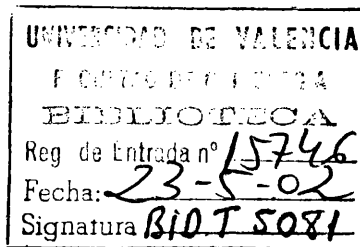


UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Facultad de Psicología



*Implicación del Sistema Dopaminérgico en el
Condicionamiento de la Preferencia de Lugar
Inducido por la Morfina en Ratones*

TESIS DOCTORAL

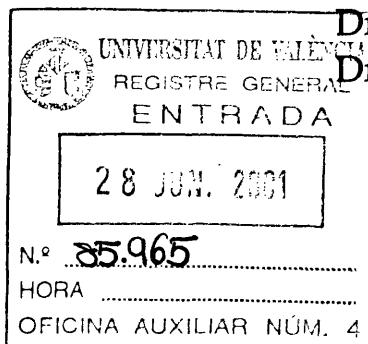
Presentada por:

D^a Carmen Manzanedo Pérez

Dirigida por:

Dr. José Miñarro López

Dra. M^a Asunción Aguilar Calpe



Valencia, Junio 2001



UMI Number: U607500

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607500

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

D.1259412

L.1259430



UNIVERSITAT DE VALENCIA
Facultad de Psicología
Area de Psicobiología
Blasco Ibañez, 21
46010.Valencia.

El Doctor D. José Miñarro López, Profesor Titular y la Doctora Dña Mª Asunción Aguilar Calpe, Profesora Ayudante, ambos del Área de Psicobiología de la Facultad de Psicología de la Universitat de València,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral presentada por Dª Carmen Manzanedo Pérez, con el título “Implicación del sistema dopaminérgico en el condicionamiento de la preferencia de lugar inducido por la morfina en ratones”, ha sido realizada bajo su dirección. Tras haberla examinado hacen constar su autorización para que se realicen los trámites conducentes a su defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado a once de junio de dos mil uno.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Miñarro'.

Fdo.: Dr. José Miñarro López

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Aguilar'.

Fdo.: Dra. Asunción Aguilar Calpe

Agradecimientos

La presente Tesis Doctoral, es el producto del trabajo comenzado hace cuatro años; en ningún momento he estado sola y este es el espacio que dedico al agradecimiento y al recuerdo de quienes han contribuido a este logro.

La Dra. Asunción Aguilar Calpe, a quien acudí poco antes de estos cuatro años, la encontré en su despacho, en su sitio, donde ha seguido estando; siempre a mi alcance, sabiendo estar a la altura de cada situación, sabiendo estar enfrente de mis miedos. Me acogió como doctoranda y comenzó a enseñarme pacientemente como realizar todo esto.

Junto a ella y como co-director de mi tesis el Dr. José Miñarro quien ha organizado y dirigido mi esfuerzo, siempre he notado su protección, su preocupación por mi bienestar y más importante aún, me he sentido cuidada con mucho cariño.

Ellos han sido dos pilares básicos en todo este camino, pero no hubiera estado tan cómoda y segura de no haber contado con un tercer pilar que forma la sólida base en la que estoy situada, la Dra. Marta Rodríguez-Arias, con ella he compartido mucho: espacio físico, tiempo, momentos entrañables, quiero resaltar su tesón y profesionalidad, pero a mi me ha dado algo más, a ella he acudido a la hora de resolver dudas, su escucha atenta me ha hecho sentir que tenía alguien cercano en quien confiar.

Cuando entré en el departamento, no sabía que comenzaba a formar parte de un equipo; conocí al Dr. José Pinazo, entrañable y agradable, capaz de agitar los sueños, coincidimos poco tiempo en el área pero la relación siguió, pertenecía a ese equipo. Isolde y Carmen María, o Carmen María e Isolde, ya estaban cuando llegué, y nunca hubiera supuesto la dimensión de su presencia cuando las conocí, han pasado a formar parte de mi vida, de mi mundo, de mi familia y de mi casa, en este sentido, existe un antes y un después de ellas. Y luego llegaron Amparo y Concha, siempre dispuestas a ayudarme, a compartir, a saborear los intermedios del laboratorio. En esta última etapa, la presencia del Dr. Luis Stinus en nuestra facultad, ha posibilitado mi asistencia a sus clases, así he podido integrar muchos conceptos teóricos dentro del marco de la experimentación. Y este equipo de investigación al cual pertenezco ahora de forma consciente, sigue ampliándose. Todos ellos han hecho de mi una persona mejor y más

Agradecimientos

preparada, pero aún es más valioso para mí que con todos vosotros he sido feliz, gracias.

Agradecer al Profesor Dr. Vicente Simón director del Área de Psicobiología, así como al resto de profesores, profesoras y doctorandos que forman el Departamento de Psicobiología la ayuda prestada en la realización de toda mi investigación, mencionando de forma especial a la Dra. Rosa Redolat Iborra, siempre informando y buscando la última novedad relacionada con mi trabajo, a la Dra. Carmen Carrasco compartiendo el día a día con buen humor y a la Dra. Carmen Arenas, profesora en la carrera y en doctorado de la que guardo un recuerdo especial. Igualmente, agradecer a mi compañero en el laboratorio Ferrán Dual, que con él las primeras horas de la mañana tuvieron una sonrisa. Y Miriam por toda su ayuda con el Inglés, los días que ella vino fueron más dulces.

He tenido más personas a mi lado que me han acompañado y a las que estoy agradecida, mi madre, mi hija, Josep... también forman parte de la historia de esta tesis doctoral, pero su lectura adquiere sentido en la persona de Alfredo, mi hermano; si hay una dedicatoria es para ti.

Junio, 2001

Agradecimientos

La realización de la presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a las siguientes Becas y Ayudas:

Programa Sectorial de Formación de Profesorado Universitario y Personal Investigador, del Ministerio de Educación y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica (ref. AP-97).

Dirección General de Enseñanza Superior (DGES), Ministerio de Educación y Cultura (ref. PS95-0123).

Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica, Ministerio de Educación y Cultura (ref. PB98-1497).

Agradecemos a los laboratorios Astra, Janssen, Novartis Pharma y Sandoz, el habernos proporcionado el raclopride, la risperidona, el CGS 10746B y la clozapina, respectivamente.

RESUMEN

Carmen Manzanedo. Implicación del sistema dopaminérgico en el condicionamiento de preferencia de lugar inducido por morfina en ratones. Tesis Doctoral. Área de Psicobiología. Facultad de Psicología. Universitat de València. Apto. 22109, 46071 Valencia. Spain.

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido examinar la implicación del sistema dopaminérgico sobre los efectos conductuales de la morfina en ratones macho. Nos hemos planteado las siguientes cuestiones: a) ¿cuál es el papel de la dopamina y de los diferentes receptores DA en los efectos motores de la morfina?; b) ¿cuál es la implicación de la dopamina y de los diferentes receptores DA en los efectos reforzantes inducidos por morfina?, y c) ¿puede usarse el paradigma de preferencia de lugar para estudiar la recaída a los opiáceos en ratones?. Con el objetivo de contestar a la primera cuestión, co-administramos morfina con antagonistas DA con mayor selectividad por los receptores D3 (U-99194A maleate), D2 (sulpiride) o D1/D2 (haloperidol) en el estudio 1, y con un inhibidor de la liberación de DA (CGS 10746B) en el estudio 3. Los resultados de ambos estudios indicaron que la interferencia con la transmisión dopaminérgica bloquea, de forma dependiente de la dosis, la hiperactividad inducida por morfina. Para estudiar la implicación del sistema DA en los efectos reforzantes de la morfina, usamos el paradigma de condicionamiento de lugar, evaluando los efectos sobre la preferencia de lugar inducida por morfina de varios antagonistas DA con diferente perfil bioquímico, SCH 23390, haloperidol, raclopride, risperidona, U-99194A maleato y clozapina (estudio 2), además de los efectos del inhibidor de la liberación de dopamina CGS 10746B (estudio 3). Los resultados mostraron que todos los antagonistas DA, con la excepción de U-99194A maleato, así como el inhibidor de la liberación de DA, selectivamente bloquearon los efectos reforzantes de la morfina. Finalmente, para contestar la tercera cuestión, realizamos un experimento (estudio 4) en el cual, animales que mostraban una fuerte preferencia condicionada por el lugar asociado con morfina, fueron sometidos a un proceso de extinción del condicionamiento y después, se evaluó el efecto de una inyección « priming » de morfina administrada de forma no contingente. Observamos que dicha inyección producía una reinstauración de la preferencia de lugar, sugiriendo que éste paradigma puede ser usado como un modelo alternativo al paradigma de auto-administración para estudiar el problema de la recaída a los opiáceos. En conclusión, nuestros resultados apoyan la idea de que la dopamina tiene un papel esencial en los efectos motores y reforzantes de los opiáceos y en el

Resumen

fortalecimiento de los procesos asociativos que conducen a cambios en los sistemas neurales implicados en la adicción a las drogas.

Palabras clave : morfina, condicionamiento de preferencia de lugar, actividad motora, dopamina, SCH 23390, haloperidol, sulpiride, raclopride, risperidona, U-99194A maleato, clozapina, CGS 10746B, ratones.

ABSTRACT

Manzanedo, Carmen. Involvement of the dopaminergic system in place preference conditioning induced by morphine in mice. Doctoral Dissertation. Area de Psicobiología. Facultad de Psicología. Universitat de València. Aptdo. 22109, 46071 Valencia. Spain.

The general aim of the present Doctoral Thesis was to examine the involvement of the dopaminergic system on the behavioural effects of morphine in male mice. The following questions were addressed : a) what is the role of DA and DA subtype receptors in the motor effects of morphine ? b) how are DA and DA subtype receptors involved in the rewarding place preference effects of morphine? and c) can the place conditioning paradigm be used to study relapse to opiates in mice ? With the purpose of answering the first question, we co-administered morphine with DA antagonists, with greater selectivity for D3 (U-99194A maleate), D2 (sulpiride) and mixed D1/D2 (haloperidol) in study 1, and with an inhibitor of DA release (CGS 10746B) in study 3. The results of both studies indicate that the interference with DA transmission dose-dependently block the morphine-induced hyperactivity. To study the involvement of the DA system in the rewarding effects of morphine we used the conditioned place paradigm, evaluating the effects on morphine-induced place preference of several DA antagonists with different biochemical profiles, SCH 23390, haloperidol, raclopride, risperidone, U-99194A maleate and clozapine (study 2), besides studying the effects of the DA release inhibitor CGS 10746B (study 3). The results show that all DA antagonists, with the exception of U-99194A maleate, the same as the DA release inhibitor, selectively block the rewarding effects of morphine. Finally, to answer the third question, we performed an experiment (study 4) in which animals showing a strong conditioned preference for the place associated with morphine, underwent an extinction process of conditioning and afterwards, the effects of a priming non contingent injection of morphine were evaluated. We observed that this injection produces a reinstatement of the place preference, suggesting that this paradigm can be used as an alternative model to self-administration studies to address the issue of relapse to opiates. In conclusion, our results support the idea that dopamine have an essential role in the motor and rewarding effects of opiates and in the associative processes leading to changes in neural systems involved in drug addiction.

Keywords : morphine, place preference conditioning, motor activity, dopamine, SCH 23390, haloperidol, sulpiride, raclopride, risperidone, U-99194A maleate, clozapine, CGS 10746B, mice.

PREFACIO

La presente Tesis Doctoral está basada en los siguientes cuatro estudios:

1.- Manzanedo, C., Aguilar, M.A. and Miñarro, J. (1999) The effects of dopamine D2 and D3 antagonists on spontaneous motor activity and morphine-induced hyperactivity in male mice. *Psychopharmacology*, 143: 82-88.

2.- Manzanedo, C., Aguilar, M.A., Rodríguez-Arias, M. y Miñarro, J. (2001a) Effects of dopamine antagonists with different receptor blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice. *Behavioural Brain Research*, 121: 189-197.

3.- Manzanedo, C., Serrano, A., Aguilar, M.A., Rodríguez-Arias, M., Miñarro, J. (2001b) Effects of CGS 10746B on hyperactivity and place preference induced by morphine. *Behavioral Brain Research*, (in press).

4.- Manzanedo, C., Aguilar, M.A., Rodríguez-Arias, M. y Miñarro, J. (2001c) Conditioned place preference paradigm can be a mouse model of relapse to opiates. *Neuroscience Research Communications*, 28: 23-29.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN GENERAL.....	15
2.- CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIA DE LUGAR.	21
2.1.- Una técnica para estudiar el refuerzo.....	21
2.2.- El CPL desde una perspectiva histórica.....	23
2.3.- Descripción básica del procedimiento.....	25
2.4.- Efecto de los fármacos.....	32
3.- INTERACCION SISTEMA DA Y OPIÁCEO.....	35
3.1.- Mecanismos neuroanatómicos.....	35
3.2.- Estudios conductuales.....	37
3.2.1.- Estudios sobre conducta motora.....	37
3.2.2.- Estudios sobre el refuerzo.....	39
4.- RESUMEN GLOBAL RESULTADOS.....	47
4.1.- Estudio 1.....	47
4.2.- Estudio 2.....	50
4.3.- Estudio 3.....	57
4.4.- Estudio 4.....	63
5.- DISCUSIÓN.....	67
6.- CONCLUSIONES FINALES.....	73
7.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ANEXO: Artículos originales.....	93

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

6-OHDA : 6- hidroxidopamina
AAIC : Auto-administración intracraneal
AEIC : Auto-estimulación eléctrica intracraneal
AMPc : Adenosín monofosfato cíclico
ATV: Área Tegmental Ventral
CAL : Condicionamiento de Aversión de Lugar
CPL: Condicionamiento de Preferencia de Lugar
CREB : Elemento de enlace en respuesta al AMPc
CRF : Factor de liberación de corticotropina
DA: Dopamina
EC : Estímulo Condicionado
EI : Estímulo Incondicionado
IC : Intracraneal
ICV : Intracerebroventricular
IP : Intraperitoneal
IV : Intravenosa
NAcc: Núcleo Accumbens
O : Oral
SC : Subcutánea

1.- INTRODUCCIÓN

El estudio de las propiedades reforzantes de las drogas y su manipulación psicofarmacológica se ha convertido en un área principal de investigación en el campo de la farmacología de la conducta. Este hecho es fácil de entender si consideramos que el problema de la adicción a las drogas sigue siendo uno de los más importantes, desde un punto de vista sanitario, social, económico, familiar y personal. En las últimas décadas se han producido importantes avances en la comprensión de la neurobiología de la adicción a las drogas, sin embargo, todavía no existen estrategias de tratamiento efectivas. Entre los síntomas centrales de la drogodependencia se encuentran la toma compulsiva de la droga y el intenso deseo de consumirla (craving) y quizá el problema principal con el que se enfrentan los terapeutas es la recaída en el consumo después de periodos de abstinencia.

Entre los diversos enfoques utilizados para evaluar los efectos reforzantes de las drogas en animales, el paradigma de condicionamiento de preferencia de lugar (CPL) es uno de los más interesantes porque se centra en los aspectos apetitivos de la conducta más que en los aspectos consumatorios, como hace el paradigma de la autoadministración de drogas. Además, el CPL tiene otras ventajas como el hecho de que los animales son testados libres de fármaco, su mayor sensibilidad, etc. Precisamente, gracias a estos factores se debe su gran difusión y utilización en el estudio del efecto reforzante o aversivo de diferentes compuestos, la capacidad de bloquear estos efectos por otras sustancias y el estudio de las vías neurales implicadas en el refuerzo.

El sistema dopaminérgico mesolímbico es considerado como el substrato neural del refuerzo. La liberación de dopamina en el núcleo accumbens es un hecho común tras la administración de diferentes drogas, como la Anfetamina, la cocaína, los opiáceos, la nicotina o el alcohol. Incluso se ha sugerido que la capacidad adictiva de una droga está relacionada con este efecto sobre la liberación de dopamina. En concreto, en el caso de los opiáceos como la morfina o la heroína existe un efecto primario sobre el sistema de refuerzo, mediado por los receptores opiáceos μ y δ , que parece ser responsable de su valor

Introducción

hedónico, o sensación de placer, y un efecto secundario sobre el sistema dopaminérgico, que puede contribuir a otros aspectos del refuerzo inducido por los opiáceos o a su capacidad de inducir adicción.

