



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO**

**O Labirinto em Cruz Elevado como Modelo de Adicção
Animal: Efeito Comportamental do Pareamento de
Morfina com os Braços Abertos**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Déborah Alencar de Oliveira

**Brasília
2012**



Universidade de Brasília

Instituto de Psicologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências do Comportamento

O Labirinto em Cruz Elevado como Modelo de Adicção Animal: Efeito Comportamental do Pareamento de Morfina com os Braços Abertos

Déborah Alencar de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Vitor Augusto Motta Moreira

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

Brasília
2012

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Pedro de Mello Cruz (Membro Efetivo)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Domingos Sávio Coelho (Membro Suplente)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Marília Barros (Membro Efetivo)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Vitor Augusto Motta Moreira (Presidente)
Universidade de Brasília

Brasília, 27 de Março de 2012

**Aos meus pais e minha irmã,
por todo amor e dedicação.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda graça concedida, especialmente pela saúde, mental e física, e por guiar todos meus passos.

Aos meus amados pais, Odilon e Francisca, que sempre me acolheram e me apoiaram. Que tornaram meus caminhos mais seguros. Que me honraram com sua sabedoria e amor incondicional. Que me ensinaram que a educação e os princípios são a maior riqueza que se pode ter. Dedico a eles tudo o que aprendi e tudo que tenho de bom.

À minha linda irmã, Irina, que tanto me inspira e ampara. Meu braço direito e esquerdo, meu ombro amigo. Me consolou e motivou inúmeras vezes e a cada dia me faz a irmã mais orgulhosa, seja por sua postura e superação, seja por sua doçura e generosidade. A ela, dedico meu obrigada especial e meu carinho eterno.

À minha adorada família, meus primos e primas, tios e tias, e minhas amáveis avós, que muito contribuíram para minha jornada e formação. Também à minha encantadora Lulu, a pessoa mais doce desse mundo. Dedico a eles o querer colocar amor em tudo que faço.

Aos meus, mais que especiais, amigos e amigas, especialmente a Dai, Mari, Lu, Nat, Lili, Caroláine, Rachel e Gleiton, que foram meu escape e meu apoio durante esses dois anos e que sei que assim será para o resto da vida. Compartilho com eles a realização desse sonho.

To my lovely Mitch, who even being so far away, took care of my heart so carefully. Vielen dank! I dedicate to him my hope that people and life can be good and beautiful.

Aos meus queridos colegas e companheiros de laboratório, Virgínia, Maurício, Thalita, Jonathan, George, Dona Neusa, Ademar, Joyce e Keules, que sempre me ajudaram com paciência e prestatividade. Divido com eles a conclusão desse trabalho.

Ao Júlio César, do Hospital Universitário de Brasília, pela colaboração técnica.

Ao Danilo Assis Pereira, do IBNeuro, pelos ensinamentos estatísticos.

A todos os professores que tive a oportunidade de conviver durante o período de mestrado, pelo aprendizado e estímulo intelectual. Em especial, ao Prof. Antônio Pedro, pelo apoio técnico em relação ao labirinto e pelos gentis esclarecimentos quanto à realização da análise etofarmacológica dos dados.

À banca examinadora, pela aceitação do convite e pela atenção dispensada para a leitura desse trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, Prof. Vitor Motta, que me instruiu com inteligência e me propôs desafios acreditando na minha capacidade para superá-los, contribuindo irreparavelmente para meu crescimento científico e pessoal.

Assim como eu, esse trabalho foi apoiado por pessoas extraordinárias.

A todas vocês, sou mais grata do que imaginam.

RESUMO

OLIVEIRA, D. A. **O Labirinto em Cruz Elevado como Modelo de Adicção Animal: Efeito Comportamental do Pareamento de Morfina com os Braços Abertos.** 2012. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Psicologia, Universidade de Brasília, Brasília.

A partir de um procedimento de preferência condicionada por lugar, o labirinto em cruz elevado foi utilizado para investigar o efeito de variáveis ambientais e de outras propriedades farmacológicas de drogas sobre a aquisição de adicção, através do número de pareamentos de morfina intraperitoneal com os braços abertos desse labirinto, compartimentos naturalmente aversivos ao comportamento exploratório de ratos. Setenta e dois ratos Wistar machos foram divididos em seis grupos experimentais. Quatro grupos receberam diferentes doses de morfina (0,3, 1,0, 5,0 e 10,0 mg/kg) pareadas aos braços abertos do labirinto, por 20 minutos, no período da manhã, enquanto injeções de salina foram pareadas aos braços fechados, no período da tarde. O grupo controle recebeu apenas injeções de salina, que foram pareadas a ambos os braços. No total, oito sessões alternadas de condicionamento foram realizadas em quatro dias consecutivos, sendo que os grupos de morfina totalizaram quatro pareamentos aos braços abertos. Um sexto grupo também recebeu somente injeções de salina, mas foi exposto ao labirinto apenas no dia do teste, realizado no quinto dia. Os resultados revelaram que o condicionamento não alterou a aversão aos braços abertos, nem a atividade motora do grupo controle. Um efeito locomotor foi demonstrado para o grupo condicionado com 1,0 mg/kg de morfina, enquanto um possível efeito anti-aversivo foi observado para o grupo condicionado com 0,3 mg/kg. O condicionamento com 5,0 e com 10,0 mg/kg de morfina não alterou a aversão dos animais aos braços abertos. Esses resultados contrariam os achados anteriores, que demonstraram que dois pareamentos com 1,0 e 5,0 mg/kg de morfina atenuavam a aversão aos braços abertos promovida por dois pareamentos de salina. Estudos adicionais devem ser realizados, a fim de confirmar os resultados obtidos e revelar mais sobre a precisa aplicabilidade do labirinto em cruz elevado no estudo da adicção a drogas.

Palavras-chave: preferência condicionada por lugar; labirinto em cruz elevado; adicção a drogas; reforçamento negativo; morfina.

ABSTRACT

OLIVEIRA, D. A. **The Elevated Plus Maze as a Model of Animal Addiction: Behavioral Effect of Pairing Morphine with the Open Arms.** Dissertation (Master's Degree) - Institute of Psychology, University of Brasília, Brasília.

With a conditioned place preference procedure, the elevated plus maze was applied to investigate the effect of environmental variables and other pharmacological properties of drugs on the acquisition of drug addiction, by the number of pairings between intraperitoneal morphine and its open arms, compartments naturally aversive to the exploratory behavior of rats. Seventy two male Wistar rats were divided into six experimental groups. Four groups received different doses of morphine (0,3, 1,0, 5,0 e 10,0 mg/kg) paired to the open arms of the maze for 20 minutes in the morning, while saline injections were paired to the close arms in the afternoon. The control group received only saline injections, which were paired to both open and close arms of the maze. In total, eight alternate conditioning sessions were conducted on four consecutive days, and morphine groups totaled four pairings to the open arms. A sixth group also received only saline injections, although it was exposed to the maze only on the test day, performed on the fifth day. Results showed that conditioning did not influence the aversion to the open arms or the motor activity of the control group. A locomotor effect was demonstrated for the group conditioned with 1,0 mg/kg of morphine, while a potential anti-aversive effect was observed for the group conditioned with 0,3 mg/kg. Conditioning with 5,0 and 10,0 mg/kg of morphine did not influence the animal aversion to the open arms. These results contradict previous findings, which showed that two pairings with 1,0 and 5,0 mg/kg of morphine attenuated the aversion to the open arms promoted by two pairings with saline. Additional studies should be performed in order to confirm these results and reveal more about the applicability of the elevated plus maze in the study of drug addiction.

Keywords: conditioned place preference; elevated plus maze; drug addiction; negative reinforcement; morphine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - (A) LCE adaptado para as sessões de condicionamento, através da utilização de um sistema de guilhotina que isolava os braços abertos e fechados. (B) Forma padrão do LCE utilizada durante os testes. 31
- Figura 2** - Todos testes foram registrados identificando a data e o grupo do animal testado. 34
- Figura 3** - Número de entradas nos braços fechados (barras vermelhas) e abertos (barras azuis) e número total de entradas (barras azuis + barras vermelhas). S/cond: animais submetidos ao teste do LCE sem condicionamento prévio. MO 0,0: animais submetidos ao teste do LCE após sessões de condicionamento aos braços abertos e fechados com salina. MO (0,3, 1,0, 5,0 e 10,0): animais submetidos ao teste do LCE após sessões de condicionamento aos braços abertos com morfina, respectivamente nas doses 0,3, 1,0, 5,0 e 10,0 mg/kg, e aos braços fechados com salina. Os valores estão apresentados como média + EPM (n = 12). * $p < 0,05$ para número de entradas nos braços fechados; + $p < 0,05$ para número de entradas nos braços abertos; e ## $p < 0,01$ para número total de entradas, quando comparado ao grupo controle. One-way ANOVA seguida por teste de Dunnett. 37
- Figura 4** - Tempo de permanência nos braços fechados (barras vermelhas), no centro (barras verdes) e nos braços abertos (barras azuis) do LCE. S/cond: animais submetidos ao teste do LCE sem condicionamento prévio. MO 0,0: animais submetidos ao teste do LCE após sessões de condicionamento aos braços abertos e fechados com salina. MO (0,3, 1,0, 5,0 e 10,0): animais submetidos ao teste do LCE após sessões de condicionamento aos braços abertos com morfina, respectivamente nas doses 0,3, 1,0, 5,0 e 10,0, e aos braços fechados com salina. Os valores estão apresentados como média + EPM (n = 12). + $p < 0,05$ para tempo nos braços fechados e ** $p < 0,01$ para tempo no centro do LCE, quando comparado ao grupo controle. One-way ANOVA e teste de Dunnett. 38
- Figura 5** - Porcentagem de entradas (barras azuis) e porcentagem de tempo de permanência (barras vermelhas) nos braços abertos do LCE. S/cond: animais submetidos ao teste do LCE sem condicionamento prévio. MO 0,0: animais submetidos ao teste do LCE após sessões de condicionamento aos braços abertos e fechados com salina. MO (0,3, 1,0, 5,0 e 10,0): animais submetidos ao teste do LCE após sessões de condicionamento aos braços abertos com morfina, respectivamente nas doses 0,3, 1,0, 5,0 e 10,0 mg/kg, e aos braços fechados com salina. Os valores estão apresentados como média + EPM (n = 12). One-way ANOVA seguida por teste de Dunnett. 39
- Figura 6** - Tempo de esquadramento e de espreitamento e frequência de exploração das extremidades dos braços abertos do LCE. S/cond: animais submetidos ao teste do LCE sem condicionamento prévio. MO 0,0: animais submetidos ao teste do LCE após sessões de condicionamento aos braços abertos e fechados com salina. MO (0,3, 1,0, 5,0 e 10,0): animais submetidos ao teste do LCE após sessões de condicionamento aos braços abertos com morfina, respectivamente nas doses 0,3, 1,0, 5,0 e 10,0 mg/kg, e aos braços fechados com salina. Os valores estão apresentados como média + EPM (n = 12). ## $p < 0,01$ para esquadramento e * $p < 0,05$ para espreitamento, quando comparado ao grupo controle. One-way ANOVA seguida por teste de Dunnett. 40

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas	Definição
CPP	Preferência condicionada por lugar
CRF	Fator de liberação de corticotrofina
DSM-IV	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (4ª. Edição)
EPM	Erro Padrão da Média
<i>F</i>	Razão (estatística) <i>F</i>
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HPA	Eixo hipófise-hipotálamo-adrenal
i.p.	Intraperitoneal
LCE	Labirinto em cruz elevado
MO	Morfina
n	Número de uma subamostra
NAc	Núcleo accumbens
OMS	Organização Mundial de Saúde
One-way ANOVA	Análise da variância de um fator
<i>p</i>	Probabilidade
S/cond	Sem condicionamento
VTA	Área Tegmental Ventral

ÍNDICE

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
INTRODUÇÃO	11
Adicção a Drogas	11
<i>Neurobiologia da Adicção</i>	<i>13</i>
<i>Adicção e Aprendizagem.....</i>	<i>15</i>
Modelos Animais de Adicção a Drogas.....	17
<i>Auto-Administração</i>	<i>18</i>
<i>Preferência Condicionada por Lugar</i>	<i>19</i>
Labirinto em Cruz Elevado	21
Opióides	24
OBJETIVOS	29
MATERIAIS E MÉTODOS	30
Sujeitos.....	30
Droga.....	30
Equipamentos.....	30
<i>Labirinto em Cruz Elevado</i>	<i>31</i>
<i>Sistema Filmadora-Computador.....</i>	<i>31</i>
Procedimento.....	32
<i>Condicionamento</i>	<i>32</i>
<i>Teste</i>	<i>34</i>
Análise Estatística	35
RESULTADOS.....	36
DISCUSSÃO	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXOS	Erro! Indicador não definido.

INTRODUÇÃO

Adicção a Drogas

O uso de drogas que alteram o humor e a mente tem prevalecido por milhares de anos na sociedade. O etanol, por exemplo, tem sido consumido por pelo menos 8.000 anos, constituindo um dos melhores exemplos de droga utilizada para recreação ao longo da história (Betz et al., 2000). O costume de mascar folhas de coca tem sido praticado por índios sul-americanos há mais de 1.500 anos (Woolverton & Johnson, 1992). No início do século XX, drogas como cocaína, heroína e morfina eram livremente prescritas e comercializadas para o tratamento de diversas doenças (Szasz, 1975). Todavia, sérios problemas de adicção foram sendo gradualmente identificados com o consumo indiscriminado dessas substâncias.

Um histórico similar se aplica ao ópio, ao tabaco e a uma série de outras substâncias de ação central. O consumo da maconha (*Cannabis sativa*), por exemplo, remete ao ano de 2.737 a.C., na China, principalmente em decorrência de seus efeitos eufóricos e medicinais (Szasz, 1975). Embora essa droga seja considerada ilegal na maioria dos países, ela permanece popular e sua descriminalização é defendida por muitos. Outro exemplo importante é o dos benzodiazepínicos, uma das medicações psicotrópicas mais prescritas no mundo atualmente. Quando foram introduzidos na prática clínica, acreditava-se que esses compostos não eliciavam adicção. Entretanto, a partir da década de 1970, sua capacidade de produzir sintomas de abstinência e dependência psicológica passou a representar um sério problema de saúde mundial (De las Cuevas, Sanz & De la Fuente, 2003).

A adicção a drogas consiste em uma doença crônica que envolve alterações biológicas, cognitivas e comportamentais, desenvolvidas após o uso repetido de substâncias capazes de promover adicção. Essa desordem é caracterizada, principalmente, por: (1) compulsão pela procura e pelo consumo contínuo e excessivo da droga, implicando em limitação do repertório comportamental; (2) perda do controle sobre o consumo e evidentes danos à função social e ocupacional do indivíduo; e (3) surgimento de um estado emocional negativo quando o acesso à droga é impedido, envolvendo sinais de disforia, irritabilidade e ansiedade (Organização Mundial da Saúde, OMS, 2002; Koob et al., 2004).

