

Universidade de Brasília

Instituto de Psicologia

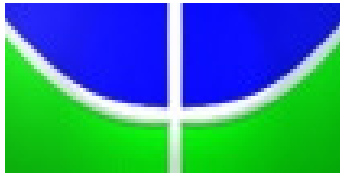
Departamento de Processos Psicológicos Básicos

**Efeito do pareamento da morfina i.p. com os braços
abertos do Labirinto em Cruz Elevado: um novo
modelo para o estudo de adicção a drogas?**

Virgínia Maria Dalfior Fava

Orientador: Prof. Dr. Vitor Augusto Motta Moreira

Brasília, abril de 2009



Universidade de Brasília

Instituto de Psicologia

Departamento de Processos Psicológicos Básicos

**Efeito do pareamento da morfina i.p. com os braços
abertos do Labirinto em Cruz Elevado: um novo
modelo para o estudo de adicção a drogas?**

Virgínia Maria Dalfior Fava

Orientador: Prof. Dr. Vitor Augusto Motta Moreira

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências do Comportamento, na área de Neurociências e Cognição.

Brasília, abril de 2009

"Mas, como um homem que caminha só e nas trevas, decidi proceder tão lentamente e a usar de tanta circunspeção em todas as coisas, que, mesmo se só avançasse muito pouco, ao menos estava certo de não cair."

René Descartes
Discurso do Método: Regras para a Direção do Espírito

Agradecimentos

Aos meus pais, Antônio Elias e Leila, por terem me proporcionado uma história de vida com mil estímulos reforçadores, que aumentaram a probabilidade de padrões comportamentais relacionados a perseguir meus objetivos, independente dos obstáculos; por terem me ensinado regras, que se transformaram em valores, de respeito aos professores e aos cols.; e por terem sido modelos para a minha persistência e ambição ao conhecimento.

Aos meus irmãos, Leilinha, Rafael e Rubens, ao meu cunhado Irisnei, aos meus sobrinhos, Matheus, Helena e Isadora, ao meu namorado, Rafael, e à Mara, por estarem ao meu lado, por serem a minha família, por entenderem os meus momentos de isolamento no quarto, ao analisar meus dados e ao escrever a dissertação, e por não interromperem mais do que o necessário.

A todos os meus amigos, que me ofereceram a oportunidade de esquecer que eu era aluna de mestrado e ótimos momentos de diversão, joguinhos, filmes e muita comilança.

Especialmente, às professoras Elenice Hanna e Josele Abreu, por serem meus modelos e por terem colocado meu comportamento sob o controle de estímulos, altamente reforçadores, provenientes da escolha de procedimentos experimentais e da análise de dados de pesquisa.

Aos meus cols. de laboratório, tanto de Análise Experimental do Comportamento quanto de Psicobiologia, por terem me proporcionado discussões valiosas sobre o comportamento humano e sobre pesquisa, além de momentos de esparecimento e de conversas fiadas.

À dona Neusa, ao Ademar, à Abadia, à Salete e à Joyce, por terem me dado o suporte técnico e operacional para o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao pesquisador Manoel Jorge Nobre, da USP – Campus de Ribeirão Preto, pela doação da droga, à professora Magda Verçosa Carvalho Branco, do UniCEUB, pela doação de animais; ambos utilizados na fase piloto do experimento;

Ao Hospital Universitário de Brasília (HUB), pelo seu apoio técnico, em especial ao seu ex-diretor professor João Batista e ao farmacêutico Julio César Marques.

Ao meu orientador, Vitor Motta, por ter me ensinado um pouco sobre a imensidão da psicobiologia, por ter disponibilizado vários instrumentos para a minha pesquisa, entre os quais, os sujeitos experimentais, a droga e o labirinto, e por ter compreendido minha obsessão pela análise experimental do comportamento.

E a todos aqueles que estão refletidos de alguma forma nessa dissertação, seja por sugestões práticas ou apoio nos momentos de desespero.

Índice

Agradecimentos	i
Índice	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Introdução	1
Adicção a drogas	1
Modelos animais de adicção	2
Morfina	7
Labirinto em Cruz Elevado	10
Justificativa	12
Objetivo	13
Método	14
Sujeitos	14
Equipamentos	14
Drogas	15
Procedimento	15
Análise estatística	16
Resultados	17
Discussão	21
Referências	27

Resumo

O Labirinto em Cruz Elevado foi adaptado para avaliar os efeitos do pareamento entre a administração de morfina e um ambiente previamente aversivo, a partir de um procedimento de preferência por lugar condicionado. Propõe-se um novo procedimento experimental que permita verificar a influência de outras variáveis ambientais e de outras propriedades farmacológicas na aquisição da adicção a drogas, além daquelas avaliadas pelos modelos de auto-administração e de preferência por lugar condicionado. Setenta e dois ratos foram divididos em seis grupos. Cinco grupos foram administrados com solução de morfina (0,0; 0,3; 1,0; 5,0 e 10,0 mg/kg) ou de salina, e confinados aos braços abertos ou aos braços fechados do labirinto, respectivamente (20 minutos), durante quatro dias consecutivos e alternados, de forma a expor o animal uma vez a cada braço. O sexto grupo de animais recebeu apenas injeção de salina durante os quatro dias de condicionamento, sem exposição ao labirinto. No quinto dia, todos os animais foram colocados no teste-padrão de cinco minutos do labirinto. Os resultados mostraram que a exposição aos braços do labirinto, sem a administração da droga, diminui a exploração dos braços abertos, indicando o aumento da aversão a esses compartimentos. Esse efeito é prevenido pelo condicionamento com morfina nas doses de 1,0 e 5,0 mg/kg, que também produzem preferência por lugar condicionado no modelo padrão, mas não na dose ansiolítica de 0,3 mg/kg. Esses resultados sugerem que esse procedimento pode ser empregado para o estudo da adicção, na medida em que ele permite a verificação dos efeitos reforçadores da administração de drogas. As principais vantagens desse modelo são: (1) a perspectiva etológica do procedimento, ao avaliar uma resposta relacionada à aversão determinada filogeneticamente, e (2) a avaliação da adicção em contextos onde estão presentes estímulos aversivos.

Palavras-chave: Labirinto em Cruz Elevado, Preferência por Lugar Condicionado, morfina

Abstract

The Elevated Plus-Maze was adapted to assess the effects of the association between morphine administration and a previous aversive environment, in a Conditioned Place Preference procedure. This is a proposal of a new experimental procedure that can assess other environmental variables and other pharmacological functions effects of addiction, which cannot be assessed by self-administration and conditioned place preference models. Seventy two rats were divided into six groups. Five groups were administrated with morphine solution (0,0; 0,3; 1,0; 5,0 and 10,0 mg/kg) or saline and exposed to the maze open arms or closed arms, respectively, in four consecutive alternated days, in a manner that each animal was exposed to each maze arm. The sixth group of animals was just administrated with saline during the four conditioning days, without exposition to the maze. At the fifth day, all groups were exposed to the maze five minutes test. As a result, the exposition to the maze arms, without the drug administration, reduced the open arms exploring, which suggests that the aversion elicited by these compartments have enlarged. This effect is prevented by the morphine conditioning in doses of 1,0 and 5,0 mg/kg, that cause conditioned place preference at the pattern model, but is not prevented in the anxiolytic dose of 0,3 mg/kg. These results indicate that this procedure might be employed in addiction studies, because it can be used to assess the reinforcing effects of drugs administration. The model proposed main advantages are: (1) the procedure ethologic perspective, because it is analyzed an aversion related and genetically determined behavior; and (2) the addiction study in a context where aversive stimuli are presented.

Key-words: Elevated Plus-Maze, Conditioned Place Preference, morphine

Introdução

1. Adicção a drogas

A adicção a drogas é uma desordem crônica caracterizada pela administração compulsiva, pela inabilidade de limitar o consumo e pela emergência de síndrome de abstinência durante a cessação da administração da droga. Embora cada droga de abuso possua mecanismos de ação específicos, todas elas têm efeitos comuns no cérebro. Elas ativam a via mesolímbica, considerada o sistema de recompensa neural, que se estende da área tegmental ventral até o núcleo accumbens, com projeções para áreas como o sistema límbico e o córtex orbitofrontal (Leshner, 1997). O principal neurotransmissor envolvido na via mesolímbica é a dopamina. A administração de cocaína, de anfetamina, de opióides, de nicotina e de outras drogas de abuso eleva os níveis desse neurotransmissor (Salamone & cols., 2007).

Os estudos na área de adicção partem do pressuposto de que os comportamentos relacionados ao uso de drogas são adquiridos em função dos efeitos reforçadores positivos de sua administração (Koob, Sanna & Bloom, 1998). Evidências empíricas confirmam essa hipótese ao mostrar que tanto as drogas de abuso como reforçadores naturais – água, comida e sexo – possuem o mesmo mecanismo de ação, ativando a via mesolímbica (Berridge, 2007; Di Chiara, 1998). Entretanto, o comportamento de adicção seria mantido por suas propriedades reforçadoras negativas. Pesquisas mostram que o uso crônico da droga causa adaptações neurais, caracterizadas pela diminuição da atividade do sistema dopaminérgico mesolímbico, que está envolvida no aparecimento dos sintomas da abstinência. Dessa forma, a administração da droga tem como consequência a cessação dos sintomas da crise de abstinência, que são considerados estímulos aversivos (Koob & Le Moal, 2005; Koob, Sanna & Bloom, 1998).

Entretanto, alguns autores questionam a suficiência de uma explicação neurofisiológica para a adicção, dado que nem todos os indivíduos que já usaram drogas ou que fazem o seu uso ocasional tornam-se adictos. Winger e cols. (2005) defendem que a adicção é também uma desordem comportamental que ocorre quando os reforçadores relacionados à droga, quando da ativação da via mesolímbica, assumem o controle sobre uma parte substancial do repertório comportamental do indivíduo. Nesse caso, esses reforçadores são mais potentes do que outros reforços disponíveis no

ambiente desse indivíduo, devido, em parte, a predisposições genéticas, mas também por uma história de aprendizagem particular, combinada com a facilidade relativa de acesso à droga e com o contato insuficiente com outras fontes alternativas de reforço.

São necessárias novas pesquisas que esclareçam e validem o papel desses fatores na aquisição e manutenção do padrão comportamental relacionado ao abuso de drogas. Os estudos atuais com modelos animais de adicção revelam uma alta prevalência de animais adictos. Ahmed (2005) defende que essa prevalência pode ser consequência da falta de reforços alternativos e da presença de estímulos aversivos, nas condições experimentais e nos biotérios, e que, portanto, existe a necessidade de se criar modelos animais de adicção que avaliem a disponibilidade de outros estímulos, reforçadores e aversivos, na aquisição de comportamentos de uso de drogas.