En diferentes estudios bioquímicos se ha observado que los opiáceos estimulan la liberación de dopamina, sin embargo, los estudios conductuales no apoyan de forma definitiva la influencia del sistema dopaminérgico en los efectos reforzantes de la morfina. Por ejemplo, el bloqueo de la transmisión dopaminérgica no siempre reduce la autoadministración de opiáceos y el CPL inducido por estas sustancias.

En concreto, respecto a los estudios realizados sobre la contribución del sistema dopaminérgico a los efectos reforzantes de los opiáceos en el CPL, la literatura ofrece datos controvertidos, muchas veces difíciles de conciliar, que se han intentado explicar por la utilización de diferentes especies o cepas y diferencias metodológicas en el procedimiento de CPL. El estudio del efecto reforzante de una droga y su modificación por diferentes tratamientos farmacológicos en la misma cepa de ratones macho y utilizando la misma metodología puede ser necesario a la hora de comprender las propiedades reforzantes de esa droga, su poder adictivo, los sistemas neurales implicados y las posibles alternativas de tratamiento.

En el presente trabajo nuestro objetivo ha sido principalmente estudiar la mediación del sistema dopaminérgico en los efectos reforzantes de la morfina utilizando el paradigma de CPL. No obstante, también hemos realizado una serie de estudios sobre la implicación de este sistema de neurotransmisión en los efectos motores de la morfina. En muchas ocasiones se ha comprobado que los fármacos psicoestimulantes a nivel psicomotor son capaces de producir refuerzo, hipotetizándose que la activación del sistema dopaminérgico mesolímbico subyace a ambos efectos. La mayor parte de estudios realizados sugieren que la hiperactividad inducida por la morfina depende de la activación del sistema dopaminérgico, puesto que cuando los receptores de dopamina (DA) son bloqueados o cuando se realiza una lesión con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) este efecto de la morfina desaparece o se reduce drásticamente. Por otra

Introducción

parte, también hemos intentado establecer un modelo de recaída a la morfina tras un periodo de abstinencia como un paso previo para el estudio de la implicación del sistema dopaminérgico en este aspecto.

En primer lugar, nos centramos en estudiar el papel de los diferentes subtipos de receptores dopaminérgicos en los efectos motores y reforzantes de la morfina. Las propiedades motoras de algunos antagonistas selectivos de los receptores DA y su efecto sobre la hiperactividad inducida por morfina ya se habían estudiado en nuestro laboratorio (Rodríguez-Arias et al., 2000), no obstante, el papel de los receptores D3 en la hiperactividad inducida por la morfina sólo se había realizado parcialmente. Por ello, en el estudio 1 decidimos estudiar en profundidad los efectos motores de un antagonista selectivo de los receptores D3, el U-99194A maleato, así como sus efectos sobre la hiperactividad inducida por morfina. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que el bloqueo de los receptores D3 produce hiperactividad, lo cual se explicaría por el papel inhibitorio de estos receptores. Sin embargo, paradójicamente, el bloqueo de estos receptores provocó una inhibición de la hiperactividad inducida por la morfina, lo que sugería una actuación diferente en función del nivel basal de actividad dopaminérgica.

En segundo lugar, con respecto a los efectos reforzantes de la morfina, en la literatura parecía existir bastante acuerdo en la contribución de los receptores D1, mientras que, sobre los receptores D2 existía más bien la idea opuesta, es decir, que no parecían contribuir de forma significativa a los efectos reforzantes de la morfina. Por otra parte, el papel de los receptores D3 sólo se había estudiado parcialmente con la administración de agonistas y en ningún estudio se había valorado la influencia de los receptores D4. Para conseguir este objetivo, en el estudio 2, utilizamos diferentes dosis de antagonistas dopaminérgicos con cierta preferencia o selectividad sobre cada uno de los diferentes subtipos de receptores descritos anteriormente: SCH 23390, raclopride, U99194A maleato y clozapina, que actúan preferentemente sobre los receptores D1, D2, D3 y D4 respectivamente. Igualmente, administramos antagonistas menos selectivos como el haloperidol, que bloquea receptores D1 y D2 y la risperidona que bloquea receptores D2 y 5-HT₂. En primer lugar valoramos los efectos de estos antagonistas dopaminérgicos en el

Introducción

paradigma de condicionamiento de lugar para conocer sus efectos motivacionales y posteriormente, estudiamos sus efectos sobre el CPL inducido por morfina. En este segundo experimento observamos que el bloqueo de los receptores D1 tiene efectos aversivos, al igual que el bloqueo conjunto de los receptores D1 y D4 con clozapina, de los receptores D1 y D2 con haloperidol y de los receptores D2-5HT2 con risperidona. Por el contrario, el bloqueo selectivo de los receptores D2 y D3 no tuvo efectos motivacionales. Por otra parte, todos los antagonistas dopaminérgicos utilizados bloquearon la adquisición del CPL inducido por morfina, a excepción del antagonista de los receptores D3 que parecen tener un papel inhibitorio sobre los procesos de refuerzo al igual que sobre la conducta motora. Estos resultados indican que la activación de los diferentes subtipos de receptores dopaminérgicos contribuyen de forma significativa a los efectos reforzantes de la morfina, en contra de la idea previa de que únicamente los receptores D1 eran esenciales.

En tercer lugar, nuestro objetivo en el estudio 3, fue valorar si el bloqueo de la liberación de dopamina podía modificar dos efectos conductuales característicos de la morfina, la estimulación psicomotora y el refuerzo. Nuestra hipótesis era que el bloqueo de la liberación de dopamina impediría la manifestación de ambos efectos conductuales de la morfina. Para comprobar esta hipótesis, administramos a los animales un inhibidor de la liberación de dopamina, el CGS 10746B, valorando sus propiedades motoras y motivacionales, así como sus efectos sobre la hiperactividad y el CPL inducido por morfina. Los resultados obtenidos en este estudio apoyaron nuestra hipótesis de que tanto la hiperactividad como los efectos reforzantes de la morfina dependían de la liberación de DA.

Finalmente, en el estudio 4, nos planteamos si el paradigma de CPL podía usarse para valorar otros aspectos de la adicción a los opiáceos, más allá de su poder reforzante. En concreto, pensamos si este paradigma podría usarse como una alternativa a los estudios de reinstauración de la autoadministración de drogas, tras un periodo de extinción, que son prácticamente los únicos utilizados para estudiar la recaída a las drogas en animales. Con este objetivo, decidimos valorar si el CPL inducido por morfina desaparecía después un periodo de extinción y si la administración de una dosis de morfina tras la

Introducción

extinción podría reinstaurar el CPL. Para conseguir la extinción del CPL, los animales fueron expuestos al aparato en diferentes sesiones de test sin droga, hasta que el tiempo pasado en el compartimento asociado con la droga se redujo a los niveles previos al condicionamiento, siendo por tanto igual que el tiempo pasado en este compartimento por los animales del grupo control. Una vez conseguida la extinción del condicionamiento, se administró a los animales una inyección de morfina de una forma no contingente, es decir, no asociada al ambiente donde habían recibido la morfina durante las sesiones de condicionamiento. Esta inyección de morfina tiene un efecto de "priming" en el paradigma de autoadministración reinstaurando la respuesta requerida para conseguir la droga tras la extinción. Los resultados obtenidos en este experimento son muy prometedores porque muestran que la reexposición a la morfina es suficiente para reinstaurar el CPL previamente extinguido. La coincidencia de nuestros resultados con aquellos obtenidos en el paradigma de autoadministración, sugieren que el paradigma de CPL puede usarse como un método para estudiar la recaída en animales. Evidentemente, serán necesarios más estudios para validar este modelo animal de recaída, tal como el efecto de diferentes dosis de morfina, la contribución de los estímulos ambientales y del estrés, así como el papel de diferentes fármacos sobre la reinstauración del CPL.

2.- CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIA DE LUGAR

2.1.- Una técnica para estudiar el refuerzo.

El estudio de las propiedades reforzantes de las drogas y su modificación farmacológica se ha convertido en un área de investigación preferente en el campo de la Psicofarmacología. De hecho, en los últimos años se ha observado un creciente aumento de la bibliografía sobre este tema (Van der Kooy, 1987; Carr y cols. 1989; Schechter y Calcagnetti, 1998; Tzschentke, 1998; Bardo y Bevins, 2000). Sin embargo, unido a este interés, también ha surgido una gran controversia acerca de los métodos utilizados para conseguir estos objetivos.

El condicionamiento de lugar es uno de los métodos usados para evaluar los efectos apetitivos de las drogas. El refuerzo puede ser medido de una forma objetiva por los efectos que ejerce sobre la conducta, que se conocen como efectos organizadores.

El refuerzo produce dos efectos organizadores principales que actúan respectivamente en la fase apetitiva y en la fase consumatoria de la conducta. En primer lugar, un estímulo que sea percibido como reforzante (estímulo incentivo) tendrá la capacidad de provocar respuestas de acercamiento, aproximación y mantenimiento del contacto con el estímulo. Por ejemplo, un animal con frío trataría de acercarse y de mantener contacto con una fuente productora de calor, mientras que un animal con hambre buscaría comida. En segundo lugar, el refuerzo tendrá la capacidad de aumentar la probabilidad de que se repitan las respuestas que lo preceden. Desde este punto de vista, el refuerzo sería el "fortalecimiento" de la asociación entre el estímulo ambiental y la respuesta que lo ha provocado (Skinner, 1938). Por ejemplo, si un animal hambriento consigue comida realizando una determinada respuesta, se incrementará la probabilidad de que en el futuro emita esta conducta.

Estas influencias organizadoras ejercidas por el estímulo reforzante, también pueden ser utilizadas como medida de refuerzo: si un estímulo provoca acercamiento o la repetición de una respuesta

Condicionamiento de preferencia de lugar

anterior, entonces el estímulo es definido como reforzante. De hecho, los dos métodos más utilizados para la evaluación de las propiedades reforzantes de las drogas, la auto-administración y el CPL, se basan en estos mismos efectos conductuales.

El paradigma de CPL refleja la capacidad del estímulo reforzante para provocar respuestas de acercamiento y mantenimiento del contacto (Spitieri y cols., 2000) y permite evaluar la intensidad del recuerdo, del valor hedónico, que una sustancia inyectada deja al animal. Además, este paradigma utiliza el fenómeno de condicionamiento secundario donde un estímulo neutro, tras ser apareado con un refuerzo, adquiere la capacidad de actuar como refuerzo por sí mismo. De este modo, en el condicionamiento de lugar, los efectos subjetivos de un fármaco se aparean con un conjunto de estímulos neutros de un ambiente. Si durante un test posterior, el animal aumenta el tiempo que permanece aproximándose y manteniendo el contacto con los estímulos ambientales que se han apareado con el fármaco, se infiere que el fármaco es reforzante. En contraste, el paradigma de auto-administración se refiere principalmente al efecto del refuerzo sobre la probabilidad de incrementar la respuesta conductual que provoca el acceso al refuerzo. En este paradigma, la inyección del fármaco se produce de manera contingente a la respuesta (por ejemplo presionar una palanca o pedal) y se asume que si éste es reforzante, el animal repetirá la respuesta.

Los paradigmas de CPL y auto-administración se basan de forma respectiva en los dos efectos organizadores del refuerzo comentados anteriormente. Sin embargo, es importante tener en cuenta que ambas medidas conductuales pueden estar influenciadas por cualquiera de los dos efectos organizadores. Así, en la auto-administración la palanca se convierte en un refuerzo secundario debido a que se aparea con la droga y provoca respuestas de aproximación. Igualmente, en el CPL un animal puede mantener contacto con un ambiente distintivo que haya sido asociado previamente con una droga, porque el refuerzo ha fortalecido la respuesta dirigida hacia él.

Por tanto, en el paradigma de condicionamiento de lugar, las propiedades motivacionales primarias de un estímulo, fármaco o

Condicionamiento de preferencia de lugar

tratamiento sirven como un estímulo incondicionado (EI). El apareamiento repetido del EI con un conjunto de estímulos ambientales inicialmente neutros, hace que estos adquieran, en el curso del condicionamiento, propiedades motivacionales secundarias ("valencia o saliencia") que pueden actuar como estímulo condicionado (EC) y pueden provocar acercamiento o retirada, en función de si las propiedades motivacionales del tratamiento fueron apetitivas o aversivas, cuando el animal es expuesto a ese estímulo (Tzschentke, 1998; Bardo y Bevins, 2000).

Aunque se han realizado algunos intentos para introducir los principios del condicionamiento operante en el paradigma del CPL (Crowder y Hutto; 1992a y b), el condicionamiento de lugar parece seguir los principios del condicionamiento clásico o pavloviano. Esto se manifiesta, por ejemplo, en la dependencia de contexto y en el hecho de que se produce extinción del CPL cuando los animales son expuestos repetidamente al EC en ausencia del EI (Tzschentke y Schmidt, 1995; Tzschentke, 1998, Manzanedo y cols., 2001). Esta propiedad permite que el paradigma de CPL pueda ser utilizado como una herramienta para estudiar el ansia "craving" por la droga y la recaída tras un periodo de abstinencia, así como, para analizar aquellos fármacos que puedan eliminar o reducir estas conductas (Tzschentke, 1998; Mueller y Stewart, 2000; Parker y McDonald, 2000; Wang y cols., 2000; Manzanedo y cols., 2001).

2.2.- El CPL desde una perspectiva histórica.

Existen varios antecedentes de la utilización de los aspectos esenciales del condicionamiento de preferencia de lugar para estudiar el refuerzo. Spragg en 1940 (citado en Bardo y Bevins, 2000) entrenó chimpancés para que eligieran entre una caja de color blanco en la que les administraba una dosis diaria de morfina, frente a otra de color negro que contenía un plátano, observando que escogían la caja blanca cuando estaban sin droga. El descubrimiento de que la estimulación eléctrica cerebral podía ser reforzante se realizó de forma casual y, sin un conocimiento explícito, utilizando el paradigma de CPL. Olds y Milner en 1954, demostraron que las ratas permanecían más tiempo en una parte determinada de un aparato si la estimulación era hecha de forma contingente a situarlas en ese lugar.

Condicionamiento de preferencia de lugar

Igualmente, Egger y Miller (1962) demostraron que las ratas preferían un estímulo que predecía consistentemente la comida, sobre otro estímulo que sólo la predecía en ocasiones: los animales eran capaces de presionar una palanca si la presión producía el estímulo predictivo.

El uso del paradigma de condicionamiento de lugar empleando dos compartimentos con estímulos de características distintivas, fue sugerido por García y cols. (1957). Estos autores encontraron que las ratas aprendían a evitar un compartimento que había sido previamente asociado con náuseas y mareos. La primera demostración de que un fármaco podría servir como refuerzo en animales, también utilizó el paradigma de CPL. Beach en 1957 a partir del trabajo preliminar de Spragg (citado en Bardo y Bevins, 2000), encontró que ratas no adictas, podrían acercarse a un compartimento que había sido apareado previamente con morfina prefiriéndolo a otro apareado con salino. Siguiendo a la demostración de Beach, el método de CPL fue usado de manera diversa en las décadas siguientes, aunque sólo en años recientes, éste método ha comenzado a tener un procedimiento común.

Diferentes factores contribuyeron al aumento en la popularidad del condicionamiento de preferencia de lugar. Un factor histórico fue el debilitamiento de la tradición conductista y la llegada de la llamada revolución cognitiva, que introdujo una amplia variedad de acercamientos al estudio de la conducta. Un ejemplo concreto, fue el reconocimiento de que algunos estímulos tenían propiedades incentivas que actuaban para modificar la conducta, de forma independiente al reforzamiento operante. Junto con este cambio, los investigadores comenzaron a enfrentarse a determinados problemas prácticos, con el uso del paradigma de auto-administración para el estudio del refuerzo, como el efecto motor de los fármacos que interfería en la ejecución de la respuesta. Por el contrario, en el CPL, el test conductual se realiza en animales que están libres de fármaco, por lo que ningún efecto del fármaco puede interferir con la manifestación de sus propiedades aversivas o reforzantes.

