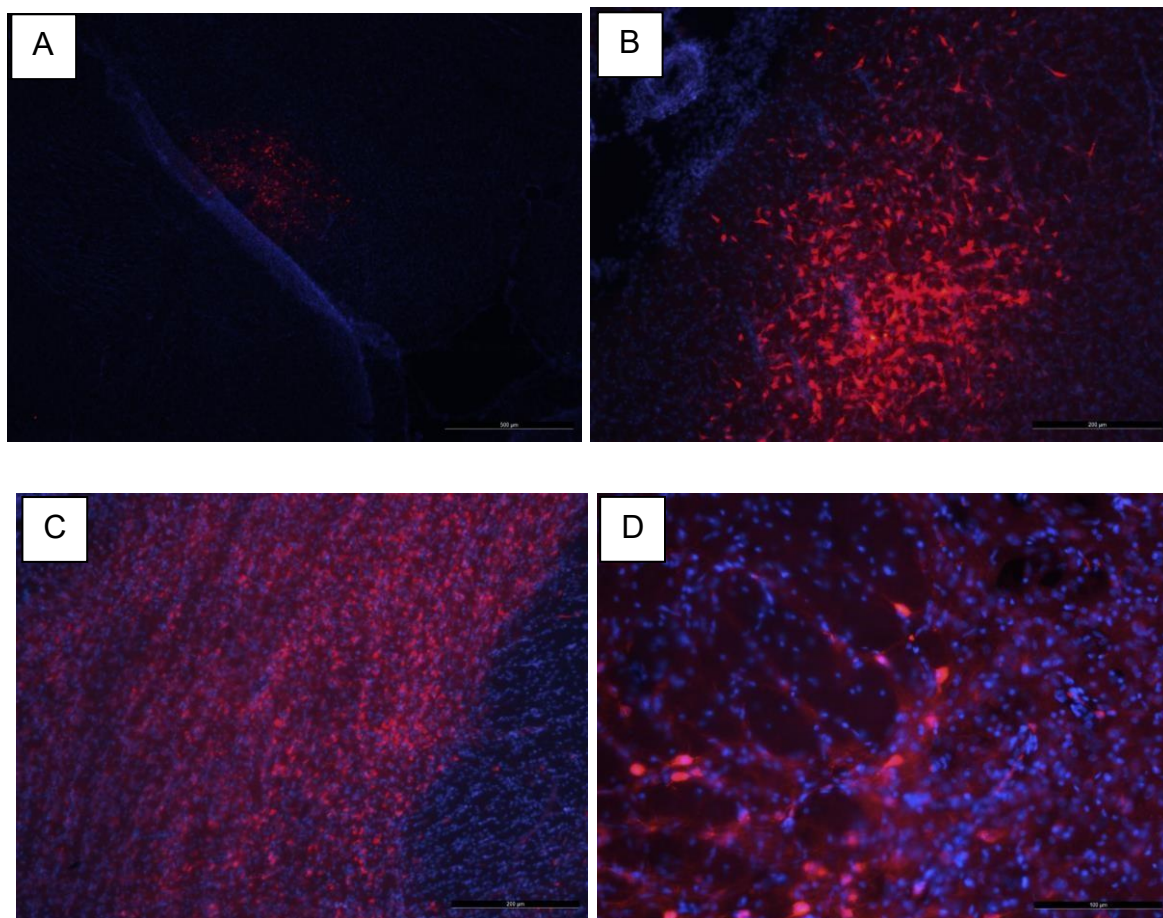


Figura 34 | Expressão do vetor AAV8.CaMKIIa.hM4D(Gi)-mCherry na VTA. Em azul núcleos celulares e em vermelho células que expressaram o receptor. A – aumento de 4x, B e C – aumento de 10x, e D – aumento de 20x. São a representação de diferentes animais do grupo VTA-CaMK.

Foi observada a expressão em todos os animais de ambos os grupos com um padrão representado na Figura 35.

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 3

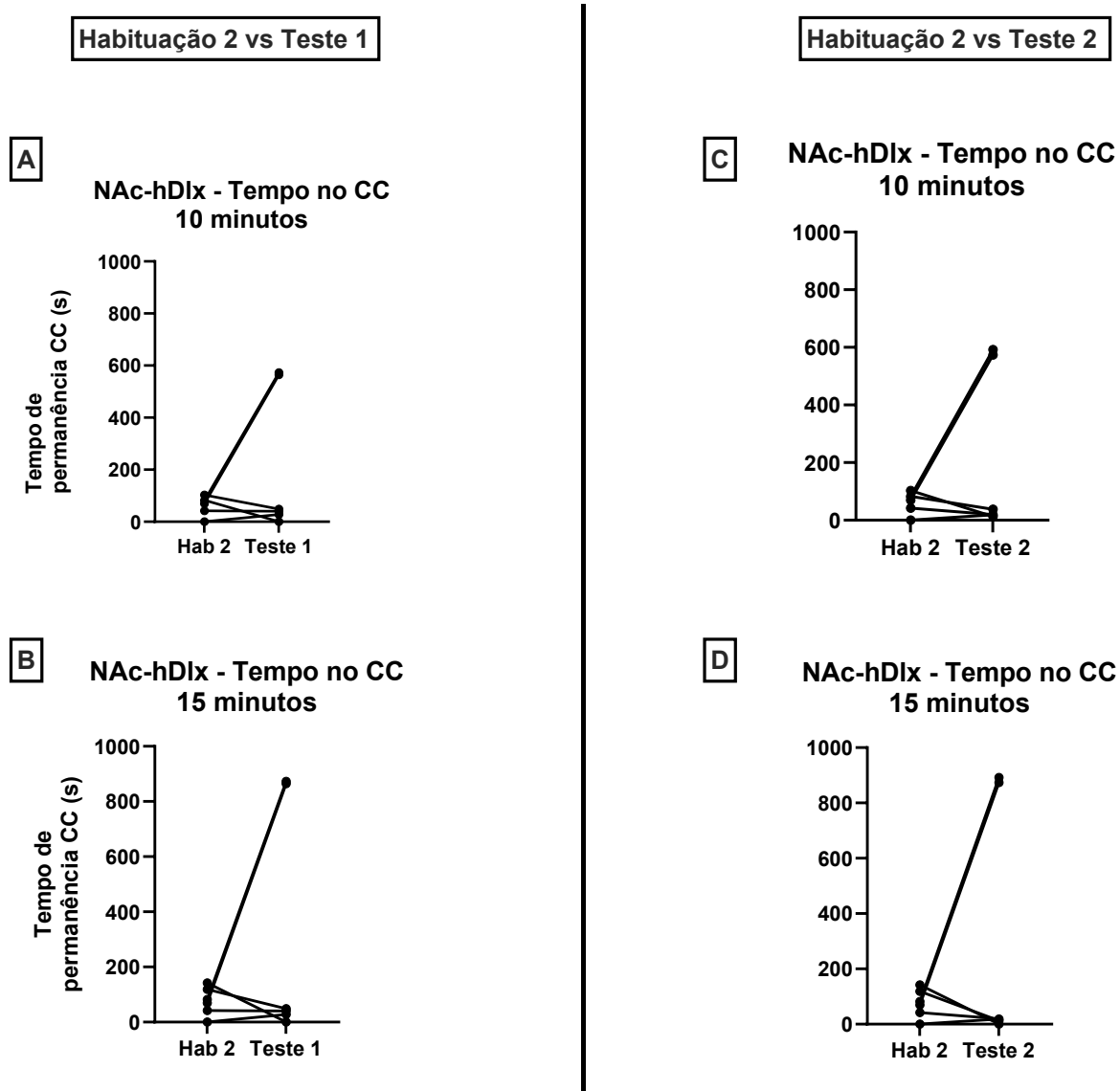


Figura 36 | Tempo gasto no CC por sessão grupo NAc-hDlx. A e C – recorte dos 10 minutos iniciais; B e D – recorte dos 15 minutos iniciais. As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por Teste Wilcoxon pareado.

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 3

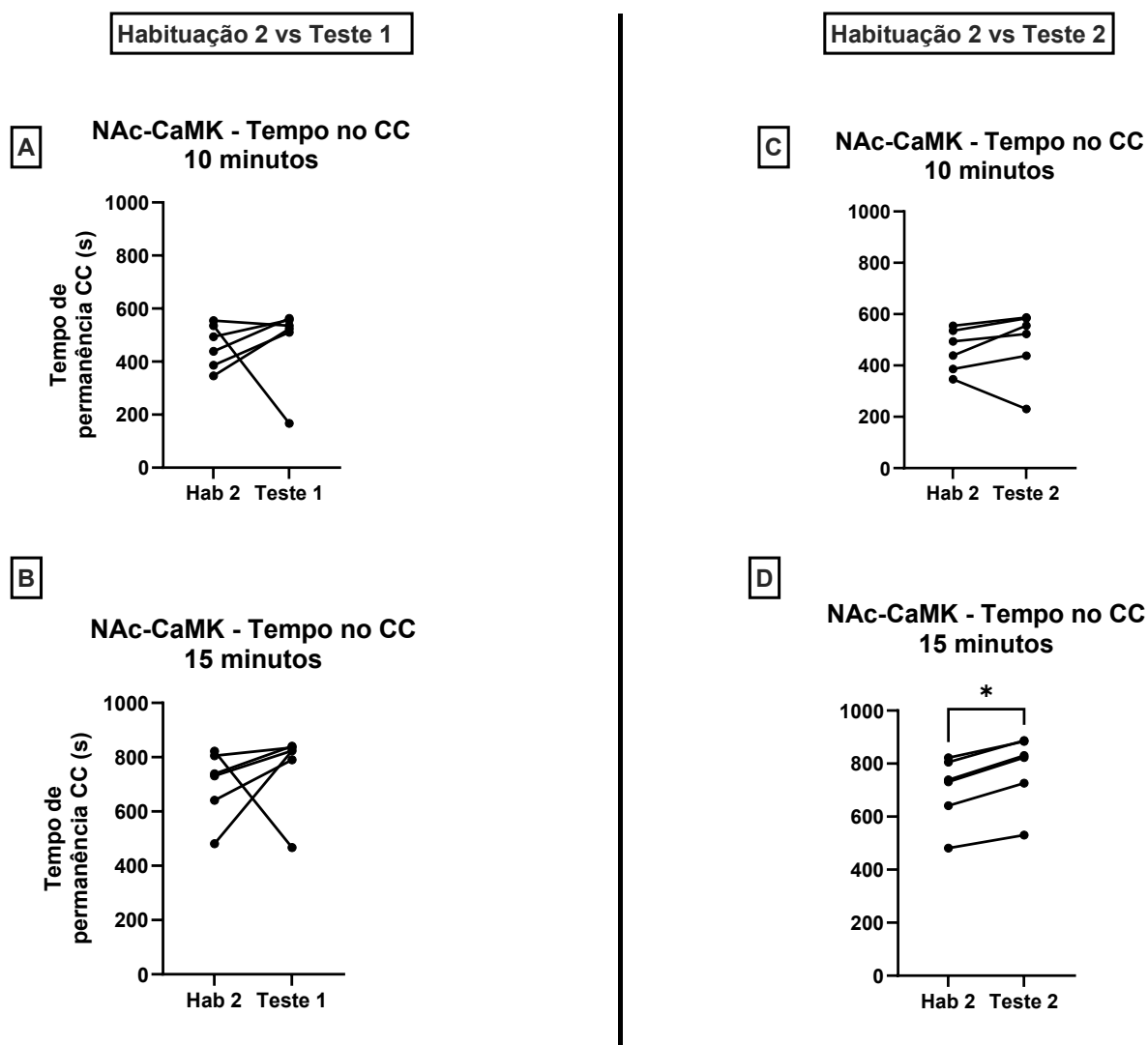


Figura 37 | Tempo gasto no CC por sessão grupo NAc-CaMK. A e C – recorte dos 10 minutos iniciais; B e D – recorte dos 15 minutos iniciais. As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por Teste Wilcoxon pareado (A e B) e Teste t pareado (C e D). Símbolo de significância estatística * $p < 0,05$.

Ainda no Experimento 3, os grupos VTA-hDlx e VTA-CaMK apresentam todos os recortes para comparação e não demonstram nenhuma alteração significativa, considerando tempo de sessão e dia de teste (Figura 38 e 39).