O termo adicção tem sido muito utilizado nas últimas décadas como sinônimo de dependência, se referindo ao estágio final do processo de consumo de drogas (Gardner, 2008). Todavia, tal equiparação de conceitos confunde a terminologia da área e, conforme determinado pela quarta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV), o termo dependência passou a ser utilizado no âmbito clínico para se referir aos transtornos produzidos por classes de drogas capazes de causar sintomas de abstinência, como medicamentos antidepressivos e corticosteróides (Volkow & Li, 2004; Gardner, 2008). A utilização da expressão “consumo de drogas”, em vez de “abuso de drogas”, também é orientada quando houver referência a qualquer forma de auto-administração de uma substância psicoativa, incluindo consumo ocasional ou prolongado (OMS, 2002).

A transição do consumo recreacional ou mesmo cerimonial de drogas para a consolidação da adicção é um processo difícil de ser definido. Drogas legais (como álcool, nicotina e benzodiazepínicos) e ilegais (como maconha, cocaína e heroína) são utilizadas de forma excessiva por diversas razões, como para alteração de estado mental, melhora de desempenho e, em certos casos, para auto-medicação (Volkow & Li, 2004). O consumo inicial de drogas geralmente está relacionado aos efeitos de prazer, bem-estar e euforia produzidos por essas substâncias (Gerrits, Lesscher & van Ree, 2003). Além disso, indivíduos demonstram notáveis diferenças de vulnerabilidade à adicção, sofrendo complexa influência da predisposição genética e da condição fenotípica (Betz et al., 2000; Gerrits et al., 2003).

O processo de adicção a drogas pode ser representado por um ciclo de patologia crescente, resultante de repetidas falhas de auto-regulação do sistema cerebral de recompensa (Koob & Le Moal, 2001; Kenny, 2007). Do ponto de vista comportamental, esse ciclo da adicção é composto por três fases: (1) fase de compulsão e intoxicação; (2) fase de afeto negativo de abstinência e; (3) fase de antecipação e preocupação (Koob & Le Moal, 2001).

O conhecimento crescente da neurobiologia das drogas e das alterações adaptativas que ocorrem durante a adicção tem orientado novas estratégias para a prevenção e tratamento dessa desordem, contribuindo também para identificar as áreas nas quais pesquisas adicionais são necessárias (Volkow & Li, 2004). Esse aprimoramento tem se tornado cada vez mais importante, visto o dramático impacto da problemática da adicção na sociedade e na saúde mundial. No ano de 2002, a Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou que somente o tabaco contribuiu para 8,8% de todas as mortes no mundo, enquanto o álcool contribuiu para 3,2% das mortes (Hughes, Watson, Kalk & Reid, 2010).

Neurobiologia da Adicção

A pesquisa neurobiológica no campo da adicção a drogas procura esclarecer as alterações envolvendo processos fisiológicos e comportamentais, que medeiam a transição entre o uso controlado e ocasional e a perda do controle sobre o uso de drogas (Koob & Le Moal, 2001; Schindler, Panlilio & Goldberg, 2002). As drogas agem sobre sistemas neuroquímicos que compõem o circuito de recompensa cerebral. Esse circuito anatômico foi inicialmente descrito em 1954, por Olds e Milner, que verificaram um aumento nas respostas de auto-estimulação, quando regiões cerebrais específicas (principalmente ao longo do feixe prosencefálico medial) eram estimuladas eletricamente em ratos (apud Koob & Le Moal, 2001). A ativação dessas vias neurais, elétrica ou quimicamente (por drogas ou por recompensas naturais, como comida e sexo), provoca sensações prazerosas fortemente reforçadoras, mantendo comportamentos estereotipados (Betz et al., 2000). A partir dessas observações, pesquisas adicionais identificaram as estruturas anatômicas e as vias neuroquímicas envolvidas no circuito cerebral de recompensa.

Estudos consistentes demonstraram que a liberação de dopamina, especialmente no núcleo accumbens, está intensamente associada aos efeitos de recompensa (prazer) das drogas (Koob, 1992; Di Chiara, 1999; Crombag & Robinson, 2004; Volkow & Li, 2004). Os corpos celulares do sistema dopaminérgico de recompensa originam-se na área tegmental ventral (VTA) e se projetam amplamente para o estriado ventral, incluindo: (1) o núcleo accumbens (NAc), importante interface entre os sistemas límbico e motor, envolvido na aprendizagem de recompensas e expressão de comportamentos adaptativos; (2) diferentes áreas corticais pré-frontais, envolvidas na avaliação do estímulo e no controle de impulso; e (3) outras regiões do sistema límbico, como a amígdala, responsável pela avaliação do significado emocional de estímulos em situações que envolvem estados de medo e ansiedade (Di Chiara & North, 1992; Koob & Le Moal, 2001; Hughes et al., 2010).

O consumo crônico de drogas é capaz de alterar a atividade do circuito de recompensa, envolvendo mecanismos compensatórios que se opõem aos efeitos prazerosos dessas substâncias. Isso é caracterizado pela redução do nível de dopamina no NAc e pelo aumento do nível de estresse, numa tentativa do cérebro de manter os níveis homeostáticos normais (Koob & Le Moal, 2001; Crombag & Robinson, 2004; Kenny, 2007). Esse crescente e persistente estado afetivo negativo mascara os efeitos hedônicos iniciais das drogas e é responsável pelo mecanismo de reforçamento negativo de procurar a droga para evitar os efeitos aversivos gerados por sua abstinência (Koob & Le Moal, 2001). Essas alterações

neuroplásticas, associadas às propriedades reforçadoras das drogas, contribuem para a formação do estado alostático, um estado de desvio crônico do nível homeostático normal, alterando o quadro hedônico eliciado inicialmente pela droga (Koob & Le Moal, 2001).

Alterações neurofisiológicas também contribuem para a vulnerabilidade à adicção. Uma reduzida atividade do córtex pré-frontal em indivíduos adictos reflete a alteração do controle de tomada de decisão pré-frontal, para um controle mais compulsivo sobre o consumo de drogas, observado nesses indivíduos. Isso pode ser responsável pelo aumento da responsividade a níveis elevados de dopamina (gerados por drogas) e pela redução da sensibilidade a níveis fisiológicos (gerados por recompensas naturais), caracterizando a transição do simples uso prazeroso para o desejo compulsivo pela droga (fissura) (Koob & Le Moal, 2001; Crombag & Robinson, 2004; Volkow & Li, 2004).

Avanços recentes em biologia molecular e em imagem funcional aumentaram a compreensão de como tais adaptações ocorrem. Em nível celular, o uso repetido de drogas promove alterações de longa duração na expressão de certos fatores de transcrição (como Δ FosB), que modulam a síntese de proteínas envolvidas na plasticidade sináptica, alterando, assim, a transdução de sinal intracelular e a transcrição gênica na via dopaminérgica (Volkow & Li, 2004; Koob, Lloyd & Mason, 2009). Esse quadro altera a atividade regular desses neurônios e o funcionamento dos circuitos neurais associados, promovendo os complexos comportamentos característicos da adicção a drogas (Nestler & Aghajanian, 1997).

Drogas como cocaína, anfetamina e ecstasy atuam diretamente sobre a transmissão dopaminérgica (Volkow & Li, 2004). Porém, outros neurotransmissores também contribuem de forma significativa para a função anormal dos circuitos cerebrais, sob efeito de repetidas exposições a drogas. Substâncias como opióides, álcool e maconha, agem indiretamente através de neurônios estimulantes (mediados por GABA ou glutamato), que modulam a célula dopaminérgica através de receptores opióides, GABAérgicos e receptores canabinóides, respectivamente (Volkow & Li, 2004; Hughes et al., 2010).

Agonistas GABAérgicos, como benzodiazepínicos, demonstraram reduzir a procura e a compulsão por drogas como álcool, cocaína e nicotina em estudos pré-clínicos, ao inibirem o disparo neuronal de dopamina (Cousins, Roberts & de Wit, 2002; Filip & Frankowska, 2008). Foi demonstrado também que alterações nos receptores glutamatérgicos NMDA estão envolvidas em diferentes aspectos da adicção, como na fase de preocupação-antecipação e na recaída desencadeada por exposição a estresse, à própria droga ou a estímulos ambientais previamente associados à droga (Volkow & Li, 2004; Gardner, 2008; Koob et al., 2009).

Adicção e Aprendizagem

O conceito de reforçamento é crucial para características comuns a adicção a drogas, como a compulsão ao consumo e a síndrome de abstinência resultante da retirada da droga. Um reforço pode ser definido operacionalmente como qualquer evento que aumenta a probabilidade de uma resposta (Koob, 2000). Diferentes fontes de reforçamento podem contribuir para o consumo compulsivo de drogas durante o curso da adicção. No paradigma de auto-administração de drogas, um reforço positivo ocorre quando a apresentação da droga aumenta a probabilidade da resposta de obter a droga novamente (Koob, 1992). Inicialmente, a adicção é impulsionada principalmente pelos efeitos reforçadores positivos das drogas (efeitos prazerosos), sendo que, mesmo em condições de acesso limitado (onde o organismo ainda não está dependente), essas poderosas propriedades reforçadoras são capazes de motivar taxas altas de resposta operante (Koob, 1992; Gardner, 2008).

Porém, a transição do uso ocasional para o estado de adicção necessita de uma fonte adicional de reforçamento, além do reforço positivo (Koob, 2003). O reforço negativo surge, então, com o alívio do estado aversivo gerado pela abstinência da droga e representaria, no estado dependente, o poder motivacional da adicção. Esse conceito, proposto por Koob (1992), sugere que os comportamentos associados ao consumo de drogas podem ser *adquiridos* em função de seus efeitos reforçadores positivos e *mantidos* por seus efeitos reforçadores negativos. Todavia, é importante destacar que essa idéia não se aplica a todas as substâncias capazes de promover adicção, existindo algumas exceções importantes, como a *Cannabis* e outras drogas que não desenvolvem considerável síndrome de abstinência. Deve-se considerar ainda a possibilidade das propriedades reforçadoras negativas das drogas influenciarem também a aquisição da adicção, e não apenas sua manutenção.

A intensidade do comportamento de procura pela droga seria resultado, portanto, da ação de propriedades de reforço positivo e de estímulos discriminativos da droga, podendo ser enfraquecida por suas propriedades aversivas (Stolerman, 1992). Segundo Di Chiara (1999), a adicção se configura, nesse contexto, como “a expressão do controle excessivo dos estímulos relacionados à droga sobre o comportamento adquirido, como um resultado de aprendizagem associativa após a estimulação repetida da transmissão dopaminérgica no NAc pela droga”. Por esse motivo, os modelos animais utilizados atualmente para estudar adicção passaram a enfatizar os processos de aprendizagem envolvidos nos mecanismos de reforçamento positivo e negativo, fundamentais para o desenvolvimento da adicção a drogas (Stolerman, 1992; Di Chiara, 1999; Gerrits et al., 2003; Kenny, 2007).

Estímulos ambientais associados ao consumo de drogas também são capazes de estimular e manter o comportamento de procura pela droga, ao ativar o sistema cerebral de recompensa, contribuindo para a recaída à adicção (Koob, 2000; Crombag & Robinson, 2004). Ao manipular condições ambientais distintas, Paolone, Burdino e Badiani (2003) verificaram que um ambiente novo pode potencializar os efeitos reforçadores da morfina (especialmente atividade locomotora) e o desenvolvimento de sensibilização a esses efeitos, sem modular, porém, seus efeitos analgésicos. Portanto, para compreender melhor as conseqüências imediatas e de longa duração das drogas sobre o comportamento e o cérebro, é necessário valorizar as circunstâncias ambientais nas quais essas substâncias são vivenciadas (Paolone et al., 2003; Crombag & Robinson, 2004).

O estresse pode ser uma característica comum a vários fatores que aumentam a suscetibilidade ao consumo de drogas (Volkow & Li, 2004). A literatura confirma que a exposição a estressores ambientais (como isolamento e estresse físico) tem um impacto significativo sobre a adicção, ao acentuar a ação hedônica das drogas (Gerrits et al., 2003; Goeders, 2003). O estresse consiste nas respostas do organismo a demandas ambientais geralmente nocivas, gerando a ativação de determinadas áreas a fim de definir respostas comportamentais e fisiológicas altamente coordenadas que garantam a integridade do organismo (Goeders, 2003). Essas adaptações envolvem a participação do eixo hipófise-hipotálamo-adrenal (HPA), do sistema nervoso simpático e de sistemas emocionais.

O fator de liberação de corticotrofina (CRF) é responsável por modular comportamentos de medo e ansiedade, logo após o início de um evento estressante, através da ativação do eixo HPA. Ao ser secretado no sistema porta-hipofisário, o CRF é transportado até a hipófise, onde induz a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que liberado na circulação sistêmica, estimula a glândula adrenal a secretar glicocorticóides (corticosterona nos roedores e cortisol nos primatas), os quais são fundamentais para as respostas de luta e fuga e importantes indicadores de estresse (Koob & Le Moal, 2001). Assim, drogas reforçadoras negativas, como o álcool e os benzodiazepínicos, também poderiam promover auto-administração por atenuarem o estresse.

Mesmo após longa abstinência, período durante o qual o consumo da droga está interrompido, a exposição a estressores ou a fatores ambientais anteriormente associados à droga pode estimular o eixo HPA a associá-los aos efeitos da droga, promovendo fissura e recaída (Goeders, 2003). A fissura, um intenso desejo de voltar a vivenciar os efeitos da droga, surge como principal responsável por reforçar a auto-administração, podendo se desenvolver através de aprendizagem associativa (Gerrits et al., 2003).

Modelos Animais de Adicção a Drogas

Muito do progresso recente observado na neurobiologia da adicção a drogas se deve à interação entre estudos de imagem funcional em humanos e estudos utilizando modelos animais (Koob et al., 2009; Hughes et al., 2010). Modelos animais fornecem uma importante ferramenta para estudar as bases comportamentais e biológicas da adicção, permitindo a investigação dos substratos cerebrais envolvidos nesse transtorno, contribuindo, de forma significativa, para o tratamento da adicção em seres humanos (Koob, 2003). Esses modelos de adicção são utilizados para avaliar padrões comportamentais e neurofarmacológicos estabelecidos na literatura e podem ser definidos por diferentes construtos psicológicos (como reforçamento positivo ou negativo) ou por diferentes estágios do ciclo de adicção (Koob, Sanna & Bloom, 1998; Koob et al., 2009).

Apesar de não existir um modelo animal ou humano único para todos os aspectos da adicção e de que nenhum modelo animal de adicção emula completamente a condição humana, esses modelos são capazes de simular aspectos específicos da adicção em humanos, como a sensação de prazer induzida pela administração da droga, a disforia gerada por abstinência aguda, comportamentos de procura e consumo, assim como aspectos da recaída (Koob, 2003; Gardner, 2008). Além disso, fatores ambientais, comportamentais e neurobiológicos que contribuem para as diferenças individuais de vulnerabilidade a adicção (a aquisição, manutenção, extinção ou restabelecimento) podem ser cuidadosamente manipulados em situações controladas em laboratório (Koob, 2000).