2. Modelos animais de adicção

Modelos animais têm sido utilizados para simular alguns componentes das desordens psiquiátricas, com a finalidade de auxiliar na compreensão dos mecanismos neurofisiológicos e comportamentais subjacentes a esses transtornos e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o seu enfrentamento. O desenvolvimento de modelos animais para o estudo da adicção permitiu a compreensão de processos psicológicos envolvidos no abuso de drogas. De acordo com Deroche-Gamonet, Belin e Piazza (2004), o estudo do padrão comportamental relacionado ao abuso de drogas em animais é realizado principalmente a partir da identificação e análise de três tipos de padrões comportamentais para a dependência de substâncias, descritos no Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (DSM-IV): 1) dificuldade de parar ou limitar o uso da droga; 2) alta motivação para o consumo da droga; e 3) uso contínuo, independente de suas consequências prejudiciais.

Para elucidar os processos comportamentais subjacentes à adicção, esses modelos permitem a análise da droga enquanto um estímulo ambiental, portador de funções eliciadoras de respostas fisiológicas ou reforçadoras de comportamentos operantes (Everitt, Dickinson & Robbins, 2001). Quando a droga, administrada a um organismo, produz respostas fisiológicas decorrentes de seu mecanismo de ação, ativando ou inibindo vias neurais, ela está exercendo a função de estímulo incondicionado de comportamentos respondentes. Quando a droga aumenta a

probabilidade de emissão de comportamentos operantes, ela está exercendo o papel de estímulo reforçador. Nesse segundo caso, ela pode reforçar positivamente os comportamentos que resultam em sua administração, ao produzir efeitos apetitivos, como euforia e êxtase; ou ainda reforçar negativamente outros comportamentos, que evitam conseqüências aversivas, como aquelas provenientes da síndrome de abstinência.

Entre os modelos animais desenvolvidos para o estudo da adicção, aqueles baseados na auto-administração e no condicionamento clássico são os mais utilizados (Van Ree, Guerrits & Vanderschuren, 1999). No primeiro, a auto-administração da droga é vista como uma resposta operante reforçada pelos efeitos eliciados pela droga no organismo, que possui, portanto, similaridades funcionais com outros estímulos reforçadores. Ou seja, a administração da droga produzida de forma contingente a uma determinada resposta ou a um conjunto de respostas aumenta a probabilidade de emissão desses comportamentos pelo animal. A função reforçadora da droga tem o potencial de produzir efeitos condicionados, tornando estímulos neutros, quando associados ao comportamento de adicção, em reforçadores condicionados ou estímulos discriminativos para a resposta de auto-administração da droga (Ator & Griffiths, 2003; Panlilio & Goldberg, 2007).

No procedimento experimental do modelo de auto-administração, inicialmente, o animal é treinado a emitir determinada resposta, geralmente a resposta de pressionar uma barra ou de focinhar. A droga é administrada ao animal como conseqüência da emissão dessa resposta, cuja freqüência é elevada, levando à aquisição e à manutenção desse comportamento. Esse procedimento pode variar de forma a avaliar os efeitos reforçadores da droga a partir de diferentes esquemas de reforçamento, a fim de comparar com os efeitos produzidos por conseqüências reforçadoras naturais, como a apresentação de comida ou de água (Ahmed, Bobashev & Gutkin, 2007; Panlilio & Goldberg, 2007). O valor reforçador da droga e o padrão comportamental identificados em animais são similares àqueles verificados em humanos. As respostas requisitadas aumentam gradualmente até a droga produzir seus efeitos fisiológicos específicos. A verificação de que a produção desses efeitos controla o comportamento do animal pode ser demonstrada pelo pré-tratamento com morfina e outras drogas que possuam mesmo mecanismo de ação, como a codeína, que resultam na redução da taxa de respostas emitidas para a auto-administração da morfina. Em contraste, quando alguns receptores são bloqueados com drogas antagonistas de morfina, como a naloxona, a emissão dessas respostas aumenta. Esses estudos mostram que o animal aprende um padrão

comportamental, que é controlado pela quantidade de morfina que está atuando nos receptores e produzindo as conseqüências reforçadoras (Woods & cols., 1993). Embora o modelo de auto-administração apresente validade aparente e generalização entre espécies, ele possui algumas desvantagens. A modelagem inicial da resposta requisitada (pressão à barra ou focinhar) demanda muito tempo e a utilização de outras conseqüências reforçadoras, como comida ou água. São necessários também cuidados especiais para manter o funcionamento do cateter para a administração da droga (Panlilio & Goldberg, 2007).

Várias drogas de abuso têm o potencial de produzir auto-administração. Arroyo e cols. (1998) demonstraram que a cocaína produz auto-administração intravenosa, em doses de 0,25 mg/infusão, e que a emissão das respostas requeridas é mantida mesmo quando apenas estímulos condicionados aos efeitos da droga estão presentes. Roberts e Bennet (1993) demonstraram que a heroína também possui a propriedade de produzir auto-administração, a partir de um esquema de razão progressiva, em que a taxa de respostas emitidas para a auto-administração intravenosa dessa droga crescia com o aumento da dose administrada, de 12,5 até 50 µg/infusão, e diminuía a partir da dose de 100 µg/infusão. Esses autores observaram ainda que a taxa de respostas diminuía, quando os animais eram tratados previamente com naltrexona, um antagonista opióide, indicando um efeito bloqueador das respostas fisiológicas reforçadoras geradas pela heroína.

O modelo de preferência por lugar condicionado é baseado no princípio do condicionamento clássico, que envolve a associação entre o efeito da droga, estímulo incondicionado, que elicia respostas filogeneticamente determinadas, independente de aprendizagem (a administração de morfina, por exemplo, ativa vias dopaminérgicas, resultando em uma sensação de prazer e relaxamento), e estímulos ambientais neutros, que não eliciam essas respostas. Esse princípio descreve que estímulos previamente neutros, quando pareados sucessivamente com um estímulo incondicionado, passam a atuar como estímulos condicionados, eliciando comportamentos respondentes semelhantes aos efeitos produzidos anteriormente apenas pelo estímulo incondicionado (Mucha & Iversen, 1984; Tzschentke, 1998).

A maioria dos estudos utiliza caixas de condicionamento com dois ou três compartimentos, que podem diferir em relação à textura do piso, à cor das paredes, ao odor, entre outras características. No procedimento experimental, a droga é administrada imediatamente antes de confinar o animal em um dos compartimentos do

aparato experimental. Os animais são injetados com salina e pareados com o outro compartimento, diferente daquele que foi pareado com a droga. Após o condicionamento, é realizado um teste de escolha, em que é permitido ao animal, sem a prévia administração da droga, explorar o ambiente e escolher entre esses dois compartimentos, com a possibilidade de haver ainda mais um compartimento, novo para o animal. Os resultados mostram que os animais preferem o contexto pareado com a droga, permanecendo mais tempo neste do que no pareado com salina (Tzschentke, 1998), ou seja, o comportamento de explorar o compartimento pareado com a droga é reforçado positivamente. Uma vantagem desse modelo é que o teste comportamental ocorre em uma fase distinta daquela em que o animal é exposto à droga e às eventuais manipulações farmacológicas, diminuindo a interferência desses fatores no comportamento analisado (Fenu & cols., 2006).

Existe uma tendência nessa área a utilizar aparatos experimentais não enviesados, ou seja, aqueles em que animais ingênuos não mostram preferência por nenhum dos compartimentos antes do pareamento com a droga, caracterizando a neutralidade do procedimento. O procedimento enviesado tem sido criticado devido a sua suscetibilidade de produzir falso-positivos, se a droga possuir propriedades ansiolíticas, o que reduz a aversão inicial ao compartimento pareado, reforçando negativamente a exploração desse ambiente e, portanto, resultando no aumento da magnitude da preferência no teste de escolha (Tzschentke, 1998). Alguns autores têm utilizado o campo aberto para o estudo da preferência por lugar condicionado, que consiste em quatro quadrantes uniformes, para reduzir ao máximo o viés de preferência entre os compartimentos, antes da fase de condicionamento, e para assegurar a influência apenas dos efeitos reforçadores positivos da droga. Para possibilitar a discriminação dos compartimentos, são utilizadas diferentes texturas para o assoalho (Vezina & Stewart, 1987) ou estímulos visuais externos ao campo (Hasenöhrl, Oitzl & Huston, 1989).

A partir da meta-análise de artigos, publicados entre 1979 e 1992, que utilizaram o modelo de preferência por lugar, Bardo, Rowlett e Harris (1995) investigaram diferenças na magnitude do efeito do condicionamento com drogas opióides e estimulantes, decorrentes de variáveis metodológicas. Esses autores observaram que a realização de um pré-teste antes do condicionamento e que o pareamento da droga com o compartimento não preferido (procedimento enviesado) podem diminuir a magnitude da preferência; enquanto que o aumento do tempo de confinamento e o pareamento com

salina no compartimento oposto, ambos na fase de condicionamento, podem aumentar a magnitude da preferência. Outras variáveis metodológicas que podem afetar a magnitude do efeito do condicionamento são a via de administração da droga e o número de tentativas de condicionamento.

Biala e Langwinski (1996) demonstraram que o etanol (1 g/kg), a morfina (5 mg/kg), a cocaína (5 mg/kg) e a anfetamina (5 mg/kg) produzem preferência por lugar quando condicionadas ao compartimento não preferido. Esses autores observaram ainda que esse efeito é bloqueado pelo pré-tratamento com naloxona, antagonista opióide, durante a fase de condicionamento, o que sugere o envolvimento de receptores opióides, principalmente aqueles localizados em neurônios dopaminérgicos do sistema mesolímbico, na aquisição da adicção. Itzhak e Martin (2001) mostraram que a cocaína (20 mg/kg) também induz preferência por lugar condicionado e que, após sua extinção, esse efeito pode ser reinstalado a partir da administração de cocaína ou de outros estimulantes, como a metanfetamina e o metilfenidato, mas não pela administração de fenciclidina, o que indica que as três primeiras drogas possuem mecanismos de ação similar. Esse estudo sugere a possibilidade de utilizar esse modelo em estudos de discriminação de drogas.