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 3

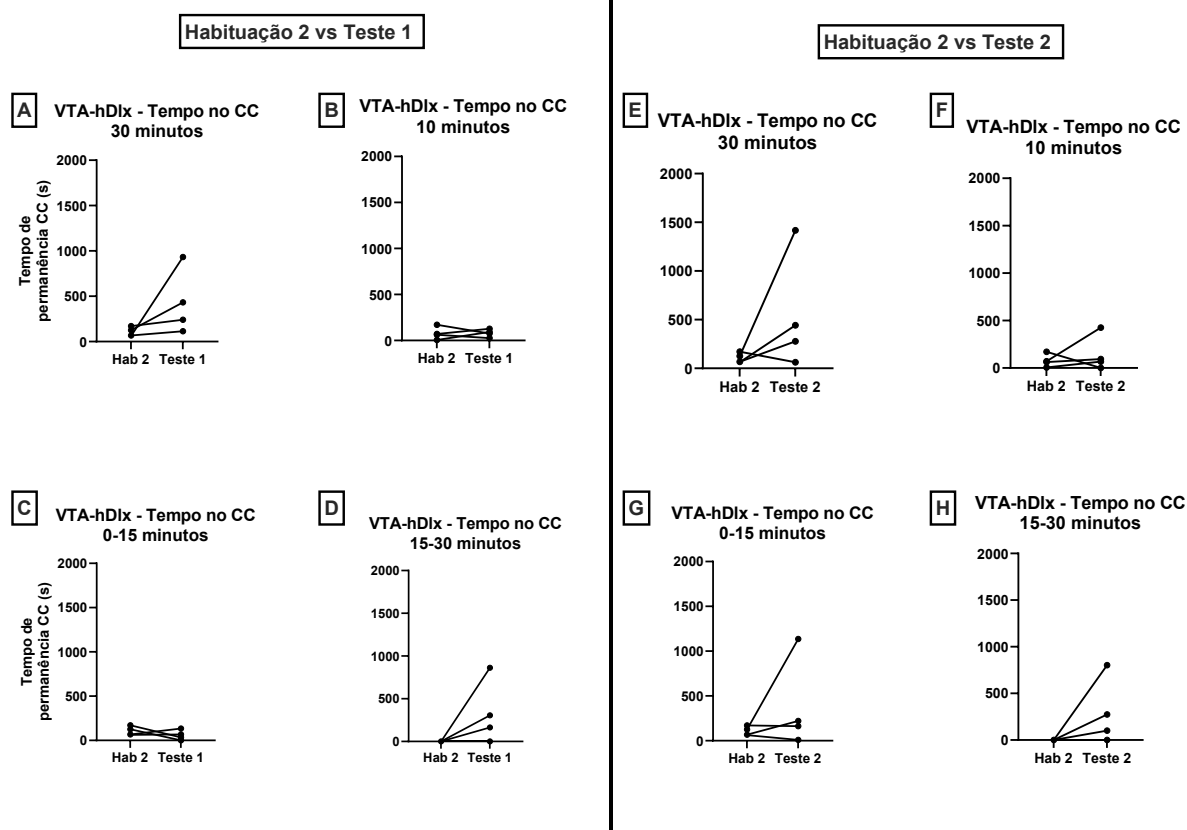


Figura 38 | Tempo gasto no CC por sessão grupo VTA-hDlx. A e E – sessão completa; B e F – recorte dos 10 minutos iniciais; C e G – recorte dos 15 minutos iniciais; e D e H – recorte dos 15 minutos finais. As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por Teste t pareado.

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 3

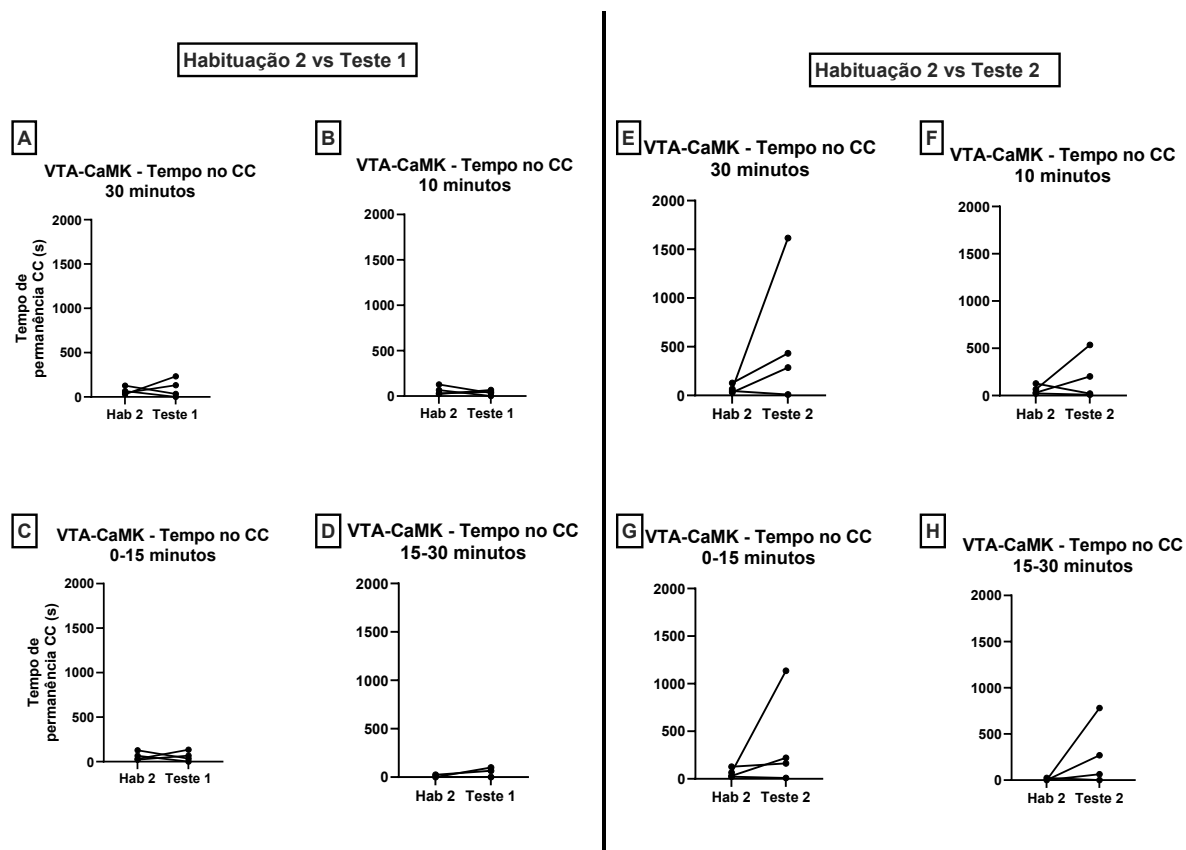


Figura 39 | Tempo gasto no CC por sessão grupo VTA-CaMK. A e E – sessão completa; B e F – recorte dos 10 minutos iniciais; C e G – recorte dos 15 minutos iniciais; e D e H – recorte dos 15 minutos finais. As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por Teste t pareado (A, B, C, E, F e G) e Teste Wilcoxon pareado (D e H).

3.9.2.3 Comportamentos

Foi mensurada a distância percorrida, em metros, de maneira automática e a duração do comportamento de exploração, em segundos. O tratamento com CNO 5 mg/Kg *i.p.* não apresentou alteração no padrão de locomoção, tampouco no padrão de exploração (Figuras 40 e 41).

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 3

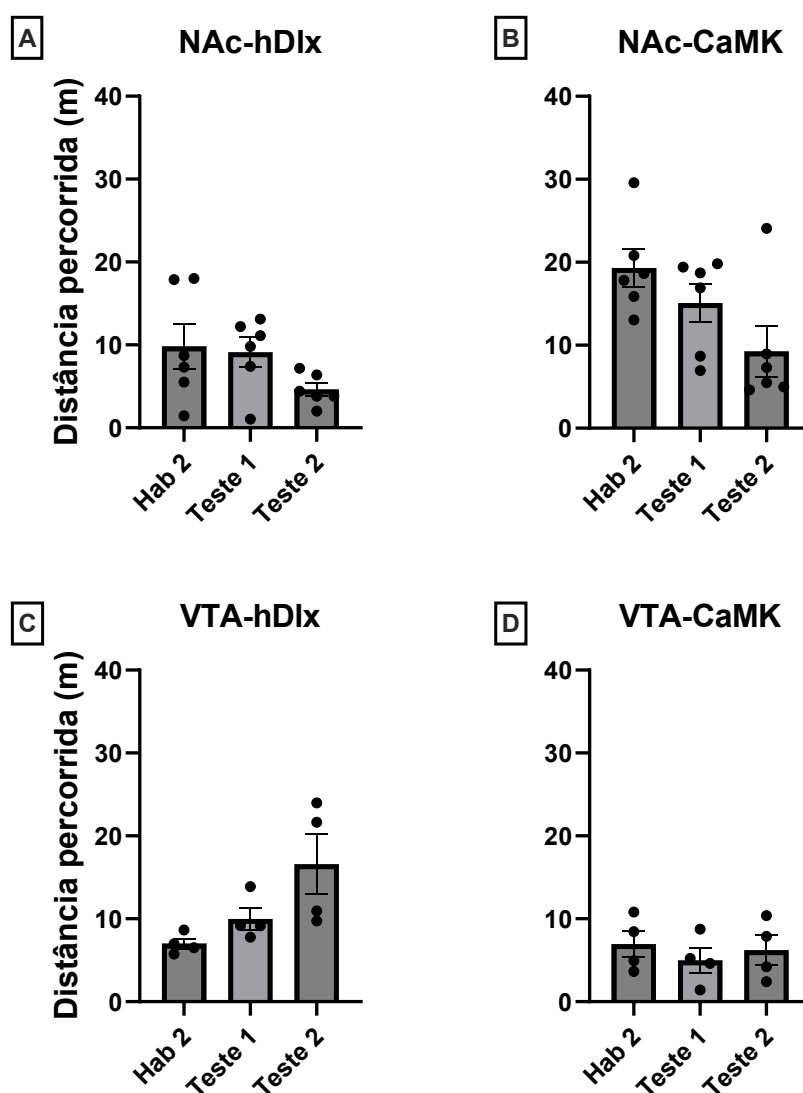


Figura 40 | Distância percorrida, em metros, por sessão. A – grupo NAc-hDlx; B – grupo NAc-CaMK; C – grupo VTA-hDlx e D – grupo VTA-CaMK. Resultados apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por One-way ANOVA repeated measures (A, C e D); e Teste Friedman (B).

Os dados do tempo de exploração, em minutos, corroboram a baixa distância percorrida supramencionada.

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 3

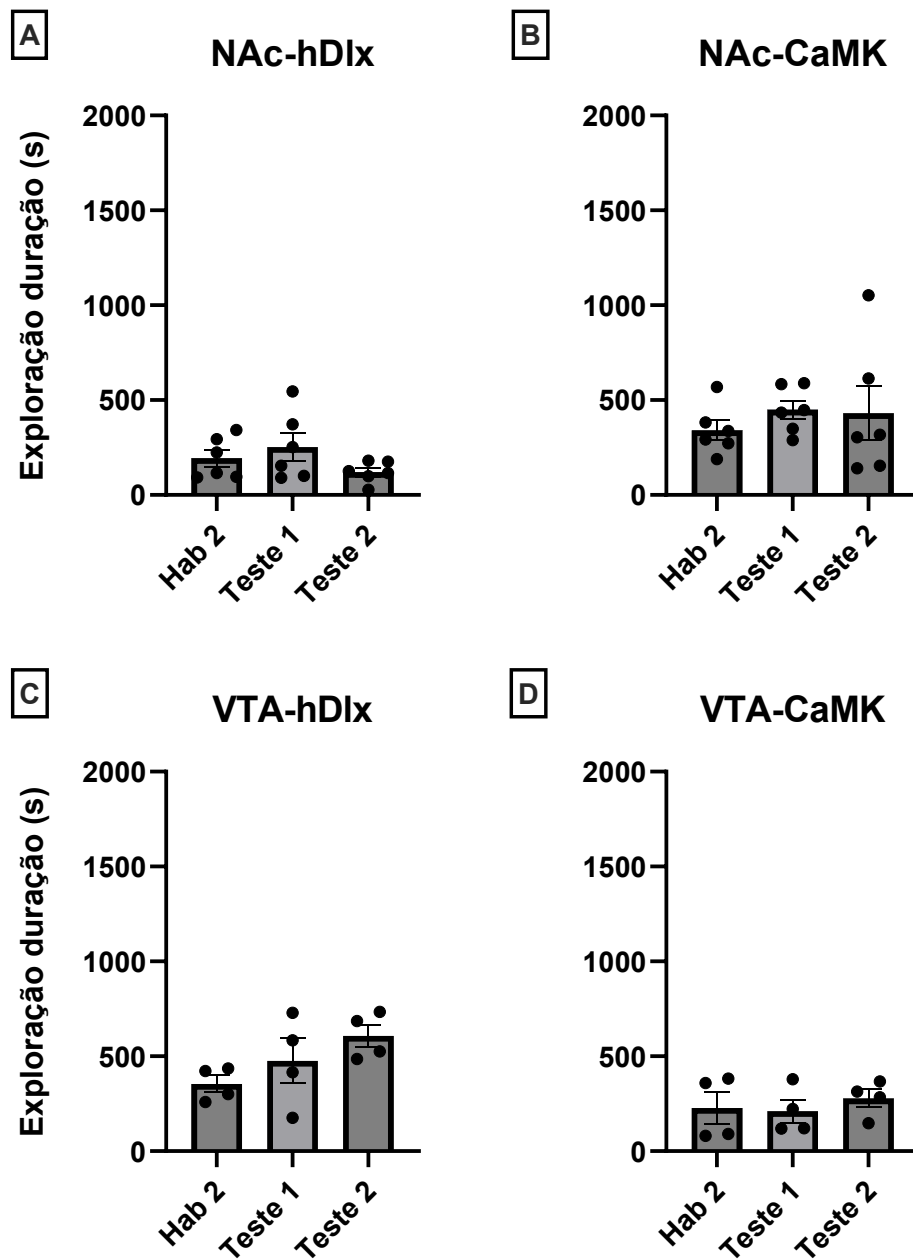


Figura 41 | Duração da exploração, em segundos, por sessão. A – grupo NAc-hDlx; B – grupo NAcCaMK; C – grupo VTA-hDlx e D – grupo VTA-CaMK. Resultados apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por One-way ANOVA repeated measures.