Diversas técnicas experimentais têm sido desenvolvidas a fim de construir ou aprimorar modelos animais válidos para estudar os mecanismos e circuitos cerebrais envolvidos no desenvolvimento do padrão comportamental da adicção (Gardner, 2008). Através do modelo de auto-administração, por exemplo, Shippenberg (1993) verificou que animais auto-administraram o opióide endógeno β -endorfina, o que foi bloqueado por antagonistas dos receptores μ e σ , sugerindo fortemente o envolvimento do sistema opióide nos processos de reforçamento. Agonistas dos receptores κ , por sua vez, não produziram auto-administração e induziram estados aversivos, através de comportamentos de esquia.

Atualmente, os modelos animais mais amplamente utilizados na área de adicção a drogas são aqueles baseados em auto-administração e em preferência condicionada por lugar (Ator & Griffiths, 2003).

Auto-Administração

O modelo mais utilizado em pesquisas experimentais de adicção tem como base o conceito de condicionamento operante, no qual a ocorrência de um estímulo específico, logo após um comportamento operante, altera a frequência subsequente daquele comportamento (Gerrits et al., 2003). No procedimento de auto-administração de droga, o animal é inicialmente treinado para emitir uma determinada resposta instrumental (pressão de uma barra, por exemplo), contingente à auto-administração da droga. Um aumento progressivo na frequência da resposta operante condicionada ao estímulo de auto-administração indica um estado de aquisição de adicção (O'Brien & Gardner, 2005). Diversos estudos demonstraram que drogas de diferentes classes farmacológicas reforçam a resposta de auto-administração.

Esse modelo possibilita a utilização de diferentes contingências de reforçamento (variações de quando e em qual frequência o comportamento é reforçado), que fornecem variantes interessantes do modelo (Crombag & Robinson, 2004; Gardner, 2008). O esquema de reforçamento de razão fixa é muito utilizado. Outra variante importante é o esquema de razão progressiva, cujo protocolo impõe ao animal uma carga de resposta progressivamente aumentada para receber a administração da droga, até atingir um ponto no qual as respostas caem consideravelmente. Esse ponto de ruptura de razão progressiva é utilizado como medida da eficiência da função reforçadora da droga (Gardner, 2008).

A variedade de manipulações comportamentais e farmacológicas, possível através da utilização desse modelo, fornece ao experimentador uma maior flexibilidade experimental e um controle relativamente preciso sobre as linhas de base comportamentais (Gerrits et al., 2003). Além disso, o fato dos animais voluntariamente auto-administram a droga simula a situação de adicção em humanos, enriquecendo a validade desse procedimento (Bardo & Bevins, 2000; Gerrits et al., 2003).

Por outro lado, o modelo de auto-administração de drogas possui algumas desvantagens importantes, como o investimento de longos períodos para treinamento e modelagem do comportamento operante que, por sua vez, não faz parte do padrão comportamental natural do animal. Esse modelo necessita ainda de investimento em automação e de procedimentos cirúrgicos para implantação de cânulas e cateteres, que também requerem cuidados especiais de manutenção (Bardo & Bevins, 2000). Além disso, o protocolo experimental geralmente envolve privação de água ou comida aos sujeitos experimentais (Panlilio & Goldberg, 2007).

Preferência Condicionada por Lugar

Dentre os modelos comportamentais de adicção a drogas, o modelo de preferência condicionada por lugar (CPP) é amplamente utilizado para estudar os efeitos reforçadores de drogas, investigando a influência dos estímulos ambientais associados a elas (Biala & Langwinski, 1996; Tzschentke, 1998). O paradigma de CPP se baseia no procedimento de condicionamento pavloviano, no qual a droga (estímulo incondicionado), promotora de respostas inatas, é repetidamente pareada com um ambiente específico, que não elicia respostas filogeneticamente determinadas. Esse ambiente passa, então, a atuar como um estímulo condicionado, promovendo comportamentos respondentes semelhantes aos produzidos pelo estímulo incondicionado (droga) (Bardo, Rowlett & Harris, 1995).

Esse modelo geralmente utiliza como aparato experimental uma caixa composta por dois ou três compartimentos com uma porta de guilhotina entre eles. Esses compartimentos possuem características perceptuais distintas (diferentes padrões de parede, de textura de piso, de cor e/ou de odor) e são neutros, do ponto de vista motivacional. Nesse procedimento, um determinado compartimento do aparato é repetidamente associado à administração da droga. Em sessões alternadas, um compartimento diferente é associado a um estado sem droga (administração de salina). Após as sessões de condicionamento, o teste ocorre sem a administração da droga e é permitido ao animal explorar livremente o aparato (Mucha & Iversen, 1984; Bardo et al., 1995; Biala e Langwinski, 1996; Gerrits et al., 2003; Gardner, 2008). Um tempo de permanência significativamente maior no compartimento pareado com a droga indica que esse estímulo ambiental adquiriu propriedades reforçadoras condicionadas (secundárias), devido ao efeito de reforçamento positivo daquela droga (Bardo et al. 1995).

Estudos utilizando CPP confirmam que os animais preferem o contexto pareado com drogas que comumente eliciam adicção em humanos (Tzschentke, 1998). Biala e Langwinski (1996) demonstraram que morfina (5 mg/kg), cocaína (5 mg/kg), anfetamina (5 mg/kg) e etanol (1 g/kg) produzem preferência por lugar em ratos, quando condicionados a um compartimento não-preferido anteriormente. Por outro lado, os animais demonstraram aversão condicionada por lugar, ao evitar ambientes associados aos estados aversivos da abstinência da droga (reforçamento negativo secundário) (Kearns, Weiss & Panlilio, 2002). Através de um procedimento baseado em CPP, Childs e de Wit (2009) demonstraram que os seres humanos, assim como os animais, preferem um lugar previamente associado com a administração de anfetamina, uma droga com conhecidos efeitos reforçadores.

Assim, o modelo de CPP atesta a evidência clínica de que, após o uso prolongado de uma droga, o ambiente onde seu efeito ocorre influencia e contribui consideravelmente para o fenômeno da adicção, controlando sentimentos subjetivos e comportamentos como fissura e recaída (Bardo et al., 1995; Gerrits et al., 2003). Esse paradigma também é sensível a diferentes manipulações farmacológicas e permite mensurar aspectos comportamentais, como atividade locomotora, compondo um perfil mais abrangente das intervenções experimentais (Bardo et al., 1995; Rodgers, Cao, Dalvi & Holmes, 1997). Além disso, a administração da droga é passiva e não ocorre durante a sessão de teste, o que reduz possíveis interferências.

Assim, por se tratar de um procedimento mais simples, rápido, não-invasivo e de baixo custo, o modelo de CPP vem sendo muito utilizado como ferramenta experimental alternativa ao modelo de auto-administração, a fim de investigar os mecanismos neurais subjacentes a adicção e estudar as propriedades reforçadoras positivas e negativas das drogas (Bardo et al., 1995; Fenu et al., 2006). Uma possível desvantagem desse método consiste no pressuposto de que a preferência do animal por um determinado compartimento depende unicamente do pareamento com os efeitos reforçadores positivos da droga, o que prejudica a análise dessa escolha, já que desconsidera a influência de outras variáveis do ambiente ou da droga, que também podem estar afetando a preferência do animal (Tzschentke, 1998). Vale considerar ainda que, em roedores, o efeito do condicionamento observado na CPP varia conforme alguns fatores, como o número de sessões de condicionamento, o intervalo entre as sessões, a natureza do estímulo ambiental, a dose e a via de administração da droga (Tzschentke, 1998).

A fim de estudar adicção de uma forma mais abrangente, modelos comportamentais híbridos tentam envolver aspectos de condicionamento operante e de condicionamento respondente, num paradigma de reforçamento condicionado. Nesse esquema, ao associar estímulos previamente neutros (como luz ou som) a comportamentos de adicção, esses estímulos passam a adquirir propriedades reforçadoras condicionadas à auto-administração (Ator & Griffiths, 2003; Gardner, 2008). Em modelos de restabelecimento de recaída, por exemplo, é permitido ao animal auto-administrar a droga, com subsequente extinção do reforçamento (não mais apresentado até o comportamento de procura pela droga cessar). Em seguida, vários estímulos (exposição a estresse, à própria droga ou a estímulos ambientais previamente associados aos efeitos da droga) são apresentados, a fim de tentar restabelecer a resposta operante inicial (Gerrits et al., 2003; Gardner, 2008).

Labirinto em Cruz Elevado

Nas últimas décadas, o labirinto em cruz elevado (LCE) se estabeleceu como o mais clássico modelo animal de comportamento exploratório utilizado em laboratório (Haller & Alickli, 2012). Esse labirinto foi inicialmente desenvolvido por Handley e Mithani (1984) e foi validado comportamental, fisiológica e farmacologicamente por Pellow, Chopin, File e Briley, em 1985, ganhando um rápido destaque na literatura especializada (Cruz, Frei & Graeff, 1994). Atualmente, o LCE é utilizado como um instrumento confiável e valioso para o estudo da neurobiologia da ansiedade, permitindo selecionar drogas ansiolíticas e ansiogênicas e estudar seus mecanismos de ação (Haller & Alickli, 2012). Sua utilização tem se estendido também para a compreensão das bases biológicas relacionadas à aprendizagem e memória, dor, hormônios, a vários subtipos de transtorno de ansiedade, assim como ao estudo da adicção e abstinência de drogas (Carobrez & Bertoglio, 2005).

O aparato experimental do LCE fica elevado do chão e é composto por dois braços abertos e dois braços fechados (por paredes laterais), opostos entre si. A medida das suas categorias comportamentais reflete o conflito entre a tendência natural dos animais em explorar ambientes novos e em evitar situações potencialmente perigosas (Pellow et al., 1985). O comportamento do animal no LCE é passível de medição através de observação direta, determinando-se as medidas absolutas e relativas de preferência (número de entradas e tempo de permanência) pelos braços abertos e fechados (Pellow et al., 1985).

Pellow et al. (1985) observaram que, ao explorar espontaneamente o LCE na ausência de um reforço explícito, roedores entram significativamente menos e permanecem por menos tempo nos braços abertos, quando comparado aos braços fechados, indicando o caráter aversivo dos braços abertos do LCE. Um aumento significativo no número de entradas e na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos foi observado com a administração de ansiolíticos clinicamente eficazes (como benzodiazepínicos e barbitúricos). Por sua vez, compostos que causam ansiedade em humanos (como cafeína e anfetamina) reduziram, de forma significativa, a porcentagem de entradas e o tempo gasto nos braços abertos (Handley & Mithani, 1984; Pellow et al., 1985; Cruz et al., 1994).

Várias hipóteses foram levantadas para tentar explicar a relutância dos animais a explorar esses compartimentos. Treit, Menard e Royan (1993) demonstraram que a altura do labirinto, por si só, não é responsável pela aversão provocada pelos braços abertos, assim como não é a tigmotaxia, reação de defesa na qual os animais tendem a permanecer próximos

a superfícies verticais (Cardenas, Lamprea & Morato, 2001). Martínez et al. (2002) verificaram que pistas visuais distais presentes nos braços abertos são fundamentais para sua característica aversiva. Segundo Carobrez e Bertoglio (2005), é consenso a necessidade de pelo menos dois ambientes com diferentes níveis de aversão (braços abertos e fechados), para produzir os padrões comportamentais típicos exibidos por roedores no LCE.

O teste no LCE é considerado um modelo animal incondicionado, por envolver a exploração espontânea do ambiente e por envolver situações etologicamente aversivas ao animal. Entretanto, alguns comportamentos aprendidos ocorrem e influenciam o desempenho durante o teste, gerando um aumento gradual do comportamento de evitar o compartimento aversivo (braços abertos) e a decisão de permanecer no local mais seguro (braços fechados) (Carobrez & Bertoglio, 2005). Assim, é possível dizer que o LCE envolve a combinação de mecanismos aversivos condicionados, inatos, proximais e distais, de tal forma que sinais detectados à distância atuam como estímulo aversivo, mantendo o animal distante dos braços abertos (Deakin & Graeff, 1991; Martínez et al., 2002).

A popularidade da utilização do LCE nos laboratórios de psicobiologia é explicada por suas diversas vantagens: economia, rapidez do teste-padrão (cinco minutos), medição convencional rápida e fácil, simplicidade de design, facilidade de uso, sensibilidade bidirecional à droga, não requerimento de treinos prolongados ou privação de água e comida ou mesmo choques elétricos (Rodgers et al., 1997; Carobrez & Bertoglio, 2005). Acima de tudo, o fato da aversão provocada durante o teste envolver uma resposta inata, independente de aprendizagem, carrega um significado etológico muito valioso, permitindo uma análise mais fidedigna das intervenções experimentais (Rodgers et al., 1997).

Apesar da aparente simplicidade da situação de teste, diversas variáveis influenciam os padrões de respostas comportamentais e farmacológicas relacionados à aversividade dos braços abertos (Martinez, Garcia & Morato, 2005). Algumas dessas variáveis são inerentes ao sujeito, como: gênero, idade, linhagem e espécie. Outras estão relacionadas ao procedimento experimental adotado ao utilizar o LCE, tais como: ciclo de luz, condições de alojamento (individual ou em grupo), tempo de permanência no biotério antes do teste, sujeitos ingênuos ou experientes, estresse prévio, manipulações prévias, hora do dia em que o teste é realizado, nível de luminosidade da sala experimental, construção do aparato (cor das paredes, comprimento dos braços, borda nos braços abertos), medidas registradas (convencionais, etológicas) e método de registro (ao vivo, fita ou automatizado) (para uma revisão, ver Hogg, 1996). Tais aspectos metodológicos correspondem às principais fontes de variação entre laboratórios no uso do teste do LCE (Carobrez & Bertoglio, 2005).

O nível de ansiedade está diretamente relacionado à esquivar-se aos braços abertos do LCE, que é geralmente reduzida por drogas ansiolíticas e acentuada por drogas ansiogênicas (Handley & Mithani, 1984; Pellow et al., 1985; Motta & Brandão, 1993; Cruz et al., 1994; Rodgers et al., 1997). As medidas clássicas validadas por Pellow et al. (1985) para verificar o nível de ansiedade no LCE são: o número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados, o total de entradas em ambos os braços e o tempo de permanência em cada compartimento (braços abertos, braços fechados e centro), além das porcentagens de entrada e de tempo nos braços abertos. Todavia, o LCE tem se mostrado bastante complexo em termos de análise comportamental, por envolver uma combinação de comportamentos exploratórios, que refletem ansiedade e atividade geral, influenciados por fatores genéticos e ambientais (Carobrez & Bertoglio, 2005). Esses comportamentos são passíveis de uma análise etofarmacológica, podendo, juntamente com as medidas tradicionais, representar indicadores mais consistentes da exploração no LCE (Blanchard & Blanchard, 1989).

Utilizando análise fatorial, Cruz et al. (1994) propuseram uma ampliação da medição clássica aplicada ao teste do LCE, ao incluir comportamentos e posturas específicos do padrão comportamental defensivo de roedores. O comportamento de espreitamento, por exemplo, caracterizado por uma exploração cautelosa a fim de buscar informações ambientais em situações potencialmente ameaçadoras, consiste em uma importante ferramenta para medir mais precisamente a reatividade emocional em roedores (Blanchard et al., 1993; Rodgers et al., 1997; Carobrez & Bertoglio, 2005). A atividade locomotora também pode influenciar o comportamento no LCE, estando muito relacionada ao número total de entradas nos braços do labirinto e ao número de entradas nos braços fechados (Pellow et al., 1985; Cruz et al., 1994).