Estos factores y otras ventajas del CPL han contribuido a la popularidad del paradigma (Carr y cols. 1989; Bardo y cols., 1995; Tzschentke, 1998; Bardo y Bevins, 2000). La principal ventaja del

paradigma de condicionamiento de lugar, es que puede medir tanto las propiedades reforzantes de una droga, si induce CPL, como las propiedades aversivas, si produce un condicionamiento de aversión de lugar (CAL). Además el CPL y el CAL se han observado con pocas sesiones, lo que supone un corto tiempo de experimentación, y con dosis relativamente bajas, lo que sugiere que esta técnica tiene una mayor sensibilidad que otros tests conductuales que miden las propiedades reforzantes o aversivas de las drogas. Además, el equipo necesario para realizar el condicionamiento de lugar puede ser poco costoso, aunque existen aparatos, que no sólo registran de manera automática el tiempo que permanecen en un espacio en concreto, sino que también, pueden medir la actividad del animal mientras está en un espacio determinado (Shimosato y Ohkuma, 2000). Igualmente hay que señalar, que las predicciones del condicionamiento de lugar son consistentes con las de otros paradigmas conductuales: las drogas que han provocado CPL o CAL, han mostrado consistentemente que eran reforzantes o aversivas en otros paradigmas (Bardo y Bevins, 2000).

2.3.- Descripción básica del procedimiento.

Podemos encontrar hasta nueve tipos diferentes de aparatos de CPL (Carr y cols., 1989) usados por diferentes laboratorios, que varían en forma y tamaño. Los aparatos más simples se componen de dos compartimentos, con una puerta tipo guillotina en el centro. Una variación común es la inclusión de un tercer compartimento, más pequeño, en el centro que sirve de conexión entre ambos lados.

Hay que señalar que no ha habido un método único para realizar los estudios de CPL, aunque en los últimos años se han ido unificando algunas características del paradigma. En general, el apareamiento del tratamiento con un lugar que tiene determinados estímulos distintivos y el test de la preferencia de los animales entre ese lugar y otro, que tiene claves estimulares distintas, ha sido el procedimiento más común. A pesar de esta característica común en el procedimiento, la variabilidad metodológica sigue siendo importante (Bardo y cols., 1995), lo cual es un problema, ya que la comparación de datos obtenidos en diferentes laboratorios es difícil y en el caso de datos conflictivos estas diferencias son a menudo difíciles de unificar.

Condicionamiento de preferencia de lugar

Las dos principales variantes del procedimiento de CPL han sido denominadas diseños "biased" y "unbiased". En el procedimiento "biased" se realiza un pre-test en que se determina la línea base de preferencia de los animales entre dos ambientes. Este test inicial se realiza generalmente después de un periodo en el cual los animales han tenido libre acceso a ambos ambientes y han estado habituándose a los aparatos. Los animales permanecerán más tiempo en uno u otro ambiente antes del condicionamiento, es decir manifestarán una preferencia natural por uno de ellos. Si esta preferencia es significativa (por ejemplo, que todos los animales permanezcan más tiempo en un ambiente oscuro que en otro fuertemente iluminado), se puede intentar balancear el estímulo entre los dos ambientes (por ejemplo, se podría disminuir la luz o modificar el ambiente oscuro con otra modalidad sensorial que hiciera disminuir la aproximación de los animales, como un olor a vinagre).

Utilizando un diseño "biased", una droga que tenga propiedades reforzantes puede condicionar positivamente un ambiente que el animal prefería menos. Es decir, después de múltiples emparejamientos de la droga con el lugar menos preferido, con un número igual de emparejamientos de vehículo en el lugar más preferido, en la sesión de test (sin droga), el animal permanece más tiempo en el ambiente que, inicialmente, había preferido menos el día de la línea base de su preferencia. Por ello, se infiere que la droga ha producido propiedades reforzantes suficientes, condicionando la preferencia del animal por ese lugar. En este tipo de diseño se compara el tiempo que permanece en el lugar menos preferido, antes y después del condicionamiento con la droga.

En el otro diseño, denominado "unbiased", los animales son entrenados para que asocien los ambientes, asignados al azar, con uno u otro estado distintivo, por ejemplo después de la administración de la droga o del vehículo, sin registrar su preferencia innata a las señales presentes en uno o en el otro ambiente. Otra variante de este procedimiento es balancear el número de animales que reciben el tratamiento y el vehículo entre ambos compartimentos. Por ejemplo, que la mitad de animales de cada grupo reciba el fármaco en un compartimento y la otra mitad en el compartimento opuesto (la mitad del grupo experimental y del grupo control en el compartimento

Condicionamiento de preferencia de lugar

blanco y la otra mitad de animales de cada grupo en el compartimento negro). Dentro de esta variante, se puede realizar una medición del tiempo pasado en cada compartimento antes del condicionamiento, de modo que la mitad de animales de cada grupo sea condicionado al compartimento más preferido y la otra mitad al menos preferido.

Los aparatos de condicionamiento pueden ser diseñados de tal manera que los animales no muestren una preferencia significativa por uno de los compartimentos en la exposición inicial o fase de precondicionamiento (diseño "unbiased"). Por el contrario, también pueden ser diseñados para que los animales muestren una preferencia incondicionada por un lugar sobre el otro (diseño "biased"). En este último caso, la administración de la droga puede aparearse con la exposición del animal tanto al lugar preferido como al no preferido (asignación fija).

Aunque estos dos diseños son utilizados de manera independiente, algunos laboratorios han utilizado ambos para realizar una comparación entre ellos (Blander y cols., 1984). En general se observa desde hace años una preferencia por los diseños experimentales "unbiased". Se ha señalado que mediante la utilización del diseño "biased" se pueden obtener resultados falsos positivos, por ejemplo, si una droga tiene un fuerte componente ansiolítico podría vencer la aversión inicial por el compartimento no preferido, aumentando la preferencia por ese compartimento. Sin embargo, este argumento sólo es válido, cuando un tratamiento produce un aumento relativo en la preferencia por el lugar inicialmente no preferido, sin producir una preferencia absoluta. Si con el diseño "biased" se obtiene una preferencia absoluta por el lugar inicialmente no preferido, este efecto no puede ser explicado solamente por la acción ansiolítica del tratamiento, aunque tal acción pueda contribuir al efecto observado (Tzschentke, 1998). En la actualidad no hay una evidencia clara de discrepancias en los resultados obtenidos cuando se utilizan diseños "biased" vs "unbiased" para evaluar las propiedades reforzantes de las drogas. No obstante, los investigadores parecen preferir el diseño "unbiased" con el fin de obviar los problemas de interpretación de los resultados.

Condicionamiento de preferencia de lugar

Aunque los diseños "biased" y "unbiased" representan las principales variantes del procedimiento experimental del CPL, los distintos laboratorios que utilizan esta técnica también muestran grandes diferencias en otras variables (Bardo y cols., 1995). Un ejemplo es el espacio experimental que no solo puede diferir en la forma de cada uno de los dos ambientes, sino también en el número de compartimentos, en la presencia o ausencia de una zona central y en la situación espacial de los dos ambientes (forma en T, disposición recta, etc).

Otra variable que difiere en los estudios de CPL, es el número de modalidades sensoriales ofrecidas para hacer que cada uno de los dos ambientes sea diferente. La elección del estímulo discriminativo es importante, porque ha de ser suficientemente notorio o sobresaliente para que el animal aprenda la asociación. No hay una modalidad particular de estímulo (visual, táctil), que sea utilizada por todos los laboratorios y en realidad, es posible establecer CPL en presencia de un solo estímulo distintivo (textura del suelo, dibujos en la pared, etc.). Muchos laboratorios utilizan más de un estímulo distintivo para aumentar el potencial del aprendizaje asociativo; pueden utilizarse varias combinaciones de señales ambientales que ofrecen variables contrapuestas, tales como la percepción de la luz (iluminación vs. oscuridad), color (blanco vs. negro), forma (cuadrado vs. triangular o semicircular), dibujos (rayado vs. continuo liso, listas horizontales vs. verticales), sensación táctil de la textura del suelo (liso o uniforme vs. rugoso o rejilla de alambre), señales olfatorias (olor a vinagre, pino, limón, sésamo, brandy o cedro vs sin olor), etc. Intuitivamente, se puede esperar que un mayor contraste entre las señales estimulares a las que es expuesto el animal, produzca una discriminación más fácil entre el ambiente apareado con la droga y el apareado con el vehículo.

Los estudios también varían en la utilización o no de un pre-test antes de la fase de condicionamiento. En aquellos estudios en los que se utiliza un pre-condicionamiento, los animales normalmente son situados dentro del aparato sin fármaco para que lo exploren libremente. La pre-exposición varia, desde 9 a 20 minutos, siendo muy común la exposición de 15 minutos, durante tres días consecutivos. Estas sesiones de pre-exposición permiten al animal

Condicionamiento de preferencia de lugar

familiarizarse con los aparatos, antes del condicionamiento y del test y también pueden utilizarse para conocer el lugar preferido inicialmente por el animal, antes de que se le administre el fármaco. El principal inconveniente de la pre-exposición al aparato, es que un exceso puede atenuar el aprendizaje de CPL debido a la inhibición latente: es más difícil establecer el condicionamiento, si el animal ha sido expuesto previamente al estímulo sin refuerzo (Carr y cols. 1989; Tzschentke, 1998). Se ha observado que la ausencia o presencia de la preexposición (habitación), puede tener una influencia significativa en la magnitud de los efectos condicionados observados, de tal manera que en estudios sin preexposición generalmente se observan efectos mayores (Bardo y cols., 1995; Martín-Iverson y Reimer, 1996).

El número y duración de los ensayos de condicionamiento usados en los diferentes estudios también es variable. Generalmente el número de exposiciones a cada condición (por ejemplo, droga o vehículo) es igual pero algunas veces hay más sesiones de condicionamiento en una condición que en otra (Bilsky y cols. 1990). El número de sesiones de condicionamiento utilizado varía desde uno a seis, siendo cuatro lo más común. La duración de las sesiones de condicionamiento también es variable, desde 4 a 90 minutos, siendo de 30 a 45 minutos lo más habitual. Finalmente, el tiempo entre la inyección de fármaco y la colocación de los animales tampoco es fija, aunque, la mayor parte de investigadores optan por situar a los animales dentro de los compartimentos, inmediatamente o con pocos minutos de diferencia después de la inyección.

Otra variable es el número de sesiones de condicionamiento que se realizan por día. La secuencia relativa de la administración del fármaco y el número de sesiones de condicionamiento puede tener un gran efecto. En los experimentos de CPL, normalmente se utilizan un número extenso de sesiones de condicionamiento, por ello es interesante a nivel práctico utilizar protocolos experimentales que reduzcan el tiempo necesario para producir CPL sin reducir la validez y significación de los datos. Con el fin de reducir el tiempo necesario de un experimento es posible disminuir el número de ensayos de condicionamiento o realizar dos sesiones por día en vez de una (Kivastik y cols., 1996; Tzschentke y Schmidt, 1997). Este

Condicionamiento de preferencia de lugar

procedimiento genera los mismos resultados que el uso de una sola sesión de condicionamiento por día, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo. Sin embargo ha de tenerse un cuidado especial y asegurarse que el efecto de la sesión previa no interfiere en la siguiente. Este sería el caso de drogas que tienen un efecto a largo plazo, donde es necesario utilizar diseños contrabalanceados (Tzschentke, 1998).

Por último, el procedimiento del CPL también puede diferir en cuanto al número de sesiones de test realizadas. Todos los procedimientos de CPL realizan una sesión de test sin fármaco después del condicionamiento. Normalmente el tiempo registrado es de 10 a 45 minutos aunque lo más común es 15 minutos y la posición del animal puede ser registrada con observación directa o de forma automática (células fotoeléctricas). Algunos investigadores añaden otro día de test, administrando fármaco, con el objetivo de observar si el aprendizaje dependiente de estado contribuye al cambio de preferencia. En algunos estudios se evalúa el CPL en momentos diferentes, como ensayos de extinción.

En nuestro laboratorio hemos utilizado un aparato con dos compartimentos de igual tamaño, pero que difieren en cuanto al color (blanco vs negro) y a la textura del suelo (más o menos rugoso), separados por un tercer compartimento más pequeño, de color gris y suelo liso, que sirve de pasillo entre ambos compartimentos de condicionamiento (fig. 1).



Fig. 1

El procedimiento de CPL que realizamos consta de tres fases:



Fig 2

En la primera fase, llamada de pre-condicionamiento (fig.2), los animales exploran libremente los diversos compartimentos durante 15 minutos en 3 días consecutivos y el último día de esta fase, realizamos una medición del tiempo pasado en cada compartimento, para conocer la preferencia incondicionada.

A las 24 horas, comenzamos la fase de condicionamiento, en la que durante cuatro días consecutivos se aparea suero fisiológico con un compartimento y, a las cuatro horas, el tratamiento farmacológico correspondiente con el otro (figs. 3 y 4).



Fig 3

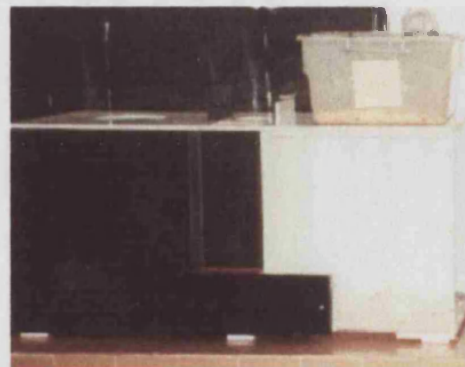


Fig 4

En nuestros experimentos iniciales, utilizamos en esta fase un procedimiento "biased" o de asignación fija de los animales al compartimento menos preferido (como puede verse en el estudio número 4), pero en los estudios posteriores hemos utilizado un diseño "unbiased" o contrabalanceado. El objetivo de esta fase es asociar los efectos de la droga con un entorno particular.

Al día siguiente del último ensayo de condicionamiento, tiene lugar la tercera fase, denominada post-condicionamiento o test, en la

que el animal, en un estado libre de droga, puede explorar libremente los compartimentos durante 15 minutos, registrándose el tiempo que permanece en cada ambiente (fig. 5).

Fig 5



Si hay un aumento del tiempo que permanece en el ambiente que previamente había sido condicionado con el tratamiento, comparado con el tiempo obtenido en la fase de precondicionamiento o con el tiempo pasado en el otro

ambiente, que había sido asociado con el vehículo en la fase de test, este cambio es llamado preferencia condicionada de lugar, o CPL. Este cambio en el tiempo que permanece en el ambiente apareado con la droga, puede ser atribuido a las propiedades reforzantes de la droga, que ha provocado una respuesta de aproximación. De igual modo, cuando el animal permanece menos tiempo en el ambiente apareado con un fármaco, se asume que la elección del animal es la expresión de su experiencia aversiva en este ambiente inducida por el fármaco. Este menor tiempo de permanencia es indicativo de una aversión condicionada al lugar y constituye una respuesta de escape (Schechter y Calcagnetti, 1993).

2.4.- Efecto de los fármacos.

Se han realizado numerosos estudios sobre los efectos de diferentes fármacos en el paradigma de condicionamiento de lugar. Los trabajos varían en cuanto al tipo de fármacos utilizados, pudiendo agrupar estos en dos categorías: aquellos que inducen CPL y aquellos que inducen CAL. Otra variación importante es la utilización de una dosis única o de múltiples dosis, así como, el uso de uno o varios fármacos de la misma o de diferente acción bioquímica. Finalmente, también se han utilizado varias rutas de administración de los fármacos incluyendo la oral (O), intravenosa (IV), subcutánea (SC), intraperitoneal (IP), intracerebroventricular (ICV) e intracraneal (IC).

Condicionamiento de preferencia de lugar

De hecho, hay numerosos estudios en los cuales se usan varios fármacos con diferentes vías de administración, por ejemplo, cuando se prueba el efecto de antagonistas administrados sistémicamente sobre la administración ICV o IC de drogas. En muchas ocasiones, la falta de resultados consistentes entre diferentes estudios, ha sido atribuida a estas diferencias en el procedimiento farmacológico.