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 3

Relacionado ao tempo de imobilidade, houve um aumento significativo nos dados dos grupos NAc-hDlx e NAc-CaMK, juntamente com a manutenção em torno de 80% da sessão imóvel (~1500 s) dos grupos VTA-hDlx e VTA-CaMK (Figura 42).

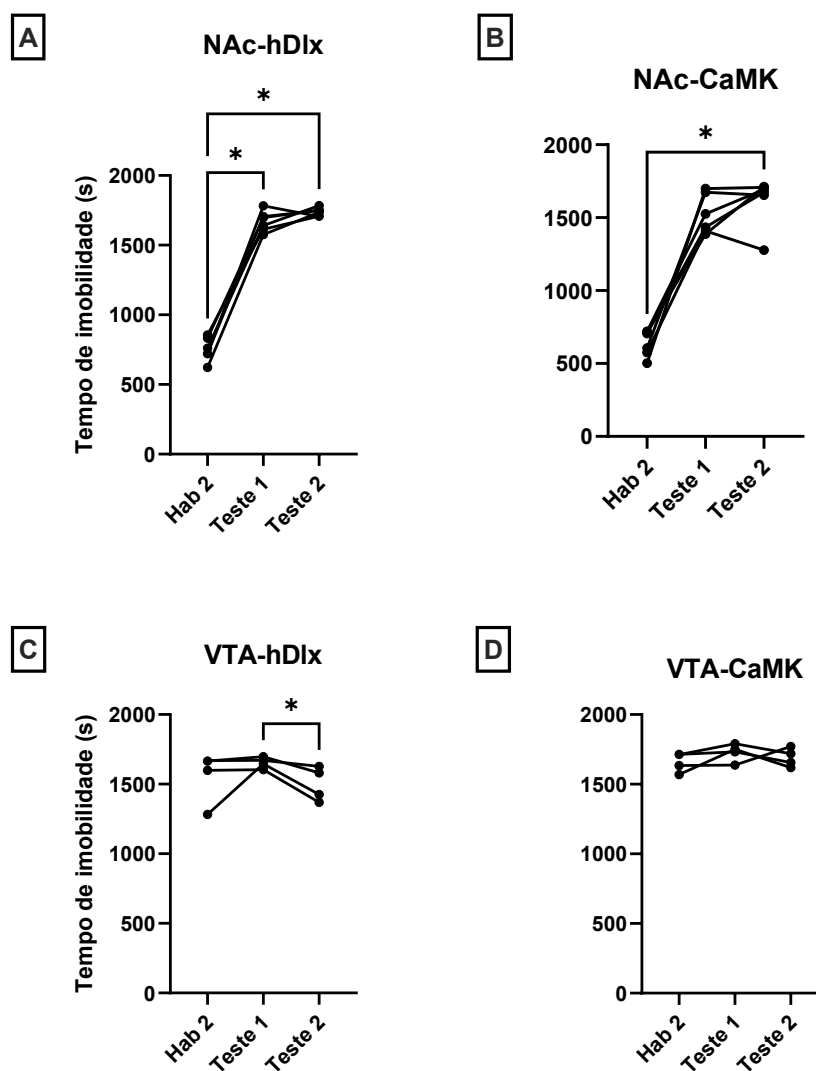


Figura 42 | Tempo total de imobilidade, em segundos, por sessão. A – grupo NAc-hDlx; B – grupo NAc-CaMK; C – grupo VTA-hDlx e D – grupo VTA-CaMK. As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por Oneway ANOVA repeated measures (A e D); e Teste Friedman (B e C). Símbolo de significância estatística * $p < 0,05$.

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 3

Foi contabilizado o comportamento basal de autolimpeza (*grooming*), e, na comparação entre linha de base e os dias de teste, não apresentou alteração (Figura 43).

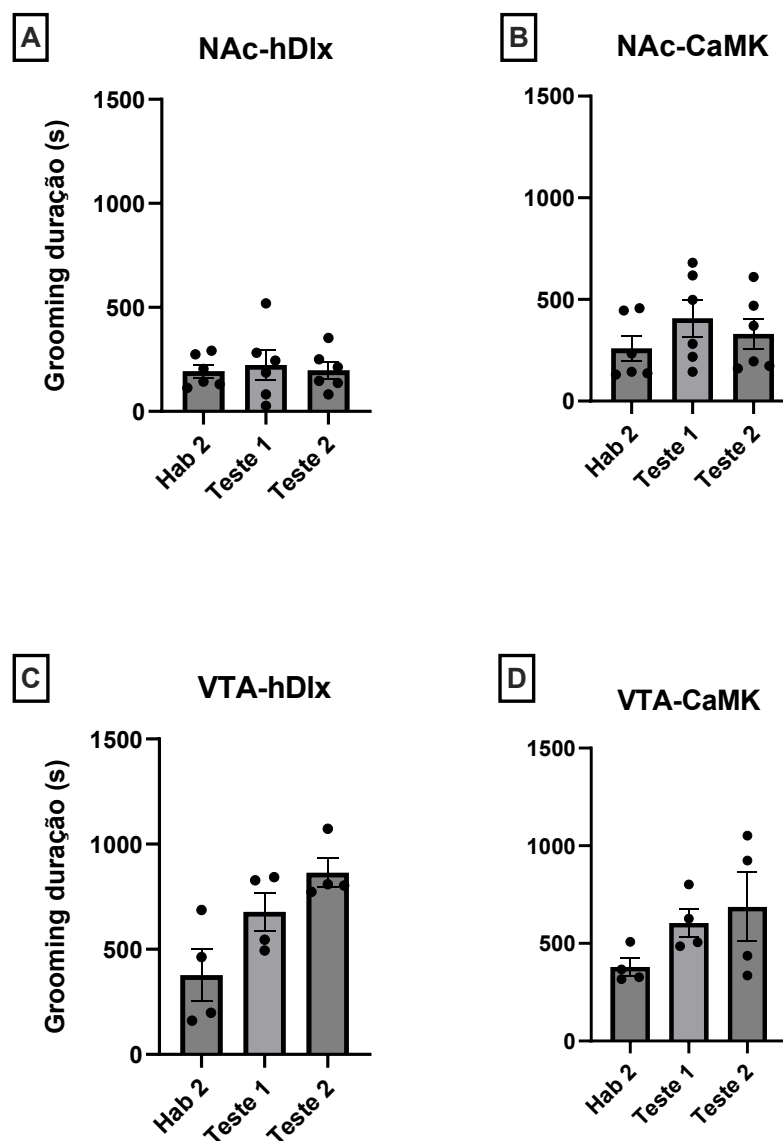


Figura 43 | Duração do grooming, em segundos, por sessão. A – grupo NAC-hDlx; B – grupo NACCaMK; C – grupo VTA-hDlx e D – grupo VTA-CaMK. Resultados apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por One-way ANOVA repeated measures (A e D); e Teste Friedman (B e C).

METODOLOGIA E RESULTADOS – EXPERIMENTO 3

O tremor de mandíbula foi primeiramente identificado nas sessões de condicionamento dos grupos NAc-hDlx e NAc-CaMK e, portanto, não há dados das sessões de habituação desses grupos para comparar. Apenas o grupo VTA-CaMK apresentou uma alteração estatisticamente relevante, ao comparar a linha de base com o dia do Teste 1 (Figura 44).

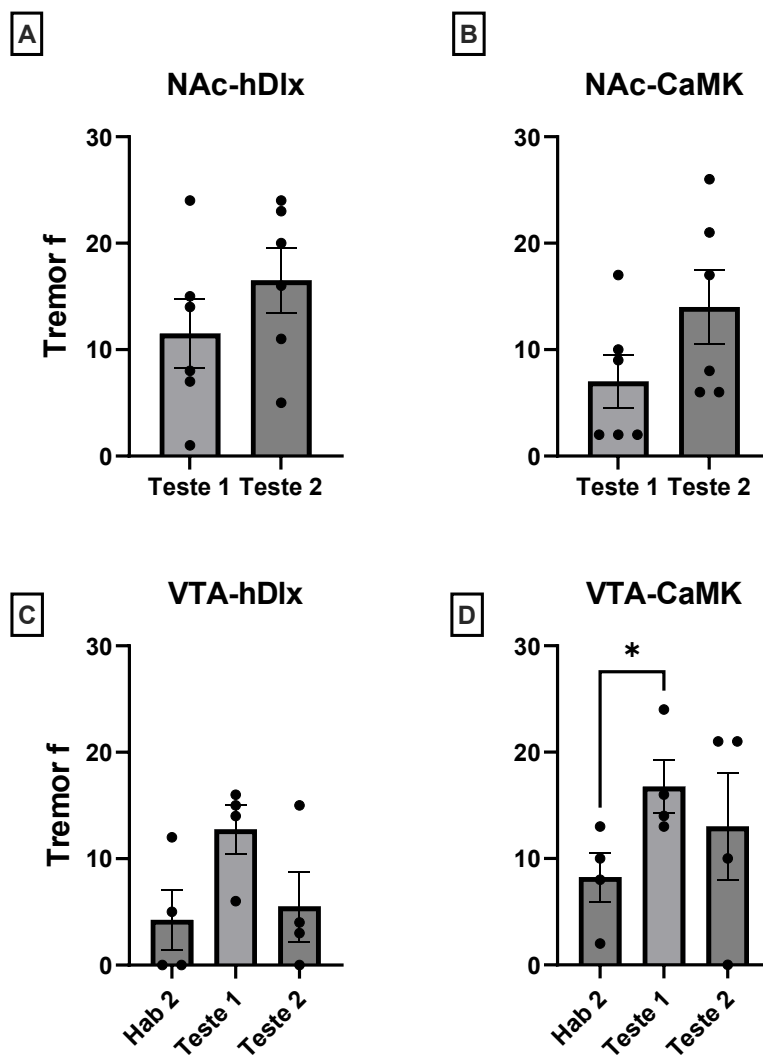


Figura 44 | Frequência de Tremor por sessão. A – grupo NAc-hDlx; B – grupo NAc-CaMK; C – grupo VTA-hDlx e D – grupo VTA-CaMK. Resultados apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). As comparações entre sessões do mesmo grupo foram feitas por Teste t pareado (A e B); e por One-way ANOVA repeated measures (C e D). Símbolo de significância estatística * $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

4.1 Dados vs. Literatura

4.1.1 Animais CET

O condicionamento feito com CET 10 mg/Kg *i.p.* foi suficiente para observar um aumento estatisticamente relevante do tempo gasto no CC dos grupos CET 3 e CET5 quando comparado com a linha basal dos próprios sujeitos experimentais em determinados cortes temporais. O grupo CET 3, com três sessões de exposição ao tratamento durante a fase de condicionamento, apresentou resposta ao CPP no dia do Teste 2 em todas as análises, porém no dia do Teste 1 apenas considerando a primeira metade da sessão. O grupo CET 5, com cinco sessões de exposição, apresentou diferença estatística do tempo gasto no CC somente no Teste 2, considerando tanto a análise da sessão inteira quanto a análise da segunda metade. Ainda que exista diferença entre as comparações dos dois dias de Teste com a linha de base (o estado pré e pós-condicionamento sendo comparados), não há diferença quando comparados entre si (estado pós-condicionamento), o que demonstra que o efeito observado não é dependente do estado de droga

A falta de uniformidade dos resultados ressalta uma necessidade de maiores informações para definir o protocolo como, de fato, padronizado. Uma possibilidade de interpretação da variação dos dados é o próprio efeito da droga mascarar uma possível preferência, como o que ocorre com estimulantes (e a cetamina) que aumentam a locomoção e, com isso, aumentam a probabilidade do animal sair do compartimento condicionado – mascarando o efeito de CPP. Ou ainda mascaram a falta de CPP por aumentar a probabilidade do animal entrar no compartimento condicionado ao acaso. Em roedores, a hiperlocomoção é um comportamento relacionado com alterações dopaminérgicas (Gilmour et al., 2009; Van Den Buuse, 2010).