Algumas pesquisas (Lu & cols., 2002; Parker, Limebeer & Slomke, 2006) sugerem a confirmação da hipótese do condicionamento clássico para explicar a preferência por lugar condicionado, ao verificar a possibilidade de extinção dessa preferência, a partir do pareamento do animal com o compartimento condicionado anteriormente, mas sem a administração da droga. Entretanto, o efeito da extinção é menor quando o animal não é confinado ao compartimento, mas é deixado livre para explorar todo o aparato experimental. Outra evidência que defende essa hipótese é o estudo realizado por Sahraei e cols. (2005), que verificou o efeito da administração de agonistas gabaérgicos na área tegmental ventral, os quais atuam inibindo a atividade dopaminérgica na via mesolímbica, após a fase de condicionamento com morfina, e imediatamente antes do teste de escolha. Os resultados mostraram uma diminuição da magnitude da preferência, ou indiferença na exploração dos dois compartimentos, sugerindo que a escolha pelo compartimento pareado depende da ativação da atividade dopaminérgica.

Vários pesquisadores têm se preocupado em verificar o efeito de estímulos aversivos para a aquisição e a manutenção de comportamentos de adicção. Estudos com o modelo de preferência por lugar mostram que a exposição a estímulos estressores

aumenta o efeito do condicionamento quando a droga administrada é a morfina, e diminui esse efeito quando a droga administrada é a anfetamina (Will, Watkins & Maier, 1998); e colaboram para a reinstalação da preferência por lugar condicionado com morfina, após a sua extinção (Do Couto & cols., 2006). Em pesquisas realizadas a partir do modelo de auto-administração, alguns autores demonstraram que o comportamento de adicção pode ser suprimido por estímulos aversivos condicionados (Kearns, Weiss & Panlilio, 2002) ou por conseqüências punitivas contingentes à resposta (Panlilio, Thorndike & Schindler, 2003). Outros autores, contudo, verificaram que a supressão desse comportamento não ocorre quando o estímulo aversivo é apresentado a animais que possuem uma longa história de auto-administração de cocaína (Vanderschuren & Everitt, 2004, Pelloux, Everitt & Dickinson, 2007) ou quando os animais apresentam altas taxas de respostas durante a fase de aquisição do comportamento de auto-administração ((Derochet-Gamonet & cols., 2004). Entretanto, ainda não existem estudos com modelos animais que verifiquem os efeitos do pareamento de estímulos aversivos com comportamentos respondentes eliciados pela administração da droga, a partir do modelo de preferência por lugar condicionado.

3. Morfina

A morfina é a principal substância ativa presente nas drogas opióides, que são extraídas da semente da papoula. Essas drogas pertencem à classe dos narcóticos analgésicos, e reduzem a dor, ao mesmo tempo em que mantêm a consciência. Produzem também a sensação de relaxamento e sono e, em doses altas, podem levar ao coma ou à morte (Meyer & Quenzer, 2005). Entretanto, a primeira experiência com a administração de drogas opióides pode ser desagradável, podendo provocar náuseas e vômito (WHO, 2004).

Estudos sobre os mecanismos de ação da morfina mostram que essa droga produz um aumento de neurotransmissores dopaminérgicos, assim como outras drogas de abuso como a cocaína e o álcool (Di Chiara, 1998). Di Chiara e Imperato (1988) mostraram que a administração de morfina na dose de 1,0 mg/kg aumentou a concentração de dopamina preferencialmente no núcleo accumbens. Entretanto, as drogas opióides influenciam a atividade dopaminérgica na via mesolímbica de forma indireta. Evidências indicam que a estimulação de receptores opióides inibe a liberação

de neurotransmissores gabaérgicos na área tegmental ventral, deixando de inibir neurônios dopaminérgicos, o que resulta no aumento desse neurotransmissor no núcleo accumbens (Pierce & Kumarcson, 2006).

Pesquisas que utilizam modelos animais também têm demonstrado que a morfina é potencialmente uma droga de abuso. Nos procedimentos de auto-administração, quando respostas específicas têm como consequência a administração de morfina, a frequência de emissão dessas respostas aumenta. Sob diferentes esquemas de razão e de intervalo e sob esquemas mistos, de segunda ordem e de escolha, características comportamentais mantidas por uma variedade de outros eventos reforçadores e por outras drogas de abuso foram desenvolvidas e mantidas também pela administração de morfina (Everitt & Robbins, 2000; Grasing & cols., 2003; Spealman & Goldberg, 1978).

Nos procedimentos que utilizam condicionamento clássico, ao parear os efeitos da morfina com um contexto específico, este passa a ser preferido pelos sujeitos experimentais, que permanecem mais tempo neste do que no contexto pareado com salina durante o teste de escolha. A magnitude do efeito do condicionamento cresce com o aumento da dose até 1,0 mg/kg, tornando-se estável a partir dessa dose. Apesar da dose de 1mg/kg não produzir sempre o efeito máximo nesse modelo, parece que não existe muita diferença quando doses maiores são administradas (Bardo, Rowlett & Harris, 1995). Pesquisas na área (Blander & cols., 1984; Do Couto & cols., 2003) demonstraram que o condicionamento com morfina, principalmente a partir da dose de 5,0 mg/kg, produz preferência por lugar. Blander e cols. (1984) mostraram ainda que não existe diferença na magnitude do efeito quando os animais são condicionados randomicamente aos compartimentos do aparato experimental, ou quando os animais são condicionados ao lado não preferido, de acordo com o resultado de um teste anterior ao condicionamento com a droga.

A participação de neurotransmissores dopaminérgicos na preferência por lugar condicionado com morfina foi verificada por Fenu e cols. (2006), por meio da administração intracerebral de antagonistas de receptores de dopamina D₁ e D₂, presentes no núcleo accumbens. Esses autores observaram o bloqueio do efeito do condicionamento, indicando que ambos receptores estão envolvidos na aquisição da preferência. Esse modelo permitiu identificar também outros processos neurofisiológicos envolvidos no abuso de morfina, além da ativação da via dopaminérgica mesolímbica, como o papel de mecanismos alfa-adrenérgicos, a partir da

administração de drogas agonistas e antagonistas desses neurotransmissores durante a aquisição e na expressão do comportamento condicionado (Sahrei & cols., 2004). Estudos realizados a partir desse modelo, com procedimentos baseados na administração de morfina por meio de micro-injeções em regiões específicas do cérebro, também permitiram identificar que o hipotálamo lateral, a substância cinzenta periaquedutal e o núcleo accumbens podem estar envolvidos na aquisição do comportamento condicionado, ao contrário de estruturas como a amígdala e os núcleos caudado e putâmen (Van der Kooy & cols., 1982). O modelo de preferência por lugar condicionado contribuiu ainda para avaliar o efeito de história prévia. Simpson e Riley (2005) verificaram que a experiência prévia com morfina facilita a expressão do comportamento condicionado no teste, verificada pelo maior tempo despendido no compartimento pareado com morfina pelos animais que foram administrados com a droga antes das sessões de condicionamento. Outros autores demonstraram que a exposição a eventos estressores facilita tanto a expressão do comportamento condicionado com morfina (Ferguson & cols., 2004), como contribui para a reaquisição desse comportamento após a sua extinção (Do Couto & cols., 2006).

O fato de a exposição a eventos estressores aumentar a magnitude do efeito do condicionamento com morfina pode estar relacionado às propriedades ansiolíticas dessa droga. Will, Watkins e Maier (1998) levantaram essa hipótese ao verificar que a exposição a choques inescapáveis ou a administração de uma substância ansiogênica, anterior ao condicionamento com morfina (3 mg/kg), aumentam a expressão da preferência pelo compartimento associado com essa droga, mas anulam a preferência quando o compartimento é pareado com os efeitos da administração de anfetamina, uma droga que demonstrou ser ansiogênica em outros modelos (Biala & Kruk, 2007). Esses autores defendem que é possível que esse efeito não esteja relacionado ao aumento das propriedades recompensadoras da morfina, considerando a divergência no efeito quando a droga administrada é a anfetamina. Mas defendem que o incremento na preferência pelo compartimento pareado com a morfina seja resultado da redução da ansiedade gerada pelos estímulos estressores, caracterizando um processo de reforçamento negativo. Motta e Brandão (1993) comprovaram os efeitos ansiolíticos da morfina, utilizando o Labirinto em Cruz Elevado, cujos resultados serão descritos na próxima sessão.

4. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Entre os modelos animais desenvolvidos para o estudo de desordens psiquiátricas, o LCE foi criado inicialmente para o estudo da ansiedade (File, 1980). O aparato experimental fica elevado a certa distância do chão, e é composto por dois braços fechados e dois abertos. Os braços fechados possuem uma parede lateral. A tarefa dos animais expostos a esse labirinto envolve a exploração espontânea do ambiente pelos sujeitos experimentais na ausência de reforçamento explícito. No LCE, o animal mostra um alto nível de exploração ou uma preferência pelos braços fechados, o que é um indício de que a resposta de evitar os braços abertos ocorre devido à presença de estímulos aversivos nesse compartimento, considerando que ambos os braços deveriam evocar o mesmo comportamento de exploração (Montgomery, 1955; Rodgers & Dalvi, 1997).

Para identificar se os estímulos aversivos eliciados pelos braços abertos possuem correlação com a ansiedade e verificar a validade desse modelo, Handley e cols., em dois experimentos, (Handley & Mithani, 1984; Handley & McBlane, 1993) avaliaram a influência de drogas ansiolíticas e ansiogênicas na taxa de entradas nos braços abertos, uma medida utilizada para medir a aversão relativa eliciada por esse espaço. Esses autores demonstraram que os animais evitam os braços abertos, e que essa aversão é reduzida pelo tratamento com drogas ansiolíticas e aumentada pela administração de drogas ansiogênicas.

O tempo de exploração dos braços abertos também é reduzido quando o animal é exposto ao labirinto em várias alternativas. Espejo (1997) observou esse efeito em animais testados sem a administração prévia de drogas, uma vez por dia, durante três dias, ou uma vez por semana, durante três semanas. A porcentagem de tempo nos braços abertos diminuiu em ambas as condições experimentais, em decorrência do aumento do nível de ansiedade, enquanto que a atividade locomotora permaneceu similar entre os testes. Essa pesquisa indica que o processo envolvido na alteração do padrão comportamental (i.e., diminuição da exploração dos braços abertos) no labirinto ocorre devido ao processo de punição positiva, porque explorar os braços abertos elicia respostas fisiológicas de medo e ansiedade, que constituem estímulos aversivos para o animal.