Essa nova abordagem das respostas no LCE permite uma análise mais etológica dos dados e a avaliação de um perfil comportamental bem mais abrangente, melhorando a eficiência em discriminar componentes comportamentais observados no teste (Cruz et al., 1994; Carobrez & Bertoglio, 2005). Rodgers et al. (1997) reforçaram a aplicação dessas “novas” medidas, reafirmando que estudos comportamentais devem observar e descrever o repertório comportamental completo dos animais. A utilização dessa análise fornece, assim, uma maior validade ao teste do LCE, aumentando sua utilidade e segurança. Outras vantagens importantes da utilização de medidas etológicas são a maior sensibilidade e especificidade às drogas e a possibilidade de realizar comparações refinadas dentro e entre classes de drogas (Carobrez & Bertoglio, 2005).

Opióides

Os opióides pertencem à classe farmacológica dos analgésicos opióides, substâncias capazes de reduzir dor sem perda de consciência. Além de induzir analgesia, essas drogas produzem sensação de relaxamento, bem-estar e euforia em seres humanos, o que pode levar ao aumento de seu consumo e a eventual morte, em caso de overdose (Meyer & Quenzer, 2005). A palavra ópio é derivada do grego “*opos*”, uma referência ao suco leitoso extraído da cápsula da semente da papoula (*Papaver somniferum*). As substâncias opióides extraídas dessa planta têm sido utilizadas por milhares de anos, tanto na medicina, por seu potente efeito analgésico, como de forma recreacional, por seu efeito euforizante (Brownstein, 1993).

Os primeiros escritos referentes a extratos da papoula com ações opióides foram encontrados no Oriente Médio e datam de 4.000 a.C (Snyder, 1986). Gregos e romanos antigos já conheciam as poderosas propriedades medicinais dessas substâncias, que eram muito utilizadas para tratamento de dor e disenteria (Snyder, 1986; Gerrits et al., 2003). O uso medicinal e recreativo do ópio também era comum na Ásia, especialmente na Índia e na China, onde antros de ópio se disseminaram, e de lá se espalhou para a Europa, a partir do século X, através de peregrinos religiosos das Cruzadas, que se referiam ao ópio como “a cura milagrosa” (Snyder, 1986; Meyer & Quenzer, 2005).

Em 1806, o farmacêutico alemão Friedrich Sertürner isolou um importante princípio ativo da papoula, a morfina, cujo nome deriva-se de Morfeu, o deus dos sonhos (Brownstein, 1993). Com o advento da seringa hipodérmica, a partir de 1853, a morfina pôde ser injetada diretamente na corrente sanguínea, passando a ser utilizada em procedimentos cirúrgicos e no tratamento de dor crônica (Snyder, 1986; Brownstein, 1993). As guerras Civil Americana e Franco-Prussiana foram as grandes responsáveis pela difusão do uso da morfina injetável para analgesia. Contudo, os veteranos dessas guerras se tornaram tão adictos a essa droga que a adicção a morfina passou a ser conhecida como a “doença dos soldados” (Snyder, 1986).

Até o início do século XX, não havia qualquer preocupação em relação à segurança do consumo crônico de opióides, que eram comercializados e consumidos indiscriminadamente. Somente em 1920, a prescrição de opióides foi restrita ao uso medicinal nos Estados Unidos, tornando ilegal seu consumo recreacional (Meyer & Quenzer, 2005). Durante o século XX, várias outras drogas opióides foram sintetizadas com a finalidade de tentar separar suas propriedades analgésicas das propriedades que eliciam adicção. Entre essas drogas estão a heroína, a meperina e a metadona (Brownstein, 1993; Nestler, 2004).

A descoberta de substâncias agonistas e antagonistas opióides seletivas sugeriu a existência de locais específicos de ligação opióide no sistema nervoso central. Drogas antagonistas opióides tinham uma forte relação com as estruturas químicas das drogas agonistas, porém, bloqueavam seletivamente a atividade agonista, revertendo seus efeitos (Snyder, 1986). A partir de então, vários estudos foram realizados, nas décadas de 1960 e 1970, para tentar evidenciar a existência de receptores específicos para essas substâncias (Brownstein, 1993; Nestler, 2004). Utilizando radioligantes altamente seletivos, Pert e Snyder (1973) conseguiram identificar e localizar os receptores cerebrais de diferentes opióides exógenos, que seriam os responsáveis por mediar os efeitos farmacológicos dessas drogas (apud Snyder, 1986). As características de ligação de vários opióides levaram à identificação dos quatro principais subtipos de receptores opióides: μ (mü), κ (kappa), σ (sigma) e δ (delta). Essas descobertas tornaram possível o desenvolvimento de protótipos de ligantes com alta especificidade e afinidade para esses diferentes receptores, capazes de produzir analgesia sem causar muitos efeitos adversos indesejáveis (Gerrits et al., 2003; Meyer & Quenzer, 2005).

Modelos comportamentais permitiram distinguir as diferentes ações farmacológicas desses receptores opióides. Woods e Winger (1987), por exemplo, através do modelo de auto-administração, evidenciaram efeitos distintos de agonistas μ e κ , ao observarem que homens e macacos *rhesus* foram capazes de discriminar quando receberam um ou outro desses agonistas, indicando a ativação de estados diferentes. Os agonistas μ demonstraram ter um efeito reforçador, enquanto que agonistas κ tiveram efeitos aversivos. O receptor μ é considerado o local primário da ação reforçadora dos opióides (Di Chiara & North, 1992). Estudos pré-clínicos revelaram que camundongos sem esses receptores não demonstraram função de reforçamento, nem síndrome de abstinência de opióides (Le Merrer, Becker & Befort, 2009). Estudos de imagem comprovaram um aumento significativo de receptores μ em indivíduos em abstinência de opióides, álcool ou cocaína (apud Hughes et al., 2010).

Uma vez confirmado que opióides de fato agem através de receptores específicos, os pesquisadores sugeriram a existência de um sistema opióide endógeno, que justificaria a existência de receptores cerebrais para os derivados da papoula (Meyer & Quenzer, 2005). Hughes et al. (1975) verificaram que extratos do tecido cerebral de mamíferos eram capazes de reproduzir o efeito da morfina numa preparação isolada do intestino de uma cobaia. Esses autores, então, identificaram e determinaram a estrutura química das substâncias contidas nesses extratos, que foram chamadas de encefalinas. A partir daí, outros peptídeos endógenos com propriedades de agonistas opióides foram sendo identificados, como as endorfinas e as dinorfinas (Meyer & Quenzer, 2005).

Essas descobertas influenciaram consideravelmente a pesquisa neurobiológica da adicção a drogas, ao comprovarem a participação de um sistema opióide endógeno nas propriedades reforçadoras de opióides (Gerrits et al., 2003). Dessa forma, exposições repetidas a essa classe de drogas refletem uma rápida e profunda alteração na neuroplasticidade de sistemas dopaminérgicos e de sistemas não-dopaminérgicos. Assim como outras drogas que eliciam adicção, o consumo de opióides é positivamente reforçado pelo aumento da liberação de dopamina no NAc (Koob, 1992; Nestler, 2004). Essas drogas exercem ainda uma ação reforçadora, de natureza modulatória, mediada pelos diferentes subtipos de receptores opióides, localizados nos neurônios GABAérgicos da VTA, com projeção para os neurônios dopaminérgicos do NAc (Koob, 1992).

Ao ativarem esses receptores, que são acoplados a proteínas G, os opióides inibem a atividade da adenilato ciclase e a formação de AMPc, alterando a transcrição gênica da célula (Di Chiara & North, 1992). A abertura de canais de potássio hiperpolariza o neurônio, inibindo o disparo do potencial de ação e produzindo efeitos inibitórios sobre os neurônios inibitórios GABAérgicos. Assim, através da inibição da inibição GABAérgica nos neurônios dopaminérgicos da VTA, os opióides são capazes de ativar indiretamente a transmissão dopaminérgica, gerando a maior parte dos efeitos da administração sistêmica de opióides (Gerrits et al., 2003; Meyer & Quenzer, 2005; Hughes et al., 2010).

Essas propriedades reforçadoras positivas das substâncias opióides são fundamentais para a aquisição, a manutenção e a recaída à adicção. As alterações na transmissão dopaminérgica do circuito de recompensa, com a administração crônica de opióides, ainda estão relacionadas à redução da responsividade neuronal, podendo levar ao desenvolvimento de tolerância a efeitos opióides específicos, como analgesia e as propriedades depressoras (Nestler, 2004; Meyer & Quenzer, 2005).

A adicção a opióides é uma condição crônica complexa, caracterizada pela procura e pelo consumo compulsivo da droga, mesmo com suas conseqüências adversas, que envolvem o surgimento de um estado emocional negativo, após a interrupção do uso contínuo da droga (Koob et al., 1998). Essa pronunciada expressão física de angústia, característica da síndrome de abstinência, é precipitada pelo fato da adenilato ciclase não ser mais inibida na ausência da droga (Meyer & Quenzer, 2005). Os sintomas de abstinência a opióides são geralmente de natureza contrária aos seus efeitos agudos. Assim, se o consumo crônico de morfina – que normalmente induz euforia, sonolência e alívio de dor – é interrompido, seu estado de abstinência será caracterizado por depressão, irritabilidade, insônia e hipersensibilidade a estímulos dolorosos (Meyer & Quenzer, 2005).

Em roedores, a abstinência de opióides resulta em estados aversivos em modelos animais, os quais são geralmente caracterizados por supressão da resposta operante, redução da exploração, aumento da resposta a estressores em modelos de ansiedade, aumento dos limiares de reforçamento e aversão condicionada por lugar (Koob, 2000). Além disso, são comuns sinais somáticos como saltos, ranger de dentes, tremor de patas, perda de peso, hiperalgesia e diarreia (Koob, 1992). Esse estado de disforia pode ser relativamente suprimido pelo consumo da droga, através de reforçamento negativo, no qual a motivação para consumir a droga é resultado do desejo de evitar ou aliviar os efeitos aversivos induzidos por sua abstinência (Di Chiara & North, 1992; Koob, 2000; Gerrits et al., 2003). Assim, a presença ou a expectativa dos sintomas de abstinência atuam como importantes reforçadores da manutenção da adicção e da recaída ao uso de opióides (Lu et al., 2005; Rico et al., 2009).

Vários estudos têm comprovado que a transmissão opióide participa dos comportamentos de recaída e dos processos de aprendizagem e memória envolvidos no desenvolvimento de associação entre drogas e contextos ambientais (Lu et al., 2005; Patti et al., 2006). Dessa forma, o processo de adicção a opióides resulta de processos de adaptação e aprendizagem envolvendo mecanismos de reforçamento positivo e negativo (Di Chiara & North, 1992; Morón et al., 2010). Por essa razão, os modelos de auto-administração e CPP são os mais utilizados para estudar adicção a opióides.

Quando administrada diretamente na VTA e no NAc, a morfina demonstrou induzir auto-administração e preferência por lugar, além de aumentar atividade locomotora (apud Di Chiara & North, 1992). A administração de β -endorfina, via intracerebroventricular, também induziu CPP em ratos (Meyer & Quenzer, 2005). Consistente com esses dados, antagonistas opióides, principalmente dos receptores μ , produziram aversão por lugar ou reverteram auto-administração em animais não-adictos (Stinus et al., 2005).

Estudos utilizando CPP demonstraram que um contexto previamente pareado com morfina intraperitoneal (1,0 e 5,0 mg/kg) adquire propriedades reforçadoras similares às induzidas pela própria droga, na ausência da mesma (Mucha e Iversen, 1984; Bardo et al., 1995). Mucha e Iversen (1984) observaram que a magnitude da preferência por esses contextos ambientais é diretamente proporcional ao número de condicionamentos realizados. Pesquisas adicionais verificaram que a exposição a estímulos estressores (como choques inevitáveis ou droga ansiogênica), antes do condicionamento com morfina, aumenta a expressão da preferência pelo compartimento pareado com a droga, além de facilitar a recaída ao consumo (Bartoletti et al., 1990). Um efeito oposto foi observado com a administração de anfetamina, droga considerada ansiogênica (Will, Watkins & Maier, 1998).

O fato de a exposição a eventos estressores aumentar a magnitude do efeito do condicionamento pode estar relacionado às propriedades ansiolíticas da morfina. Através da administração de morfina intraperitoneal (0,3 mg/kg) e intracraniana na substância cinzenta periaquedutal dorsal (10 nmol), Motta e Brandão (1993) verificaram o aumento da exploração (porcentagem de entradas e de tempo gasto) de ratos nos braços abertos do LCE, sugerindo que doses baixas de morfina produzem uma ação ansiolítica, através da inibição de substratos neurais de aversão. Estudos posteriores, também utilizando modelos animais de ansiedade, confirmaram os efeitos ansiolíticos da morfina e de outros opióides (Anseloni, 1999; Sasaki et al., 2002; Kahveci, Gulec & Ozluk, 2006; Rezayof, Hosseini & Zarrindast, 2009). Esses resultados sugerem que as propriedades ansiolíticas da morfina caracterizam um mecanismo de reforçamento negativo, importante para o processo de aprendizagem no estado de adicção.

A interrupção da administração crônica de morfina, tanto espontaneamente, como precipitada pela administração do antagonista opióide naloxona, bloqueia as ações ansiolíticas dessa droga em ratos, eliciando intensas reações de medo incondicionado, representadas por aversão condicionada por lugar (Ávila et al., 2008) e por efeitos ansiogênicos no teste do LCE (Glover & Davis, 2008). Coletivamente, esses resultados corroboram para a participação do sistema opióide na modulação de comportamentos relacionados a medo e ansiedade (Motta, Penha & Brandão, 1995; Sasaki et al., 2002; Glover & Davis, 2008). Koob et al. (2009) defendem que os modelos animais mais relevantes atualmente a serem estudados no campo da adicção a drogas são aqueles relacionados ao reforçamento negativo e aos componentes motivacionais de abstinência, os quais envolvem aversão condicionada por lugar, respostas de ansiedade e aumento de auto-administração induzido por abstinência.

A partir de um procedimento de CPP, Fava (2009) pareou duas vezes injeções intraperitoneais de morfina (0,3, 1,0, 5,0 e 10,0 mg/kg) ao confinamento nos braços abertos do LCE, enquanto, de forma alternada, injeções de salina foram pareadas ao confinamento nos braços fechados (com exposição única dos ratos a cada braço do labirinto). Após a fase de condicionamento, o teste-padrão no LCE ocorreu sem administração de droga e revelou que o condicionamento com 1,0 e 5,0 mg/kg de morfina atenuou a aversão aos braços abertos observada no grupo controle, o que não ocorreu de forma significativa na dose ansiolítica de 0,3 mg/kg de morfina. Esses resultados sugerem que o LCE pode ser empregado para estudar adicção, na medida em que esse paradigma permite investigar os efeitos reforçadores de drogas, como a morfina (Fava, 2009).