La administración de fármacos que estimulan el sistema dopaminérgico directamente, como la anfetamina o la cocaína, produce CPL cuando son administrados de forma sistémica, ICV o IC, en gran variedad de especies animales (Tzchentke, 1998; Bardo y Bevins, 2000). Sin embargo, a pesar de que los estudios indican que las drogas que causan un incremento en los niveles de DA extracelular producen CPL, no están claros los subtipos de receptor dopaminérgico implicados en este efecto. Los agonistas D2 normalmente inducen CPL, mientras que, los agonistas D1 no producen claros efectos reforzantes.

Por el contrario interferir con la transmisión DA puede producir CAL, como se ha observado tras la administración de dosis altas de CGS 10746B, un inhibidor de la liberación de DA (Calcagnetti y Schechter, 1991; Schechter y Meehan, 1994). Igualmente, los antagonistas dopaminérgicos tienen efectos diferentes sobre el condicionamiento de lugar, en función del tipo de receptor sobre el que actúan. No está del todo claro, el efecto de bloquear la transmisión dopaminérgica en los receptores D1, aunque algunos estudios han observado un efecto aversivo (CAL) de antagonistas selectivos del receptor D1, como el SCH 23390 (Shippenberg y Herz, 1988; Shippenberg, y cols., 1991; Shippenberg y cols., 1993; Acquas y Di Chiara, 1994). Por el contrario, parece bastante claro que el bloqueo de la transmisión dopaminérgica en los receptores D2 no tiene efectos aversivos (Shippenberg y Herz, 1988; Shippenberg, y cols., 1991; Bechara y cols., 1992; Shippenberg, y cols., 1993; Planeta y cols., 1995; Wu y Zhu, 1999). El papel de los receptores D3 también parece ser importante en las propiedades reforzantes de los fármacos, aunque su activación o bloqueo tiene efectos opuestos al de otros receptores DA (Chaperon y Thiebot, 1996; Khroyan y cols., 1997). Por ejemplo, la administración de antagonistas D3 produce CPL (Kling-Petersen y cols., 1995a y b), lo que sugiere un papel



Condicionamiento de preferencia de lugar

inhibidor para estos receptores en la mediación del refuerzo. Finalmente, el papel de los receptores D4 ha sido muy poco estudiado debido a la falta de antagonistas selectivos de alta afinidad.

Otro grupo de fármacos, que claramente produce CPL, son los agonistas opiáceos, como la morfina (Shippenberg y cols., 1996; Contarino y cols., 1997; Coventry y cols., 1997; Randall y cols., 1998; Belzung y Barreau, 2000; Xu y cols., 2001) o la heroína (Hand y cols., 1989; Stinus y cols., 1989) mientras que los antagonistas opiáceos como la naloxona producen CAL (Mucha e Iversen, 1984). En general, los estudios han confirmado el posible papel del sistema opioide y sus receptores en los mecanismos de refuerzo. La activación del receptor μ comúnmente produce CPL, mientras que la situación no está tan clara para el receptor δ . Por el contrario, la activación del receptor κ tiene predominantemente efectos aversivos (Funada y cols., 1993; Shippenberg, y cols., 1993).

Otros fármacos también son capaces de inducir condicionamiento de lugar, pero los parámetros metodológicos y de procedimiento pueden modificar los resultados obtenidos con estos fármacos. Algunos ejemplos son el tetrahidrocannabinol (Cheer y cols., 2000; Valjent y Maldonado, 2000), el etanol (Cunningham y cols., 2000), la nicotina (Martin e Itzhak, 2000; Di Chiara, 2000) y las benzodiazepinas (Leri y Franklin, 2000a y b) que generalmente inducen CPL, excepto bajo determinadas circunstancias.

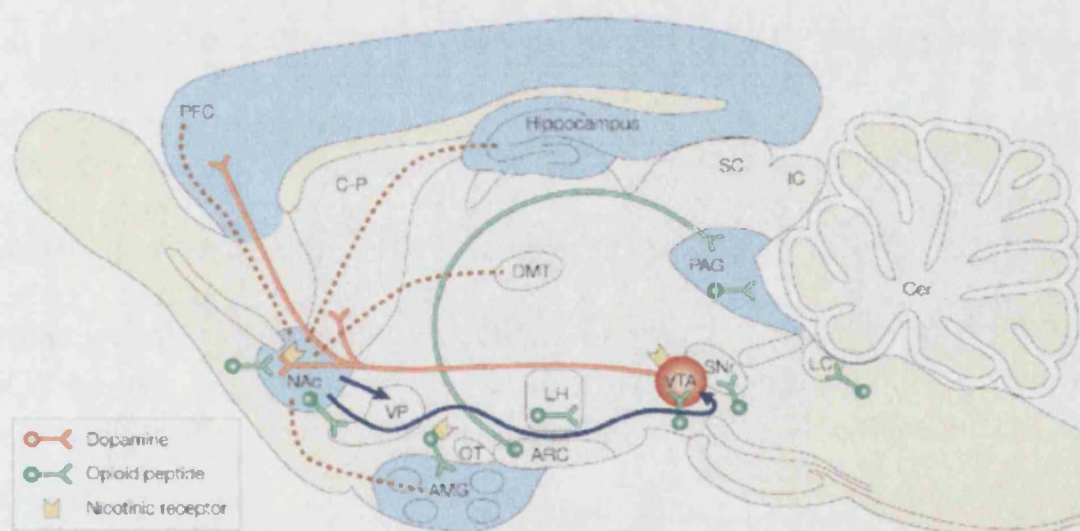
Finalmente, los resultados obtenidos con otros grupos de fármacos, como los que actúan sobre el sistema serotoninérgico (Subhan y cols., 2000), glutamatérgico (Panos y cols., 1999), hormonas peptídicas (Lu y cols., 2000a, b), inhibidores de los canales de calcio (Fan y cols., 1999), etc. están mucho menos claros, por lo que la implicación de estos sistemas en los mecanismos del refuerzo no está aclarada de forma definitiva. En la actualidad, el paradigma del CPL se está usando en la evaluación del efecto motivacional de nuevos compuestos con diferente acción farmacológica o para estudiar la implicación de diferentes sistemas de neurotransmisión en las propiedades reforzantes de diferentes drogas (Ciccocioppo y cols., 2000; Li y cols., 2000; Lu y cols., 2001; Sora y cols., 2001).

3.- INTERACCIÓN DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO Y EL SISTEMA OPIÁCEO.

3.1. Mecanismos neuroanatómicos

Durante los últimos años, numerosos resultados experimentales señalan un importante papel del sistema dopaminérgico como mediador en muchos de los efectos de los opiáceos sobre diversas conductas, lo cual indicaría la existencia de una interacción entre el sistema opiáceo y el sistema dopaminérgico. A nivel anatómico esta interacción se observa en la figura 6.

Fig. 6



Nature Reviews | Neuroscience

PFC: córtex prefrontal	NAc: núcleo accumbens	ATV: área tegmental ventral	CE: cerebelo
C-P: caudado-putamen	ARC: núcleo arcuato	DMT: tálamo dorsomedial	AMG: amígdala
SNr: sustancia negra	LC: locus coeruleus	PAG: sust. gris periacueductal	SC: col. superior
VP: pálido ventral	OT: tubérculo olfatorio	LH: Hipotálamo lateral	IC: col. inferior

Se ha observado una alta densidad de encefalinas y receptores opiáceos en estructuras límbicas y del prosencéfalo (Koob, 1992; Sesack y Pickel, 1992; Angulo y McEwen, 1994; Ostrowski y Pert, 1995; Wang y cols., 1997; Lu y cols., 1998; Zahm, 1999; David y

Interacción del sistema dopaminérgico y el sistema opiáceo

Cazala, 2000; Unterwald y Cuntapay, 2000), estando estas regiones implicadas en la regulación de los estados emocionales y motivacionales. En concreto, se ha visto que existe una estrecha asociación entre la distribución de las fibras encefalinérgicas y las neuronas dopaminérgicas, detectándose altas concentraciones de encefalinas y receptores opiáceos en el Núcleo Accumbens (NAcc), Área Tegmental Ventral (ATV), sistema nigroestriatal y córtex prefrontal.

Desde un punto de vista bioquímico, los opiáceos influyen en el funcionamiento de los sistemas dopaminérgicos centrales, estimulando la síntesis, metabolismo, y recambio (turnover) de dopamina, e incrementando la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas. Utilizando técnicas de microdiálisis se ha demostrado que la administración de agonistas de los receptores opiáceos μ y δ (morfina y β -endorfina) provoca un aumento en la tasa de descarga de las neuronas dopaminérgicas (Gysling y Wang, 1983; Matthews y German, 1984; Melis y cols., 2000), así como también un aumento de la liberación de dopamina y de su metabolismo en las regiones terminales, principalmente en el NAcc (Di Chiara e Imperato 1988a; Spanagel y cols., 1990; Leone y cols., 1991; Pontieri y cols., 1995; Bassareo y cols., 1996; Tanda y Di Chiara, 1998; Piepponen y cols., 1999). Por el contrario, la administración de agonistas del receptor opiáceo κ produce una disminución de la liberación de dopamina (Di Chiara e Imperato, 1988a; Spanagel y cols., 1992; Maisonneuve y cols., 1994; Gray y cols., 1999).

Al parecer, los agonistas de los receptores μ y δ opiáceos aumentan la liberación de dopamina a través de mecanismos indirectos. La activación de estos receptores, situados probablemente sobre neuronas gabérgicas inhibitorias (Di Chiara y North, 1992; Johnson y North, 1992), produce la desinhibición de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas. En contraste, la activación de los receptores κ , localizados presinápticamente en el NAcc inhiben la liberación de dopamina (Spanagel y cols., 1992; Gray y cols., 1999).

En la figura 7 se muestra la relación entre las neuronas gabérgicas y dopaminérgicas del ATV y la presencia de receptores κ en el NAcc.

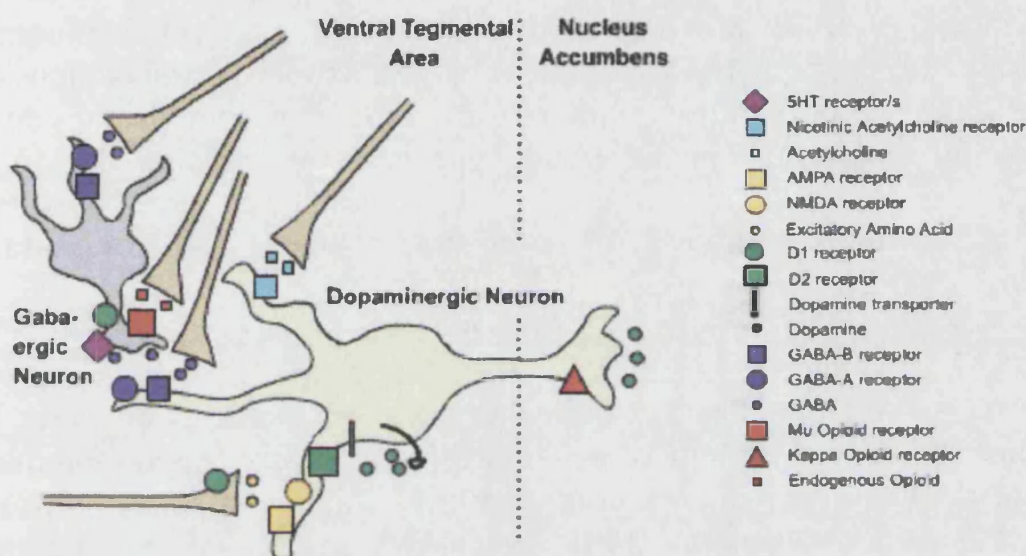


Fig. 7

3.2. Estudios conductuales.

Desde un punto de vista conductual, la interacción entre el sistema dopaminérgico y opiáceo se ha estudiado sobre aquellas conductas en las que los dos sistemas parecen estar implicados, fundamentalmente sobre la actividad motora y los procesos de refuerzo.

3.2.1. Estudios sobre conducta motora.

Uno de los resultados mejor conocidos en psicofarmacología, es que los fármacos que aumentan la transmisión en las sinapsis dopaminérgicas, incrementan la actividad motora y que la disminución o el bloqueo de los sistemas dopaminérgicos por la administración de antagonistas dopaminérgicos o por las lesiones con 6-OHDA, la disminuyen (Beninger, 1983; Di Chiara e Imperato, 1987; Simón y cols., 2000).

Interacción del sistema dopaminérgico y el sistema opiáceo

Las vías dopaminérgicas nigroestriatal y mesolímbica han sido implicadas en la regulación de la actividad motora, ya que su lesión mediante 6-OHDA provoca una disminución de la actividad (Bloom y cols., 1989; Schwarting y Huston, 1996). Sin embargo, ambos tipos de neuronas dopaminérgicas pueden mediar diferentes componentes de la función motora. Se ha observado que la administración de DA o agonistas DA en el estriado produce conductas estereotipadas, mientras que, cuando es administrada en el NAcc produce hiperactividad (Bloom y cols., 1989; Arnt, 1995).

Los opiáceos también ejercen marcados efectos sobre la actividad motora de los animales experimentales. En ratas, la administración sistémica de morfina a dosis bajas produce hiperactividad (Di Chiara y cols., 1987; Di Chiara e Imperato, 1988a y b; Ostrowsky y Caggiula, 1991; Bespalov y Zvartau, 1996), mientras que dosis más altas provocan un efecto bifásico, caracterizado por una primera fase de sedación que es seguida por una fase de hiperactividad (Di Chiara y cols., 1987; Magnus-Ellenbroek y Havemann-Reinecke, 1993). La administración de dosis más altas de morfina produce efectos sedativos (Broekkamp y cols., 1984; Tzschentke y Schmidt, 1996). En ratones, la administración de morfina produce únicamente hiperactividad (Manzanedo y cols., 1999; Rodríguez-Arias y cols., 2000). La hiperactividad inducida por la morfina parece estar influida por el sistema dopaminérgico, ya que diversos estudios han mostrado que la administración de antagonistas de los receptores dopaminérgicos o la lesión con 6-OHDA del NAcc hace desaparecer la hiperactividad producida por los opiáceos (Kimmel y cols., 1995; Manzanedo y cols., 1999; Rodríguez-Arias y cols., 2000). Por el contrario, los efectos sedativos de la morfina parecen ser independientes del sistema dopaminérgico, y pueden deberse a la estimulación de receptores opiáceos localizados en diferentes estructuras como el núcleo rafe, el núcleo caudado, etc. (Broekkamp y cols., 1984; Magnus-Ellenbroek y Havemann-Reinecke, 1993).

Tanto los receptores dopaminérgicos D1 como los D2 parecen estar implicados en la hiperactividad producida por la administración de morfina, ya que este efecto puede ser antagonizado por fármacos que actúan más específicamente en los receptores D1, como el SCH 23390 (Longoni y cols., 1987; Rodríguez-Arias y cols., 2000) y en los

Interacción del sistema dopaminérgico y el sistema opiáceo

receptores D2, como el haloperidol (Magnus-Ellenbroek y Havemann-Reinecke, 1993; Manzanedo y cols., 1999; Rodríguez-Arias y cols., 2000).

Cuando la morfina es administrada de forma crónica aparece sensibilización a su efecto estimulante sobre la actividad. Este fenómeno de sensibilización va acompañado por un aumento en la liberación de dopamina y de su metabolismo en el NAcc (Spanagel y Shippenberg, 1993; Airio y Ahtee, 1997), mientras que en el caudado-putamen hay resultados controvertidos, observándose una falta de efecto (Johnson y Glick, 1993) o un incremento similar al observado en el NAcc (Cadoni y Di Chiara, 1999). En concreto, la estimulación de la liberación de DA se ha observado en el "core" del NAcc (Cadoni y Di Chiara, 1999). Estas observaciones sugieren que el aumento en la actividad de la vía dopaminérgica mesolímbica puede mediar algunos aspectos del fenómeno de sensibilización (Vanderschuren y Kalivas, 2000).

3.2.2. Estudios sobre el refuerzo.

El sistema dopaminérgico mesolímbico ha sido implicado en las propiedades motivacionales de diferentes estímulos. El refuerzo producido por drogas, estimulación eléctrica cerebral y otros estímulos naturales como la comida, el agua o la novedad del entorno, es disminuido por los antagonistas dopaminérgicos y por las lesiones de este sistema de transmisión (Wise, 1998; Di Chiara, 1999; Ikemoto y Panksepp, 1999; Spanagel y Weiss, 1999; Wise, 2000; Tzschentke, 2001).