As medidas-padrão utilizadas para verificar o nível de ansiedade no LCE são: número de entradas e tempo despendido nos braços abertos. Entretanto, outras medidas

também são usadas na tentativa de explicar o padrão comportamental observado no labirinto. O comportamento de exploração é interpretado também como função do nível de atividade locomotora do animal, considerando o número total de entradas nos braços e o número de entradas nos braços fechados. Uma terceira medida refere-se ao tempo despendido no centro do labirinto, interpretado como um ponto de tomada de decisão (Cruz, Frei & Graeff, 1994; Rodgers & Johnson, 1995).

Por ser um modelo que envolve uma resposta inata, isto é, incondicionada, que não depende de aprendizagem, a aversão eliciada durante a tarefa no LCE possui um significado etológico, o que consiste em uma das principais vantagens na utilização desse aparato. O comportamento incondicionado é menos suscetível à interferência de variáveis intervenientes, como história de reforçamento ou memória; fome ou sede; e, portanto, permite uma análise mais fidedigna das intervenções experimentais (Rodgers & cols., 1997). Além disso, a resposta inata não exige treinos prolongados ou a utilização de estímulos nocivos, nem há a necessidade de que o animal esteja em estado de privação de água ou comida. Outras vantagens do LCE para a realização de pesquisas estão relacionadas ao fato de o teste ser rápido e simples, e de não envolver equipamentos caros; e de o labirinto ser bidirecionalmente sensível às manipulações experimentais, possibilitando a identificação de efeitos tanto de variáveis ansiolíticas como ansiogênicas (Rodgers & Dalvi, 1997).

Atualmente, o LCE é utilizado também na compreensão das bases biológicas e processos comportamentais relativos à adicção e à abstinência a drogas, além de possibilitar a descoberta de outras propriedades das drogas de abuso (Carobrez & Bertoglio, 2005). Na área da abstinência, Rasmussen e cols. (2001) utilizaram o LCE para medir os efeitos da síndrome de retirada do etanol. Esses autores demonstraram que ratos que consumiram álcool durante nove semanas e foram expostos ao labirinto quatro semanas após a retirada da droga apresentaram diminuição da exploração dos braços abertos, que está correlacionado com o aumento da ansiedade, sintoma presente em alcoólicos abstinentes.

Motta e Brandão (1993) confirmaram as propriedades ansiolíticas da morfina, por meio de sua administração intraperitoneal (0,3 mg/kg) e diretamente na substância cinzenta periaquedutal (10 nmol) previamente à colocação do animal no LCE. Esses autores observaram que ambos os tratamentos aumentaram a exploração dos braços abertos, o que permite concluir que a morfina, administrada em doses baixas, possui

propriedades ansiolíticas, por meio da inibição de substratos neurais da aversão na substância cinzenta periaquedutal dorsal.

5. Justificativa

Os modelos animais utilizados atualmente para o estudo da adicção a drogas apresentam algumas desvantagens relativas ao procedimento experimental. O modelo de auto-administração demanda muito tempo para a modelagem de uma resposta que não faz parte do padrão comportamental do animal (pressão à barra ou focinhar), além de cuidados especiais para manter o funcionamento do cateter para a administração da droga (Panlilio & Goldberg, 2007). O modelo de preferência por lugar condicionado parte do pressuposto da neutralidade entre os compartimentos, avaliando que a escolha do animal por um ou por outro depende apenas do pareamento com os efeitos reforçadores positivos da droga (Tzschentke, 1998). Esse pressuposto prejudica a análise da preferência, ao desconsiderar a influência de outras variáveis ambientais e de outras propriedades da droga administrada, que podem estar afetando o comportamento de escolha do animal.

Os estudos na área de adicção que utilizam modelos animais têm se concentrado nas propriedades apetitivas da droga, ao focar na aquisição do comportamento de abuso, ou em propriedades reforçadoras negativas, ao focar na redução dos sintomas de abstinência. Entretanto, as drogas de abuso possuem outras propriedades farmacológicas que podem influenciar na aquisição e na manutenção do abuso. Os estudos de Will, Watkins e Maier (1998) e Motta e Brandão (1993) sugerem que a morfina possui propriedades ansiolíticas, que podem contribuir para o aumento da probabilidade de desenvolver um padrão comportamental de abuso, por meio da diminuição da aversão de estímulos presentes no ambiente. Assim como a morfina, outras drogas de abuso podem possuir outras propriedades farmacológicas que induzem ao abuso, além daquelas relacionadas aos efeitos apetitivos de sua administração e à redução dos sintomas de abstinência.

Considerando, portanto, a necessidade de desenvolver procedimentos experimentais que sejam simples e parcimoniosos, e que permitam verificar a influência de outras variáveis ambientais e de outras propriedades farmacológicas na aquisição da adicção a drogas, o presente estudo utilizou o LCE, adaptando-o de forma a servir como

aparato experimental para a tarefa proveniente do modelo de preferência por lugar condicionado. A droga foi administrada imediatamente antes de confinar o animal em um dos braços abertos do labirinto, compartimento eliciador de respostas fisiológicas de ansiedade, que são aversivas ao animal (Rodgers & Dalvi, 1997). Nesse estudo, a droga utilizada foi a morfina, por ter sido demonstrada seu efeito ansiolítico na dose de 0,3 mg/kg (Motta & Brandão, 1992) e seu efeito reforçador em doses de 1,0 a 5,0 mg/kg (Mucha & Iversen, 1984). Nessa situação experimental de teste, existem três processos comportamentais atuando sobre o comportamento de explorar os braços abertos do LCE: 1) punição positiva, devido à ansiedade produzida pelo compartimento; 2) reforçamento negativo, devido aos efeitos ansiolíticos da morfina em doses baixas; e 3) reforçamento positivo, devido aos efeitos apetitivos da droga observados nas pesquisas de preferência por lugar condicionado (Mucha & Iversen, 1984).

6. Objetivos

O objetivo da presente pesquisa é verificar se o LCE pode ser utilizado para avaliar o comportamento de preferência por lugar, quando os efeitos da droga (morfina) são pareados com um compartimento naturalmente aversivo ao condicionamento, considerando a necessidade de desenvolver modelos animais mais etológicos para o estudo do comportamento de adicção, que permitam avaliar a influência de outros estímulos, tanto reforçadores como aversivos, em um padrão comportamental apresentado pelo animal em seu ambiente natural.

Método

Sujeitos

Setenta e dois (72) ratos albinos da linhagem Wistar, machos, pesando entre 230 e 330 gramas, experimentalmente ingênuos, provenientes do biotério central da Universidade de Brasília (UnB), foram utilizados como sujeitos experimentais. Os animais foram alojados em grupos de quatro em gaiolas-viveiro de polietileno, com acesso livre à comida e água, sob um ciclo claro-escuro de 12h. Os animais foram mantidos nessas condições por pelo menos 72h antes do início das sessões experimentais e durante todo o experimento. Os ratos foram manipulados uma vez durante três dias antes do início do experimento.

Equipamentos

LCE. O LCE utilizado, elevado a 50 cm do chão, é composto por dois braços abertos e dois fechados, perpendiculares entre si, cada qual medindo 50 cm de comprimento e 10 cm de largura. Os braços fechados possuem paredes laterais de 40 cm de altura, e os braços abertos uma borda de acrílico com 0,5 cm de altura. O labirinto estava localizado em uma sala de 1,80 m x 1,50 m, sob iluminação vermelha constante produzida por uma lâmpada de 60 watts. Nas sessões de condicionamento, cada um dos braços era isolado por um sistema de quatro guilhotinas, tornando a parte central do labirinto inacessível.



Figura. 1. Labirinto em Cruz Elevado, com sistema de guilhotinas, utilizado no condicionamento (A), e na forma padrão, utilizado no teste (B).

Televisão e vídeo-cassete. As sessões eram monitoradas por meio de uma televisão e de um vídeo-cassete localizados em sala adjacente à sala experimental, acoplados a uma filmadora montada verticalmente, a 1,70 metros acima do assoalho central do labirinto. As sessões de teste foram gravadas em vídeo, com o auxílio desse equipamento.

Drogas

Solução de sulfato de morfina (DIMORF[®], Cristália, Brasil) foi diluída em solução salina (NaCl – 0,9%), e foi administrada nas doses de 0,3; 1,0; 5,0 e 10,0 mg/ml, preparadas com antecedência máxima de duas semanas antes de sua utilização. A droga era armazenada em freezer, a uma temperatura de -5 °C, e retirada 20 minutos antes de sua administração. A solução de morfina ou a solução salina fisiológica era injetada via intraperitoneal (i.p.), em um volume de 1,0 ml/kg, cinco minutos antes da sessão experimental.

Procedimento

Sessenta (60) animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais (salina; MO 0,3; MO 1,0; MO 5,0 ou MO 10,0), com doze animais cada, que se diferenciavam pela dose de morfina administrada na fase de condicionamento. Para verificar o efeito do condicionamento, doze (12) animais foram alocados em um grupo, denominado s/cond, que recebeu injeção de salina nos quatro dias de condicionamento, mas não foi confinado nos braços do labirinto. Todos passaram pelo mesmo procedimento na fase de teste. A Tabela 1 resume os tratamentos administrados aos animais em cada dia da fase de condicionamento, de acordo com o grupo.

Condicionamento. A fase de condicionamento consistiu em quatro sessões, que ocorreram no turno da manhã, das 08h30 às 10h00, em quatro dias consecutivos. No primeiro dia, os animais dos grupos experimentais receberam injeção de salina e, após cinco minutos, foram confinados em um dos braços fechados durante 20 minutos. No segundo dia, receberam injeção de morfina (0,3; 1,0; 5,0; ou 10,0 mg/kg) e, após cinco minutos, tempo para o início dos efeitos da morfina considerando a farmacocinética da droga, os animais foram confinados em um dos braços abertos, durante 20 minutos (Bardo, Rowlett & Harris, 1995; Motta & Brandão, 1993). No terceiro e no quarto dias, os procedimentos dos primeiro e segundo dias foram repetidos, respectivamente, exceto

pelo fato do animal ter sido colocado no braço oposto ao que havia sido confinado anteriormente. Esse procedimento garantiu que o período entre a última administração de morfina e o teste fosse o menor possível e igual para todos os animais.