Na literatura, CET nas doses: 5; 10; e 31,6 mg/Kg *i.p.* estabelece CPP (Botanas et al., 2015; de la Peña et al., 2012; R. Guo et al., 2016; Y. Guo et al., 2018; Li et al., 2018; van der Kam et al., 2009). Além das variações de dose, também há alterações consoante ao número de sessões de condicionamento, duração das sessões e modelo de CPP (enviesado ou não).

DISCUSSÃO

Van der Kam et al. (2009) demonstraram CPP com CET 10 e 31,6 mg/Kg *i.p.* utilizando ratos Sprague-Dawley com seis sessões de condicionamento com duração de 20 minutos, realizadas no mesmo período do dia. Os animais que apresentaram uma preferência prévia superior a 65% foram retirados do experimento e, desta forma, foi realizado o modelo não enviesado, sendo o resultado expresso pelo percentual do tempo gasto no compartimento condicionado, considerando apenas os dados do dia do teste e o aparato com três compartimentos. Como correlato comportamental, o grupo reportou um aumento da locomoção. Guo et al. (2018) também demonstraram, na mesma dose, via e modelo, em aparato com dois compartimentos e critério de exclusão sendo a preferência pelo lado branco do aparato, já que o lado branco foi determinado previamente como CC. As sessões de condicionamento eram de uma hora, feitas duas vezes ao dia, como as demais, e análise comparativa entre tempo gasto pré e pós-condicionamento no CC. Guo et al. (2016), com ratos Sprague-Dawley machos e fêmeas, estabeleceram como critério de exclusão a permanência superior a 600 segundos em um dos três compartimentos do aparato, com sessão de 20 minutos para habituação e teste e de 40 minutos para condicionamento. Foram feitas dezesseis sessões de condicionamento, duas vezes ao dia. As análises foram feitas considerando o tempo de permanência pré e pós-condicionamento, seguindo o modelo não enviesado. A comparação entre sexo explicitou que há diferença na metabolização quando analisada a urina dos animais, com a afirmação de que fêmeas são mais sensíveis à indução do efeito de CET feita no protocolo.

Os três estudos utilizaram um critério de exclusão baseado no tempo gasto em cada compartimento durante a habituação e, conseqüentemente, o modelo não enviesado para o condicionamento, o que difere do protocolo feito no presente trabalho. A comparação de resultado é complexa por não serem os mesmos índices analisados, mas, de fato, CET 10 mg/Kg *i.p.* altera o comportamento de forma a aumentar o tempo de permanência do sujeito ao compartimento pareado à droga, ainda que esta medida do dia do teste de maneira isolada não seja diretamente comparável.

Os dados de modelo enviesado apresentam outras limitações de comparação, como, por exemplo, de la Peña et al. (2012) e Botanas et al. (2015), que demonstraram CPP com metade da dose testada (CET 5 mg/Kg *i.p.* com ratos Sprague-Dawley)

DISCUSSÃO

também em um aparato de dois compartimentos, com seis sessões de condicionamento de 30 minutos. A análise considerou o tempo gasto no compartimento condicionado nas fases pré e pós-condicionamento (habituação e teste, respectivamente). Li et al. (2018) demonstraram CPP com CET 10 mg/Kg s.c. também com Sprague-Dawley em aparato de dois compartimentos de forma enviesada, com 8 sessões feitas duas vezes ao dia (período da manhã com tratamento e período da tarde com solução salina) durante uma hora cada. As comparações foram feitas entre os tempos gastos e distância percorrida no compartimento condicionado, comparando-os aos dados do grupo controle.

Com relação aos dados de locomoção, o presente trabalho reitera os achados de van der Kam et al. (2009) e Li et al. (2018), nos quais foi observado um aumento significativo da distância percorrida no aparato. Diferente do exposto por van der Kam et al. (2009), não foi encontrada extinção de condicionamento. O grupo CET 5, com cinco sessões, mesma quantidade que os autores acima demonstraram, não consolidou uma preferência com o condicionamento feito, de forma que não haveria o que ser extinto. Foi observada uma quebra da preferência prévia dos sujeitos desta pesquisa, não uma consolidação de preferência pelo tratamento.

4.1.2 Animais submetidos à técnica DREADDs

Os grupos de animais do Experimento 3 não demonstraram alteração comportamental compatível com mudança de preferência, mediante ativação dos receptores expressos, de ambos os vetores virais e ambos os alvos de inóculo. Com exceção do grupo NAc-CaMK, que apresentou um aumento significativo do tempo gasto no CC após condicionamento no compartimento com preferência prévia. A hipótese inicial que a inibição dos neurônios da região acarretaria uma diminuição do padrão basal de ativação e, conseqüentemente, seria observado um padrão de aversão no teste comportamental não foi confirmada e ainda foi observado um aumento da preferência. Pela característica da prevalência de neurônios GABAérgicos na região, a inibição gerada pela ativação dos DREADDs pode ter alterado o equilíbrio basal favorecendo a diminuição do *feedback* de GABA para VTA e, portanto ter aumentado a atividade em NAc.

DISCUSSÃO

Existe atualmente a discussão sobre a retroconversão (*back transformation*) do CNO a clozapina e esta seria a responsável pela ativação dos DREADDs. Como antipsicótico atípico, seu mecanismo de ação é dado majoritariamente pelo antagonismo de receptores dopaminérgicos D₂ e serotoninérgico 5-HT_{2A}, além de ser antagonista de receptores alfa-adrenérgicos, histamínico H₁, colinérgico e outros receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos em menor grau. Em humanos, essa retroconversão existe, porém é baixa, em torno de 10%. Isso aumenta a atenção em se tratando de translação dos estudos, considerando que a substância dita responsável por ativar os receptores expresso já ser um fármaco aprovado e, pela necessidade de doses ser subterapêuticas. Nesse cenário, uma atenção especial a efeitos adversos relacionados e conhecidos, como, por exemplo, efeitos anticolinérgicos (xerostomia, constipação e retenção urinária, visão turva), efeitos cardiovasculares (hipotensão, bradicardia e síncope), efeitos do sistema nervoso (sedação inicial, sintomas extrapiramidais e depressão do sistema), entre outros (Clozapine: Drug Information; B. L. Roth, 2016). Portanto, a possibilidade de outros fármacos ativadores, como a DCZ, é relevante visando observar a ativação dos receptores na ausência de metabólitos que ativem o sistema de estudo.

A administração de clozapina nas doses 0,05 e 0,1 mg/Kg, em ratos, demonstrou diminuição da locomoção no teste de campo aberto (Ilg et al., 2018). Os dados do presente trabalho mostram uma tendência de diminuir a distância percorrida ou uma manutenção de baixa locomoção desde a linha de base em paralelo coerente com aumento significativo do tempo de imobilidade dos grupos 4 e 5 ou manutenção dos grupos 1, 6 e 7 em torno de 80% da sessão imóvel (~1500 s). Existem diferentes raciocínios acerca desses dados, como um efeito chão da distância percorrida e um efeito teto do tempo de imobilidade, somado a uma habituação ao aparato e, portanto, com uma locomoção inicial induzida por novidade e ainda um possível efeito da clozapina retroconvertida do CNO administrado (Tzschentke, 2007).

Segundo (Gomez et al., 2017), utilizando ratos, supôs que a responsável pelos efeitos da ativação dos DREADDs seria, de fato, a clozapina, dada a maior afinidade de ligação com receptores comparada com ensaios de *binding* com CNO, além da demonstração de CNO ser substrato da glicoproteína P, a bomba de efluxo da barreira hemato-encefálica (BHE). Análise do sobrenadante de amostras do plasma e do

DISCUSSÃO

cérebro homogeneizados, de camundongos, após administração sistêmica de CNO, mostrou que a substância principal encontrada no cérebro é clozapina, comprada com o pico de CNO plasmático nos tempos analisados (15; 30 e 60 minutos), além do dado da concentração da clozapina ser ao menos 20 vezes maior que a de CNO, o que mostra também uma diferença entre espécies para eventuais comparações da literatura (Wang et al., 2025).

Dado o mecanismo de ação da clozapina e sua provável participação na ativação dos DREADDs, eventuais achados comportamentais relacionados a essa linha de pesquisa que envolva o sistema de recompensas precisa ser interpretada com cautela. Os achados do presente trabalho estão limitados para comparações sobre o CPP, dada a preferência prévia de todos os sujeitos experimentais.

Runegaard et al. (2018) demonstraram, em camundongos, uma alteração comportamental em animais que foram submetidos ao protocolo de CPP com cocaína 10 mg/Kg *i.p.* ao ativar receptores inibitório (hM4Di) expressos na VTA (bilateral) nos dias de condicionamento, diferente do que foi feito no presente projeto que teve como mecanismo a ativação de receptores inibitórios na VTA, porém de maneira unilateral. O correlato comportamental visto foi a diminuição da locomoção, ao passo que a preferência instalada não foi prevenida. O aparato experimental possuía dois compartimentos (claro e escuro), com um protocolo de oito dias de condicionamento, com sessões de 30 minutos e administração de 2 mg/Kg *i.p.* CNO (ou veículo) 30 minutos anterior à administração de cocaína (sempre no lado claro, dada a esperada preferência inicial pelo lado escuro) e salina. Após o condicionamento, foi feita uma etapa de extinção, até que não fosse mais observado, por dois dias consecutivos, diferença no tempo gasto no CC comparada com o padrão basal e também uma sessão de reestabelecimento, 10 dias após a extinção com uma dose de 5 mg/Kg *i.p.* de cocaína. A associação do CPP de cocaína com o pré-tratamento de CNO não alterou a preferência gerada, entretanto foram necessárias mais sessões para alcançar a extinção – animais que tiveram apenas a administração de cocaína não mostraram diferença na 3ª sessão, ao passo que os pré-tratados com CNO na 6ª – e não apresentaram diferença com a dose de reestabelecimento 10 dias após. Os pesquisadores também testaram alteração no padrão de locomoção basal, com injeções diárias durante 14 dias, o que não acarretou mudança, postulada a hipótese

DISCUSSÃO

de alterar a homeostase dopaminérgica da região. O presente trabalho não observou diminuição da locomoção pela ativação isolada dos receptores, o que não pode ser diretamente correlacionado com os dados apresentados por Runegaard e colaboradores, que observaram esse efeito sob ação de cocaína. Além disso, a modulação da via de maneira bilateral é outra variável para correlação direta dos resultados.

Outro caso de quimiogenética com condicionamento foi utilizando etanol como substrato, em camundongo expressando receptores hM3Dq e hM4Di no NAc (bilateral), com aparato de três compartimentos, modelo não enviesado com oito sessões de condicionamento com CNO 1 mg/Kg administrado 30 minutos antes do etanol 2 g/Kg. O CPP com etanol associado com ativação dos receptores excitatórios altera o comportamento de maneira diferente entre os sexos, uma vez que fêmeas apresentam CPP e machos deixam de apresentar, comparado com o dado de que ambos os sexos adquirem preferência após esse protocolo de condicionamento com etanol e que não foi reportada diferença na expressão dos receptores. O CPP com etanol associado com ativação de receptores inibitórios impede a expressão preferência em fêmeas e, devido ao controle dos machos não ter dado diferença estatística, não foi possível confirmar que a ativação quimiogenética foi a responsável pela não expressão da preferência, segundo os autores (Chan et al., 2025).

Em suma, os dados do presente trabalho não apresentaram alterações comportamentais após modulação quimiogenética na VTA e no NAc, de forma isolada e, como não foi encontrado na literatura outro protocolo que tentasse o mesmo, pode ser considerado um trabalho pioneiro na aplicação das técnicas de forma conjunta. A associação de modulação quimiogenética com protocolo de CPP utilizando drogas de abuso (cocaína e etanol) foi relatado, em camundongos, com variações de resultados entre machos e fêmeas e entre os estudos, sendo necessárias maiores contribuições na área a fim de concluir de maneira mais assertiva o papel da modulação quimiogenética do sistema de recompensa nos contextos de preferências sólidas.

DISCUSSÃO

4.1.3 Registros comportamentais

Os comportamentos basais dos roedores, como locomoção, exploração, autolimpeza, elevação, escalada e sono foram analisados em frequência e duração, a depender do tipo de dado almejado. Todos os animais foram submetidos a sessões de *handling* (sessões de manipulação com o/a pesquisador/a para mitigar estresse). Além da hiperlocomoção gerada por CET e da alta imobilidade geral observada, os demais comportamentos se mantiveram como esperado da linha de base. Uma hipótese da preferência prévia observada se dá, justamente, pela alta taxa de imobilidade, no qual os animais se habituaram ao aparato e diminuíram a exploração inicial relacionada com o efeito de novidade. Além disso, bocejos, alongamento e espirro também foram observados (UACC, 2016; ULAM, 2015).