Se ha comprobado que los opiáceos afectan de forma significativa a los procesos motivacionales. Dependiendo del tipo de receptor con el que interactúan, los opiáceos pueden inducir efectos motivacionales opuestos: la activación de los receptores μ y δ es reforzante mientras que la activación de los receptores κ produce efectos aversivos. Por ejemplo, se ha observado que la administración de morfina y β -endorfina produce CPL (Spanagel y cols., 1991; Belzung y Barreau, 2000), al igual que los agonistas de los receptores delta BW373U86 y SNC 80 (Longoni y cols., 1998), mientras que la

Interacción del sistema dopaminérgico y el sistema opiáceo

administración de U-50,488H, un agonista de los receptores kappa, produce aversión condicionada a un lugar (Funada y cols., 1993).

La mediación del sistema dopaminérgico mesolímbico en el refuerzo y la aversión producidos por los opiáceos fue sugerida a partir de los siguientes hallazgos experimentales:

1. Los agonistas de los receptores opiáceos μ y δ tienen propiedades reforzantes a las mismas dosis que incrementan la liberación de dopamina en el NAcc (Di Chiara y cols., 1987; Di Chiara e Imperato, 1988a y b; Spanagel y cols., 1991; Piepponen y cols., 1999).

2. Los agonistas de los receptores opiáceos κ tienen propiedades aversivas a las mismas dosis que disminuyen la transmisión en el sistema dopaminérgico mesolímbico (Spanagel y cols., 1992).

3. Los antagonistas dopaminérgicos o las lesiones con 6-OHDA del NAcc eliminan los efectos motivacionales de los opiáceos. En concreto, se ha observado que el refuerzo inducido por la heroína es bloqueado por la administración de antagonistas dopaminérgicos como haloperidol (Spyraki y cols., 1983), SCH 23390 (Nakajima y Wise, 1987; Gerrits y cols., 1994), pimocida (Hand y cols., 1989) y racloprida (Nakajima, 1989) y por la lesión con 6-OHDA del NAcc (Spyraki y cols., 1983; Bozarth y Wise, 1986). Igualmente, Leone y Di Chiara (1987) han observado que las propiedades reforzantes de la morfina son antagonizadas por la administración de antagonistas dopaminérgicos como SCH 23390 y haloperidol.

Últimamente, la interacción entre el sistema dopaminérgico y el opiáceo en la mediación del refuerzo se ha estudiado utilizando tres técnicas: el CPL, la auto-estimulación eléctrica intracraneal (AEIC) y la auto-administración (Tzchentke, 1998; Di Chiara, 1999; McBride y cols., 1999; Bardo y Bevins, 2000).

A partir de los estudios realizados con estas tres técnicas, se ha podido comprobar como los opiáceos parecen ejercer sus acciones reforzantes actuando en diferentes áreas, entre las que destacan el ATV, a nivel de los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas

A10, y en el NAcc, a nivel de los terminales dopaminérgicos (Wise y Rompré, 1989; Wise y cols., 1992; Shippenberg y Elmer, 1998).

En la figura 8 se pueden observar los resultados obtenidos utilizando el paradigma de auto-administración (en rojo) y de CPL (en azul).

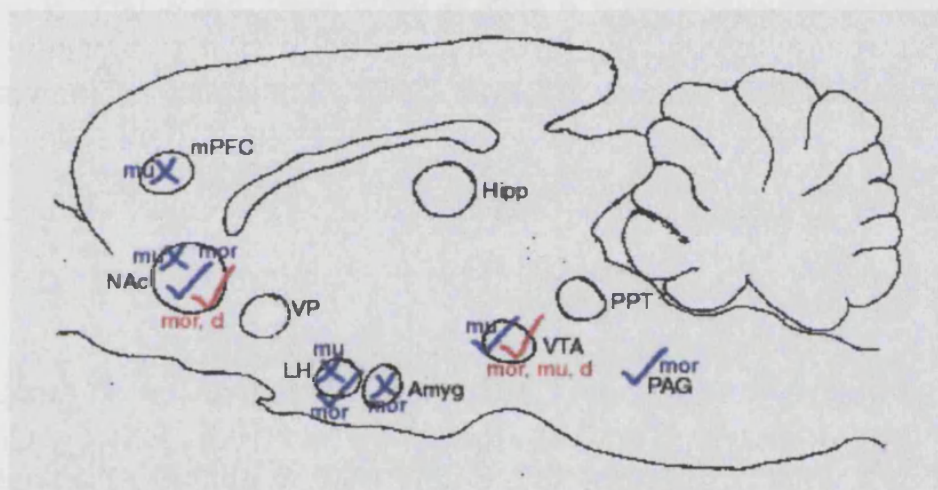


Fig. 8

mPFC: córtex prefrontal medial
Amyg: amígdala
NAc: núcleo accumbens
LH: hipotálamo lateral
PAG: sustancia gris periacueductal

VP: pálido ventral
PPT: núcleo tegmental pedúnculo-pontino
VTA: área tegmental ventral
Hipp: hipocampo

La interacción entre los opiáceos y el sistema dopaminérgico en el refuerzo parece ser diferente a nivel del ATV y del NAcc.

Interacción en el ATV

Utilizando la técnica de auto-administración intracraneal (AAIC) se ha observado que ratas y ratones se auto-administran morfina o agonistas μ y δ dentro del ATV (Self y Stein, 1993; David y Cazala, 1994a; Devine y Wise, 1994). Los mismos resultados se han obtenido usando administración intracraneal en el paradigma de CPL (Bals-Kubik y cols., 1993; Olmstead y Franklin 1997a). También se ha observado que la administración intracerebral de morfina en el ATV

Interacción del sistema dopaminérgico y el sistema opiáceo

potencia los efectos reforzantes de la estimulación hipotalámica cerebral (Bauco y cols, 1993).

Estos estudios sugieren que el ATV es responsable, al menos en parte, del refuerzo inducido por los opiáceos y, en general, de la acción reforzante de todas las drogas (Shippenberg y Elmer, 1998; Wise, 1998; McBride y cols., 1999). La morfina actuaría sobre los receptores opiáceos μ estimulando, de forma indirecta a través de interneuronas gabérgicas, la actividad del sistema dopaminérgico mesolímbico (Di Chiara y North, 1992) poniendo en marcha los sistemas motivacionales del cerebro (Ikemoto y Panksepp, 1999; Spanagel y Weiss, 1999; Wise, 2000; Tzschentke, 2001).

Interacción en el NAcc

Los trabajos con AAIC sugieren que la activación de receptores opioides μ y δ en el NAcc es reforzante (Olds, 1982; David y Cazala, 2000) por lo que se piensa que en el NAcc también hay un sustrato neuroanatómico que media el efecto reforzante de la morfina. Por otra parte los estudios realizados con administración intracraneal en el CPL han encontrado tanto un efecto reforzante de la morfina (van der Kooy y cols., 1982), como una falta de CPL (Bals-Kubik y cols., 1993; Olmstead y Franklin, 1997a). Las razones de estas diferencias no están claras, pero pueden ser debidas a las diferentes tareas realizadas, protocolo experimental o dosis utilizadas.

Con respecto a la implicación del sistema dopaminérgico también hay resultados diversos. Algunos estudios han observado que, en determinadas ocasiones, la administración de antagonistas dopaminérgicos no bloquea las propiedades reforzantes de los opiáceos. Mackey y van der Kooy (1985) encontraron que la administración de haloperidol y α -flupentixol no eliminaba las propiedades reforzantes de la morfina, mientras que Bechara y cols. (1992) sólo observaron un bloqueo del refuerzo producido por la morfina en animales dependientes pero no en animales inyectados por primera vez.

Interacción del sistema dopaminérgico y el sistema opiáceo

Estos resultados, en contraste a los obtenidos cuando se estudia el ATV, pueden deberse a que el refuerzo inducido por los opiáceos puede ser bastante independiente de la dopamina a nivel del NAcc. En este sentido, se ha observado que la administración crónica de antagonistas dopaminérgicos no elimina la administración de heroína en el NAcc sino que puede incluso potenciarla (Stinus y cols., 1992).

Otras estructuras implicadas en los efectos reforzantes de los opiáceos han sido el hipotálamo lateral y medial, zona ventral de la formación reticular (David y Cazala, 1994b), el hipocampo (Self y Stein, 1993), el núcleo pedúnculo pontino (Bechara y cols., 1998) y la sustancia gris periacueductal (Van der Kooy y cols., 1982; David y Cazala, 1994b; Olmstead y Franklin, 1997a y b), aunque la implicación del sistema dopaminérgico en el refuerzo inducido por los opiáceos en estas estructuras no ha sido estudiada.

Finalmente, nos centraremos en la descripción más exhaustiva de los resultados obtenidos sobre la interacción entre el sistema dopaminérgico y el sistema opiáceo mediante el CPL, procedimiento que hemos utilizado en el presente trabajo.

Numerosos estudios han mostrado que la inyección de morfina de forma sistémica o en diferentes áreas cerebrales, como el ATV, el NAcc, el hipotálamo lateral o la sustancia gris periacueductal, induce CPL. Este efecto es bloqueado con antagonistas dopaminérgicos o por lesiones mediante 6-OHDA de las neuronas mesolímbicas. Estudios más recientes usando técnicas genéticas, también han demostrado la implicación del sistema dopaminérgico en el CPL inducido por morfina (Tolliver y cols., 2000), y en ratones "knockout" para el transportador de DA, se produce una potenciación del CPL inducido por morfina, sugiriendo que el incremento en los niveles de DA extracelular es el responsable de este efecto (Spielewoy y cols., 2000).

No obstante, parece existir una acción diferente de los antagonistas dopaminérgicos sobre el efecto reforzante de los opiáceos en función del tipo de receptor que bloquean preferentemente. Así, se ha observado que la administración de antagonistas de los receptores D1 (como el SCH 23390), ejerce efectos aversivos y disminuye las acciones reforzantes de la morfina; sin embargo la administración de

Interacción del sistema dopaminérgico y el sistema opiáceo

antagonistas selectivos de los receptores D2 (como el sulpiride o la espiperona) no ejerce dicha acción, no modificando el CPL inducido por dicho opiáceo.

Aunque estos resultados parecen indicar una falta de implicación de los receptores D2 en los efectos reforzantes de los opiáceos, los trabajos realizados con ratones "knockout" muestran claramente que sin receptores D2 la morfina no ejerce efectos reforzantes (Maldonado y cols., 1997).

Un resumen de los resultados obtenidos por los diferentes trabajos que estudian los efectos del bloqueo de los receptores dopaminérgicos sobre los efectos reforzantes de la morfina y la heroína en el CPL puede encontrarse en la Tabla 1,

Tabla 1

AUTOR	AÑO	DOSIS DE MORFINA	ESPECIE	MANIPULACIÓN SIST. DA	EFEECTO
Mackey y van der Kooy	1985	1 y 5 mg/kg SC	Rata Wistar	Haloperidol 1 mg/kg α -flupentixol 0.8mg/kg IP 2.5 h antes de morfina	= CPL
Leone y Di Chiara	1987	0.5 mg/kg SC	Rata Sprague-Dawley	SCH 23390 0.05mg/kg SC Haloperidol 0.2 mg/kg	↓ CPL
Shippenberg y Herz	1988	3 mg/kg	Rata Sprague-Dawley	SCH 23390, 1mg/kg/día crónico Sulpiride 20 mg/kg Espiperona 0.5mg/kg	↓ CPL = CPL
Acquas y cols.	1989	1 mg/kg SC	Rata Sprague-Dawley	SCH 23390 0.05 mg/kg SC	↓ CPL
Bechara y cols.	1992	2 mg/kg IP	Rata dependiente Rata No depend. Wistar	α -flupentixol 0.8 mg/kg IP	↓ CPL = CPL

Interacción del sistema dopaminérgico y el sistema opiáceo

Tabla 1 (cont.)

AUTOR	AÑO	DOSIS DE MORFINA	ESPECIE	MANIPULACIÓN SIST. DA	EFEECTO
Shippenberg y cols.	1993	3 mg/kg 5 mg/kg 3 mg/kg SC	Rata Sprague- Dawley	SCH 23390 0.1 µg/kg SCH 23390 0.1 µg/kg Sulpiride 2 y 20 µg/kg intra-accumbens	↓ CPL = CPL = CPL
Suzuki y cols.	1993	1 a 5 mg/kg SC	Ratón CXBX	SCH 23390, 1 mg/kg SC	↓ CPL
Acquas y Di Chiara	1994	1 mg/kg SC	Rata Sprague- Dawley	SCH 23390, 0.0125 SCH 39166, 0.025 SCH 23390, 0.05 y 1 SCH 39166, 0.05 y 1 mg/kg SC	= CPL ↓ CPL
Suzuki y cols.	1995	7 mg/kg SC	Ratón ddY	SCH 23390 0.3 y 3 µg/kg SC	↓ CPL
Suzuki y Misawa	1995	8 mg/kg IP	Rata Sprague- Dawley	Sertindole 1 mg/kg SC	↓ CPL
Nader y van der Kooy	1997	ATV 500 ng	Rata Wistar	α-Flupentixol 0.8 mg/kg IP	↓ CPL
AUTOR	AÑO	DOSIS DE HEROINA	ESPECIE	MANIPULACIÓN SIST. DA	EFEECTO
Spyraki y cols.	1983	2 mg/kg IP	Rata Wistar	Haloperidol 0.2 mg/kg IP	↓ CPL
Handa y cols.	1989	250 µg/kg SC	Rata Sprague- Dawley	Pimocide 50, 100 Pimocide 250 µg/kg IP	= CPL ↓ CPL
Nader y cols.	1994	2 mg/kg SC	Rata Wistar	Pimocide 0.5 mg/kg IP	↓ CPL

4.- RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

4.1.- Estudio 1: Efectos de antagonistas de los receptores dopaminérgicos D2 y D3 en la actividad motora espontánea y en la hiperactividad inducida por morfina en ratones.

Investigación original: C. Manzanedo, M.A. Aguilar and J. Miñarro (1999) The effects of dopamine D2 and D3 antagonist on spontaneous motor activity and morphine-induced hyperactivity in male mice. Psychopharmacology, 143: 82-88.

La neurotransmisión dopaminérgica y en particular la vía mesolímbica, ha sido implicada en la mediación de la conducta motora y de la hiperactividad inducida por la morfina. En este sentido, se ha observado que las sustancias que bloquean los receptores DA pueden disminuir la actividad motora espontánea y reducir la hiperactividad inducida por la morfina, no obstante, este último efecto de los antagonistas DA puede ser dependiente del tipo de receptor DA que es bloqueado con mayor preferencia. En general, se ha observado que tanto el bloqueo de los receptores DA D1 como D2 revierte la hiperactividad inducida por la morfina, sin embargo los efectos del bloqueo de los receptores DA D3 no han sido estudiados. El U-99194A maleato es un antagonista DA que tiene una preferencia 20 veces mayor por los receptores D3 que por los receptores D2. En ratas y ratones se ha observado que este fármaco produce efectos estimulantes sobre la conducta motora lo cual ha sido explicado mediante dos hipótesis alternativas. La primera explicación está basada en la idea de que el bloqueo de autorreceptores D3 causaría un incremento en la liberación de dopamina que explicaría la hiperactividad. Por el contrario, la segunda hipótesis está basada en los resultados obtenidos con agonistas D3 que tienen efectos similares a los antagonistas DA D1/D2, produciendo deterioros de la conducta motora. Otra característica interesante de los receptores D3 es su localización en el sistema límbico, lo que sugiere un posible papel de estos receptores en la hiperactividad inducida por la morfina.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la acción del U-99194A maleate sobre la actividad motora espontánea y sobre la hiperactividad inducida por diferentes dosis de morfina en ratones

Resumen global de resultados

machos. También se comparó la acción del antagonista DA D3 con otros antagonistas dopaminérgicos más estudiados como son el antagonista mixto DA D1/D2 haloperidol y el antagonista selectivo DA D2 sulpiride.