Teste. O teste ocorreu no quinto dia após o início do experimento, no mesmo horário em que ocorreu a fase de condicionamento. Nessa fase, cada animal, sem tratamento, foi colocado no centro do LCE, com a cabeça direcionada para um dos braços fechados, e a ele foi permitido explorar o labirinto durante cinco minutos. Foram registrados os números de entradas nos braços abertos e fechados, considerada apenas quando o animal estava com as quatro patas no braço especificado; e o tempo de permanência no centro do labirinto, nos braços abertos e nos braços fechados.

Análise Estatística

A análise da variância (Oneway ANOVA) foi aplicada aos dados coletados para verificar se a diferença entre os grupos era significativa, para as seguintes variáveis dependentes: número de entradas nos braços fechados; número de entradas nos braços abertos; número total de entradas nos braços; tempo de permanência no centro do labirinto; tempo de permanência nos braços fechados; e tempo de permanência nos braços abertos. O teste de Dunnett foi utilizado para comparar os grupos s/cond, MO 0,3; MO 1,0; MO 5,0 e MO 10,0 com o grupo salina, utilizado como controle do experimento.

Tabela 1. Tratamento administrado e o braço do LCE onde o animal foi colocado em cada dia da fase de condicionamento, para cada grupo de sujeitos. Somente os animais do grupo s/cond não eram expostos ao LCE antes da fase de teste.

Grupo	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
s/cond	salina sem condic.	salina sem condic.	salina sem condic.	salina sem condic.
salina	salina braço fechado	salina braço aberto	salina braço fechado	salina braço aberto
MO 0,3	salina braço fechado	morfina 0,3 braço aberto	salina braço fechado	morfina 0,3 braço aberto
MO 1,0	salina braço fechado	morfina 1,0 braço aberto	salina braço fechado	morfina 1,0 braço aberto
MO 5,0	salina braço fechado	morfina 5,0 braço aberto	salina braço fechado	morfina 5,0 braço aberto
MO 10,0	salina braço fechado	morfina 10,0 braço aberto	salina braço fechado	morfina 10,0 braço aberto

Resultados

A figura 2 mostra o efeito do condicionamento com as diferentes doses de morfina (salina; 0,3; 1,0; 5,0; 10,0 mg/kg) no número de entradas nos braços abertos e fechados do LCE, durante o teste. As mesmas medidas são mostradas para o grupo sem condicionamento. A análise da variância revelou um efeito significativo entre os grupos para as três variáveis dependentes apresentadas – número de entradas nos braços fechados, $F(5, 66) = 3,68, p < 0,01$; número de entradas nos braços abertos, $F(5, 66) = 3,23, p < 0,05$; e número total de entradas nos braços $F(5, 66) = 4,12, p < 0,01$. A análise posthoc mostrou que a dose de 1,0 mg/kg produziu um aumento significativo no número de entradas nos braços fechados, no número de entradas nos braços abertos e no número total de entradas nos braços ($p < 0,01$); e que a dose de 5,0 mg/kg produziu um aumento significativo no número de entradas nos braços abertos ($p < 0,05$); ambos quando comparados ao grupo salina. A diferença produzida no número de entradas nos braços abertos indicava um aumento na exploração desses compartimentos pelos animais condicionados com doses de 1,0 e 5,0 mg/kg de morfina. A diferença produzida no número total de entradas indica que a dose de 1,0 mg/kg também gerou maior atividade locomotora.

É possível observar uma tendência de que o número total de entradas nos braços seja maior para o grupo sem condicionamento, quando comparado com o grupo que recebeu apenas salina durante a fase de condicionamento, o que indica um possível efeito do confinamento aos braços do labirinto, sem a administração de morfina. Essa tendência é caracterizada por uma diferença maior no número de entradas nos braços abertos do que no número de entradas nos braços fechados.

Existe ainda a tendência de que todos os grupos condicionados com morfina apresentassem um número total de entradas nos braços maior do que o grupo que recebeu apenas salina durante a fase de condicionamento, devido a um maior incremento do número de entradas nos braços abertos do que no número de entradas nos braços fechados, o que sugere um efeito produzido pela administração da droga. A diferença no número total de entradas nos braços cresce na medida em que há um incremento na dose de morfina, até a dose de 1,0 mg/kg, devido a um incremento maior no número de entradas nos braços abertos, e diminui a partir da dose de 5,0 mg/kg.

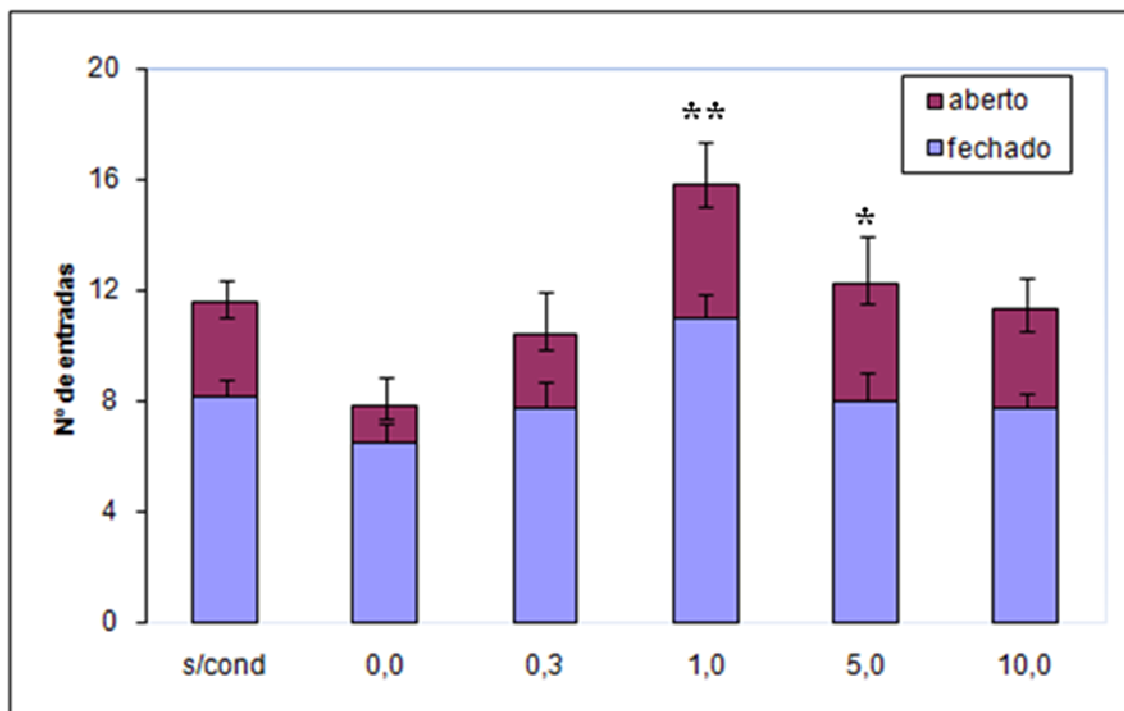


Figura. 2. Média (\pm erro padrão) do número de entradas nos braços fechados (barras azuis) e nos braços abertos (barras vermelhas) e o número total de entradas em ambos os braços (somatório das barras azuis e vermelhas) do LCE para os ratos que foram condicionados com diferentes doses de morfina (0,0; 0,3; 1,0; 5,0 e 10,0 mg/kg) aos braços abertos e para aqueles que não foram condicionados (s/cond). $N = 12$. * $p < 0,05$, para o número de entradas nos braços abertos; e ** $p < 0,01$, para as três variáveis dependentes consideradas, teste de Dunnett.

A figura 3 mostra a porcentagem de tempo despendido nos braços abertos para todos os grupos. A análise da variância revelou um efeito significativo entre os grupos para a variável dependente apresentada – porcentagem de entradas nos braços abertos, $F(5, 71) = 2,36$, $p = 0,05$. A análise posthoc mostrou que a dose de 1,0 mg/kg produziu um aumento significativo na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos ($p < 0,05$), quando comparado com o grupo salina. A diferença produzida no tempo despendido nos braços abertos indica que o condicionamento com a dose de 1,0 mg/kg de morfina gerou o aumento da exploração dos braços abertos. A diferença também foi significativa entre os grupos s/cond e salina, para a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos ($p < 0,05$). Essa diferença indica que o condicionamento diminuiu a exploração dos braços abertos para os animais que foram administrados apenas com salina.

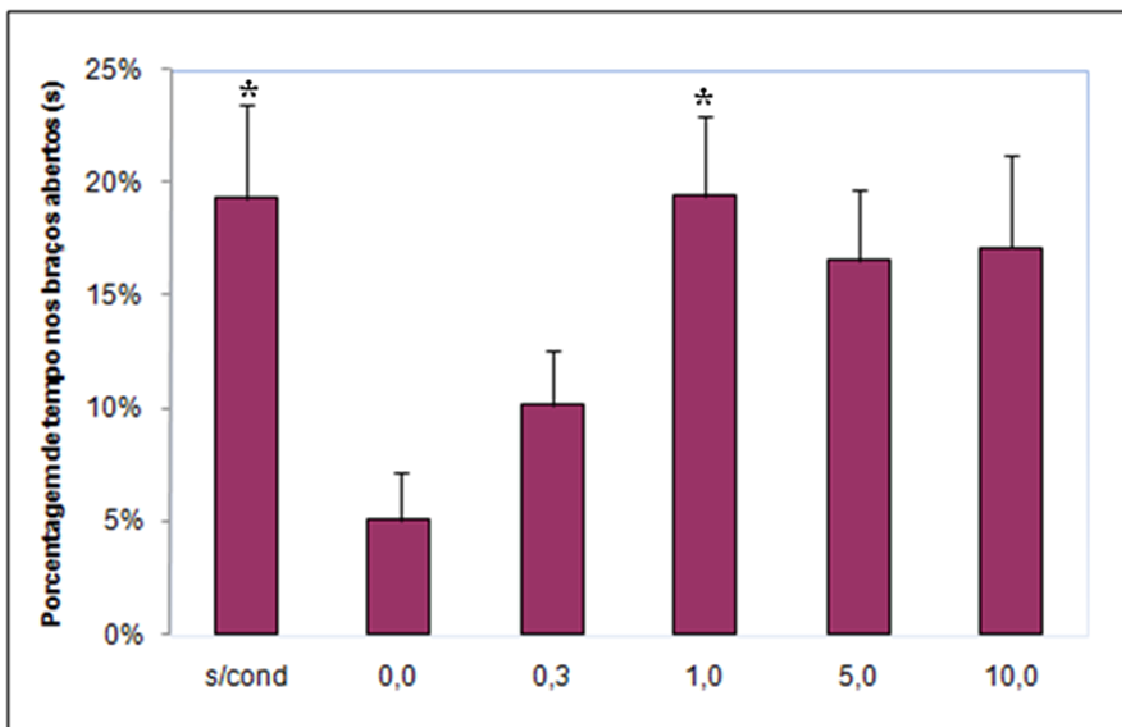


Figura. 3. Porcentagem (\pm erro padrão) de tempo de permanência nos braços abertos do LCE para os ratos que foram condicionados com diferentes doses de morfina (0,0; 0,3; 1,0; 5,0 e 10,0 mg/kg) aos braços abertos e para aqueles que não foram condicionados (s/cond). N = 12. * $p < 0,05$, teste de Dunnett.