OBJETIVOS

A fim de ampliar a compreensão dos efeitos comportamentais e neuroquímicos resultantes do processo de adicção a drogas e desenvolver terapias mais eficazes para o tratamento e a prevenção dessa psicopatologia, são necessários modelos animais que permitam estudar tanto as propriedades reforçadoras positivas das drogas, quanto as propriedades reforçadoras negativas. O fato dos modelos animais de adicção utilizados atualmente apresentarem consideráveis limitações corrobora para a necessidade de desenvolver novos modelos e estratégias experimentais com um caráter mais etológico, capazes de avaliar a influência de estímulos ambientais e das propriedades reforçadoras negativas das drogas sobre a aquisição de comportamentos relacionados à adicção.

A confirmação das propriedades ansiolíticas de baixas doses de morfina (Motta & Brandão, 1993) e a atenuação da aversão aos braços abertos do LCE após o condicionamento com doses reforçadoras de morfina (Fava, 2009) ampliaram a possibilidade de utilizar procedimentos de condicionamento no LCE para investigar a influência dos efeitos reforçadores negativos sobre o processo de aquisição de adicção a drogas. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi estender os achados anteriores, ao verificar a influência do aumento do número de pareamentos de morfina intraperitoneal com os braços abertos do LCE, compartimentos naturalmente aversivos ao comportamento exploratório de ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sujeitos

Foram utilizados como sujeitos experimentais setenta e dois (72) ratos Wistar machos, experimentalmente ingênuos, pesando entre 240 e 290 gramas (50 a 60 dias de idade) no dia do teste no LCE. Esses animais, provenientes do biotério do Grupo Bioagri (Planaltina - DF), permaneceram no biotério do Laboratório de Psicobiologia da Universidade de Brasília por, no mínimo, 72 horas antes do início das sessões de condicionamento e durante todo protocolo experimental. Grupos de cinco ou seis ratos foram alojados em gaiolas-viveiro de polietileno (50 x 35 x 15 cm) contendo maravalha, trocada de dois em dois dias para limpeza das gaiolas. Os ratos tiveram livre acesso a água e comida e foram mantidos sob um ciclo de claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 07:00 horas) e sob temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1$, controlada por um sistema de troca de ar forçada com resfriamento.

Droga

A solução de sulfato de morfina (10,0 mg/ml, Dimorf®, Cristália, Brasil) foi diluída em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%, Equiplax, Brasil) nas seguintes concentrações: 0,3, 1,0 e 5,0 mg/ml. A fim de garantir as características físico-químicas da droga, cada diluição foi preparada 24 horas antes do início da primeira sessão de condicionamento, sendo utilizada em, no máximo, quatro sessões consecutivas. Essas diluições da droga foram colocadas em vidros âmbar, devidamente rotulados e envolvidos por papel alumínio, sendo armazenadas em freezer (-20°C) e retiradas com antecedência, para garantir que estivessem em temperatura ambiente durante a administração, sendo, em seguida, agitadas manualmente. As soluções de morfina ou salina foram injetadas por via intraperitoneal (i.p.) (na proporção de 1,0 ml/kg), cinco minutos antes das sessões de condicionamento no LCE. A escolha das doses e do tempo de início de ação foi baseada em estudos anteriores (Motta & Brandão, 1993; Fava, 2009).

Equipamentos

Labirinto em Cruz Elevado

Um LCE de madeira tratada (Insight Equipamentos Ltda.) foi utilizado como aparato experimental, consistindo em dois braços abertos e opostos (50 x 10 cm) e outros dois braços opostos, de mesmo tamanho, fechados com paredes laterais de 40 cm de altura. Os braços abertos e fechados, elevados a 40 cm do chão, cruzavam-se perpendicularmente, formando uma área central de 10 cm². As laterais dos braços abertos possuíam uma borda de acrílico de 1 cm de altura, a fim de evitar a queda dos animais. Esse instrumento foi alocado de forma fixa em uma sala experimental (1,80 m x 1,50 m) com isolamento acústico. Durante a fase piloto, uma iluminação vermelha foi testada, porém, os resultados preliminares revelaram pouca aversão dos animais aos braços abertos. Por esse motivo, foi ajustada ao protocolo experimental a iluminação constante de duas lâmpadas fluorescentes brancas (32W/64 RS) fixadas no teto da sala do LCE. Cada braço do labirinto foi enumerado para sua devida identificação (braço aberto 1 e braço aberto 2, braço fechado 1 e braço fechado 2). Para as sessões de condicionamento, cada um desses braços foi isolado por um sistema de guilhotina, que tornava inacessível a plataforma central do LCE (Figura 1).

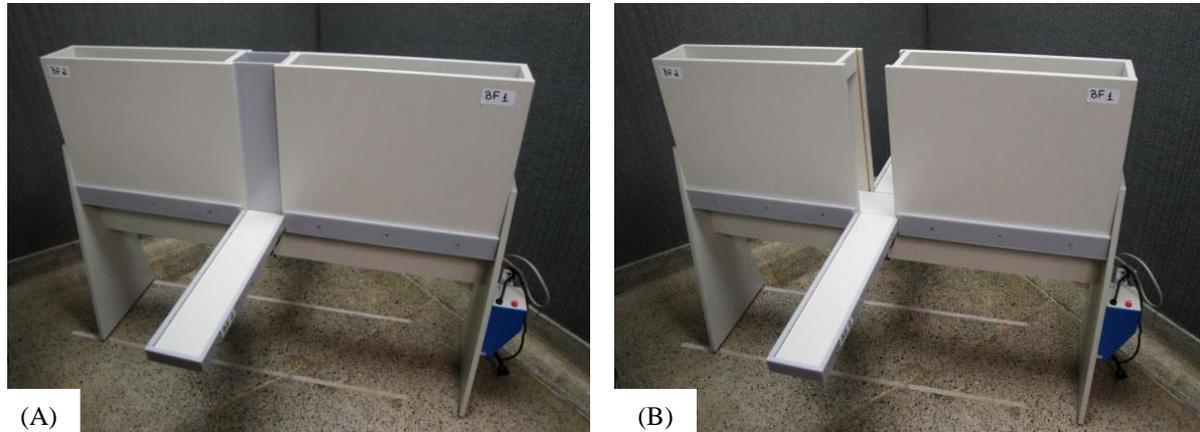


Figura 1 - (A) LCE adaptado para as sessões de condicionamento, através da utilização de um sistema de guilhotina que isolava os braços abertos e fechados. (B) Forma padrão do LCE utilizada durante os testes.

Sistema Filmadora-Computador

Todos os testes foram registrados por uma filmadora (Sony® HandyCam HDR-CX360), localizada verticalmente acima do labirinto e conectada a um computador instalado em uma sala adjacente à sala experimental. Os vídeos produzidos permitiram análise posterior com o auxílio de um software de análise comportamental no LCE (PlusMZ®, v. 1.1, UFRN).

Procedimento

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais, contendo doze ratos cada. O grupo controle (MO 0,0) foi constituído por animais que receberam apenas injeções i.p. de salina antes do condicionamento tanto aos braços abertos, quanto aos braços fechados do LCE, totalizando oito injeções de salina. Já os grupos de morfina (MO 0,3; MO 1,0; MO 5,0; MO 10,0) foram formados por animais que receberam injeções i.p. de morfina (nas doses de 0,3, 1,0, 5,0 e 10,0 mg/kg, respectivas aos grupos), quando condicionados aos braços abertos, e injeções i.p. de salina, quando condicionados aos braços fechados do LCE. No total, cada grupo de morfina recebeu quatro injeções de morfina e quatro injeções de salina. A fim de verificar o efeito do condicionamento, um grupo denominado sem condicionamento (s/cond) passou pelo mesmo protocolo experimental do grupo controle (com a administração de oito injeções i.p. de salina), com exceção, porém, das sessões de condicionamento no LCE, já que esse grupo foi exposto ao labirinto apenas no dia do teste.

Condicionamento

O esquema de condicionamento empregado no presente trabalho foi baseado em trabalhos clássicos (Mucha & Iversen, 1984) e mais recentes (Bardo et al., 1995) de preferência condicionada por lugar (CPP). O condicionamento consistiu em quatro sessões no turno da manhã (entre 08:00 e 11:00 horas) e quatro no turno da tarde (entre 14:00 e 17:00 horas), durante quatro dias consecutivos. No mínimo 30 minutos antes do início dessas sessões, os grupos de animais foram transportados para a sala adjacente à sala experimental para ambientação. Nas manhãs dos quatro dias, os animais pertencentes ao grupo controle receberam injeções i.p. de salina, enquanto os pertencentes aos grupos de morfina receberam injeções i.p. das doses de morfina respectivas a cada grupo. Após cinco minutos, cada rato foi colocado na porção proximal de um determinado *braço aberto* (1 ou 2) do LCE, onde ficou confinado durante 20 minutos. A fim de evitar o contato direto com os animais não condicionados, após as sessões de condicionamento, os ratos foram alojados em uma gaiola individual, com as mesmas condições das gaiolas-viveiro, até o término da próxima sessão de condicionamento, o que também foi realizado com o grupo sem condicionamento, após as injeções i.p. de salina. Nas tardes dos quatro dias, todos os animais receberam injeções i.p. de salina e, após cinco minutos, foram confinados em um determinado *braço fechado* (1 ou 2) do LCE, durante 20 minutos, seguindo o mesmo protocolo do período da manhã.

Esse esquema visava o condicionamento primário ao compartimento naturalmente aversivo de interesse, representado pelos braços abertos do labirinto. Para garantir que os animais fossem condicionados de forma equivalente, o confinamento em cada braço aberto (1 e 2) e fechado (1 e 2) foi alternado em dias alternados. No total, foram realizadas oito sessões de condicionamento, sendo, para os grupos de morfina, quatro sessões com morfina nos braços abertos (duas em cada um dos braços). A Tabela 1 apresenta o tratamento administrado a cada grupo experimental durante a fase de condicionamento.

Tabela 1 - Condicionamento dos animais aos braços do LCE: tratamento administrado a cada grupo e braço respectivo a cada dia de condicionamento. BA: braço aberto; BF: braço fechado; MO: morfina.

GRUPOS	1º Dia		2º Dia		3º Dia		4º Dia	
	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
S/Cond.	Salina	Salina	Salina	Salina	Salina	Salina	Salina	Salina
MO 0,0	Salina	Salina	Salina	Salina	Salina	Salina	Salina	Salina
	BA 1	BF 1	BA 2	BF 2	BA 1	BF 1	BA 2	BF 2
MO 0,3	Morfina 0,3	Salina						
	BA 1	BF 1	BA 2	BF 2	BA 1	BF 1	BA 2	BF 2
MO 1,0	Morfina 1,0	Salina						
	BA 1	BF 1	BA 2	BF 2	BA 1	BF 1	BA 2	BF 2
MO 5,0	Morfina 5,0	Salina						
	BA 1	BF 1	BA 2	BF 2	BA 1	BF 1	BA 2	BF 2
MO 10,0	Morfina 10,0	Salina						
	BA 1	BF 1	BA 2	BF 2	BA 1	BF 1	BA 2	BF 2

Teste

Após as sessões de condicionamento, todos os sujeitos passaram pelo mesmo procedimento de teste, que ocorreu entre as 09:00 e 12:00 horas. Nessa fase, os animais, sem qualquer tratamento, foram colocados individualmente no centro do LCE (sem o sistema de guilhotina), com a cabeça direcionada para um dos braços fechados e podiam explorar livremente todo o aparato durante cinco minutos. Entre um animal e outro era realizada a assepsia do labirinto com algodão e álcool diluído a 20%. Todos os testes foram registrados identificando a data e o grupo do animal testado (Figura 2).



Figura 2 - Todos os testes foram registrados identificando a data e o grupo do animal testado.

As seguintes medidas comportamentais clássicas foram consideradas para análise: (1) número de entradas nos braços abertos; (2) número de entradas nos braços fechados; (3) número total de entradas; (4) tempo de permanência nos braços abertos; (5) tempo de permanência nos braços fechados; e (6) tempo de permanência no centro do LCE. Uma entrada em um dos braços do labirinto foi considerada somente quando as quatro patas do animal atravessavam o limite daquele braço. Foram consideradas ainda a (7) porcentagem de entradas nos braços abertos e a (8) porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos do LCE, calculadas conforme as seguintes fórmulas:

$$\% \text{ Entradas nos Braços Abertos} = \frac{\text{Entradas nos Braços Abertos}}{(\text{Entradas nos Braços Abertos} + \text{Entradas nos Braços Fechados})} \times 100$$

$$\% \text{ Tempo nos Braços Abertos} = \frac{\text{Tempo nos Braços Abertos}}{(\text{Tempo nos Braços Abertos} + \text{Tempo nos Braços Fechados})} \times 100$$

As medidas etológicas selecionadas para a análise deste estudo foram: (9) tempo de esquadramento; (10) frequência de exploração das extremidades dos braços abertos e (11) tempo de espreitamento. A escolha dessas medidas foi baseada no trabalho de Cruz et al. (1994) que, através de uma análise etofarmacológica do teste do LCE, verificaram que esses comportamentos são indicadores de estados aversivos em ratos. O esquadramento foi considerado ao mensurar o tempo em que o animal projetava a cabeça sobre as laterais dos braços abertos do labirinto, examinando em qualquer direção, o que incluía mergulhos de cabeça/ombros, movimentos exploratórios sobre as laterais ou extremidades do braço aberto, em direção ao chão. Para a exploração das extremidades foi considerada a frequência em que o animal alcançava as extremidades dos braços abertos. O tempo de espreitamento foi medido quando o animal saía parcialmente de um braço fechado (somente com a cabeça e as patas dianteiras), avaliando os arredores e, geralmente, esticando todo o corpo.

Vale considerar, por fim, que o projeto de pesquisa do presente estudo foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, cuja declaração encontra-se em anexo (ver Anexos).

Análise Estatística

Os resultados dos testes no LCE, expressos como média + erro padrão da média (EPM), foram submetidos à análise de variância de um fator (One-way ANOVA), para acessar a significância das diferenças entre os grupos experimentais. O teste *post-hoc* de Dunnett foi aplicado para comparar os grupos experimentais (s/cond, MO 0,3, MO 1,0, MO 5,0 e MO 10,0) com o grupo controle. Os valores de p inferiores a 5% ($p < 0,05$) foram considerados significativos nessa análise.

RESULTADOS

O gráfico da Figura 3 ilustra o efeito do condicionamento sobre o número absoluto de entradas nos braços abertos e fechados e sobre o número total de entradas, durante o teste no LCE. A análise de variância de um fator (One-way ANOVA) revelou diferenças significativas entre os grupos para o número de entradas nos braços fechados ($F_{5,66} = 4,00$, $p < 0,01$) e para o número total de entradas em ambos os braços ($F_{5,66} = 3,44$, $p < 0,01$), mas não houve diferença significativa para o número de entradas nos braços abertos ($F_{5,66} = 1,69$, $p > 0,05$). É importante destacar que a análise *post-hoc* de Dunnett não evidenciou diferença significativa estatisticamente entre o grupo controle (MO 0,0) e o grupo sem condicionamento (s/cond) em nenhum dos parâmetros estudados ($p > 0,05$). Tais resultados indicam que a exposição dos animais controle aos braços abertos e fechados do LCE, por quatro dias consecutivos, não afetou nem a atividade locomotora, nem a aversão desses animais aos braços abertos.