La actividad de los animales (n=11) fue evaluada usando un actímetro que realizaba un registro de actividad cada 30 minutos tras la administración de los diferentes fármacos, registrándose un total de 120 minutos tras el tratamiento con 2.5, 5, 10 y 20 mg/kg de U-99194A maleato (experimento 1) y 60 minutos tras el tratamiento con 5, 10, 20 y 40 mg/kg de morfina, 0.075 y 0.1 mg/kg de haloperidol y 20 y 40 mg/kg de sulpiride (experimento 2). Para estudiar los efectos del bloqueo de los receptores DA D3 sobre la hiperactividad inducida por morfina, los animales eran colocados en el actímetro tras recibir la morfina (20 y 40 mg/kg) y, tras 30 minutos de intervalo, se les inyectaba 20 mg/kg de U-99194A maleato, registrándose la actividad por un periodo de 30 minutos (experimento 3). Finalmente, para evaluar los efectos del haloperidol (0.075 y 0.1 mg/kg) y del sulpiride (20 y 40 mg/kg) sobre la hiperactividad inducida por morfina (10, 20 y 40 mg/kg) los animales fueron colocados en el actímetro inmediatamente después de la administración de morfina más el antagonista DA correspondiente y se evaluó su actividad entre los 30 y los 60 minutos tras la administración de los fármacos (experimento 4).

Los resultados nos indicaron que los animales tratados con 20 y 40 mg/kg de morfina, entre los 30 y los 60 minutos después de su administración, mostraron hiperactividad. Igualmente, el bloqueo de los receptores DA D3 con el U-99194A maleato produjo un aumento significativo de la actividad motora con la dosis de 20 mg/kg en los primeros 30 minutos tras su administración. Por otro lado, la administración de haloperidol y sulpiride no tuvo efectos sobre la actividad de los animales. Sin embargo, todos los antagonistas DA utilizados revirtieron la hiperactividad inducida por morfina, aunque se observaron diferencias en función de la dosis y del antagonista DA utilizado. La dosis de 20 mg/kg de U-99194A maleato bloqueó la hiperactividad inducida por 20 pero no por 40 mg/kg de morfina, todas las dosis de haloperidol bloquearon la hiperactividad inducida por 20 y 40 mg/kg de morfina y únicamente la dosis más alta de

sulpiride bloqueó la hiperactividad inducida por la dosis menor de morfina.

El hecho de que el bloqueo de los receptores D3 con la administración de U-99194A maleato incremente la actividad sugiere que estos receptores pueden ejercer un papel inhibitorio en el control de la conducta motora. Sin embargo, el bloqueo de los receptores D3 tiene efectos similares al bloqueo de otros receptores DA como los D1 o D2 contrarrestando la hiperactividad inducida por morfina. Este efecto podría explicarse por un efecto directo del bloqueo de los receptores DA D3 o, de forma alternativa, por un mecanismo relacionado con el antagonismo de los receptores D2.

Una posible explicación para los efectos paradójicos del U-99194A maleato, que produce un incremento de la actividad pero contrarresta la hiperactividad inducida por la morfina, podría estar basada en dos características importantes de los receptores D3: su localización tanto presináptica como postsináptica y el hecho de que su papel pueda variar en función del nivel basal de dopamina. Si el bloqueo de los receptores D3 se produce cuando el nivel de dopamina es bajo o normal, es decir, si la administración de U-99194A maleato se realiza cuando los animales están explorando un nuevo entorno, predomina el efecto de antagonismo de los autorreceptores D3, con la consecuente liberación de DA e incremento de la actividad motora. Por el contrario, si el bloqueo de los receptores D3 se produce cuando el nivel de dopamina es elevado, por ejemplo, tras la administración de morfina, el efecto predominante es sobre los receptores postsinápticos, produciendo efectos similares a otros antagonistas dopaminérgicos.

En general, los resultados sugieren que el tratamiento con neurolépticos, independientemente de su perfil bioquímico (actuación preferente sobre receptores D1, D2 y D3), produce un bloqueo de la hiperactividad inducida por morfina, lo que apoya la idea de que este efecto de la morfina está mediado por el sistema DA mesolímbico.

4.2.- Estudio 2 : Efectos de antagonistas dopaminérgicos con diferente perfil bioquímico sobre la preferencia de lugar inducida por morfina en ratones.

Investigación original: C. Manzanedo, M.A. Aguilar, M. Rodríguez-Arias and J. Miñarro (2001) Effects of dopamine antagonists with different receptor blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice. Behavioural Brain Research, 121, 189-197.

El sistema dopaminérgico mesolímbico parece ser el principal sustrato neural de los efectos reforzantes producidos por la morfina. A nivel bioquímico, se ha demostrado que la administración de morfina aumenta la DA extracelular en el NAcc, hipotetizándose que esta estimulación de la transmisión dopaminérgica juega un papel crucial en la adicción a las drogas.

A nivel conductual, numerosos trabajos han indicado que la morfina produce, tanto en ratas como en ratones, una preferencia condicionada por el lugar en el que ha sido administrada. En general se ha sugerido que el CPL inducido por morfina depende del sistema DA mesolímbico, ya que los antagonistas DA y las lesiones del NAcc con 6-OHDA bloquean este efecto. Sin embargo, en algunos trabajos se ha observado que, bajo determinadas circunstancias, el CPL inducido por morfina puede producirse de forma independiente de la activación del sistema DA. Por ejemplo, se ha observado que el antagonista dopaminérgico haloperidol bloquea el CPL inducido por morfina únicamente en ratas dependientes.

Los trabajos realizados para examinar el papel de los diferentes receptores de DA en el CPL inducido por morfina han producido resultados inconsistentes. La mayor parte de los estudios ofrecen datos acerca de la importancia de los receptores DA D1, ya que los antagonistas selectivos de estos receptores bloquean el CPL inducido por morfina. Con respecto al papel de los receptores DA D2 su influencia no está clara, ya que la administración de antagonistas que actúan de forma más selectiva sobre estos receptores, generalmente no tienen efectos sobre el CPL inducido por morfina o sólo lo bloquean en algunos estudios. Sin embargo, utilizando ratones modificados genéticamente, se ha observado un bloqueo total del CPL inducido por morfina en ratones con una supresión genética de los receptores D2,

lo que apoya la idea de que estos receptores también pueden estar implicados en los efectos reforzantes de la morfina. Por otra parte, la relevancia funcional de los receptores DA D3 y DA D4 en los efectos reforzantes de la morfina no ha sido analizada mediante la administración de antagonistas selectivos de estos receptores.

Con el objetivo de analizar la contribución de los diferentes receptores DA a los efectos reforzantes de la morfina, en este trabajo se estudiaron los efectos de la morfina y de seis antagonistas dopaminérgicos con diferente perfil bioquímico, en la adquisición del condicionamiento de lugar en ratones machos. Posteriormente, se estudiaron los efectos de todos estos neurolépticos en la adquisición de la preferencia de lugar inducida por morfina. Los antagonistas dopaminérgicos estudiados se eligieron por su actuación más selectiva sobre diferentes subtipos de receptores DA: el SCH 23390 que actúa selectivamente en los receptores DA D1, el haloperidol, que bloquea tanto los receptores DA D1 como los D2; el raclopride que actúa en los receptores DA D2; la risperidona, que bloquea los receptores DA D2 y 5-HT₂; el U99194A maleato, que actúa en los receptores DA D3 y la clozapina que bloquea con mayor selectividad los receptores DA D4.

Para evaluar el condicionamiento de lugar, se utilizaron cuatro cajas de plástico idénticas, con dos compartimentos de igual tamaño que diferían en el color de las paredes (blanco/negro) y en la textura del suelo (menos/más rugoso), separados por un área central. El procedimiento de tipo «unbiased» constaba de tres fases: en la primera fase, llamada pre-condicionamiento, los animales tenían libre acceso a los compartimentos durante 15 minutos (900 s) al día, durante tres días, registrándose el tiempo pasado en cada uno el último día. Los animales que mostraron una fuerte aversión o preferencia por alguno de los compartimentos (menos del 33% o más del 66% del tiempo total) se descartaron. Un compartimento fue elegido para ser apareado con el fármaco y el otro con el vehículo de tal manera que dentro de cada grupo, la mitad de los animales recibieran el tratamiento en el lugar menos preferido y la otra mitad en el más preferido. Después de la asignación de compartimentos, no existían diferencias significativas entre el tiempo que permanecían en

Resumen global de resultados

el lugar apareado con el fármaco y el vehículo en la fase de pre-condicionamiento.

En la segunda fase, denominada condicionamiento, los animales recibían una inyección de suero fisiológico antes de ser confinados durante una hora en el compartimento elegido para ser apareado con el vehículo y, después de cuatro horas, recibían el fármaco antes de ser confinados también durante una hora en el compartimento elegido para ser apareado con la droga, repitiéndose este procedimiento a lo largo de cuatro días.

Durante la tercera fase, llamada post-condicionamiento, se registraba el tiempo que el animal, libre de tratamiento, pasaba en cada compartimento durante 900 s. La diferencia, en segundos, en el tiempo de permanencia en el compartimento apareado con el fármaco entre los días de pre- condicionamiento y test es una medida del grado de condicionamiento inducido por la droga. Si esta diferencia es positiva entonces el fármaco ha inducido una preferencia por el compartimento o lugar con el que había sido apareado, mientras que lo opuesto indica que induce aversión.

Para evaluar los efectos de los antagonistas de dopamina en la adquisición del condicionamiento de lugar y en el CPL inducido por morfina, los animales fueron divididos en 35 grupos (n=8), según el tratamiento que recibían durante la fase de condicionamiento: grupo 1: salino + salino; grupos 2, 3 y 4: salino + SCH 23390 0.5, 0.25 ó 0.125 mg/kg; grupos 5 y 6: salino + haloperidol 0.2 ó 0.1 mg/kg; grupos 7, 8 y 9: salino + raclopride 1.2, 0.6 ó 0.3 mg/kg; grupo 10 : salino + salino con ácido tartárico (vehículo); grupos 11, 12 y 13: salino + risperidona 0.4, 0.2 ó 0.1 mg/kg; grupos 14 y 15: salino + U-99194A maleato 20 ó 40 mg/kg; grupos 16, 17 y 18: salino + clozapina 2.5, 1.25 ó 0.625 mg/kg; grupo 19: morfina 40 mg/kg + salino; grupos 20, 21 y 22 : morfina 40 mg/kg + SCH 23390 0.5, 0.25 ó 0.125 mg/kg; grupos 23 y 24: morfina 40 mg/kg + haloperidol 0.2 ó 0.1 mg/kg; grupos 25, 26 y 27: morfina 40 mg/kg + raclopride 1.2, 0.6 ó 0.3 mg/kg; grupos 28, 29 y 30: morfina 40 mg/kg + risperidona 0.4, 0.2 ó 0.1 mg/kg; grupos 31 y 32: morfina 40 mg/kg + U-99194A maleato 20 ó 40 mg/kg; grupos 33, 34 y 35: morfina 40 mg/kg + clozapina 2.5, 1.25 ó 0.625 mg/kg.

Los resultados mostraron que los animales tratados con morfina pasaron más tiempo en el compartimento apareado con el fármaco, no observándose diferencias significativas en los animales condicionados con salino y vehículo. Sin embargo, hay que indicar que los animales que recibieron la dosis mayor de SCH 23390, haloperidol y clozapina y la dosis baja de risperidona permanecieron menos tiempo en el compartimento apareado con el fármaco.

Respecto al efecto de los antagonistas dopaminérgicos en el CPL inducido por morfina, se observó que no hubo diferencias significativas entre el tiempo pasado en el pre y el post-condicionamiento en los animales tratados con morfina más las tres dosis de SCH 23390 y risperidona, la dosis alta de haloperidol y la dosis media y baja de raclopride y clozapina, por tanto, todos estos tratamientos redujeron el CPL inducido por morfina. Por el contrario, los animales tratados con morfina más la dosis alta de raclopride y clozapina, la dosis baja de haloperidol y las dos dosis de U-99194A maleato, permanecieron más tiempo en el compartimento apareado con el fármaco, indicando que estos tratamientos no afectaron el CPL inducido por morfina.

Estos resultados confirman que la morfina induce una preferencia condicionada por el lugar con el que ha sido asociada, un efecto que ha sido encontrado por muchos trabajos realizados con roedores. Por el contrario, los efectos de los antagonistas DA en el condicionamiento de lugar, parecen depender de su diferente afinidad por los receptores de DA. Concretamente, hemos observado que los antagonistas DA que actúan preferentemente sobre los receptores D1, D1-D2, D4 y D2-5HT2 producen una aversión condicionada por el lugar con que han sido asociados, tal como se observa tras la administración de las dosis altas de SCH 23390, haloperidol y clozapina, y la dosis baja de risperidona. Por tanto, el bloqueo de los receptores DA D1 parece tener propiedades motivacionales aversivas y es posible que el bloqueo de los receptores D4 y 5-HT2 contribuya a estos efectos aversivos. Otros antagonistas que actúan más selectivamente sobre los receptores DA D2 o D3, como el raclopride y el U-99194A maleato, no tienen efectos sobre el condicionamiento de

Resumen global de resultados

lugar, lo que sugiere que el bloqueo de estos receptores no tiene propiedades motivacionales.

Por otra parte, se observó que todos los antagonistas DA, con excepción del U-99194A maleato, bloqueaban el CPL inducido por la morfina: el SCH 23390 y la risperidona con todas las dosis, el haloperidol con la dosis más alta, y el raclopride y la clozapina con las dosis intermedia y baja. Por tanto, el bloqueo de los diferentes receptores DA, con la excepción de los receptores DA D3, contrarresta las propiedades reforzantes de la morfina. Concretamente, el bloqueo de los receptores D1 con la administración de SCH 23390 y la dosis alta de haloperidol, elimina el CPL inducido por morfina, de acuerdo con la idea predominante del papel esencial de estos receptores en los efectos reforzantes de la morfina. Igualmente, el bloqueo de los receptores D2 con la dosis baja y media de raclopride y con las tres dosis de risperidona reduce el CPL inducido por morfina. Estos resultados coinciden con los observados en otros estudios recientes en los que se ha observado la importancia de estos receptores en los efectos reforzantes de la morfina y de otras drogas. Las mismas conclusiones podemos extraer a partir de los resultados obtenidos con la administración de clozapina, el bloqueo de los receptores D4 reduce el CPL inducido por morfina y, como se ha demostrado en estudios recientes, por otras drogas.

El hecho de que las dosis altas de raclopride y de clozapina no produzcan efecto sobre el CPL inducido por morfina puede deberse a la actuación sobre otros receptores no DA o bien a un incremento en la sensibilidad de los receptores DA. Por otra parte, el bloqueo de los receptores 5-HT₂ también puede contribuir a contrarrestar los efectos reforzantes de la morfina ya que este efecto se observa con todas las dosis de risperidona y con antagonistas selectivos de estos receptores.

Finalmente, el bloqueo de los receptores DA D3 con la administración de U-99194A maleato no afecta el CPL inducido por morfina. Estos resultados coinciden con los encontrados en aquellos estudios que han observado un bloqueo del CPL inducido por morfina tras la administración de agonistas selectivos de los receptores D3. Estos resultados apoyan la idea de que los receptores DA D3 tienen un papel inhibitorio en los procesos de refuerzo.

Por otra parte, puede ser interesante comparar los efectos de los antagonistas de DA en la hiperactividad y en la preferencia de lugar inducida con morfina. Utilizaremos para ello los datos obtenidos en el presente estudio así como los de un trabajo previo de nuestro equipo de investigación, utilizando la misma cepa de ratones, en el que se evaluó el efecto de varios antagonistas DA sobre la hiperactividad inducida por morfina (Rodríguez-Arias y cols., 2000). El SCH 23390 bloquea la hiperactividad inducida por morfina con una dosis alta (0.5 mg/kg) pero no con dosis menores (0.1 y 0.05 mg/kg). También hay que señalar que este efecto del SCH 23390 se produce de forma inespecífica, ya que la dosis que bloquea la hiperactividad inducida por morfina también produce una disminución de la actividad motora espontánea. El hecho de que todas las dosis de SCH 23390 eliminen el CPL inducido por morfina sugiere que el antagonismo de los receptores de DA D1 parece ser más efectivo en bloquear el efecto reforzante de la morfina que su efecto motor. Por el contrario, hemos observado que el haloperidol específicamente bloquea la hiperactividad inducida por morfina a una dosis (0.1 mg/kg) que no tiene efectos sobre el CPL inducido por morfina, lo que sugiere que este neuroléptico es más efectivo en bloquear los efectos motores de la morfina que sus efectos reforzantes.