A figura 4 mostra o efeito do condicionamento com morfina no tempo despendido nos braços fechados, nos braços abertos e no centro do labirinto. A análise da variância revelou um efeito significativo entre os grupos para as três variáveis dependentes apresentadas – tempo de permanência nos braços fechados $F(5, 66) = 5,11$, $p < 0,01$; tempo de permanência nos braços abertos $F(5, 66) = 3,33$, $p = 0,01$; e tempo de permanência no centro do labirinto, $F(5, 66) = 6,11$, $p < 0,01$. A análise posthoc mostrou que a dose de 1,0 mg/kg produziu um aumento significativo no tempo despendido nos braços abertos e no centro do labirinto, além de diminuição significativa do tempo despendido nos braços fechados ($p < 0,01$), quando comparado com o grupo salina. A diferença nessas duas medidas indica um aumento da exploração aos braços abertos e da exposição ao risco, respectivamente. A diferença também foi significativa entre os grupos s/cond e salina, para as variáveis relativas ao tempo despendido nos braços fechados e no centro do labirinto ($p < 0,01$), indicando que o condicionamento apenas com salina produziu uma diminuição na exploração dos braços abertos e na exposição ao risco, respectivamente.

Pode ser observada ainda uma tendência de que o tempo despendido nos braços abertos seja maior para o grupo sem condicionamento, quando comparado ao grupo que

recebeu apenas salina durante o condicionamento, o que indica um efeito da exposição ao labirinto sem a administração de morfina. Essa mesma tendência pode ser vista para todos os grupos condicionados com morfina (MO 0,3; MO 1,0; MO 5,0; MO 10,0), que despenderam maior tempo nos braços abertos do que o grupo que recebeu apenas salina durante a fase de condicionamento, o que sugere um efeito produzido pela administração da droga. A diferença no tempo despendido nos braços abertos parece crescer na medida em que há um incremento na dose de morfina, até a dose de 1,0 mg/kg, e diminui para as doses de 5,0 e 10,0 mg/kg. O processo inverso pode ser observado ao comparar o tempo despendido nos braços fechados entre os grupos. A tendência observada para o efeito no tempo despendido no centro do labirinto é similar àquela observada para o efeito no tempo despendido nos braços abertos para todos os grupos. Além disso, o padrão das barras que mostram o tempo despendido nos braços abertos, na figura 4, e o padrão das barras que mostram a porcentagem dessa medida, na figura 3, são semelhantes, o que sugere que ambas as medidas, absoluta e relativa, representam de forma fidedigna o comportamento de exploração dos braços abertos.

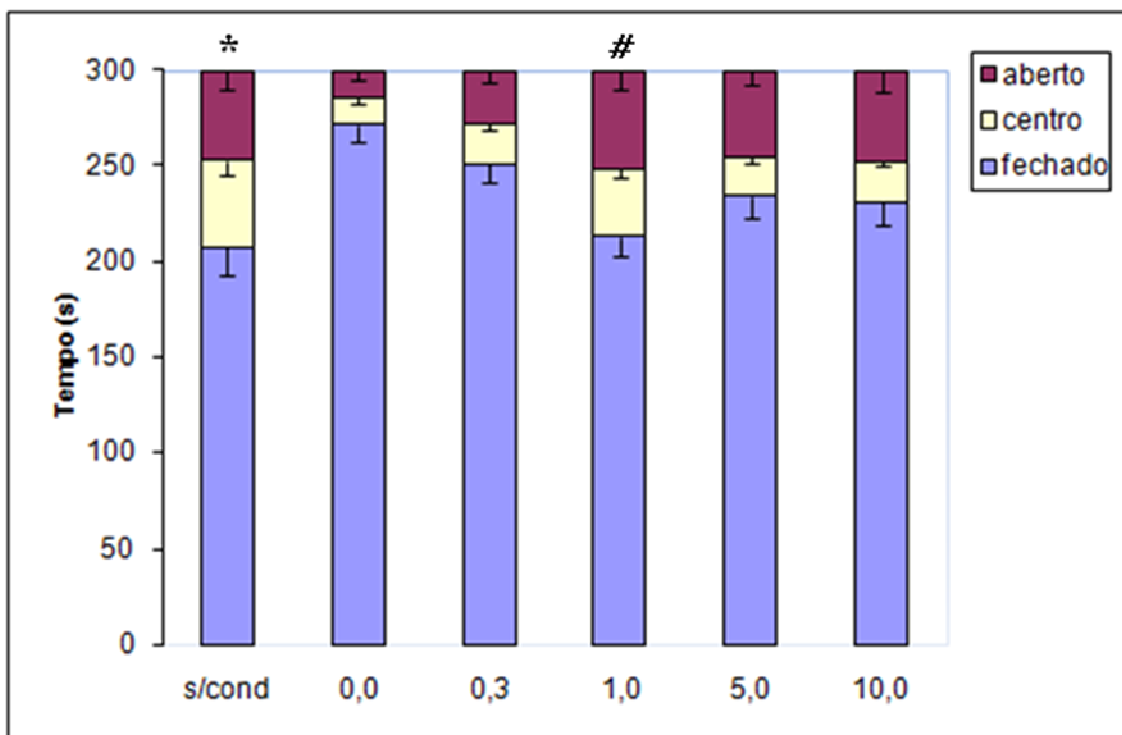


Figura. 4. Média (\pm erro padrão) do tempo despendido nos braços fechados (barras azuis), nos braços abertos (barras vermelhas) e no centro do LCE (barras amarelas) para os ratos que foram condicionados com diferentes doses de morfina (0,0; 0,3; 1,0; 5,0 e 10,0 mg/kg) aos braços abertos e para aqueles que não foram condicionados (s/cond). N = 12. * $p < 0,01$, para o tempo despendido no centro e para o tempo despendido nos braços fechados; # $p < 0,01$, para as três variáveis dependentes consideradas, teste de Dunnett.

Discussão

O presente estudo sugere que o confinamento aos braços do LCE, de forma isolada, diminui o comportamento de exploração no teste padrão de cinco minutos, evidenciada pela redução no número total de entradas nos braços apresentado pelo grupo condicionado sem a administração da droga (salina), quando comparado com o grupo sem condicionamento. A exposição ao labirinto afetou principalmente o comportamento de exploração dos braços abertos, demonstrado pela menor quantidade de entradas e pelo tempo reduzido despendido nesses compartimentos apresentados por esse mesmo grupo. Os resultados indicam que o pareamento da morfina com os braços abertos, nas doses de 1,0 e 5,0 mg/kg, que produzem preferência por lugar condicionado (Mucha & Iversen, 1984), mas não na dose de 0,3 mg/kg, comprovadamente ansiolítica (Motta & Brandão, 1993), previne a potenciação da aversão causada pelo confinamento prévio aos braços do labirinto.

Os resultados obtidos coincidem com aqueles apresentados em estudos anteriores, de que a experiência prévia no LCE, sem a administração de drogas, modifica a exploração do labirinto em uma segunda exposição, observada na diminuição do tempo de permanência nos braços abertos (Bertoglio e Carobrez, 2000; Espejo, 1997). Isso é um indicativo da preferência por compartimentos seguros do labirinto e do medo natural de locais abertos e elevados, o que resulta na tendência de evitar os braços abertos e de despender mais tempo nos braços fechados (Montgomery, 1955). Diferente dos estudos anteriores, a presente pesquisa mostra que o confinamento aos braços, abertos e fechados, de forma isolada, ao invés da exposição ao LCE completo, também diminui o tempo de permanência nos braços abertos. Bertoglio e Carobrez (2000) observaram ainda que uma única exposição de animais somente aos braços fechados ou somente aos braços abertos, de forma isolada, durante cinco minutos, não produziu diferenças na exploração do LCE nas medidas relativas à porcentagem de tempo nos braços abertos e ao número de entradas nos braços abertos, quando comparados a animais ingênuos. Entretanto, diferenças no procedimento do estudo desses autores e da presente pesquisa em relação ao tempo de exposição (5 minutos e 20 minutos, respectivamente), ao número de exposições aos braços (uma e quatro exposições, respectivamente) podem ter levado às divergências entre os resultados de ambos os estudos.

Considerando o procedimento utilizado na presente pesquisa, similar àquele usado em estudos de preferência por lugar condicionado, a diminuição da exploração dos braços abertos ocorreu provavelmente devido à experiência do animal nesses compartimentos, que eliciam estímulos aversivos (i.e., respostas fisiológicas de medo e de ansiedade eliciadas por esse compartimento), caracterizando o fenômeno de aversão por lugar condicionado. Nos estudos sobre aversão por lugar condicionado, o pareamento do efeito da administração de drogas específicas a um compartimento produz a aversão a esse compartimento, verificada pelo tempo reduzido de sua exploração, em teste de escolha posterior ao condicionamento (Tzschentke, 1998). Na presente pesquisa, as respostas fisiológicas de medo e ansiedade produzidas na fase de condicionamento são inatas, eliciadas por estímulos incondicionados, referentes ao confinamento nos braços abertos, e não geradas pela administração de drogas. A experiência forçada com esses estímulos aversivos alterou o padrão comportamental de exploração do labirinto, diminuindo o tempo despendido nos braços abertos. Essa mudança comportamental caracteriza o processo de punição positiva, em que a experiência prévia com a apresentação de estímulos aversivos (i.e., respostas fisiológicas eliciadas pela exposição aos braços abertos) diminui a emissão de determinadas respostas contingentes a essas respostas (i.e., comportamento de exploração dos braços abertos).