Outros comportamentos foram identificados ao longo das sessões comportamentais, como tremor de mandíbula junto com o bater de dentes, vocalizações, soluço e movimento estereotipado com a cabeça (*head shake*).

Segundo o etograma, o bater de dentes e a vocalização são comportamentos sociais e o mesmo comportamento foi relato em um site de criadouro de ratos como bruxismo somado à 'protusão ocular' (*eye bogging*) relacionados com a manutenção do comprimento dos dentes, bem como o ângulo e afiação corretos e, por questão anatômica do nervo ligado à mandíbula passar por trás do globo ocular, a observação dos olhos "saltando" é uma consequência. Esse comportamento pode estar relacionado a um bem-estar do animal, mas também a um incômodo (no sentido do animal realizar o comportamento como forma de auto-conforto). Uma outra forma do bater de dentes ser expresso diz estar relacionado com um movimento agressivo, feito antes de morder algo de fato, podendo ser um aviso bem como uma preparação, e está relacionado com uma postura corporal mais agressiva. Foi observado ao longo das sessões experimentais o "Tremor" (como foi nomeada a movimentação da mandíbula, junto com o bater de dentes e a movimentação dos olhos), mas sem postura agressiva, com um aumento significativo no grupo VTA-CaMK comparando a linha de base com o Teste 1 (Figura 44; *Individual Rat Behaviours*)

DISCUSSÃO

4.2 Limitações

4.2.1 Preferência prévia dos animais

A fim de padronizar a análise dos dados, foi decidido que seriam realizadas as comparações entre dados pré e pós-condicionamento de cada animal e, portanto, foi alterado o tempo da habituação de 15 para 30 minutos, de forma que todas as sessões do protocolo teriam a mesma duração, o que possibilitou a análise em recortes temporais. No Experimento 3, os grupos NAc-hDlx e NAc-CaMK tiveram habituação de 15 minutos, visto que foi o primeiro grupo na ordem cronológica a ser feito.

Além da diferença da duração das sessões de habituação, os grupos NAc-hDlx e NAc-CaMK tiveram mais pistas diferenciando os compartimentos, já que o piso do compartimento listrado era liso e no compartimento circular era rugoso e, demais grupos, o piso era o mesmo nos dois compartimentos, reduzindo a pista diferencial ao padrão das paredes do aparato.

Os animais de todos os grupos apresentaram uma preferência prévia significativa pelo compartimento circular – dos 40 sujeitos, 35 demonstraram essa tendência – e, portanto, testes adicionais foram feitos com o intuito de determinar o(s) elemento(s) responsável(is) pela inclinação da preferência. Após a primeira habituação ao aparato com o conjunto de animais (referidos grupos NAc-hDlx e NAcCaMK), foi aferida a luminosidade com luxímetro e foi designado o local ideia dentro da sala de ensaios para posicionamento do aparato (imediatamente embaixo da lâmpada tubular). Dessa forma, a diferença de claridade foi resolvida, no entanto a preferência dos animais permaneceu – permaneciam do lado circular – e o primeiro grupo de condicionamento se completou dessa maneira, com o lado listrado e piso liso à esquerda e círculos com piso rugoso à direita.

Uma vez completado o protocolo desse primeiro conjunto de animais, foram feitos testes adicionais isolando as variáveis (luminosidade – resolvida com o luxímetro, padrão da parede do aparato, posição do aparato na sala, piso do aparato, posição do observador na sala). Tais testes foram feitos com os sujeitos que já tinham completado o protocolo experimental com acesso a todo o aparato, tal qual o dia da habituação, e em dias diferentes. Para testar se a preferência era pelo lado da sala ao invés do lado do aparato, as pistas das paredes foram invertidas: círculos e piso liso à esquerda e listras e piso rugoso à direita, no qual ainda foi vista a preferência no

DISCUSSÃO

que foi interpretado como lado da sala – os animais ficaram do lado listrado. Para testar se a preferência se dava de fato ao lado da sala, foram feitos testes com os pisos também trocados (círculos e piso rugoso à esquerda e listras e piso liso à direita) e os animais, em sua maioria, permaneceram mais tempo do lado circular, o que foi interpretado como uma possível preferência ao piso rugoso. Com estes dados, a escolha foi de padronizar o piso rugoso para ambos os compartimentos e, dessa forma, a pista que os diferenciavam eram as da parede para os grupos seguintes e foi mantido a decisão inicial de: lado circular à direita e listrado à esquerda.

Além disso, para os grupos CET 3 e CET 5, foi incorporada uma sessão de habituação extra, antes dos dois dias estipulados no cronograma (Figura 26), que foi realizada em duplas de animais, com intuito de mitigar eventuais efeitos negativos relacionado à apresentação do aparato.

4.2.2 Protocolo histologia e registros

Os primeiros grupos que passaram pelo processamento histológicos, grupos NAc-hDlx e NAc-CaMK, foram submetidos ao protocolo inicial descrito no APÊNDICE A, no qual o acondicionamento e o processamento DAPI foram feitos diretamente em lâminas silanizadas. O citado protocolo estava em fase de criação e a visualização da marcação ficou comprometida e, portanto, os registros desses grupos também foram afetados. No entanto, foi feita a observação da expressão dos receptores, uma vez que possuem fluorescência própria, com a limitação de registro e impossibilidade de análise quantitativa da expressão. Com a troca e aprimoramento do protocolo, APÊNDICE B, foi possível o registro das expressões induzidas nos animais dos grupos VTA-hDlx e VTA-CaMK, inclusive com maiores ampliações e riqueza de detalhes.

Para agregar ao protocolo, fazer uma marcação *a posteriori* de TH e/ou do Transportador vesicular de GABA (*Vesicular GABA Transporter* – VGAT) corrobora na identificação do tipo celular que o vetor se direciona e, de fato, expressa os receptores geneticamente modificados. O primeiro identifica neurônios dopaminérgicos e adrenérgicos

CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho buscou modular a atividade do sistema de recompensa neural de ratos pela abordagem quimiogenética. Neste contexto, encontrou-se que a manipulação do sistema mesolímbico pelos vetores AAV1-hDlx-hM4d(Gi)-dTomatoFishell-5 e AAV8-CaMKIIa-hM4d(Gi)-mCherry não resultou em alteração na preferência condicionada por lugar (CPP), tampouco dos comportamentos observados. Dos objetivos específicos do trabalho, foi verificada a expressão de ambos os receptores nos dois alvos (NAc e VTA). Também foi avaliado o efeito de suas ativações no teste comportamental, assim como foi avaliado o efeito comportamental dos tratamentos CNO 5 mg/kg *i.p.* e cetamina 10 mg/Kg *i.p.* na ausência da variável cirúrgica, nos quais se confirmou que CNO não foi capaz de gerar preferência e cetamina reverteu a preferência prévia dos animais, além de expressar CPP ao analisar recortes temporais específicos das sessões na comparação da linha de base com os dados do dia do Teste 1 e do Teste 2 separadamente. De forma geral, os achados corroboram para a utilização da técnica associada com substâncias que ativem diretamente o sistema, uma vez que a alteração comportamental que for observada será da modulação em si e não efeito adverso da técnica.

O aparato comportamental, elaborado e montado para o presente protocolo, foi inspirado no modelo disponível da Panlab. Todavia foram feitas modificações a partir dos dados iniciais do projeto, objetivando uma padronização e redução de viés de preferência dos animais. Os resultados dos 3 experimentos indicam, entretanto, que houve preferência prévia dos animais, o que exigiu a aplicação de um protocolo com modelo enviesado para análise comportamental. Ainda que isso não configure um impedimento para avaliação de CPP, é necessário que sejam feitos mais testes, se possível com animais sem uma preferência prévia.

Em síntese, a padronização do teste de CPP necessita de mais testes para investigar a preferência prévia dos animais ao aparato construído, ao passo que o objetivo relacionado à expressão dos DREADDs nos alvos definidos foi alcançado. A neuromodulação de maneira isolada não foi suficiente para alterar o padrão comportamental dos animais. Futuros estudos podem avaliar se esta modulação afeta o efeito de fármacos que aumentam a atividade dopaminérgica na via mesolímbica (exemplo: cocaína).

REFERÊNCIA

6 REFERÊNCIAS

- Al-Garni, A. M., Vazquez, G., Alotibi, T., Hernandorena, C., & Knyahnytska, Y. (2026). Efficacy and safety of ketamine maintenance therapy in treatment-resistant depression: A systematic review of treatment protocols and clinical outcomes. In *Journal of Affective Disorders* (Vol. 394). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2025.120475>
- Amaral, R. A. do, Malbergier, A., & Andrade, A. G. de. (2010). Manejo do paciente com transtornos relacionados ao uso de substância psicoativa na emergência psiquiátrica. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 32(supl 2), S104–S111. <https://doi.org/10.1590/S1516-44462010000600007>
- Amirteymori, H., Veisi, A., Khaleghzadeh-Ahangar, H., Mozafari, R., & Haghparast, A. (2023). Involvement of orexin-2 receptors in the CA1 region of the hippocampus in the extinction and reinstatement of methamphetamine-induced conditioned place preference in the rats. *Peptides*, 160. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2022.170926>
- Angrist, B., Co&n, J., Bartlik, B., & Cooper, T. (1987). Early Pharmacokinetics and Clinical Effects of Oral D-Amphetamine in Normal Subjects. *Biological Psychiatry*. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(87\)90070-9](https://doi.org/10.1016/0006-3223(87)90070-9)
- Badanich, K. A., Adler, K. J., & Kirstein, C. L. (2006). Adolescents differ from adults in cocaine conditioned place preference and cocaine-induced dopamine in the nucleus accumbens septi. *European Journal of Pharmacology*, 550(1–3), 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.08.034>
- Bae, J., Ahn, S., Cho, D. W., Kim, H. S., Han, S. C., & Im, H. I. (2022). Claustral MeCP2 Regulates Methamphetamine-induced Conditioned Place Preference in Cynomolgus Monkey. *Experimental Neurobiology*, 31(6), 390–400. <https://doi.org/10.5607/en22034>
- Bardo, M. T., & Bevins, R. A. (2000). Conditioned place preference: What does it add to our preclinical understanding of drug reward? In *Psychopharmacology* (Vol. 153, Issue 1, pp. 31–43). <https://doi.org/10.1007/s002130000569>
- Barros, M., Dempster, E. L., Illott, N., Chabrawi, S., Maior, R. S., Tomaz, C., De Souza Silva, M. A., Huston, J. P., Mill, J., & Müller, C. P. (2013). Decreased methylation of the NK3 receptor coding gene (TACR3) after cocaine-induced place preference in marmoset monkeys. *Addiction Biology*, 18(3), 452–454. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2011.00409.x>
- Borges, A. C., Duarte, R. B. M., Nogueira, L., & Barros, M. (2015). Temporal and dose-dependent differences in simultaneously-induced cocaine hypervigilance and conditioned-place-preference in marmoset monkeys. *Drug and Alcohol Dependence*, 148, 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.01.007>
- Botanas, C. J., De La Peña, J. B., Dela Peña, I. J., Tampus, R., Yoon, R., Kim,

REFERÊNCIA

- H. J., Lee, Y. S., Jang, C. G., & Cheong, J. H. (2015). Methoxetamine, a ketamine derivative, produced conditioned place preference and was self-administered by rats: Evidence of its abuse potential. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *133*, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.03.007>
- Cam, Y., Kocum, C. G., Houska, T. K., Konrad, E. R., Schweizer, T. A., & Will, M. J. (2025). Palatable feeding effects on expression and reinstatement of morphine conditioned place preference in male and female rats. *Behavioural Brain Research*, *477*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2024.115320>
- Campbell, J. O., Wood, R. D., & Spear, L. P. (2000). Cocaine and morphine-induced place conditioning in adolescent and adult rats. In *Physiology & Behavior* (Vol. 68). [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(99\)00225-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(99)00225-5)
- Cecchetelli, A., & Hempstead, A. (2021, February 11). *GPCRs: How Do They Work and How Do We Study Them?* Addgene Blog. https://blog.addgene.org/gpcrshow-do-they-work-and-how-do-we-studythem?_gl=1*usw3hq*_gcl_au*MTYwMzIxNjE1Ny4xNzU4MDQ4ODgy*_ga*xNTM5OTc1OS4xNzQ5NjU5MjEw*_ga_5SC3L963MZ*czE3NTg1ODIzMzEkbzYkZzEkdDE3NTg1ODI0NTgkajM2JGwwJGgw
- Chan, A. E., Driscoll, G. S., Usmani, Z., & Ozburn, A. R. (2025). Nucleus accumbens core chemogenetic excitation in male mice and chemogenetic inhibition in female mice reduced ethanol reward. *Biology of Sex Differences*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s13293-025-00745-0>
- Childs, E., Astur, R. S., & de Wit, H. (2017). Virtual reality conditioned place preference using monetary reward. *Behavioural Brain Research*, *322*, 110–114. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.01.019>
- Childs, E., & de Wit, H. (2009). Amphetamine-Induced Place Preference in Humans. *Biological Psychiatry*, *65*(10), 900–904. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.11.016>
- Childs, E., & De Wit, H. (2013). Contextual conditioning enhances the psychostimulant and incentive properties of d-amphetamine in humans. *Addiction Biology*, *18*(6), 985–992. <https://doi.org/10.1111/j.13691600.2011.00416.x>
- Clozapine: Drug information*. (n.d.). UpToDate. Retrieved December 9, 2025, from <https://tekmedik.com/uptodate20/d/topic.htm?path=clozapine-druginformation#F153934>
- Correia, M. B. M., Monferrari-Martins, B., Barros, M., & Maior, R. S. (2026). Primates as animal models for CPP research. In *Neuroscience and Biobehavioral*