El raclopride también antagoniza el efecto motor de la morfina con dosis entre 0.125 y 0.5 mg/kg, pero este efecto no es específico, ya que la administración conjunta de morfina y raclopride produce catalepsia. En contraste, la risperidona bloquea, de manera específica, la hiperactividad inducida por morfina a 0.05 y 0.1 mg/kg pero no a dosis menores de 0.025 mg/kg. Al comparar estas dosis con las que bloquean el CPL inducido con morfina, parece ser que el bloqueo de los receptores DA D2 tiene una eficacia similar en la mediación de los efectos motores y reforzantes de la morfina.

Por su parte, el bloqueo de los D3 parece tener efectos diferentes en la hiperactividad y CPL inducido por morfina. De esta forma, hemos observado que 20 mg/kg de U-99194A maleato, aunque produce un aumento en la actividad motora (un resultado consistente con la hipótesis de que los receptores DA D3 son inhibitorios), bloquea la hiperactividad inducida por morfina. En contraste, el

Resumen global de resultados

antagonismo de los receptores D3 no bloquea el CPL inducido por morfina. Estos resultados sugieren que los efectos reforzantes y motores pueden estar mediados, al menos en parte, por diferentes mecanismos y que el bloqueo de los receptores D3 es más efectivo en revertir los efectos motores de la morfina que los reforzantes.

Finalmente, con respecto al bloqueo de los receptores D4 es difícil realizar alguna comparación entre su papel en los efectos motores y reforzantes de la morfina ya que las dosis utilizadas de clozapina para revertir la hiperactividad y el CPL inducidos por morfina son muy diferentes. Nosotros hemos observado que 0.4 y 0.2 mg/kg de clozapina no produce efectos sobre la hiperactividad inducida por morfina (resultados no publicados) mientras que dosis mayores (0.625 y 1.25 mg/kg) bloquean el CPL inducido por morfina. En estudios futuros sería interesante evaluar los efectos de dosis más altas de clozapina en la hiperactividad inducida por morfina con el objeto de clarificar el papel de los receptores D4 en el efecto motor de la morfina.

En resumen, nuestros resultados apoyan la noción de que los antagonistas de DA D2 y D4 son tan efectivos en bloquear los efectos reforzantes de la morfina como los antagonistas DA D1 y, aunque el antagonismo de los receptores D3 no produce efectos probablemente debido al papel inhibitorio de estos receptores, el presente trabajo sugiere un papel crucial para los principales subtipos de receptores de DA en los efectos reforzantes de la morfina en el condicionamiento de lugar.

4.3.-Estudio 3: Efectos del CGS 10746b sobre la hiperactividad y la preferencia de lugar inducida por morfina.

Investigación original: C. Manzanedo, A. Serrano, M.A. Aguilar, M. Rodríguez-Arias and J. Miñarro (2001). Effects of CGS 10746B on hyperactivity and place preference induced by morphine. Behavioural Brain Research (in press).

Como se ha comentado anteriormente, el sistema DA mesolímbico parece ser el principal sustrato neural de los efectos reforzantes y motores de la morfina. Esta hipótesis está basada en los resultados de cuatro líneas de investigación. Primero, la activación de receptores μ y δ en las aferencias de neuronas gabaérgicas en el ATV es considerado el sustrato primario del refuerzo inducido por los opiáceos, mientras que la activación de estos receptores en neuronas eferentes gabaérgicas en el NAcc, es visto como el lugar secundario del refuerzo de los opiáceos. Segundo, se ha observado que la administración aguda de morfina aumenta la DA extracelular en el NAcc y que la exposición repetida sensibiliza estos efectos estimulantes sobre la DA en el NAcc, mientras que la retirada produce una disminución de DA en el NAcc. Tercero, la morfina facilita la autoestimulación intracraneal y este efecto es dependiente de una transmisión DA intacta. Cuarto, la preferencia de lugar inducida con opiáceos se deteriora mediante la administración de antagonistas de los receptores DA y por lesiones del NAcc con 6-OHDA.

A pesar de estas evidencias, el papel exacto que tiene la DA en el efecto reforzante de los opiáceos aún no ha sido totalmente aclarado. En contraste con los resultados positivos observados en los estudios que utilizan los paradigmas de CPL y de autoestimulación intracraneal, los experimentos realizados con la técnica de autoadministración intravenosa no siempre han encontrado una implicación de la DA en las propiedades motivacionales de los opiáceos. Por ejemplo, en algunos trabajos se ha observado que la administración de antagonistas de DA no modifica la autoadministración de heroína intravenosa y cuando se ha observado un deterioro de esta conducta se ha argumentado que ello era debido probablemente a un deterioro motor, más que a la reducción del

Resumen global de resultados

impacto reforzante del opiáceo. Los mismos resultados discrepantes se han observado tras la destrucción selectiva con 6-OHDA del NAcc, observándose deterioro de la autoadministración en algunos estudios y una falta de efectos en otros. Estos datos han sido utilizados para sugerir la hipótesis de que la autoadministración de opiáceos estaría mediada por mecanismos independientes de la DA, presumiblemente por receptores opiáceos localizados postsinápticamente en el NAcc.

Con el objetivo de determinar si las propiedades motoras y reforzantes de la morfina dependen de forma crítica del sistema DA, en este trabajo se estudiaron los efectos del CGS 10746B, un fármaco que inhibe la liberación de DA, sobre la hiperactividad y la preferencia de lugar inducidas por la morfina en ratones machos. En el primer experimento, se evaluaron los efectos del CGS 10746B en la actividad motora espontánea y en la hiperactividad inducida por morfina. En el segundo experimento, se estudió el efecto de este fármaco en la adquisición del condicionamiento de lugar y sobre el CPL inducido por morfina.

En el experimento 1, los animales fueron divididos en 19 grupos (n=8): grupo 1: suero fisiológico; grupo 2: 40 mg/kg de morfina; grupos 3 a 10: diferentes dosis de CGS 10746B (0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, ó 32 mg/kg); grupos 11 a 19: morfina (40 mg/kg) más diferentes dosis de CGS 10746B (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, ó 32 mg/kg). El intervalo entre ambas inyecciones fue de 30 minutos.

Se evaluó la actividad motora con un actímetro (ver estudio 1) durante 90 minutos, registrándose un total de actividad cada 15 minutos. La medición de actividad se realizó inmediatamente después del tratamiento en aquellos grupos que recibían sólo una inyección (grupos 1 a 10) e inmediatamente después de la segunda inyección en aquellos que recibían dos inyecciones (grupos 11 a 19).

De forma complementaria, para evaluar el curso temporal de los efectos de la co-administración de morfina más la dosis alta de CGS 10746B se utilizaron otros dos grupos de animales: grupo 1: morfina 40 mg/kg + suero fisiológico y grupo 2: morfina 40 mg/kg + CGS 10746B 32 mg/kg

Estudio 3

El intervalo entre ambas inyecciones fue de 30 minutos, registrándose su actividad cada 15 minutos durante cinco horas, después de la segunda inyección.

Los resultados mostraron que la administración de CGS 10746B reducía la actividad motora espontánea de forma dependiente de la dosis, siendo este efecto significativo con dosis de 24 y 32 mg/kg, en los primeros 45 minutos tras su administración. La morfina produjo un incremento de la actividad entre los 45 y los 90 minutos tras la administración, que fue contrarrestado por la administración de CGS 10746B a partir de 2 mg/kg, durante los 60 minutos de test. Por otra parte, la administración de morfina más dosis altas de CGS 10746B produjo un deterioro muy notable de la actividad de los animales durante aproximadamente 2 horas tras la administración.

En el experimento 2, para evaluar el condicionamiento de lugar se utilizaron los mismos aparatos y el mismo procedimiento que han sido descritos previamente (ver estudio 2).

Para evaluar los efectos del CGS 10746B en la adquisición del condicionamiento de lugar y en el CPL inducido por morfina, los animales fueron divididos en 10 grupos (n=8) según el tratamiento que recibieron en la fase de condicionamiento: grupo 1: suero fisiológico + suero fisiológico; grupo 2: suero fisiológico + 40 mg/kg morfina; grupos 3 a 6: suero fisiológico + 0.5, 1, 3 ó 10 mg/kg de CGS 10746B; grupos 7 a 10: 40 mg/kg morfina + 0.5, 1, 3 ó 10 mg/kg de CGS 10746B.

Los resultados mostraron que la administración de morfina producía una clara preferencia de lugar, observándose un aumento significativo del tiempo de permanencia en el compartimento apareado con la morfina en el día de post-condicionamiento. Por el contrario, la administración de suero fisiológico o CGS 10746B no produjo efectos sobre el tiempo de permanencia en ningún compartimento. Por otra parte, el CGS 10746B contrarrestó la preferencia inducida por la morfina, excepto con la dosis más baja.

El deterioro en la actividad motora espontánea producido por el CGS 10746B comienza a ser significativo con 24 y 32 mg/kg,

Resumen global de resultados

teniendo una duración de 45 minutos. Este efecto del CGS 10746B podría ser explicado por la interrupción de la transmisión de DA en el sistema mesolímbico, ya que diferentes tratamientos que producen una destrucción de este sistema causan hipoactividad. Por otra parte, la inmediatez con que se da la acción del CGS 10746B sugiere que el mecanismo de acción de este fármaco se produce inhibiendo la liberación de DA, ya que los fármacos que actúan bloqueando los receptores DA tardan aproximadamente 30 minutos en producir sus efectos, siendo éstos más duraderos.

La reducción de la hiperactividad inducida por morfina tras la administración de CGS 10746B confirma los resultados obtenidos en estudios previos de nuestro laboratorio utilizando antagonistas DA. Este efecto del CGS 10746B parece ser bastante específico, ya que la atenuación de la hiperactividad inducida por morfina se produce con dosis diez veces menores que las necesarias para disminuir la actividad motora espontánea.

Estos resultados sugieren que la hiperactividad inducida por morfina depende críticamente del sistema DA, ya que este efecto es revertido por la inhibición de la liberación de DA inducida por la administración de CGS 10746B.

La administración de morfina más CGS 10746B también produce otro resultado interesante. Los animales que recibieron morfina más CGS 10746B con dosis a partir de 4 mg/kg presentaron niveles mucho menores de actividad que los animales que habían recibido sólo CGS 10746B, llegando a mostrar un estado de fuerte sedación similar a la catalepsia, que se prolongó durante todo el periodo del test (60 minutos) y, como se comprobó posteriormente, tuvo una duración total de 90 minutos, recuperándose el nivel normal de actividad aproximadamente después de 2 horas. La aparición de catalepsia también se ha observado tras la administración de morfina más antagonistas de los receptores DA y podría explicarse por la actuación de la morfina sobre receptores opiáceos localizados en diferentes áreas cerebrales: unos situados en el ATV que inhiben interneuronas gabaérgicas, produciendo la liberación de DA e hiperactividad como respuesta conductual y otros situados en otras áreas (NAcc, estriado y estructuras troncoencefálicas) que tienen un

papel inhibitorio en la conducta motora. Generalmente, el efecto inhibitorio de la morfina no es evidente, porque predomina su acción sobre los receptores opiáceos del ATV, sin embargo, cuando el sistema DA está bloqueado por el antagonismo de sus receptores o inhibiendo su liberación, se hace evidente la acción de la morfina sobre los receptores opiáceos inhibitorios apareciendo la catalepsia.

Por otra parte, la inhibición de la liberación de DA con la administración de CGS 10746B, aunque no tiene propiedades motivacionales, bloquea la adquisición de la preferencia de lugar inducida por morfina. Este efecto parece producirse de forma dependiente de la dosis, ya que la dosis más baja de CGS 10746B redujo, pero no eliminó, la preferencia por el compartimento apareado con morfina. Estos resultados apoyan la idea de que los efectos reforzantes de la morfina observados en el paradigma de preferencia de lugar están mediados esencialmente por el sistema de DA.

Otra explicación de los efectos del CGS 10746B en el CPL inducido por morfina podría basarse en la falta de especificidad de este fármaco ya que puede afectar múltiples procesos (refuerzo, motivación, aprendizaje, memoria, discriminación, locomoción, etc.). En el presente trabajo hemos observado que el CGS 10746B interfiere con el CPL inducido con morfina, sin embargo, con el procedimiento usado no podemos estar seguros de como produce ese efecto, ya que en el paradigma de condicionamiento de lugar se necesitan diferentes procesos para la manifestación del CPL. En primer lugar, el estímulo debe ser reforzante, en segundo lugar, los animales deben de asociar los efectos reforzantes con las señales ambientales (aprendizaje asociativo) y deben retener esta asociación (memoria); en tercer lugar, deben ser capaces de discriminar entre las señales apareadas con el refuerzo y las apareadas con un estímulo neutro (discriminación); y en quinto lugar, deben mostrar una conducta de acercamiento a las señales del refuerzo. La interferencia con uno o más de estos procesos podría manifestarse como una reducción de la preferencia por el compartimento apareado con la morfina. Al menos con las dosis bajas de CGS 10746B hemos podido excluir la influencia de los efectos motores de este fármaco, sin embargo, la influencia de sus efectos sobre el aprendizaje, memoria y discriminación queda sin evaluar y

Resumen global de resultados

podría ser muy interesante enfocarla en futuros trabajos utilizando pruebas más específicas para el estudio de los citados procesos.

De forma resumida podemos decir que nuestros resultados han mostrado que el CGS 10746B, un inhibidor de la liberación de DA, produce una disminución dosis dependiente en la actividad motora espontánea y bloquea la hiperactividad inducida por la morfina. Además, este fármaco por sí mismo no tiene efectos motivacionales en el condicionamiento de lugar pero bloquea el CPL inducido por la morfina. Estos resultados confirman que una neurotransmisión DA intacta es crítica para la manifestación de los efectos motores y de condicionamiento de preferencia de lugar inducidos por la morfina.

4.4.- Estudio 4: El paradigma de preferencia de lugar puede ser un modelo de recaída a los opiáceos en ratones.

Investigación original: C. Manzanedo, M.A. Aguilar, M. Rodríguez-Arias and J. Miñarro (2001). Conditioned place preference paradigm can be a mouse model of relapse to opiates. Neuroscience Research Communications, 28 (1): 23-29.

La recaída al consumo de las drogas es uno de los mayores problemas en el tratamiento de la drogadicción. En la investigación con animales de laboratorio, la recaída puede definirse como un evento operante que puede medirse directamente, por ejemplo cuando un animal reinicia una conducta determinada. De hecho, la reinstauración de la respuesta de presionar una palanca para conseguir la administración de la droga tras un periodo de extinción prácticamente ha sido el único paradigma usado para estudiar la recaída. Utilizando esta técnica se ha observado que diferentes estímulos, denominados "primers", son capaces de inducir la reinstauración, como por ejemplo la administración de la droga auto-administrada, la presentación de un estímulo o señal asociada a la droga y la exposición al estrés.

El paradigma de CPL ofrece un método simple de evaluación del refuerzo condicionado inducido por diferentes estímulos. Por ejemplo, una droga que actúa como EI, se aparea varias veces con unos determinados estímulos ambientales que actúan como EC y que, a través del condicionamiento, van adquiriendo propiedades motivacionales secundarias, provocando el acercamiento y el mantenimiento del contacto del animal con estos estímulos ambientales. Cuando los animales son expuestos repetidamente al EC en ausencia del EI, el CPL puede mostrar extinción. Por ejemplo, el CPL inducido por morfina dura hasta 12 días en ratas, habiendo desaparecido 28 días después del condicionamiento. Estas propiedades del CPL abren la posibilidad de que este paradigma pueda ser utilizado como una herramienta para probar diferentes aspectos del ansia o deseo por la droga (craving) y de la recaída.

El propósito del presente estudio fue evaluar la posible utilidad del paradigma de CPL para estudiar el fenómeno de la recaída a los opiáceos en ratones. Con este objetivo hemos evaluado el curso

Resumen global de resultados

temporal del CPL inducido por la morfina en ratones sometidos a un proceso de extinción del condicionamiento, tratando de determinar si la re-exposición a la droga produce la reinstauración del CPL.