Os dados da presente pesquisa mostram que a administração de morfina antes do confinamento nos braços abertos pode prevenir o efeito da punição positiva decorrente da apresentação desses estímulos aversivos. Assim, os efeitos do condicionamento com morfina, nas doses de 1,0 e 5,0 mg/kg, com os braços abertos, estímulos eliciadores de respostas fisiológicas de medo e ansiedade, resultaram em um padrão comportamental semelhante ao do grupo sem condicionamento, indicando reforçamento do comportamento de explorar esses compartimentos, em função dos efeitos recompensadores da morfina ou em função da diminuição da aversão aos braços abertos causada pela exposição prévia ao labirinto. Estudos anteriores mostraram que o reforçamento positivo da administração de morfina é resultado da ativação da via dopaminérgica mesolímbica, envolvida na produção de preferência por lugar condicionado (Di Chiara, 1998; Tzschentke, 1998). Manzanedo e cols. (2001) demonstraram que a administração de várias drogas antagonistas dopaminérgicas, como o haloperidol e a risperidona, que atuam em diferentes tipos de receptores (D₁, D₂, D₃ e

D₄), bloqueiam o condicionamento com a morfina, impedindo a preferência pelo compartimento pareado com os efeitos da administração da droga.

Apesar de o condicionamento com morfina na dose de 0,3 mg/kg, comprovadamente ansiolítica (Motta & Brandão, 1993), não ter produzido diferenças significativas na exploração dos braços abertos, não se pode descartar o envolvimento do processo de reforçamento negativo nos resultados encontrados para as doses de 1,0 e 5,0 mg/kg. A ansiedade eliciada pela exposição aos braços abertos no presente estudo pode ser comparável aos estímulos aversivos apresentados antes da administração de morfina na fase de condicionamento em estudos de preferência por lugar condicionado, que resultaram no incremento da magnitude da preferência pelo compartimento pareado com a droga (Ferguson & cols., 2004; Will & cols., 1998). Portanto, mesmo que o condicionamento com a dose ansiolítica da morfina não tenha resultado no aumento da exploração dos braços abertos, o resultado do condicionamento com as doses de 1,0 e 5,0 mg/kg, observado no presente estudo, pode ter sido produzido não apenas pelo efeito reforçador positivo da morfina, mas pela interação entre os efeitos reforçadores positivos e negativos, ao também provocar a redução da ansiedade. Para verificar o efeito de cada um desses processos isoladamente, é necessário realizar pesquisas que bloqueiem um deles. Por exemplo, para avaliar apenas o efeito do reforçamento negativo, é possível utilizar procedimentos como a administração de drogas antagonistas dopaminérgicas (Manzanedo & cols., 2001), ou com drogas antagonistas opióides (Mucha & Iversen, 1984). Para avaliar apenas o efeito do reforçamento positivo, é possível utilizar procedimentos com a administração de drogas que bloqueiem receptores opióides μ , diretamente na substância cinzenta periaquedutal dorsal. Esse procedimento, entretanto, deve levar em conta que o efeito ansiolítico da morfina é tônico, e o bloqueio desses receptores pode ser ansiogênico (Sante, Nobre & Brandão, 2000).

A falta de efeito significativo para o condicionamento com a dose de 0,3 mg/kg de morfina pode ser explicada também pelo protocolo de execução do procedimento da presente pesquisa. A figura 3 mostra que o confinamento nos braços abertos e fechados do LCE na fase de condicionamento resultou em um aumento significativo de nível de ansiedade, verificado pela diminuição da porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos no teste para o grupo condicionado apenas com salina. Devido a esse alto nível de ansiedade, foi necessária uma dose maior de morfina para a produção do efeito ansiolítico. Nesse caso, a minimização da aversão aos braços abertos nas doses maiores

poderia ser resultado de um processo de reforçamento negativo, devido ao efeito ansiolítico da morfina.

O método utilizado na presente pesquisa, similar àquele usado em estudos de preferência por lugar condicionado, permite a interpretação desse dado como o resultado da interação de propriedades reforçadoras positivas e negativas. Embora possa ser considerado um procedimento de condicionamento enviesado, dado que animais ingênuos, ou sem condicionamento, possuem aversão aos braços abertos e, portanto, mostram preferência pelos braços fechados, o método usado nesse estudo permite verificar se as propriedades ansiolíticas da morfina afetam o comportamento de preferência pelos compartimentos pareados com a droga (braços abertos). Esse procedimento analisa os dados a partir da interação de várias propriedades farmacológicas da droga, e descarta análises que consideram a redução da ansiedade no modelo de preferência por lugar condicionado como um falso-positivo.

A figura 4 permite a análise do tempo despendido nos braços abertos, nos braços fechados e no centro do labirinto. Apesar de as medidas padrão nos estudos com o LCE ser o número total de entradas nos braços, os número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados, e a porcentagem de tempo despendido nos braços abertos, Cruz, Frei e Graeff (1994) sugeriram a análise dessas outras três variáveis dependentes para avaliar de forma mais minuciosa a ansiedade no labirinto. Os dados apresentados mostram resultados similares entre a porcentagem de tempo e o tempo absoluto despendido nos braços abertos, indicando diferenças estatisticamente significativas para os grupos sem condicionamento e para a dose de 1,0 mg/kg, quando comparados ao grupo controle (salina), o que sugere que ambas as medidas estão caracterizando o mesmo aspecto do comportamento de exploração.

Outro efeito que a figura 4 permite identificar é a diminuição do tempo despendido no centro do labirinto, decorrente da exposição ao labirinto sem a administração de morfina. O centro do labirinto é considerado um ponto de tomada de decisão (Cruz, Frei & Graeff, 1994; Rodgers & Johnson, 1995). O aumento da aversão aos braços abertos diminuiu o conflito inerente ao LCE, entre o padrão comportamental determinado filogeneticamente de exploração do ambiente, que leva o animal a percorrer todo o labirinto, e o medo e ansiedade gerada pelos braços abertos, que reforça negativamente o comportamento de permanecer somente nos braços fechados (Wall & Messier, 2001). Ou seja, o aumento da aversão aos braços abertos diminuiu esse conflito, na medida em que o comportamento do animal de explorar todo o labirinto foi punido

pela experiência anterior, levando-o a permanecer quase o tempo todo do teste nos braços fechados.

Entretanto, o condicionamento com morfina, na dose 1,0 mg/kg aos braços abertos resultou no aumento do tempo despendido no centro do labirinto. Os efeitos reforçadores da droga aumentaram o conflito entre o comportamento inato de exploração do ambiente e o medo e ansiedade gerada pelos braços abertos, na medida em que aumentou a probabilidade de o animal explorar esses compartimentos. Esse efeito pode ter sido resultado do reforço positivo gerado pela droga, ao adicionar um estímulo apetitivo aos braços abertos ou do reforço negativo, ao diminuir a ansiedade eliciada por esses compartimentos.

Não foi observado nenhum efeito significativo produzido pelo condicionamento com a dose de 10,0 mg/kg de morfina, para nenhuma das medidas analisadas, quando comparado ao grupo que foi condicionado com salina. É possível que o condicionamento com essa dose de morfina pode ter produzido um efeito ansiogênico, devido à ativação de receptores κ , ou ainda efeitos locomotores ou hipnóticos, ou depressão respiratória (Motta, Penha & Brandão, 1995).

A preferência por lugar condicionado, no modelo-padrão, é caracterizada por um maior tempo despendido no compartimento pareado com o efeito da droga, quando comparado a outro, ao qual o animal foi exposto sem o efeito da droga. Entretanto, no presente estudo, o pareamento de morfina nas doses de 1,0 e 5,0 mg/kg aos braços abertos não resultou na preferência por esses compartimentos, apenas atenuou a aversão causada pela exposição prévia ao labirinto. Mucha e Iversen (1984) observaram que a magnitude da preferência por contextos pareados com morfina é diretamente proporcional ao número de condicionamentos realizados. Portanto, considerando que o presente estudo utilizou um procedimento de pareamento único, em que o efeito da droga foi pareado uma única vez com cada um dos braços abertos, considerando a existência de pistas discriminatória no ambiente experimental que diferenciavam os dois braços abertos, seria interessante replicar o experimento realizando um maior número de pareamentos, a fim de verificar a possibilidade de se obter preferência pelos braços abertos a partir do condicionamento com morfina nas doses de 1,0 e 5,0 mg/kg, ou mesmo verificar um efeito significativo estatisticamente com a dose de 0,3 mg/kg.

A maior contribuição da presente pesquisa está em demonstrar que o LCE pode ser instrumento para o estudo da adicção, na medida em que possibilita a verificação dos efeitos reforçadores da morfina que contribuem para a aquisição de

comportamentos relacionados ao abuso de drogas, indicando a possibilidade de avaliar também os efeitos reforçadores de outras drogas de abuso. Pressupõe-se, entretanto, a possibilidade de haver limitações para o estudo de drogas de abuso que produzem ansiedade, como as anfetaminas (Biala & Kruk, 2007). Nesses casos, é possível que os estímulos aversivos eliciados pelos braços abertos sejam maximizados pelo condicionamento com a droga ansiogênica, diminuindo a exploração dos braços abertos. Contudo, pode-se buscar verificar o efeito do condicionamento de drogas utilizadas para o tratamento da ansiedade. A principal vantagem de se utilizar esse modelo é o fato de a variável dependente ser uma resposta relacionada à aversão determinada filogeneticamente, o comportamento de exploração, dando um significado mais etológico para a pesquisa. Além disso, permite a avaliação da adicção em um contexto onde estão presentes estímulos naturalmente aversivos, possibilitando a verificação de sua influência na aquisição de comportamentos de abuso de drogas.

Referências

- Ahmed, S. H. (2005). Imbalance between drug and non-drug availability: a major risk factor for addiction. *European Journal of Pharmacology*, 526, 9-20.
- Ahmed, S. H., Bobashev, G. & Gutkin, B. S. (2007). The simulation of addiction: pharmacological and neurocomputational models of drug self-administration. *Drug and Alcohol Dependence*, 90, 304-311.
- Arroyo, M., Markou, A., Robbins, T. W. & Everitt, B. J. (1998). Acquisition, maintenance and reinstatement of intravenous cocaine self-administration under a second-order schedule of reinforcement in rats: effects of conditioned cues and continuous access to cocaine. *Psychopharmacology*, 140, 331-344.
- Ator, N. A. & Griffiths, R. R. (2003). Principles of drug abuse liability assessment in laboratory animals. *Drug and Alcohol Dependence*, 70, S55-S72.
- Bardo, M. T., Rowlett, J. K. & Harris, M. J. (1995). Conditioned place preference using opiate and stimulant drugs: a meta-analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 19, 39-51.
- Berridge, K. C. (2007). The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology*, 191, 391-431.
- Bertoglio, L. J. & Carobrez, A. P. (2000). Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behavioral Brain Research*, 108, 197-203.
- Biala, G. & Kruk, M. (2007). Amphetamine-induced anxiety-related behavior in animal models. *Pharmacological Reports*, 59, 636-644.
- Biala, G. & Langwinski, R. (1996). Rewarding properties of some drug studied by place preference conditioning. *Polish Journal of Pharmacology*, 48, 425-430.
- Blander, A., Hunt, T., Blair, R. & Amit, Z. (1984). Conditioned place preference: an evaluation of morphine's positive reinforcing properties. *Pharmacology*, 84, 124-127.
- Carobrez, A. P. & Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analysis of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29, 1193-1205.
- Cruz, A. P. M., Frei, F. & Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 49, 171-176.