Quando o grupo controle é comparado aos grupos de morfina, é possível observar uma tendência à formação de uma curva em forma de U invertido, visto que todos os grupos condicionados com morfina apresentaram um número total de entradas maior que o do grupo controle, certamente devido à tendência de aumento gradual das entradas nos braços abertos em relação às entradas nos braços fechados, observada até a dose de 1,0 mg/kg de morfina. Isso é corroborado pelo teste de Dunnett, que revelou que o condicionamento com 1,0 mg/kg de morfina foi o único a aumentar, de forma significativa, o número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados ($p < 0,05$ para ambos), assim como o número total de entradas ($p < 0,01$), quando comparado ao grupo controle. Dessa forma, o efeito produzido pelo pareamento de 1,0 mg/kg de morfina com os braços abertos do LCE reflete muito provavelmente um aumento significativo da atividade locomotora, representado pelo aumento da exploração desses animais no LCE.

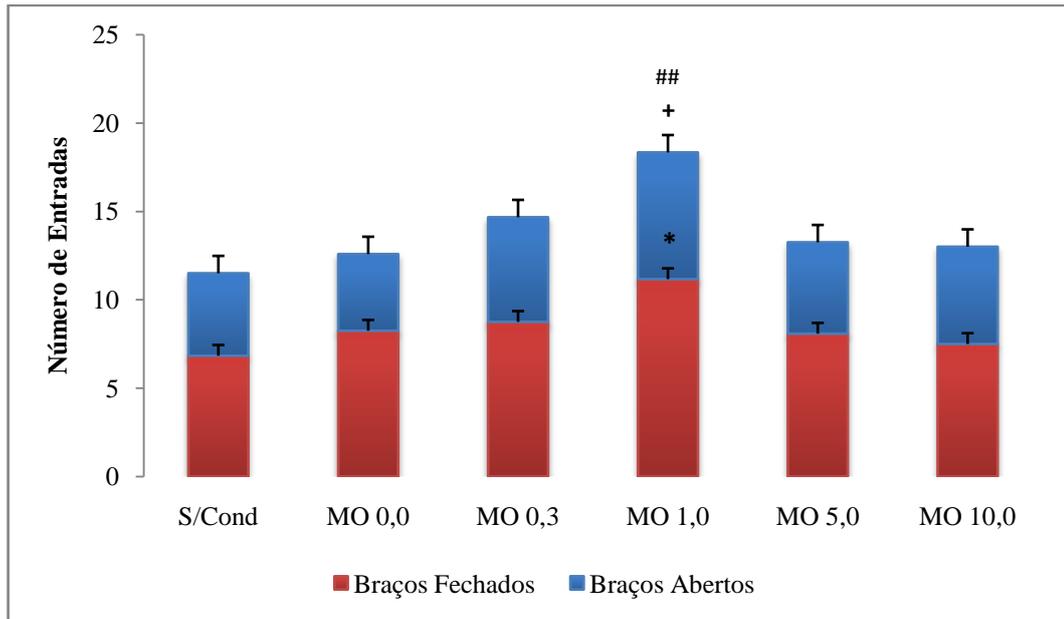


Figura 3 - Número de entradas nos braços fechados (barras vermelhas) e abertos (barras azuis) e número total de entradas (barras azuis + barras vermelhas). S/cond: animais submetidos ao teste do LCE sem condicionamento prévio. MO 0,0: animais submetidos ao teste do LCE após sessões de condicionamento aos braços abertos e fechados com salina. MO (0,3, 1,0, 5,0 e 10,0): animais submetidos ao teste do LCE após sessões de condicionamento aos braços abertos com morfina, respectivamente nas doses 0,3, 1,0, 5,0 e 10,0 mg/kg, e aos braços fechados com salina. Os valores estão apresentados como média + EPM (n = 12). * $p < 0,05$ para número de entradas nos braços fechados; + $p < 0,05$ para número de entradas nos braços abertos; e ## $p < 0,01$ para número total de entradas, quando comparado ao grupo controle. One-way ANOVA seguida por teste de Dunnett.

A Figura 4 representa o efeito do condicionamento sobre o tempo de permanência de cada grupo de animais nos diferentes compartimentos do LCE. A One-way ANOVA mostrou diferenças significativas entre os grupos no que se refere ao tempo gasto nos braços fechados ($F_{5,66} = 2,72$, $p < 0,05$) e ao tempo no centro do LCE ($F_{5,66} = 5,01$, $p < 0,01$). Porém, essas diferenças não foram significativas para o tempo gasto nos braços abertos do labirinto ($F_{5,66} = 1,45$, $p > 0,05$). Ao comparar o grupo controle (MO 0,0) com o grupo sem condicionamento (s/cond), a análise *post-hoc* de Dunnett revelou efeito significativo apenas para o aumento do tempo gasto no centro, verificado no grupo que não foi previamente condicionado ($p < 0,01$). Esse resultado indica que o condicionamento aos braços do LCE somente com injeção de salina reduz o conflito entre explorar ou não os braços abertos, representado pela redução do tempo no centro, o que pode envolver processos de aprendizagem resultantes das sucessivas exposições dos animais controle a esses ambientes naturalmente aversivos.

Em relação aos animais condicionados aos braços abertos com doses de morfina, o teste de Dunnett revelou que o tempo nos braços fechados foi significativamente reduzido nos grupos condicionados com 0,3 e 1,0 mg/kg de morfina ($p < 0,05$ para ambos), quando comparado ao grupo controle. Isso poderia indicar um aumento na exposição ao risco e,

assim, uma possível redução dos efeitos aversivos provocados pelos braços abertos. Por sua vez, o tempo despendido no centro do labirinto foi aumentado de forma significativa no grupo condicionado com 1,0 mg/kg de morfina ($p < 0,01$), quando comparado ao grupo controle. Esse resultado sugere que o condicionamento com essa dose de morfina resgata o conflito dos animais em explorar os braços abertos ou não durante o teste no LCE, o qual havia sido reduzido no grupo controle.

Apesar de não ter expressado significância ($p > 0,05$), o tempo despendido nos braços abertos pelo grupo controle foi inferior ao tempo apresentado por todos os grupos condicionados com morfina, cuja maior diferença pode ser observada no grupo condicionado com 0,3 mg/kg de morfina, tendendo a reduzir gradualmente a partir dessa dose. Um processo inverso ocorre em relação ao tempo nos braços fechados, a partir das doses de 0,3 e 1,0 mg/kg de morfina. Esses resultados podem representar um efeito do condicionamento com a droga, já que a exposição dos grupos de morfina ao teste no LCE, na ausência da administração da droga, aumentou a exploração dos compartimentos previamente pareados com ela (braços abertos), quando comparado ao grupo controle. Dessa forma, seria possível investigar os efeitos reforçadores negativos resultantes do processo de condicionamento com morfina.

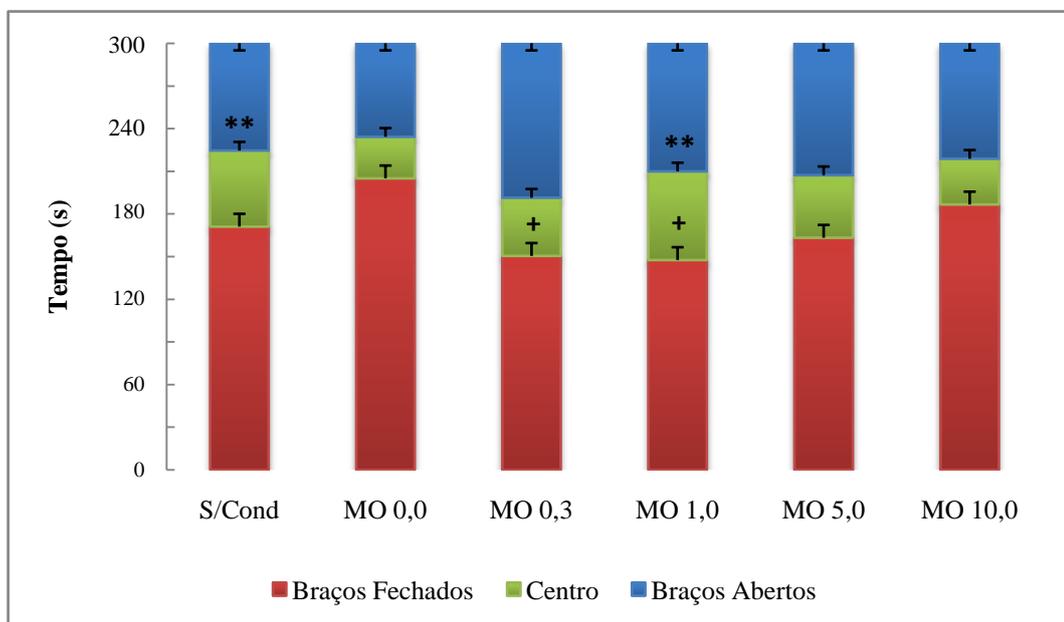


Figura 4 - Tempo de permanência nos braços fechados (barras vermelhas), no centro (barras verdes) e nos braços abertos (barras azuis) do LCE. S/cond: animais submetidos ao teste do LCE sem condicionamento prévio. MO 0,0: animais submetidos ao teste do LCE após sessões de condicionamento aos braços abertos e fechados com salina. MO (0,3, 1,0, 5,0 e 10,0): animais submetidos ao teste do LCE após sessões de condicionamento aos braços abertos com morfina, respectivamente nas doses 0,3, 1,0, 5,0 e 10,0, e aos braços fechados com salina. Os valores estão apresentados como média + EPM ($n = 12$). + $p < 0,05$ para tempo nos braços fechados e ** $p < 0,01$ para tempo no centro do LCE, quando comparado ao grupo controle. One-way ANOVA e teste de Dunnett.

O gráfico da Figura 5 demonstra o efeito do condicionamento sobre as porcentagens de entradas e de tempo despendido nos braços abertos do LCE. Ao analisar os valores absolutos da média do grupo controle (MO 0,0: 32,58 % \pm 2,39 para entradas e 24,65 % \pm 3,70 para tempo nos braços abertos) com os valores dos demais grupos, verifica-se uma menor tendência do grupo controle em relação ao grupo sem condicionamento e aos grupos de morfina. Isso poderia revelar que a exposição aos braços abertos por quatro vezes, durante 20 minutos, aumenta a aversão etológica dos animais controle aos braços abertos. Cabe ressaltar que uma maior tendência para diferença significativa é observada no grupo condicionado com 0,3 mg/kg de morfina (MO 0,3: 41,03 % \pm 3,66 para entradas e 41,34 % \pm 5,05 para tempo nos braços abertos). Todavia, a One-way ANOVA não revelou efeitos significativos para as porcentagens de entradas e de tempo nos braços abertos ($F_{5,66} = 0,97$ e $F_{5,66} = 1,57$, respectivamente; $p > 0,05$ para ambos). Esses resultados, analisados juntamente com os efeitos observados nas figuras 3 e 4, reforçam a hipótese de que o pareamento de morfina com os braços abertos do LCE tenha promovido um efeito locomotor, sem alterar os índices clássicos de ansiedade.

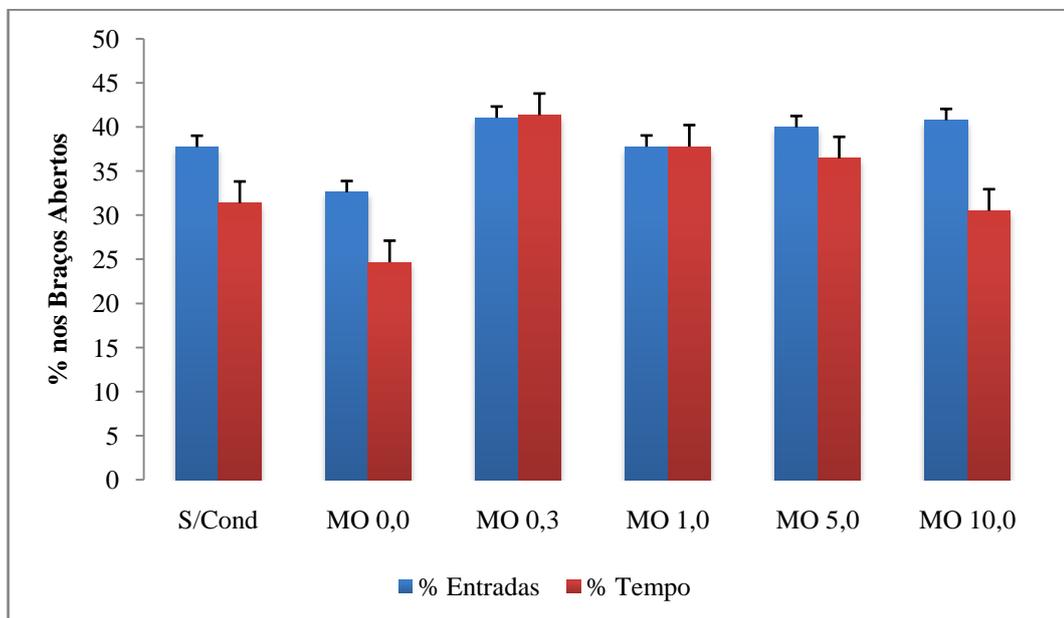


Figura 5 - Porcentagem de entradas (barras azuis) e porcentagem de tempo de permanência (barras vermelhas) nos braços abertos do LCE. S/cond: animais submetidos ao teste do LCE sem condicionamento prévio. MO 0,0: animais submetidos ao teste do LCE após sessões de condicionamento aos braços abertos e fechados com salina. MO (0,3, 1,0, 5,0 e 10,0): animais submetidos ao teste do LCE após sessões de condicionamento aos braços abertos com morfina, respectivamente nas doses 0,3, 1,0, 5,0 e 10,0 mg/kg, e aos braços fechados com salina. Os valores estão apresentados como média + EPM (n = 12). One-way ANOVA seguida por teste de Dunnett.

A Figura 6 ilustra as medidas etológicas selecionadas para a análise etofarmacológica do efeito do condicionamento aos braços abertos do LCE com diferentes doses de morfina. A One-way ANOVA revelou efeitos significativos sobre os tempos de esquadramento ($F_{5,66} = 3,09$, $p < 0,05$) e de espreitamento ($F_{5,66} = 3,21$, $p < 0,05$), mas não sobre a frequência de exploração das extremidades dos braços abertos ($F_{5,66} = 0,98$, $p > 0,05$). A análise *post-hoc* de Dunnett, por sua vez, mostrou que nenhum desses parâmetros sofreu diferenças significativas ao comparar o grupo controle com o grupo sem condicionamento ($p > 0,05$), corroborando para o fato de que o condicionamento não alterou a aversão dos animais controle aos braços abertos do LCE. O teste de Dunnett mostrou também que o tempo de esquadramento foi significativamente aumentado pelo condicionamento com 0,3 mg/kg de morfina ($p < 0,01$), enquanto que o tempo de espreitamento foi reduzido nos grupos condicionados com as doses de 1,0 e 5,0 mg/kg de morfina ($p < 0,05$ para ambos). Apesar dos expressivos erros-padrão observados na análise dessas medidas, esses resultados indicam um possível reflexo da redução da aversão aos braços abertos, através do condicionamento com os efeitos reforçadores dessas diferentes doses de morfina.