REFERÊNCIA

- Reviews* (Vol. 181). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2025.106522>
- de la Peña, J. B. I., Lee, H. C., de la Peña, I. C., Woo, T. S., Yoon, S. Y., Lee, H. L., Han, J. S., Lee, J. I., Cho, Y. J., Shin, C. Y., & Cheong, J. H. (2012). Rewarding and reinforcing effects of the NMDA receptor antagonist-benzodiazepine combination, zoletil®: Difference between acute and repeated exposure. *Behavioural Brain Research*, 233(2), 434–442.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.038>
- Department of Veterans Affairs, & Department of Defense. (2021). *Clinical practice guideline for treatment of SUD*.
- dTomato :: Fluorescent Protein Database*. (n.d.). FPbase. Retrieved November 10, 2025, from <https://www.fpbases.org/protein/dtomato/>
- Ezzati, M. R., Ezzati, M. J., Fattahi, M., Mozafari, R., Azizbeigi, R., & Haghparast, A. (2024). The role of D1-like dopamine receptors within the ventral tegmental area in the cannabidiol's inhibitory effects on the methamphetamine-induced conditioned place preference in rats. *Brain Research Bulletin*, 216.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2024.111038>
- Figueiredo, F. de A., & Vianna, D. (2020). *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Tabagismo* (kfkfk, Trans.). <http://portalms.saude.gov.br/protocolos-ediretrizes>,
- Fishell, G. (n.d.). *Addgene: pAAV-hDlx-GiDREADD-dTomato-Fishell-5*. Addgene. Retrieved November 10, 2025, from <https://www.addgene.org/83896/>
- Frankowska, M., Jesus, F. M., Mühle, C., Pacheco, J. V. N., Maior, R. S., Sadakierska-Chudy, A., Smaga, I., Piechota, M., Kalinichenko, L. S., Gulbins, E., Kornhuber, J., Filip, M., Müller, C. P., & Barros, M. (2021). Cocaine attenuates acid sphingomyelinase activity during establishment of addiction-related behavior—A translational study in rats and monkeys. *Addiction Biology*, 26(3).
<https://doi.org/10.1111/adb.12955>
- Gaidica, M. (2006). *Rat Brain Atlas*. Paxino, George, and Charles Watson.
<https://labs.gaidi.ca/rat-brain-atlas/>
- Ghasemian, S., Pascoe, A. J., Vardanjani, M. M., Haque, Z. Z., Ignatavicius, A., Fehring, D. J., Sheibani, V., & Mansouri, F. A. (2024). Morphine exposure modulates dimensional bias and set formation in anthropoids. *Addiction Biology*, 29(2). <https://doi.org/10.1111/adb.13380>
- Ghasemian, S., Vardanjani, M. M., Sheibani, V., & Mansouri, F. A. (2022). Dynamic modulation of inhibition ability following repeated exposures to morphine in macaque monkey. *Journal of Psychopharmacology*, 36(10), 1151–1160.
<https://doi.org/10.1177/02698811221112952>

REFERÊNCIA

- Gilmour, G., Pioli, E. Y., Dix, S. L., Smith, J. W., Conway, M. W., Jones, W. T., Loomis, S., Mason, R., Shahabi, S., & Tricklebank, M. D. (2009). Diverse and often opposite behavioural effects of NMDA receptor antagonists in rats: Implications for “nMDA antagonist modelling” of schizophrenia. *Psychopharmacology*, *205*(2), 203–216. <https://doi.org/10.1007/s00213-0091530-7>
- Gomez, J. L., Bonaventura, J., Lesniak, W., Mathews, W. B., Sysa-Shah, P., Rodriguez, L. A., Ellis, R. J., Richie, C. T., Harvey, B. K., Dannals, R. F., Pomper, M. G., Bonci, A., & Michaelides, M. (2017). Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science*, *357*(6350), 503–507. <https://doi.org/10.1126/science.aan2475>
- Guarino, S., Conrad, S. E., & Papini, M. R. (2020). Frustrative nonreward: Chemogenetic inactivation of the central amygdala abolishes the effect of reward downshift without affecting alcohol intake. *Neurobiology of Learning and Memory*, *169*. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107173>
- Guerin, A. A., Zbukvic, I. C., Luikinga, S. J., Drummond, K. D., Lawrence, A. J., Madsen, H. B., & Kim, J. H. (2021). Extinction and drug-induced reinstatement of cocaine seeking following self-administration or conditioned place preference in adolescent and adult rats. *Developmental Psychobiology*, *63*(1), 125–137. <https://doi.org/10.1002/dev.22017>
- Guo, R., Tang, Q., Ye, Y., Lu, X., Chen, F., Dai, X., Yan, Y., & Liao, L. (2016). Effects of gender on ketamine-induced conditioned place preference and urine metabolomics. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *77*, 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.03.007>
- Guo, Y., Luo, C., Tu, G., Li, C., Liu, Y., Liu, W., Lam Yung, K., & Mo, Z. (2018). Rhynchophylline downregulates phosphorylated camp response element binding protein, nuclear receptor-related-1, and brain-derived neurotrophic factor expression in the hippocampus of ketamine-induced conditioned place preference rats. *Pharmacognosy Magazine*, *14*(53), 81–86. https://doi.org/10.4103/pm.pm_90_17
- Ilg, A. K., Enkel, T., Bartsch, D., & Böhner, F. (2018). Behavioral effects of acute systemic low-dose clozapine in wild-type rats: Implications for the use of DREADDs in behavioral neuroscience. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00173>
- Individual Rat Behaviours*. (n.d.). Weebly. Retrieved November 9, 2025, from <http://www.isamurats.co.uk/individual-rat-behaviours.html>
- Jamali, S., Zarrabian, S., & Haghparast, A. (2021). Similar role of mPFC orexin-1 receptors in the acquisition and expression of morphine- and food-induced

REFERÊNCIA

- conditioned place preference in male rats. *Neuropharmacology*, 198.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108764>
- Jung, C., Rabinowitsch, A., Lee, W. T., Zheng, D., de Vaca, S. C., & Carr, K. D. (2016). Effects of food restriction on expression of place conditioning and biochemical correlates in rat nucleus accumbens. *Psychopharmacology*, 233(17), 3161–3172. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4360-4>
- Kashefi, A., Duarte, R. B., Jesus, F. M., Jamali, S., Haghparast, A., & Tomaz, C. (2019). Methylphenidate Produces Conditioned place preference, and cannabidiol Exposure during Extinction does not Inhibit the Reinstatement of Methylphenidate in the Marmoset Monkeys. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science*, 6(7), 66–72.
<https://doi.org/10.22161/ijaers.679>
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*, 3(8), 760–773.
[https://doi.org/10.1016/S22150366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S22150366(16)00104-8)
- Krupa, H., Gearhardt, A. N., Lewandowski, A., & Avena, N. M. (2024). Food Addiction. In *Brain Sciences* (Vol. 14, Issue 10). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/brainsci14100952>
- Li, H., Li, C., Zhou, Y., Luo, C., Ou, J., Li, J., & Mo, Z. (2018). Expression of microRNAs in the serum exosomes of methamphetamine-dependent rats vs. ketamine-dependent rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 109.
<https://doi.org/10.3892/etm.2018.5814>
- Magnus, C. J., Lee, P. H., Bonaventura, J., Zemla, R., Gomez, J. L., Ramirez, M. H., Hu, X., Galvan, A., Basu, J., Michaelides, M., & Sternson, S. M. (2019). Ultrapotent chemogenetics for research and potential clinical applications. *Science*, 364(6436). <https://doi.org/10.1126/science.aav5282>
- Mateu-Mollá, J., Pérez-Gálvez, B., & Villanueva-Blasco, V. J. (2025). Pharmacological treatment for substance use disorder: A systematic review. *Addictive Behaviors*, 163, 108242. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2024.108242>
- mCherry* :: *Fluorescent Protein Database*. (n.d.). FPbase. Retrieved November 10, 2025, from <https://www.fpbase.org/protein/mcherry/>
- Mucha, R. F., & Iversen, S. D. (1984). Reinforcing properties of morphine and naloxone revealed by conditioned place preferences: a procedural examination. *Psychopharmacology*, 82, 241–247. <https://doi.org/10.1007/BF00427782>
- Mueller, D., & Stewart, J. (2000). Cocaine-induced conditioned place preference: reinstatement by priming injections of cocaine after extinction. In *Behavioural Brain Research* (Vol. 115). www.elsevier.com/locate/abbr

REFERÊNCIA

- Nall, R. W., Heinsbroek, J. A., Nentwig, T. B., Kalivas, P. W., & Bobadilla, A. C. (2021). Circuit selectivity in drug versus natural reward seeking behaviors. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 157, Issue 5, pp. 1450–1472). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jnc.15297>
- National Institute on Drug Abuse. (2024, August). *Drug Overdose Deaths: Facts and Figures | National Institute on Drug Abuse (NIDA)*. National Institute of Health (NIH). <https://nida.nih.gov/research-topics/trends-statistics/overdose-death-rates>
- National Library of Medicine. (n.d.-a). *Clozapine | C₁₈H₁₉CIN₄ | CID 135398737 - PubChem*. National Institute of Health (NIH). Retrieved November 27, 2024, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135398737>
- National Library of Medicine. (n.d.-b). *clozapine N-oxide | C₁₈H₁₉CIN₄O | CID 135445691 - PubChem*. National Institute of Health (NIH). Retrieved November 27, 2025, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135445691>
- National Library of Medicine. (n.d.-c). *Ketamine | C₁₃H₁₆CINO | CID 3821 - PubChem*. National Institute of Health (NIH). Retrieved November 2, 2025, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ketamine>
- Panlab. (n.d.). *Spatial Place Preference Box*. Harvard Apparatus. Retrieved December 29, 2023, from <https://www.harvardapparatus.com/behavioralresearch/reward-and-addiction/spatial-place-preference-box-panlab.html>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th ed.).
- Pelloux, Y., Costentin, J., & Duterte-Boucher, D. (2004). Differential effects of novelty exposure on place preference conditioning to amphetamine and its oral consumption. *Psychopharmacology*, 171(3), 277–285. <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1584-x>
- Prus, A. J., James, J. R., & Rosecrans, J. A. (2009). 4. Conditioned Place Preference. In J. Buccafusco (Ed.), *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience* (2nd ed.).
- Psychiatric Association, A. (2014). *Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5 - 5a Edição* (5th ed.). Artmed.
- Queiroz, L. (2022, November 3). *Atendimento a pessoas com transtornos mentais por uso de álcool e drogas aumenta 12% no SUS — Ministério da Saúde*. Ministério Da Saúde. <https://www.gov.br/saude/ptbr/assuntos/noticias/2022/fevereiro/atendimento-a-pessoas-com-transtornosmentais-por-uso-de-alcool-e-drogas-aumenta-11-no-sus>
- Rang, H. P., Ritter, J. M., Flower, R. J., & Henderson, G. (2016a). 3. How drugs act:

REFERÊNCIA

- molecular aspects. In *Rang & Dale's Pharmacology* (8th ed.).
- Rang, H. P., Ritter, J. M., Flower, R. J., & Henderson, G. (2016b). 39. Other transmitters and modulators. In *Rang & Dale's Pharmacology* (8th ed.).
- Rang, H. P., Ritter, J. M., Flower, R. J., & Henderson, G. (2016c). 49. Drug addiction, dependence and abuse. In *Rang & Dale's Pharmacology*.
- Ribeiro, M., & Laranjeira, R. (2016). Evolução do conceito de dependência química. In A. Gigliotti & Â. Guimarães (Eds.), *Dependência, compulsão e impulsividade* (2nd ed.).
- Rossi, N. A., & Reid, L. D. (1976). Affective states associated with morphine injections. In *Physiological Psychology* (Vol. 19, Issue 76).
- Roth, B. (n.d.). *Addgene: pAAV-CaMKIIa-hM4D(Gi)-mCherry*. Addgene. Retrieved November 10, 2025, from <https://www.addgene.org/50477/>
- Roth, B. L. (2016). DREADDs for Neuroscientists. In *Neuron* (Vol. 89, Issue 4, pp. 683–694). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.040>
- Runegaard, A. H., Sørensen, A. T., Fitzpatrick, C. M., Jørgensen, S. H., Petersen, A. V., Hansen, N. W., Weikop, P., Andreasen, J. T., Mikkelsen, J. D., Perrier, J. F., Woldbye, D., Rickhag, M., Wortwein, G., & Gether, U. (2018). Locomotor- and reward-enhancing effects of cocaine are differentially regulated by chemogenetic stimulation of Gi-signaling in dopaminergic neurons. *ENeuro*, 5(3). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0345-17.2018>
- Saúde e Vigilância Sanitária. (2025, November 10). *CAPS: o que é, para quem serve e por que faz diferença — Ministério da Saúde*. Ministério Da Saúde. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-comciencia/noticias/2025/outubro/caps-o-que-e-para-quem-serve-e-por-que-fazdiferenca>
- Science Guides. (n.d.-a). *Addgene: Adeno-associated virus (AAV) Guide*. Addgene. Retrieved September 21, 2025, from <https://www.addgene.org/guides/aav/#serotypes%20https://www.addgene.org/guides/chemogenetics>
- Science Guides. (n.d.-b). *Addgene: Chemogenetics Guide*. Addgene. Retrieved September 21, 2025, from <https://www.addgene.org/guides/chemogenetics/>
- Shipman, S. L., Malison, R. T., Siegel, S., Rizzo, A. A., & Astur, R. S. (2006). Cocaine Induced Place Preference in a Virtual Environment. *2006 International Workshop on Virtual Rehabilitation*. <https://doi.org/10.1109/IWVR.2006.1707528>
- Stahl, S. M., Grady, M. M., & Muntner, N. (2021). 13. Impulsivity, Compulsivity, and Addiction. In *Stahl's Essential Psychopharmacology Neuroscientific Basis and Practical Applications* (5th ed.). Cambridge University Press.