- Deroche-Gamonet, V., Belin, D. & Piazza, P. V. (2004). Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science*, *13*, 1014-1017.
- Di Chiara, G. (1998). A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug abuse. *Journal of Psychopharmacology*, *12*, 54-67.
- Di Chiara, G. & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc National Academic Sciences USA*, *85*, 5274-5278.
- Do Couto, B. R., Aguilar, M. A., Manzanedo, C., Rodríguez-Arias, M., Armário, A. & Miñarro, J. (2006). Social stress is as effective as physical stress in reinstating morphine-induced place preference in mice. *Psychopharmacology*, *185*, 459-470.
- Do Couto, B. R., Aguilar, M. A., Manzanedo, C., Rodríguez-Arias, M. & Miñarro, J. (2003). Reinstatement of morphine-induced conditioned place preference in mice by priming injections. *Neural Plasticity*, *10*, 279-290.
- Espejo, E. F. (1997). Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. *Behavioral Brain Research*, *87*, 233-238.
- Everitt, B. J., Dickinson, A. & Robbins, T. W. (2001). The neuropsychological basis of addictive behavior. *Brain Research Reviews*, *36*, 129-138.
- Everitt, B. J. & Robbins, T. W. (2000). Second-order schedules of drug reinforcement in rats and monkeys: measurement of reinforcing efficacy and drug seeking behavior. *Psychopharmacology*, *153*, 17-30.
- Fenu, S., Spina, L., Rivas, E., Longoni, R. & Di Chiara, G. (2006). Morphine-conditioned single-trial place preference: role of nucleus accumbens shell dopamine receptors in acquisition, but not expression. *Psychopharmacology*, *187*, 143-153.
- Ferguson, A. R., Patton, B. C., Bopp, A. C., Maegher, M. W. & Grau, J. W. (2004). Brief exposure to a mild stressor enhances morphine-conditioned place preference in male rats. *Psychopharmacology*, *175*, 47-52.
- File, S. E. (1980). The use of social interaction as a method for detecting the anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. *Journal of Neuroscience Methods*, *2*, 219-238.
- Grasing, K, Li, N., He, S., Parrish, C., Delich, J. & Glowa, J. (2003). A new progressive ratio schedule for support of morphine self-administration in opiate dependent rats. *Psychopharmacology*, *168*, 387-396.

- Handley, S. L. & McBlane, W. J. (1993). An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. *Journal of Pharmacology and Toxicology Methods*, *29*, 129-138.
- Handley, S. L. & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoreceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of fear-motivated behavior. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *327*, 1-5.
- Hasenöhrl, R. U., Oitzl, M. S. & Huston, J. P. (1989). Conditioned place preference in the corral: a procedure for measuring reinforcing properties of drugs. *Journal of Neuroscience Methods*, *30*, 141-146.
- Itzhak, Y. & Martin, J. L. (2001). Cocaine-induced conditioned place preference in mice: induction, extinction and reinstatement by related psychostimulants. *Neuropsychopharmacology*, *26*, 130-134.
- Kearns, D. N., Weiss, S. J. & Panlilio (2002). Conditioned suppression of behavior maintained by cocaine self-administration. *Drug and Alcohol Dependency*, *65*, 253-261.
- Koob, G. F. & Le Moal, M. (2005). Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction. *Nature Neuroscience*, *8*, 1442-1444.
- Koob, G. F., Sanna, P. P. & Bloom, F. E. (1998). Neuroscience of addiction. *Neuron*, *21*, 467-478.
- Leshner, A. I. (1997). Addiction is a brain disease, and it matters. *Science*, *278*, 45-47.
- Lu, L., Nan-Jie, X., Ge, X., Yue, W., Su, W., Pei, G. & Ma, L. (2002). Reactivation of morphine conditioned place preference by drug priming: role of environmental cues and sensitization. *Psychopharmacology*, *159*, 125-132.
- Manzanedo, C., Aguilar, M. A., Rodríguez-Arias, M. & Miñarro, J. (2001). Effects of dopamine antagonists with different receptor blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice. *Behavioral Brain Research*, *121*, 189-197.
- Meyer, J. S. & Quenzer, L. F. (2005). *Psychopharmacology: drugs, the brain and behavior*. U.S.A: Sinauer Associates.
- Montgomery, K. C. (1955). The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comp. Physiology and Psychology*, *48*, 254-260.
- Motta, V. & Brandão, M. L. (1993). Aversive and antiaversive effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *44*, 119-125.

- Motta, V., Penha, K. & Brandão, M. L. (1995). Effects of microinjections of μ and κ receptor agonists into the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the plus maze test. *Psychopharmacology*, *120*, 470-474.
- Mucha, R. F. & Iversen, S. D. (1984). Reinforcing properties of morphine and naloxone revealed by conditioned place preference: a procedural examination. *Psychopharmacology*, *82*, 241-247.
- Panlilio, L. V. & Goldberg, S. R. (2007). Self-administration of drugs in animals and humans as a model and an investigative tool. *Addiction*, *102*, 1863-1870.
- Panlilio, L. V., Thorndike, E. B. & Schindler, C. W. (2003). Reinstatement of punishment-suppressed opioid self-administration in rats: an alternative model of relapse to drug abuse. *Psychopharmacology*, *168*, 229-235.
- Parker, L. A., Limebeer, C. L. & Slomke, J. (2006). Renewal effect: context-dependent extinction of a cocaine and a morphine-induced conditioned floor preference. *Psychopharmacology*, *187*, 133-137.
- Pelloux, Y., Everitt, B. J. & Dickinson, A. (2007). Compulsive drug seeking by rats under punishment: effects of drug taking history. *Psychopharmacology*, *194*, 127-137.
- Pierce, R. C. & Kumarcson, V. (2006). The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effects of drug of abuse? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *30*, 215-238.
- Rasmussen, D. D., Mitton, D. R., Green, J. & Puchalski, S. (2001). Chronic daily ethanol and withdrawal: 2. Behavioral changes during prolonged abstinence. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, *25*, 999-1005.
- Roberts, D. C. S. & Bennett, S. A. L. (1993). Heroin self-administration in rats under a progressive ratio schedule of reinforcement. *Psychopharmacology*, *111*, 215-218.
- Rodgers, R. J., Cao, B. J., Dalvi, A. & Holmes, A. (1997). Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *30*, 289-304.
- Rodgers, R. J. & Dalvi, A. (1997). Anxiety, defense and the elevated plus-maze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *21*, 801-810.
- Rodgers, R. J. & Johnson, N. J. T. (1995). Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *52*, 297-303.

- Saharei, H., Amiri, Y., Haeri-Rohani, A., Sepehri, H., Salimi, S. H., Pourmotabbed, A., Ghoshoomi, H., Zahirodin, A. & Zardooz, H. (2005). Different effects of GABAergic receptors located in the ventral tegmental area on the expression of morphine-induced conditioned place preference in rat. *European Journal of Pharmacology*, *524*, 95-101.
- Saharei, H., Ghazzaghi, H., Zarrindast, M., Ghoshooni, H., Sepehri, H. & Haeri-Rohan, A. (2004). The role of alpha-adrenoceptor mechanism(s) in morphine-induced conditioned place preference in female mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *78*, 135-141.
- Salamone, J. D., Correa, M., Farrar, A. & Mingote, S. M. (2007). Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits. *Psychopharmacology*, *191*, 461-482.
- Sante, A. B., Nobre, M. J. & Brandão, M. L. (2000). Place aversion induced by blockade of mu or activation of kappa opioid receptors in the dorsal periaqueductal gray matter. *Behavioural Pharmacology*, *11*, 583-589.
- Simpson, G. R. & Riley, A. L. (2005). Morphine preexposure facilitates morphine place preference and attenuates morphine taste aversion. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *80*, 471-479.
- Spealman, R. D. & Goldberg, S. R. (1978). Drug self-administration by laboratory animals: control by schedules of reinforcement. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, *18*, 313-339.
- Tzschentke, T. M. (1998). Measuring reward with place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Progress in Neurobiology*, *56*, 613-672.
- Van der Kooy, D., Mucha, R. F., O'Shaughnessy, M. & Buceniaks, P. (1982). Reinforcing effects of brain microinjection of morphine revealed by conditioned place preference. *Brain Research*, *243*, 107-117.
- Vanderschuren, L. J. M. J. & Everitt, B. J. (2004). Drug seeking becomes compulsive after prolonged cocaine self-administration. *Science*, *305*, 1017-1019.
- Van Ree, J. M., Guerrits, M. A. F. M. & Vanderschuren, L. J. M. J. (1999). Opioids, reward and addiction: an encounter of biology, psychology, and medicine. *Pharmacological Reviews*, *51*, 341-396.

- Vezina, P. & Stewart, J. (1987). Conditioned locomotion and place preference elicited by tactile cues paired exclusively with morphine. *Psychopharmacology*, *91*, 375-380.
- Wall, P. M. & Messier, C. (2001). Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neurosciences and Biobehavioral Reviews*, *25*, 275-286.
- WHO (2004). *Neuroscience of psychoactive substance use and dependence*. Geneva, World Health Organization.
- Will, M. J., Watkins, L. R. & Maier, S. F. (1998). Uncontrollable stress potentiates morphine's rewarding properties. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *60*, 655-664.
- Winger, G., Woods, J. H., Galuska, C. M. & Wade-Galuska, T. (2005). Behavioral perspectives on the neuroscience of drug addiction. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, *84*, 667-681.
- Woods, J. H., France, C. P., Winger, G., Bertalmio, A. J. & Schwarz-Stevens, K. (1993). Opioid abuse liability assessment in rhesus monkeys. In A. Herz (ed.). *Opioids II, Handbook of Experimental Pharmacology*, *104*, 609-632. Springer Verlag: New York.