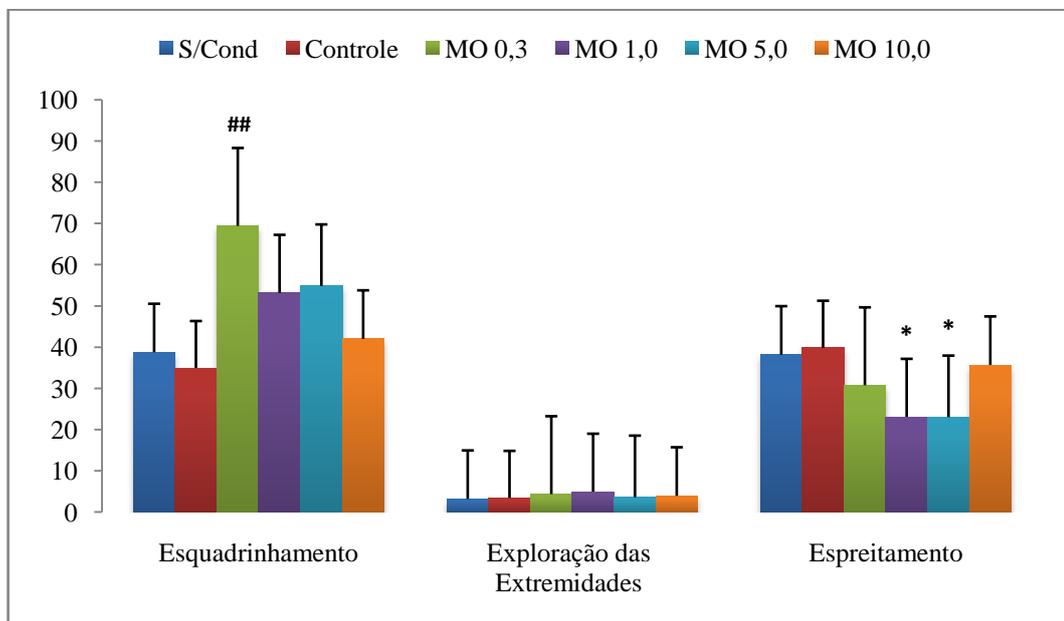


Figura 6 - Tempo de esquadramento e de espreitamento e frequência de exploração das extremidades dos braços abertos do LCE. S/cond: animais submetidos ao teste do LCE sem condicionamento prévio. MO 0,0: animais submetidos ao teste do LCE após sessões de condicionamento aos braços abertos e fechados com salina. MO (0,3, 1,0, 5,0 e 10,0): animais submetidos ao teste do LCE após sessões de condicionamento aos braços abertos com morfina, respectivamente nas doses 0,3, 1,0, 5,0 e 10,0 mg/kg, e aos braços fechados com salina. Os valores estão apresentados como média + EPM (n = 12). ## $p < 0,01$ para esquadramento e * $p < 0,05$ para espreitamento, quando comparado ao grupo controle. One-way ANOVA seguida por teste de Dunnett.

DISCUSSÃO

A adicção é uma doença crônica geralmente caracterizada pelo desenvolvimento de compulsão pela droga e síndrome de abstinência resultante de sua retirada. O papel reforçador das drogas é fundamental em todas as fases desse processo, influenciando desde a aquisição até a recaída ao consumo. A literatura propõe que os comportamentos associados à adicção são adquiridos em função dos efeitos reforçadores positivos e mantidos em função dos efeitos reforçadores negativos das drogas (Koob, 1992). Por outro lado, tem sido levantada a possibilidade dessas substâncias também eliciarem adicção em função de suas propriedades reforçadoras negativas (Will, Watkins & Maier, 1998).

Os opióides vêm se consolidando como importantes ferramentas para investigar a ação desses efeitos reforçadores negativos sobre o desenvolvimento de adicção (Koob, 2000). A comprovação das ações ansiolíticas de baixas doses de morfina (Motta & Brandão, 1993) revelou um envolvimento de mecanismos de reforçamento negativo e de processos de aprendizagem na consolidação do estado de adicção. Brandão (1993) propôs um modelo hipotético para tentar explicar a adicção a opióides. Nesse modelo, essas drogas promoveriam adicção através do aumento da transmissão dopaminérgica no sistema mesocorticolímbico, o que acarretaria em efeitos reforçadores positivos (euforia e prazer). Por outro lado, ao atuar sobre a matéria cinzenta periaquedutal dorsal, os opióides causariam um efeito reforçador negativo, reduzindo as propriedades aversivas de estímulos dolorosos ou ansiogênicos.

O desenvolvimento de novos modelos animais ou mesmo a utilização de abordagens inovadoras aos testes clássicos é um passo importante para o estudo da gênese e da modulação da adicção a drogas, com foco nos mecanismos neurobiológicos envolvidos nos reforços positivo e negativo. Esses modelos devem ser capazes de detectar alterações bidirecionais e de ressaltar novos efeitos de drogas, podendo fornecer novos *insights* sobre os mecanismos envolvidos na modulação do comportamento (Rodgers et al., 1997; Tzschentke, 1998). Koob et al. (2009) defendem que os modelos animais mais relevantes a serem estudados atualmente no campo da adicção a drogas são aqueles relacionados aos componentes reforçadores da abstinência (reforço negativo).

O processo de reforçamento negativo é caracterizado pelo aumento da responsividade comportamental a estressores em modelos animais de ansiedade, pelo aumento nos limiares de recompensa, extinção de comportamento reforçado e aversão condicionada por lugar

(Koob, 2000). A aversão por lugar tem sido muito utilizada para mensurar o efeito desses estímulos aversivos da abstinência. Nesse modelo, um estado de abstinência é associado a um ambiente específico e, quando expostos a um paradigma de conflito, os animais passam a evitar esse ambiente pareado à abstinência da droga (Stinus et al., 2005). A naloxona, por si só, produz aversão por lugar em ratos adictos e não-adictos a opióides. Buprenorfina e antagonistas dos receptores CRF-1 demonstraram bloquear os estímulos aversivos da abstinência de opióides em ratos, representando possíveis alvos terapêuticos para adicção (Stinus et al., 2005). É possível que um condicionamento não promova preferência, mas simplesmente reverta uma aversão por lugar (Koob, 2000).

O teste do LCE surge como uma potente ferramenta para estudar a neurobiologia dos estados aversivos envolvidos no processo de adicção, na medida em que é sensível às propriedades hedônicas e aversivas de drogas, como a morfina, permitindo verificar seus efeitos reforçadores positivos e negativos. Além disso, o LCE possibilita avaliar o comportamento do animal de forma muito espontânea, por simular situações próximas às encontradas em seu ambiente natural e por não requerer modelagem de comportamento ou submissão dos sujeitos a restrições de comida ou água (Cruz, et al., 1994).

A partir dessa idéia, o presente estudo procurou adaptar o LCE, um tradicional modelo de ansiedade, para estudar a influência das propriedades reforçadoras negativas das drogas sobre a aquisição da adicção, estendendo os trabalhos de Fava (2009), que avaliou o efeito do pareamento de morfina intraperitoneal com os braços abertos do LCE. Esse delineamento experimental, porém, não é novo ou único do nosso grupo de trabalho. Rico et al. (2009) estudaram a efeito do pareamento de morfina subcutânea (10 mg/kg) com a parte distal dos braços abertos, em ratos já adictos e em abstinência da droga. Seu objetivo foi estudar o papel dos efeitos reforçadores negativos da morfina sobre o estado de abstinência da droga. Cabe reiterar que o presente trabalho procurou utilizar o modelo do LCE para investigar o processo de aquisição, e não de manutenção da adicção, empregando, para tanto, protocolos experimentais consideravelmente diferentes dos utilizados por Rico et al. (2009).

Com base nos resultados apresentados pelo presente estudo, ao comparar o grupo previamente condicionado apenas com injeção de salina (MO 0,0) e o grupo não condicionado (s/cond), o grupo condicionado controle passou menos tempo no centro e expressou uma tendência a explorar menos os braços abertos do labirinto, o que pode indicar uma redução do conflito entre aproximar ou evitar esse estímulo aversivo. Entretanto, as medidas clássicas obtidas para esse grupo, como número total de entradas, número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, não apresentaram diferenças

significativas, quando comparadas às do grupo sem condicionamento. Da mesma forma, nenhuma das medidas etológicas analisadas foi alterada pelo condicionamento. Assim, é possível afirmar que o condicionamento aos braços abertos do LCE não alterou a atividade locomotora ou a aversão a esses compartimentos. Esse resultado contraria os achados de Fava (2009), que verificou um efeito do condicionamento, através da redução do comportamento exploratório do grupo condicionado sem morfina (diminuição do número total de entradas, do número de entradas nos braços abertos e do tempo gasto nos braços abertos), quando comparado ao grupo sem condicionamento, evidenciando que a aversão natural dos animais foi potencializada pelos pareamentos.

Em relação aos grupos pareados com morfina nos braços abertos do LCE, a dose de 0,3 mg/kg demonstrou uma tendência ao aumento do tempo nos braços abertos e das porcentagens de tempo e de entradas nos braços abertos, além da redução significativa do tempo despendido nos braços fechados, quando comparado ao grupo controle (MO 0,0). Isso poderia sugerir uma atenuação da aversão desses animais aos braços abertos, indicando um possível papel reforçador negativo da morfina. Efeito similar foi encontrado por Fava (2009). O presente estudo revelou ainda que o pareamento aos braços abertos com 0,3 mg/kg de morfina aumentou significativamente o tempo de esquadramento. É interessante destacar que essa dose testada diretamente no LCE também demonstrou ter um significativo efeito anti-aversivo em ratos (Motta & Brandão, 1993; Anseloni et al., 1999).

Já o pareamento de 1,0 mg/kg de morfina com os braços abertos do LCE demonstrou afetar a atividade locomotora dos animais, através do aumento do número de entradas nos braços abertos e fechados e do número total de entradas, quando comparado ao grupo controle. Esse efeito locomotor é reforçado ao observar que as porcentagens de entradas e de tempo nos braços abertos não foram alteradas de forma significativa. Por outro lado, deve-se destacar uma tendência ao aumento dessas medidas, quando comparadas ao grupo controle. Tal tendência em explorar os braços abertos é corroborada pelo aumento do tempo no centro do labirinto e pela redução do tempo despendido nos braços fechados e no espreitamento. Esse aumento da atividade locomotora geral e a possível atenuação da aversão aos braços abertos do LCE vão, em parte, ao encontro dos resultados encontrados por Fava (2009), a qual verificou um claro efeito anti-aversivo para o condicionamento com 1,0 mg/kg de morfina.

O pareamento com a dose de 5,0 mg/kg de morfina reduziu apenas o tempo de espreitamento, apesar de revelar uma tendência ao aumento do tempo nos braços abertos e das porcentagens de entradas e de tempo nesses compartimentos, quando comparado ao grupo controle. Como esse efeito sobre a aversão aos braços abertos não foi significativo, não é

possível afirmar que essa dose promoveu condicionamento. Esse achado contrapõe os resultados de Fava (2009), os quais demonstraram que o condicionamento com 5,0 mg/kg de morfina preveni a potencialização da aversão causada pelo confinamento com salina nos braços abertos. Por sua vez, o pareamento com 10,0 mg/kg de morfina não apresentou nenhum efeito significativo. Na verdade, esse grupo expressou medidas semelhantes às observadas no grupo controle, confirmando que o condicionamento com essa dose não alterou o estado aversivo dos animais.

Apesar de a morfina ser relatada na maioria das vezes como um estimulante do comportamento motor em roedores, estudos mostraram que, dependendo da dose e do local de administração, essa droga pode produzir um efeito bifásico (inibitório e excitatório) sobre o comportamento motor (Di Chiara & North, 1992). A administração sistêmica de doses superiores a 10 mg/kg de morfina esteve associada inicialmente à hipolocomoção e posteriormente à hiperatividade (Patti et al., 2006).

O núcleo accumbens (NAc) desempenha um papel crucial sobre os efeitos comportamentais dessa droga, representando uma interface entre os substratos neurais de reforçamento e a resposta motora para atividades exploratórias (apud Koob, 1992). Ao ativar preferencialmente os receptores opióides μ , baixas doses de morfina i.p. (0,1 - 0,3 mg/kg) promoveram um aumento da liberação de dopamina, induzindo efeito ansiolítico e aumento da atividade exploratória de ratos (Motta & Brandão, 1993). Microinjeções de morfina (10 e 30 nmol) no NAc produziram um efeito anti-aversivo no LCE, semelhante ao observado na injeção i.p. (Anseloni et al., 1999). Porém, uma alta dose (30 nmol) de morfina injetada na substância cinzenta periaquedutal dorsal demonstrou aumentar efeitos aversivos e comportamentos ansiogênicos no teste do LCE, resultado da ativação de receptores κ (Motta et al., 1995; Anseloni et al., 1999). Assim, a aversividade desse teste seria resultado da ação da droga sobre substratos neurais de aversão, mediados pelos receptores κ (efeitos aversivos) e μ (anti-aversivos) (Motta & Brandão, 1993; Motta et al., 1995; Anseloni et al., 1999).

Pellow et al. (1985) demonstraram que o confinamento nos braços abertos do LCE gerava comportamentos relacionados a medo e ansiedade (como congelamento e defecação) e o aumento significativo das concentrações plasmáticas de corticóides, quando comparado ao confinamento nos braços fechados e ao encontrado em animais não confinados. Fava (2009) demonstrou que a administração de morfina, associada a confinamentos sucessivos nos braços abertos do LCE, atenuava a aversão natural a esses compartimentos, quando os ratos eram testados no labirinto sem a administração da droga, o que permitiria investigar os efeitos reforçadores negativos eliciados por ela. Todavia, os resultados obtidos no presente estudo

demonstraram que, ao dobrar o número de pareamentos, a aversão aos braços abertos não foi afetada de forma significativa, contrapondo, portanto, os resultados anteriores de Fava (2009). Algumas hipóteses foram levantadas para tentar justificar essa diferença de resultados.