REFERÊNCIA

- <https://doi.org/10.1017/9781108975292>
- Tzschentke, T. M. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: Update of the last decade. In *Addiction Biology* (Vol. 12, Issues 3–4, pp. 227–462). <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x>
- UACC, U. A. C. C. (2016). Module 1 - Introduction to the Laboratory Rat. In *LABORATORY ANIMAL BIOMETHODOLOGY WORKSHOP*. McGill University.
- ULAM, U. for L. A. M. (2015). *Pain Assessment in Rats*.
- United Nations Office on Drugs and Crime. (2022a). DRUG MARKET TRENDS COCAINE AMPHETAMINE-TYPE STIMULANTS NEW PSYCHOACTIVE SUBSTANCES. In *World Drug Report 2022*. www.unodc.org/unodc/en/data-andanalysis/world-drug-report-2022.html
- United Nations Office on Drugs and Crime. (2022b). SPECIAL POINTS OF INTEREST. In *World Drug Report 2022*. www.unodc.org/unodc/en/data-andanalysis/world-drug-report-2022.html
- Urban, D. J., & Roth, B. L. (2015). DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs): Chemogenetic tools with therapeutic utility. In *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (Vol. 55, pp. 399–417). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124803>
- V. K., S., Raman, R. K., Kumar, S., S, B., Farooq, J., & Noushida, N. (2025). Laboratory Rat Vaginal Cytology: A Quick Method of Staging Unstained Cells. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.86966>
- Valença, J. (2025, October 10). *SUS realiza 192 mil atendimentos de saúde mental no primeiro semestre de 2025 — Ministério da Saúde*. Ministério Da Saúde. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2025/outubro/sus-realiza-192mil-atendimentos-de-saude-mental-no-primeiro-semester-de-2025>
- Van Den Buuse, M. (2010). Modeling the positive symptoms of schizophrenia in genetically modified mice: Pharmacology and methodology aspects. In *Schizophrenia Bulletin* (Vol. 36, Issue 2, pp. 246–270). <https://doi.org/10.1093/schbul/sbp132>
- van der Kam, E. L., De Vry, J., & Tzschentke, T. M. (2009). 2-Methyl-6(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) potentiates ketamine and heroin reward as assessed by acquisition, extinction, and reinstatement of conditioned place preference in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 606(1–3), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.12.042>
- Volkow, N. D., & Blanco, C. (2023). Substance use disorders A comprehensive update of classification, epidemiology, neurobiology, clinical aspects, treatment and prevention. *World Psychiatry*, 203–229. <https://doi.org/10.1002/wps.21073>

REFERÊNCIA

- Volkow, N. D., Koob, G. F., & McLellan, A. T. (2016). Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. *New England Journal of Medicine*, 374(4), 363–371. <https://doi.org/10.1056/nejmra1511480>
- Wang, J., Qin, J., Kumata, K., Zhang, M. R., Qian, J., Zhou, W., & Ji, B. (2025). Clozapine is responsible for the in vivo imaging and pharmacological effects of clozapine-N-oxide in murine DREADD models. *Frontiers in Pharmacology*, 16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1671065>
- WHO, W. H. O. (n.d.). *Drugs (psychoactive)*. Retrieved November 11, 2025, from https://www.who.int/health-topics/drugs-psychoactive#tab=tab_1
- Wise, R. A., & Jordan, C. J. (2021). Dopamine, behavior, and addiction. In *Journal of Biomedical Science* (Vol. 28, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00779-7>
- Yates, J. R., Horchar, M. J., Kappesser, J. L., Broderick, M. R., Ellis, A. L., & Wright, M. R. (2021). The association between risky decision making and cocaine conditioned place preference is moderated by sex. *Drug and Alcohol Dependence*, 228. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2021.109079>


ANEXO A – CERTIFICADO CEUA (Experimentos 1 e 3)



Universidade de Brasília
Comissão de Ética no Uso Animal


Brasília, 4 de agosto de 2024.


DECLARAÇÃO



Declaramos que o projeto intitulado **"Modulação quimiogenética do NAc no teste de preferência condicionada por lugar em roedores"**, SEI nº 23106.045613/2024-79, sob responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Rafael Plakoudi Souto Maior**, (**rsmaior@unb.br**), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Esse projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília na 14ª reunião extraordinária, em **25/07/2024** para fins de **PESQUISA** e para utilização de **24 (vinte e quatro) Rattus norvegicus (Rato Wistar, independentemente de sexo)** provenientes do(a) biotério de criação cadastrado pelo CONCEA e aprovado pelo Biotério da FM/UnB.

O presente certificado é válido pelo período de **04/08/2024 a 28/02/2026**.





Dr. Bruno Stéfano Lima Dallago
Coordenador da CEUA – UnB

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

ANEXO B – CERTIFICADO CEUA (Experimento 2)



Brasília, 17 de junho de 2025.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**Modulação quimiogênica do Sistema de Recompensa em roedores submetidos ao teste de preferência condicionada por lugar induzida por cetamina**", SEI nº 23106.041055/2025-53, sob responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Rafael Plakoudi Souto Maior**, (rsmajor@unb.br), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Esse projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília na 236ª reunião ordinária, em **16/06/2025** para fins de **PESQUISA** e para utilização de **72 (setenta e dois) Rattus norvegicus (ratos, wistar, independentemente de sexo)** provenientes do(a) biotério de criação cadastrado pelo CONCEA.

O presente certificado é válido pelo período de **17/06/2025 a 30/12/2026**.

BRUNO STEFANO Autimado de forma digital
LIMA por: BRUNO STEFANO LIMA
DALLAGO:721435 DALLAGO:7214351749
17149 Dadas: 2025.06.17 11:26:06
-93307

Dr. Bruno Stefano Lima Dallago
Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

APÊNDICES

APÊNDICE A – PROTOCOLO DAPI EM LÂMINA

Materiais:

- Lâmpada amarela;
- Lâminas silanizadas com os cortes e lamínulas lavadas;
- Água destilada;
- Papel toalha;
- Câmara úmida (caixa com papel toalha umedecido com água destilada);
- Esmalte transparente;
- Pipeta 1000 uL;
- Soluções: Triton (0,08% em PBS), PBS, DAPI – *working solution* (fotossensível) e meio de montagem (50% PBS e 50% glicerina);
- Verniz acrílico e solvente;
- Pincel fino.

Preparação das lâminas – usar somente a luz amarela:

1. Com o esmalte transparente, faça um quadro no redor de cada corte;
2. Pingar a solução Triton com a pipeta em quantidade suficiente para umedecer os cortes e colocar na câmara úmida tampada por 10 minutos;
3. Lavar os cortes: retirar o excesso de Triton no papel toalha, pingar PBS e deixar 5 minutos na câmara úmida tampada;
 - a. Repetir o processo.
4. Pingar DAPI – *working solution* e deixar 10 minutos na câmara úmida;
5. Lavagem com PBS e 5 minutos na câmara úmida;
6. Pingar meio de montagem e posicionar a lamínula
 - a. Retirar o ar para não haver formação de bolhas e atrapalhar a visualização;
7. Selar com verniz na junção da lamínula com a lâmina e armazenar ao abrigo de luz e na geladeira.

APÊNDICES

APÊNDICE B – PROTOCOLO DAPI *FREE-FLOATING*

Materiais:

- Lâmpada amarela;
- Placa 12 poços, lâminas silanizadas e lamínulas lavadas;
- Shaker;
- Pipeta 200 uL;
- Soluções: PBS, PBS-Triton 0,3%, DAPI – *working solution* (1 ug/mL; fotossensível) e meio de montagem (90% glicerol, 10% PBS + 0,1%PPD para-fenilenodiamina 1 g/L);
- Verniz acrílico e solvente;
- Pincel fino;
- Pinça.

Preparação dos cortes – usar somente a luz amarela:

Medida base: 1 mL/poço

1. Pegue os cortes armazenados no -20° em *free-floating* e passe eles com um pincel para um poço com PBS em temperatura ambiente na placa que será utilizada durante o protocolo (15-30 min);
2. Trocar PBS para PBST 0,3% (5 min em agitação 15 rpm)
 - a. Repetir o processo.
3. Trocar para PBS (5 min em agitação 15 rpm)
 - a. Repetir mais duas vezes o processo.
4. Trocar para DAPI *working solution* (1 ug/mL) que tenha sido filtrada (15 min em agitação 15 rpm);
5. Trocar para PBS (5 min em agitação 15 rpm)
 - a. Repetir mais duas vezes o processo.
6. Montar na lâmina e deixar secar (30-60 min);
 - a. Colocar meio de montagem na lamínula (“fio”) e encostar ponta da lâmina para não quebrar tensão superficial e cobrir todos os cortes.
7. Selar com verniz na junção da lamínula com a lâmina e armazenar ao abrigo de luz e na geladeira.

APÊNDICES

APÊNDICE C – PROTOCOLO HABITUAÇÃO CETAMINA

1. Apparatus

1.1. DREADDs CPP

This protocol specifies that ANY-maze will operate in Video tracking mode. In this mode the system will track the animal in the video image. Keys can also be used to score the animal's behaviour.

1.2. Video sources

TOP VIEW

Images for this source are captured from the Fífine K420 (Port 24) interface which is viewing the apparatus from above. The complete captured images measure 640 x 480 pixels. This source uses a subset of this area measuring 640 x 480 pixels and positioned at 0, 0 (see figure 1).

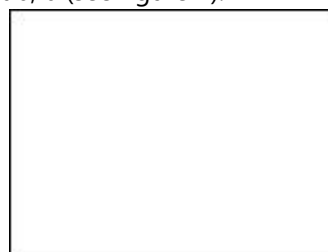


Figure 1. The TOP VIEW video source uses the un-shaded area of the complete image captured from the Fífine K420 (Port 24) interface.

Animal par

Images for this source are captured from the Fífine K420 (Port 24) interface which is viewing the apparatus from above. The complete captured images measure 640 x 480 pixels. This source uses a subset of this area measuring 640 x 480 pixels and positioned at 0, 0 (see figure 2).

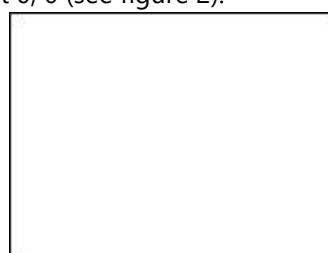


Figure 2. The Animal par video source uses the un-shaded area of the complete image captured from the Fífine K420 (Port 24) interface.

1.3. Apparatus

CPP

The image of this apparatus is provided by the TOP VIEW video source. Figure 3 shows the apparatus map for this apparatus; the 'ruler' line shown in the map extends from (180,327) to (554,327) and represents a real-world distance of 880mm.

APÊNDICES

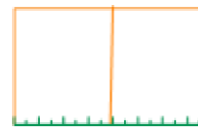


Figure 3. CPP apparatus map.

CPP 2

The image of this apparatus is provided by the Animal par video source. Figure 4 shows the apparatus map for this apparatus; the 'ruler' line shown in the map extends from (6,474) to (215,474) and represents a real-world distance of 880mm.



Figure 4. CPP 2 apparatus map.