Diversos fatores são capazes de influenciar o comportamento espontâneo de ratos no teste do LCE. Tais resultados contraditórios podem ser atribuídos, em parte, à diferença de origem dos animais utilizados em cada estudo. Os animais utilizados por Fava (2009) foram provenientes do Biotério Central da Universidade de Brasília, enquanto que o presente estudo não pôde utilizar animais da mesma origem, visto que esse biotério tinha acabado de passar por reformas e não possuía animais disponíveis para pesquisa. É possível que as condições de tratamento empregadas no biotério do Grupo Bioagri, que forneceu os animais para este trabalho, podem ter afetado a aversão natural dos animais aos braços abertos do LCE. Essa hipótese é relevante ao observar que o grupo que não havia sido previamente exposto ao labirinto (s/cond) apresentou taxas altas de exploração no teste, inclusive dos braços abertos, quando comparado às obtidas em outros trabalhos (Motta & Brandão, 1993; Cruz et al., 1994; Fava, 2009), enquanto que o grupo condicionado com salina (MO 0,0) não demonstrou redução significativa da exploração do LCE. A fim de tentar aumentar a aversão dos animais aos braços abertos, foram realizadas alterações no protocolo piloto, como o aumento da luminosidade da sala experimental e a retirada da manipulação prévia dos animais.

Outra hipótese a ser analisada envolve o próprio número de pareamentos. O presente estudo realizou quatro sessões de pareamento aos braços abertos do LCE, que aconteceram tanto de manhã, como à tarde, enquanto Fava (2009) realizou duas sessões no período da manhã. Esse aumento de pareamentos foi utilizado na tentativa de verificar o aumento do efeito do condicionamento, visto que foi demonstrado que a magnitude do efeito de preferência pela morfina está diretamente relacionada à quantidade de pareamentos entre a droga e o ambiente (Mucha & Iversen, 1984). Entretanto, é possível que esse aumento tenha extinguido o aumento da aversão aos braços abertos do grupo controle, ou seja, é possível que a potencialização da aversão aos braços abertos do LCE seja promovida com duas sessões de pareamento com salina, mas não com quatro sessões, como foi realizado no presente estudo.

É importante destacar também que o Laboratório de Psicobiologia da Universidade de Brasília, onde foi realizada esta pesquisa, sofreu um processo de mudança no sistema de ar, que durou mais de um ano, acarretando um período curto para a coleta de dados, impossibilitando, assim, a extensão da presente investigação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, é possível verificar que os sucessivos condicionamentos aos braços do LCE não alteraram na aversão dos animais controle aos braços abertos. Além disso, os quatro pareamentos de morfina com os braços abertos do labirinto não alteraram os indicadores clássicos de ansiedade, de forma significativa, apesar do condicionamento com a dose de 1,0 mg/kg ter provocado um efeito locomotor significativo. Esses resultados contrapõem os achados obtidos para dois pareamentos de morfina com os braços abertos, realizados por Fava (2009). Portanto, a fim de confirmar se o comportamento de fato reflete o encontrado no presente trabalho, é necessária a extensão ou replicação desse protocolo experimental.

Ainda resta muito a ser explorado sobre os mecanismos neurobiológicos envolvidos nas propriedades reforçadoras positivas e negativas das drogas e, para tanto, o delineamento de novos modelos animais de adicção é fundamental (Koob, 2000). Espera-se que o presente trabalho traga novas evidências para a necessidade do desenvolvimento de modelos capazes de auxiliar na compreensão da neurobiologia da adicção e que estudos futuros revelem mais sobre a precisa aplicabilidade do LCE no estudo dessa importante psicopatologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anseloni, V. C., Coimbra, N. C., Morato, S., & Brandão, M. L. (1999). A comparative study of the effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray and nucleus accumbens of rats submitted to the elevated plus maze test. *Experimental Brain Research*, 129 (2), 260-268.

Ator, N. A., & Griffiths, R. R. (2003). Principles of drug abuse liability assessment in laboratory animals. *Drug and Alcohol Dependence*, 70, S55-S72.

Ávila, M. A. V., Ruggiero, R. N., Cabral, A., Brandão, M. L., Nobre, M. J., & Castilho, V. M. (2008). Involvement of the midbrain tectum in the unconditioned fear promoted by morphine withdrawal. *European Journal of Pharmacology*, 590 (1-3), 217-223.

Bardo, M. T., & Bevins, R. A. (2000). Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology*, 153, 31-43.

Bardo, M. T., Rowlett, J. K., & Harris, M. J. (1995). Conditioned place preference using opiate and stimulant drugs: a meta-analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Rev.* 19, 39-51.

Bartoletti, M., Gaiardi, M., Gubellini, C., Bacchi, A., & Babbini, M. (1990). Morphine attenuation of a conditioned emotional response in post-dependent rats. *European Journal of Pharmacology*, 185, 163-167.

Betz, C., Mihalic, D., Pinto, M. E., & Raffa, R. B. (2000). Could a common biochemical mechanism underlie addictions? *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 25, 11-20.

Biala, G., & Langwinski, R. (1996). Rewarding properties of some drug studied by place preference conditioning. *Polish Journal of Pharmacology*, 48, 425-430.

Blanchard, R. J., & Blanchard, D. C. (1989). Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *Journal of Comparative Psychology*, 103, 70-82.

Blanchard, R. J., Yudko, E. B., Rodgers, R. J., & Blanchard, D. C. (1993). Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav. Brain Res.*, 58, 155-165.

Brandão, M. L. (1993). Involvement of opioid mechanisms in the dorsal periaqueductal gray

in drug abuse. *Reviews in the Neuroscience*, 4, 397-405.

Brownstein, M. J. (1993). A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 5391-5393.

Cardenas, F., Lamprea, M. R., & Morato, S. (2001). Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research*, 122, 169-174.

Carobrez, A. P. & Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29, 1193-1205.

Childs, E., & de Wit, H. (2009). Amphetamine-Induced Place Preference in Humans. *Biological Psychiatry*, 65, 900-904.

Cousins, M. S., Roberts, D. C., & de Wit, H. (2002). GABA(B) receptor agonists for the treatment of drug addiction: a review of recent findings. *Drug and Alcohol Dependence*, 65, 209-220.

Crombag, H. S., & Robinson, T. E. (2004). Drugs, Environment, Brain, and Behavior. *Current Directions in Psychological Science*, 13(3), 107-111.

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.

Deakin, J. F. W., & Graeff, F. G. (1991). 5-HT and mechanisms of defense. *Journal of Psychopharmacology*, 5(4), 305-315.

De las Cuevas, C., Sanz, E., & De la Fuente, J. (2003). Benzodiazepines: more “behavioural” addiction than dependence. *Psychopharmacology*, 167, 297-303.

Di Chiara, G. (1999). Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *European Journal of Pharmacology*, 375 (1-3), 13-30.

Di Chiara, G., & North, R. A. (1992). Neurobiology of opiate abuse. *Trends in Pharmacological Sciences (TIPS)*, 13, 185-193.

Fava, V. M. D. (2009). 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? Dissertação (Mestrado em Ciências do Comportamento), Instituto de Psicologia, Universidade de Brasília.

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 (Berl)*, 187 (2), 143-153.

Filip, M., & Frankowska, M. (2008). GABA(B) receptors in drug addiction. *Pharmacological Reports*, 60, 755–760.

Gardner, E. L. (2008). Use of animal models to develop antiaddiction medications. *Current Psychiatry Reports*, 10, 377-384.

Gerrits, M. A. F. M., Lesscher, H. B. M., & van Ree, J. M. (2003). Drug dependence and the endogenous opioid system. *European Neuropsychopharmacology*, 13(6), 424–434.

Glover, E. M., & Davis, M. (2008). Anxiolytic-like effects of morphine and buprenorphine in the rat model of fear-potentiated startle: tolerance, cross-tolerance, and blockade by naloxone. *Psychopharmacology (Berl)*, 198(2), 167-180.

Goeders, N. E. (2003). The impact of stress on addiction. *European Neuropsychopharmacology*, 13, 435-441.

Haller, J., & Alicki, M. (2012). Current animal models of anxiety, anxiety disorders, and anxiolytic drugs. *Current Opinion*, 25, 59-64.

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.

Hogg, S. (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54, 21-30.

Hughes, A. L., Watson, B., Kalk, N., & Reid, A. (2010). Neuropharmacology of addiction and how it informs treatment. *British Medical Bulletin*, 96, 93-110.

Hughes, J., Smith, T. W., Kosterlitz, H. W., Fotherghill, L. A., Morgan, B. A., & Morris, H. R. (1975). Identification of two related pentapeptides from brain with potent opiate agonist

activity. *Nature*, 258, 577-579.

Kahveci, N., Gulec, G., & Ozluk, K. (2006). Effects of intracerebroventricularly-injected morphine on anxiety, memory retrieval and locomotor activity in rats: involvement of vasopressinergic system and nitric oxide pathway. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 85(4), 859-867.

Kearns, D. N., Weiss, S. J., & Panlilio, L. V. (2002). Conditioned suppression of behavior maintained by cocaine self-administration. *Drug and Alcohol Dependence*, 65(3), 253-261.

Kenny, P. J. (2007). Brain reward systems and compulsive drug use. *Trends in Pharmacological Sciences (TIPS)*, 28(3), 135-141.

Koob, G. F. (1992). Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends in Pharmacological Sciences (TIPS)*, 13, 177-184.

Koob, G. F. (2000). Animal models of drug addiction. In: *Psychopharmacology - The Fourth Generation of Progress*. The American College of Neuropsychopharmacology. Acesso em 28 de fevereiro de 2012, em: <http://www.acnp.org/g4/GN401000072/Default.htm>

Koob, G. F. (2003). Neuroadaptive mechanisms of addiction: studies on the extended amygdala. *European Neuropsychopharmacology*, 13, 442-452.

Koob, G. F., & Le Moal, M. M. (2001). Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology*, 24(2), 97-129.

Koob, G. F., Lloyd, G. K. & Mason, B. J. (2009). Development of pharmacotherapies for drug addiction: a Rosetta Stone approach. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8, 500-515.

Koob, G. F., Sanna, P. P., & Bloom, F. E. (1998). Neuroscience of addiction. *Neuron*, 21, 467-478.

Koob, G. F., Ahmed, S. H., Boutrel, B., Chen, S. A., Kenny, P. J., Markou, A., O'Dell, L. E., Parsons, L. H., & Sanna, P. P. (2004). Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27, 739-749.

Le Merrer, J., Becker, J. A., & Befort, K. (2009). Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiological Reviews*, 89, 1379-1412.

Lu, L., Chen, H., Su, W., Ge, X., Yue, W., Su, F. & Ma, L. (2005). Role of withdrawal in reinstatement of morphine-conditioned place preference. *Psychopharmacology*, 181, 90-100.

Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 4^a. Ed. (DSM-IV). (2002). Associação Psiquiátrica Americana (APA). Porto Alegre: ArtMed.

Martinez, J. C., Cardenas, F., Lamprea, M., & Morato, S. (2002). The role of vision and proprioception in the aversion of rats to the open arms of an elevated plus maze. *Behavioral Processes*, 60, 15-26.

Martínez, R., Garcia, A. M. B., & Morato, S. (2005). Papel da luminosidade do biotério no comportamento do rato no labirinto em cruz elevado. *Estudos de Psicologia*, 10(2), 239-245.

Meyer, J. S., & Quenzer, L. F. (2005). *Psychopharmacology: drugs, the brain, and behavior*. Sunderland, MA, US: Sinauer Associates.

Morón, J. A., Gullapalli, S., Taylor, C., Gupta, A., Gomes, I. & Devi, L. A. (2010). Modulation of opiate-related signaling molecules in morphine-dependent conditioned behavior: conditioned place preference to morphine induces CREB phosphorylation. *Neuropsychopharmacology*, 35, 955-966.

Motta, V. A., & 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. A., 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(3), 241-247.

Nestler, E. J. (2004). Historical review: molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends in Pharmacological Sciences (TIPS)*, 25(4), 210-218.

Nestler, E. J., & Aghajanian, G. K. (1997). Molecular and cellular basis of addiction. *Science*, 278, 58-63.

O'Brien, C. P., & Gardner, E. L. (2005). Critical assessment of how to study addiction and its treatment: human and non-human animal models. *Pharmacology & Therapeutics*, 108, 18-58.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Neurociências: consumo e dependência de substâncias psicoativas (2002). Acesso em 4 de fevereiro de 2012, em: http://www.who.int/substance_abuse/publications/en/Neuroscience_P.pdf

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.

Paolone, G., Burdino, R., & Badiani, A. (2003). Dissociation in the modulatory effects of environmental novelty on the locomotor, analgesic, and eating response to acute and repeated morphine in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 166, 146-155.

Patti, C. L., Kameda, S. R., Carvalho, R. C., Takatsu-Coleman, A. L., Lopez, G. B., Niigaki, S. T., Abilio, V. C., Frussa-Filho, R., Silva, R. H. (2006). Effects of morphine on the plus-maze discriminative avoidance task: role of state-dependent learning. *Psychopharmacology*, 184, 1-12.

Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149-167.

Rezayof, A., Hosseini, S. S., & Zarrindast, M. R. (2009). Effects of morphine on rat behaviour in the elevated plus maze: the role of central amygdala dopamine receptors. *Behavioural Brain Research*, 202(2), 171-178.

Rico, J. L., Castilho, V. M., Morato, S., & Nobre, M. J. (2009). Previous spatial learning is required for the development of place preference in rats following chronic administration of and withdrawal from morphine. *Psychology & Neuroscience*, 2, 59-65.

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.

Sasaki, K., Fan, L. W., Tien, L. T., Ma, T., Loh, H. H., Ho, I. K. (2002). The interaction of morphine and gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic systems in anxiolytic behavior: using mu-opioid receptor knockout mice. *Brain Research Bulletin*, 57(5), 689-694.

Schindler, C. W., Panlilio, L. V., & Goldberg, S. R. (2002). Second-order schedules of drug

self-administration in animals. *Psychopharmacology (Berl)*, 163, 327-344.

Shippenberg, T. S. (1993). Motivational effects of opioids. In: *Opioids III*, Herz (Ed.), 633-650. Berlin, Germany.

Stinus, L., Cador, M., Zorrilla, E. P., & Koob, G. F. (2005). Buprenorphine and a CRF₁ antagonist block the acquisition of opiate withdrawal-induced conditioned place aversion in rats. *Neuropsychopharmacology*, 30, 90-98.

Snyder, S. H. (1986). Opiates. In: *Drugs and the brain*, Snyder, S. H. (Ed.), New York, Scientific American Library: 29-60.

Stolerman, I. (1992). Drugs of abuse: behavioral principles, methods and terms. *TiPS Reviews*, 13, 170-176.

Szasz, T. (1975). In: *Appendix of Ceremonial Chemistry*, Doubleday/Anchor (Ed.), Garden City, New York.

Treit, D., Menard, J., & Royan, C. (1993). Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 44, 463-469.

Tzschentke, T. M. (1998). Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Progress in Neurobiology*, 56(6), 613-672.

Tzschentke, T. M. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addiction Biology*, 12, 227-462.

Volkow, N. D., & Li, T. K. (2004). Drug addiction: the neurobiology of behavior gone awry. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(12), 963-970.

Will, M. J., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (1998). Uncontrollable stress potentiates morphine's rewarding properties. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 60(3), 655-664.

Woods, J. H., & Winger, G. (1987). Opioids, receptors, and abuse liability. In: H. Y. Meltzer, *Psychopharmacology: The third generation of progress*. New York: Raven Press, 1555-1564.

Woolverton, W. L., & Johnson, K. M. (1992). Neurobiology of cocaine abuse. *Trends in Pharmacological Sciences (TIPS)*, 13, 193-200.