2. Tracking

2.1. Animals

The animals that will be tracked are rats (not hooded). The animals are lighter than the background of the apparatus.

2.2. Tracking the animal's head & tail

The system will track the animal's head and tail as well as its centre of gravity. The results will therefore include measures specific to the position of the animal's head and tail during the test.

3. Behaviour

3.1. Zones

Circular

Figures 5 - 6 show the areas in the apparatus which correspond to this zone. The system will consider that the animal is in this zone whenever its centre point is within the

APÊNDICES

zone.



Figure 5. Position of the Circular zone in the CPP.



Figure 6. Position of the Circular zone in the CPP 2.

Listrado Figures 7 - 8 show the areas in the apparatus which correspond to this zone. The system will consider that the animal is in this zone whenever its centre point is within the zone.



Figure 7. Position of the Listrado zone in the CPP.



Figure 8. Position of the Listrado zone in the CPP 2.

3.2. Points

Maior Tempo The position of this point will be set automatically at the end of the test, to where the animal's centre point spent the most time.

APÊNDICES

3.3. Orientation and movement

ANY-maze will analyse the animal's *orientation* towards zones and points. An animal will be considered to be oriented towards a zone or point when its vector of movement is within a cone of 60° centred on the vector from the middle of the animal to the zone or point. (Note: orientation away from a zone or point is based on the inverse of the animal's vector of movement.)

ANY-maze will not analyse the animal's *movement* towards and away from zones and points.

3.4. Immobility detection

The system will detect periods when the animal is immobile and therefore the results will include mobility specific measure. The animal will be considered to be immobile if it doesn't change location and at least 70% of its body remains static for a period of 5000ms or more.

3.5. Freezing detection

The system won't detect periods when the animal is freezing.

3.6. Keys

Rearing

The key's behaviour is scored while the key is held down.

Key stroke for CPP : R

Key stroke for CPP 2 : 1

The behaviour represented by this key is an activity. This means that the animal will be deemed to be active when this key is pressed, even if it's not mobile.

Grooming

The key's behaviour is scored while the key is held down.

Key stroke for CPP : G

Key stroke for CPP 2 : 2

The behaviour represented by this key is an activity. This means that the animal will be deemed to be active when this key is pressed, even if it's not mobile.

Exploration

The key's behaviour is scored while the key is held down.

Key stroke for CPP : E

Key stroke for CPP 2 : 3

The behaviour represented by this key is an activity. This means that the animal will be deemed to be active when this key is pressed, even if it's not mobile.

Leg stand

The key's behaviour is scored while the key is held down.

Key stroke for CPP : A

Key stroke for CPP 2 : 4

The behaviour represented by this key is an activity. This means that the animal will be deemed to be active when this key is pressed, even if it's not mobile.

APÊNDICES

Sleep The key's behaviour is scored while the key is held down.

Key stroke for CPP : S

Key stroke for CPP 2 : 5

The behaviour represented by this key is an activity. This means that the animal will be deemed to be active when this key is pressed, even if it's not mobile.

bocejo The key's behaviour is scored while the key is held down.

Key stroke for CPP : B

Key stroke for CPP 2 : 6

The behaviour represented by this key is an activity. This means that the animal will be deemed to be active when this key is pressed, even if it's not mobile.

head hake The key's behaviour is scored while the key is held down.

Key stroke for CPP : H

Key stroke for CPP 2 : 7

The behaviour represented by this key is an activity. This means that the animal will be deemed to be active when this key is pressed, even if it's not mobile.

piloereção The key's behaviour is scored while the key is held down.

Key stroke for CPP : X

Key stroke for CPP 2 : 8

The behaviour represented by this key is an activity. This means that the animal will be deemed to be active when this key is pressed, even if it's not mobile.

tremor The key's behaviour is scored while the key is held down.

APÊNDICES

Key stroke for CPP : T

Key stroke for CPP 2 : 9

The behaviour represented by this key is an activity. This means that the animal will be deemed to be active when this key is pressed, even if it's not mobile.

espasmo The key's behaviour is scored while the key is held down.

Key stroke for CPP : Z

Key stroke for CPP 2 : 0

The behaviour represented by this key is an activity. This means that the animal will be deemed to be active when this key is pressed, even if it's not mobile.

4. Testing

4.1. Test scheduling

Tests will be scheduled automatically by the system.

4.2. Stages

Habituação Tests in this stage have a duration of 30min (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had 3 trials.

During this stage all the animals will be tested in each trial before the stage progresses to the next trial.

Animals will be pre-assigned to the apparatus before testing begins as follows: the first animal will be assigned to the first apparatus, the second animal to the second apparatus, etc. until each apparatus has one animal assigned to it. The next animal will then be assigned to the first apparatus again, and so on until all animals have been assigned to an apparatus.

4.3. Automatic starting of tests

The system will automatically start tests when the experimenter leaves the camera's field of view.

4.4. What to record while testing

The system will record the animal's position at most 20 times per second.

APÊNDICES

If tracking from a camera, a video of each test will be recorded automatically and will be given a file name of the format 'Test [TestNum].szv'. Videos will be recorded using *Medium quality*.

5. Additional information

5.1. Treatment groups

Animals will be grouped together into treatment groups.

Under this protocol experiments will be run blind - i.e. the treatment groups will be assigned random single letter codes, the meanings of which will be hidden from the user. However, the system won't assign the animals to the treatment groups and this will have to be done manually by the user.

5.2. Animal ID

ANY-maze will refer to animals using your IDs. This will require that you enter the ID of each animal when setting up the experiment. This ID is called the 'Animal ID' throughout the experiment.

6. Analysis

6.1. Analysis across time

In any analysis that the system performs *within* tests (i.e. through the use of the *Segment* measure) it will use a segment length of 300s. That's to say that it will break the tests into equal length segments of this duration (although the last segment may be shorter) and analyse the results in each one.

ANY-maze will also analyse the results independently for each of the following time periods :

New time period This time period starts at 0s and ends at 1800s.

6.2. Analysis options

General analysis settings

Distance (and related values, such as speed) will be reported using units of metres.

ANY-maze will use a level of significance of $p \leq 0.05$ in all statistical tests.

In this protocol the latency for events which don't occur will be *undefined*. For example, if the animal does not enter a particular zone during a test then the latency to the first entry to that zone will be undefined. This will mean that the animal will not be included in the results for the measure. This will cause the measure's N to be reduced. This will apply to: Zone entries/exits which don't occur, key presses which don't occur and sequences which don't occur.

When calculating averages where the denominator of the calculation is zero (for example, the average speed in a zone that the animal never entered) the system will consider the result to be undefined. This will mean that, in these cases, the animal won't be included in the results for the measure. This will cause the measure's N to be reduced.

In tests where the animal does not enter a certain zone, the path efficiency to that zone will be undefined. This will reduce the 'N' for this measure.

The Corrected Integrated Path Length (CIPL) for a zone will be calculated based on the path up to the first zone entry. This means that if the animal never enters the zone the CIPL will be reported as #N/A.

APÊNDICES

Analysis of heading errors

The animal's initial heading error will be calculated using the vector that joins the animal's initial position and its position 500ms after the test start (ignoring periods when the animal is immobile). ANY-maze will calculate the average heading error to a zone based on all the points on the zone's perimeter. Thus a heading error to a zone will be the heading to the perimeter point with the smallest error.

Additional scoring - overlapping key strokes

If, in tests that are rescored, the same key is pressed at the same time in multiple 'scorings' of the test, then the system will merge the overlapping key presses so the total time pressed remains accurate.

7. Notes about this report

This report shows details of the ANY-maze protocol which affect how the experiment is performed. It does *not* include sections of the protocol which determine which results are currently selected for display (for example, Reports and Charts) or how information is formatted or displayed during a test.

APÊNDICES

APÊNDICE D – PROTOCOLO CONDICIONAMENTO CETAMINA

O diferencial do protocolo de habituação de Cetamina.

3. Behaviour

3.1. Zones

Listrado

Figure 3 shows the area(s) in the apparatus which correspond to this zone. The system will consider that the animal is in this zone whenever its centre point is within the zone.

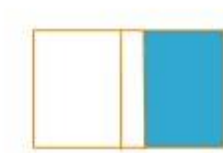


Figure 3. Position of the Listrado zone in the CPP.

Circular

Figure 4 shows the area(s) in the apparatus which correspond to this zone. The system will consider that the animal is in this zone whenever its centre point is within the zone.

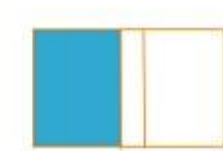


Figure 4. Position of the Circular zone in the CPP.

4. Testing

4.1. Test scheduling

Tests will be scheduled manually by the user, thus allowing them to be performed in any order.

4.2. Stages

CC1

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

APÊNDICES

The stage will end after each animal has had one trial.

NC1

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

CC2

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

NC2

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

CC3

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

NC3

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

CC4

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

NC4

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

CC5

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

APÊNDICES

NC5

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

4.3. Automatic starting of tests

The experimenter will start the test manually.

4.4. What to record while testing

The system will record the animal's position at most 20 times per second.

If tracking from a camera, a video of each test will be recorded automatically and will be given a file name of the format 'Test [TestNum].szv'. Videos will be recorded using *Medium quality*.

APÊNDICES

APÊNDICE E – PROTOCOLO TESTE CETAMINA

O diferencial do protocolo de habituação de Cetamina.

4. Testing

4.1. Test scheduling

Tests will be scheduled manually by the user, thus allowing them to be performed in any order.

4.2. Stages

Teste CPP

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

Teste CPP + CET

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

Teste extinção 1

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

Teste extinção 2

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

Teste extinção 3

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

Teste extinção 4

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

Teste extinção 5

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

APÊNDICES

The stage will end after each animal has had one trial.

4.3. Automatic starting of tests

The system will automatically start tests when the experimenter leaves the camera's field of view.

4.4. What to record while testing

The system will automatically select the frequency at which it will record the animals' position based on the programmed duration of the tests in the experiment.

If tracking from a camera, a video of each test will be recorded automatically and will be given a file name of the format 'Test [TestNum].szv'.

APÊNDICES

APÊNDICE F – PROTOCOLO HABITUAÇÃO CNO

O diferencial do protocolo para Cetamina.

4. Testing

4.1. Test scheduling

Tests will be scheduled automatically by the system.

4.2. Stages

Habituação Tests in this stage have a duration of 30min (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had 5 trials.

During this stage all the animals will be tested in each trial before the stage progresses to the next trial.

4.3. Automatic starting of tests

The system will automatically start tests when the experimenter leaves the camera's field of view.

4.4. What to record while testing

The system will record the animal's position at most 20 times per second.

If tracking from a camera, a video of each test will be recorded automatically and will be given a file name of the format 'Test [TestNum].szv'. Videos will be recorded using *Medium quality*.

APÊNDICES

APÊNDICE G – PROTOCOLO CONDICIONAMENTO CNO

O diferencial do protocolo para Cetamina.

4. Testing

4.1. Test scheduling

Tests will be scheduled manually by the user, thus allowing them to be performed in any order.

4.2. Stages

CC1	Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an <i>End the test</i> action is triggered by a procedure). The stage will end after each animal has had one trial.
NC1	Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an <i>End the test</i> action is triggered by a procedure). The stage will end after each animal has had one trial.
CC2	Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an <i>End the test</i> action is triggered by a procedure). The stage will end after each animal has had one trial.
NC2	Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an <i>End the test</i> action is triggered by a procedure). The stage will end after each animal has had one trial.
CC3	Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an <i>End the test</i> action is triggered by a procedure). The stage will end after each animal has had one trial.
NC3	Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an <i>End the test</i> action is triggered by a procedure). The stage will end after each animal has had one trial.
CC4	Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an <i>End the test</i> action is triggered by a procedure).

APÊNDICES

The stage will end after each animal has had one trial.

NC4

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

CC5

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

NC5

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

CC6

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

NC6

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

4.3. Automatic starting of tests

The experimenter will start the test manually.

4.4. What to record while testing

The system will record the animal's position at most 20 times per second.

If tracking from a camera, a video of each test will be recorded automatically and will be given a file name of the format 'Test [TestNum].szv'. Videos will be recorded using *Medium quality*.

APÊNDICES

APÊNDICE H – PROTOCOLO TESTE CNO

O diferencial do protocolo para Cetamina.

4. Testing

4.1. Test scheduling

Tests will be scheduled manually by the user, thus allowing them to be performed in any order.

4.2. Stages

Teste CPP

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

Teste CPP + CNO

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

Re-teste CPP

Tests in this stage have a duration of 1800s (although tests may end before this if an *End the test* action is triggered by a procedure).

The stage will end after each animal has had one trial.

4.3. Automatic starting of tests

The system will automatically start tests when the experimenter leaves the camera's field of view.

4.4. What to record while testing

The system will automatically select the frequency at which it will record the animals' position based on the programmed duration of the tests in the experiment.

If tracking from a camera, a video of each test will be recorded automatically and will be given a file name of the format 'Test [TestNum].szv'.