Para el condicionamiento se usaron las mismas cajas que han sido descritas previamente (estudio 2 y 3) siguiendo el procedimiento de 3 fases explicado en los estudios anteriores, a excepción de que se utilizó un diseño de tipo "biased" durante la fase de condicionamiento. Los animales fueron divididos en dos grupos (n=8): el grupo experimental recibió morfina 40 mg/kg, que se apareó siempre al compartimento menos preferido mientras que el grupo control recibió salino antes de ser colocado en el compartimento más preferido. El tiempo que permanecían los animales en cada compartimento se registró, durante 15 minutos, a los 5, 15, 20, 35 y 45 días después de la última sesión de condicionamiento. Posteriormente, a los 46 días del condicionamiento, todos los animales fueron tratados con 40 mg/kg de morfina, administrada en el animalario, y 30 minutos después se midió de nuevo el CPL.

Los resultados mostraron que la morfina inducía un CPL que era evidente 5 y 15 días después del condicionamiento, en los que se observó un aumento significativo del tiempo pasado en el compartimento apareado con la droga. En los tests sucesivos este tiempo fue disminuyendo, hasta que se observó una extinción completa 45 días después del condicionamiento. En el día 46, tras una re-exposición no contingente a la droga, se encontró una diferencia significativa entre el grupo experimental y el control, en el tiempo pasado en el compartimento apareado con la droga, de tal forma que el grupo experimental mostró de nuevo un incremento del tiempo pasado en este compartimento.

Nuestros resultados sugieren que el paradigma de CPL puede ser usado como un modelo de recaída a los opiáceos en ratones, ya que cuando la morfina ya no se administra más, el condicionamiento va desapareciendo gradualmente (extinción) y cuando los animales son re-expuestos a la droga el CPL reaparece (reinstauración). En este estudio hemos observado que la administración de 40 mg/kg de morfina produce un CPL que persiste hasta 15 días después de la última sesión de condicionamiento, mostrando un declive gradual

Estudio 4

hasta los 45 días siguientes. Además, el día 46, una exposición no contingente a la morfina en el grupo experimental aumentó de nuevo la preferencia por el lugar en que la droga había sido administrada durante el condicionamiento. En contraste, en los animales controles, que nunca habían recibido morfina, esta inyección produjo un disminución del tiempo pasado en este compartimento, es decir, que aumentaron el tiempo de estancia en el compartimento que ellos preferían de forma natural.

Los resultados de este estudio coinciden con los obtenidos en otros trabajos que estudian la recaída con el paradigma de reinstauración de la auto-administración, que han mostrado que un poderoso desencadenante de la recaída es la administración, por parte del experimentador, de una inyección "priming" de la droga que se autoadministraban, después de haberse producido la extinción de la respuesta conductual para conseguir la autoadministración. Por otra parte, en otros tres laboratorios se ha probado, muy recientemente, la hipótesis de que el paradigma del CPL pueda ser usado como un modelo para la recaída al consumo de morfina y cocaína en ratas, observándose que la re-exposición a la droga y la exposición al estrés puede reinstaurar el CPL previamente extinguido.

Como conclusión, podemos decir que los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que el paradigma del CPL puede ser una alternativa al procedimiento de autoadministración intravenosa, como modelo animal para estudiar los mecanismos de la recaída a los opiáceos.

5.- DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los diferentes estudios que componen la presente Tesis Doctoral, apoyan la idea de que existe una interacción entre el sistema dopaminérgico y el sistema opiáceo, tanto en la mediación de la conducta motora como del refuerzo. En concreto, nuestros resultados sugieren que la dopamina es esencial para que se produzcan diferentes efectos conductuales de la morfina, como la hiperactividad y el condicionamiento de preferencia de lugar.

Wise (1982) formuló la hipótesis de la "anhedonia" para explicar los efectos de los antagonistas dopaminérgicos, poniendo el énfasis en el papel esencial de la dopamina en mediar los efectos reforzantes de diferentes estímulos. Posteriormente, Acquas y cols. (1989) sugirieron que los antagonistas DA producían no sólo un bloqueo del refuerzo, sino que también causaban una falta de motivación (hipótesis de la apatía), a partir de la observación de que el SCH 23390 y el haloperidol bloqueaban tanto la preferencia como la aversión de lugar inducida por diferentes compuestos (Acquas y cols. 1989; Di Scala y Sandner, 1989).

La adicción a las drogas puede considerarse como un modelo de conducta motivada (Wise, 1996). La investigación sobre la neurobiología de la adicción estuvo basada en la idea de que el uso compulsivo de drogas se debía a un reforzamiento negativo, es decir, a la habilidad de la droga de aliviar los síntomas aversivos de la abstinencia. Sin embargo, los avances más recientes han puesto de manifiesto un papel esencial del reforzamiento positivo y de la euforia en la adicción y han impulsado el estudio de los mecanismos cerebrales que median estos efectos, fundamentalmente el sistema dopaminérgico mesolímbico. Para algunos autores, la combinación de los efectos reforzantes positivos con la reducción de los estados emocionales negativos de la abstinencia, proporciona una poderosa fuerza motivacional para la toma compulsiva de drogas que caracteriza la adicción (Koob, 1998).

La idea de que el sistema DA mesolímbico tiene un papel esencial en la adicción a los opiáceos y otras drogas de abuso ha ido desarrollándose en los últimos años, formulándose nuevas hipótesis y

Discusión

teorías (Di Chiara, 1999; Spanagel y Weiss, 1999; Horvitz, 2000; Koob y Le Moal, 2001; Robinson y Berridge, 2001; Nestler, 2001). De acuerdo con estas hipótesis, el papel de la DA continua siendo esencial en la mediación de algunos aspectos del refuerzo de opiáceos, fundamentalmente en los aspectos incentivos. Igualmente, se plantean una serie de cambios neuroadaptativos en el sistema dopaminérgico mesolímbico, que serían los responsables de los diferentes fenómenos que caracterizan la adicción: la toma compulsiva de drogas, el "craving" y la vulnerabilidad a la recaída.

En el caso de los efectos reforzantes de los opiáceos, el sistema dopaminérgico y el sistema opiáceo pueden mediar diferentes funciones. El circuito neural del refuerzo incluye el sistema dopaminérgico y el sistema opioide y los opiáceos actúan en ambos sistemas (Di Chiara y North, 1992). Igualmente, el refuerzo opiáceo consta de dos aspectos diferentes: el incentivo y el consumatorio. La estimulación del sistema de refuerzo opioide podría ser la responsable de las propiedades hedónicas y consumatorias de los opiáceos, mientras que la activación del sistema de refuerzo DA, que produce activación (arousal), locomoción (conducta de acercamiento) y adquisición de incentivos secundarios (aprendizaje incentivo), podría tener un papel en el desarrollo de la conducta de búsqueda compulsiva de la droga y adicción a los opiáceos y a otras drogas de abuso. Además, los cambios neuroadaptativos en las neuronas DA del sistema mesolímbico después de la administración crónica de droga, pueden estar implicados en la generación de estados de déficit que aumenten la vulnerabilidad al deseo de droga y la recaída (Spanagel y Weiss, 1999).

El concepto de que el refuerzo opiáceo consta de dos aspectos diferentes y que la morfina está implicada sólo en el aspecto incentivo, puede explicar las discrepancias observadas entre diferentes paradigmas. En paradigmas que dependen del aspecto incentivo del refuerzo de los opiáceos (auto-estimulación eléctrica intracraneal o condicionamiento de la preferencia de lugar), los antagonistas de receptores de dopamina interfieren con el refuerzo opiáceo, pero en mucho menor grado sucede esto en aquellos paradigmas donde los aspectos consumatorios son más importantes (como por ejemplo, la auto-administración).

Discusión

Los resultados observados en nuestros estudios apoyan la idea de que el sistema DA juega un papel crítico en el aspecto incentivo del refuerzo inducido por los opiáceos, ya que cuando se inhibe la liberación de DA, o cuando los receptores de DA están bloqueados, la preferencia de lugar inducida por morfina (que depende del aspecto incentivo del refuerzo) se reduce de forma drástica. Tal y como predice la hipótesis de Di Chiara (1999), el deterioro en la capacidad de la droga para activar la transmisión de DA en el "shell" del núcleo accumbens, podría impedir que los estímulos relacionados con la droga adquirieran y mantuvieran el control excesivo sobre la conducta. Según esta hipótesis, la adicción a una droga podría considerarse como un trastorno del aprendizaje asociativo dependiente de la DA y el hecho de que el CPL inducido por morfina se bloquee con el CGS 10746B y con antagonistas de DA, sugiere que estos fármacos podrían interferir en el establecimiento de la adicción a los opiáceos. Además, nuestros resultados apoyan la noción de que los antagonistas D2 y D4 son tan efectivos en bloquear los efectos reforzantes de la morfina como los antagonistas D1 y de esta manera, la activación de los diferentes subtipos de receptores de DA podría ser esencial para el desarrollo de la adicción a los opiáceos.

El desarrollo de la adicción depende de cambios neuroadaptativos en el sistema DA. No obstante, la naturaleza propuesta de estos cambios varía entre los diferentes autores. Para algunos, las neuroadaptaciones críticas para la adicción, hacen a los sistemas de refuerzo y a los estímulos asociados con ellas hipersensitivos o "sensibilizados" a las drogas (Robinson y Berridge, 2001). Por el contrario, otros autores piensan que en la adicción se produce un deterioro de los sistemas de refuerzo, una especie de "desensibilización", acompañada por una activación de los sistemas cerebrales de estrés (eje hipotálamo-adrenal y CRF) que median los estados emocionales negativos (Koob y Le Moal, 2001). Igualmente, se han planteado una serie de cambios moleculares que subyacen en la adicción (Nestler, 2001). Entre estos cambios, destacan modificaciones de los reguladores transcripcionales, como una regulación al alza de la vía del AMPc, que provoca un incremento en la transcripción del gen CREB y un incremento en los niveles de delta FosB. Otros mecanismos pueden contribuir a los cambios en la plasticidad a largo plazo, como una disminución en la degradación de

Discusión

proteínas, un cambio en la sensibilidad del receptor o cambios estructurales en las neuronas del sistema DA mesolímbico (por ejemplo se ha observado un incremento en la densidad de las espinas dendríticas en el NAcc.). Es importante poner de manifiesto que existe un gran paralelismo entre estos cambios moleculares que subyacen a la adicción y aquellos relacionados con otras formas de plasticidad cerebral, tal como el aprendizaje y la memoria. De hecho, algunos autores consideran que los mecanismos neurales implicados en la formación normal de la memoria, pueden ser responsables del uso compulsivo de drogas (Berke y Hymán, 2000). Igualmente el papel de la memoria puede ser esencial en la recaída, que podría ser provocada por una especie de "huella cerebral" en los circuitos neurales que son modificados durante la adicción (Koob y Le Moal, 2001).

Al iniciar los estudios que componen la presente Tesis Doctoral nos preguntábamos sobre una cuestión que, aunque parecía confirmarse por muchos estudios experimentales, todavía resultaba controvertida en el campo de la neurobiología de la adicción a las drogas en general y a los opiáceos en particular. De esta forma, algunos investigadores sostenían que el papel de la dopamina era esencial en la mediación de los efectos conductuales de los opiáceos. Por el contrario, otros autores mantenían que los efectos reforzantes de la morfina se producían de forma directa por su acción sobre el sistema opiáceo, e independientemente de la activación del sistema dopaminérgico. En una posición intermedia se encontraban un grupo de investigadores que pensaban que el refuerzo inducido por los opiáceos podía tener dos substratos, uno primario dependiente del sistema opiáceo y otro secundario dependiente del sistema dopaminérgico. Ambos sistemas podrían actuar de forma conjunta y complementaria, aunque también podrían tener funciones bastante específicas. Por ejemplo, el valor hedónico o placentero de los opiáceos dependería de la activación del sistema opioide, mientras que, el poder adictivo de la droga estaría determinado por su activación del sistema dopaminérgico.

En este contexto, coincidiendo con la visión de un papel esencial de la dopamina en determinados aspectos de la adicción a los opiáceos, nuestro objetivo general ha sido demostrar la implicación del sistema dopaminérgico en los efectos conductuales de la morfina, en concreto

Discusión

en la hiperactividad y la eficacia reforzante. Para ello, diseñamos una serie de experimentos utilizando diferentes aproximaciones para el estudio del sistema dopaminérgico, como el bloqueo de sus receptores con la administración de antagonistas más o menos selectivos y la inhibición de su liberación, estudiando como afecta la interferencia del sistema dopaminérgico sobre los efectos motores y el condicionamiento de preferencia de lugar inducidos por la morfina. De forma general podemos decir, que los resultados obtenidos en estos estudios apoyan, de forma clara, la idea de que la hiperactividad inducida por la morfina y su eficacia reforzante dependen del sistema dopaminérgico. En concreto, nosotros pensamos que el hecho de haber utilizado el paradigma de condicionamiento de preferencia de lugar para evaluar el valor reforzante de esta droga, nos permite conocer aspectos diferentes de los estudiados en otros paradigmas, como por ejemplo el de autoadministración. De hecho, el condicionamiento de preferencia de lugar estaría evaluando más bien el ansia o deseo por la droga, la necesidad de búsqueda de la droga y el mantenimiento de contacto con las señales ambientales asociadas con ella, en contraposición a la medición del valor hedónico o placentero de la droga por sí misma o el consumo compulsivo, que estaría medido en los experimentos de autoadministración.

Por ello, los resultados obtenidos en nuestros estudios apoyan la idea de que la dopamina parece ser esencial para dos aspectos fundamentales de la adicción: en primer lugar que la droga produzca un estado de ansia o de deseo que determina su búsqueda compulsiva y, en segundo lugar, que la droga provoque una asociación "excesiva" entre las señales ambientales asociadas con su administración y su efecto placentero o valor reforzante primario, de manera que cuando el sujeto experimente esas señales ambientales le sea inevitable iniciar la conducta de búsqueda de la droga y su consumo consecuente. Finalmente, nuestra hipótesis es que la reexposición a la droga, o la experiencia con las señales ambientales asociadas a su consumo, induciría un incremento en la liberación de dopamina, que determinaría el recuerdo del valor hedónico de la droga y produciría la recaída en la conducta de búsqueda compulsiva de la droga. Hasta el momento, sólo hemos podido comprobar que el condicionamiento de preferencia de lugar puede ser usado para estudiar la recaída al consumo de opiáceos en ratones, pero en futuros experimentos, nuestro objetivo será evaluar

Discusión

la implicación del sistema dopaminérgico en este fenómeno, utilizando manipulaciones similares a las usadas para evaluar la importancia de este sistema de neurotransmisión en los efectos motores y reforzantes de la morfina, que constituyen los estudios presentados en esta Tesis Doctoral.

Por último, consideramos que el papel esencial de la dopamina en la adicción a los opiáceos debería generalizarse al fenómeno de la drogadicción en términos generales. Esto es, si la dopamina no es tan importante en mediar el valor placentero primario de algunas clases de drogas, que no actúan directamente sobre el sistema dopaminérgico, como es el caso de los opiáceos, sino que su importancia radica en la producción del estado de "craving", de adicción y de recaída, lo más probable es que también ejerza el mismo papel con otras drogas. Así, además del papel de la dopamina en la mediación de los efectos reforzantes primarios de los estimulantes, este neurotransmisor tendría un papel esencial para todas, o la mayor parte de las drogas (psicoestimulantes, opiáceos, alcohol, etc), en la inducción de los fenómenos que caracterizan la adicción. De esta manera, la dopamina, actuando probablemente a nivel del "shell" del NAcc, podría estar involucrada de forma crítica en el fortalecimiento de las asociaciones entre la droga y el contexto en que se experimentan sus efectos, más que en la mediación del efecto reforzante primario de las drogas (Di Chiara, 1999; Spanagel y Weiss, 1999). Por tanto, la comprensión de los mecanismos implicados en el CPL inducido por opiáceos, o por otras drogas, puede proporcionarnos una información muy valiosa para desarrollar intervenciones conductuales y farmacológicas, encaminadas a reducir el control que ejercen los estímulos contextuales asociados al consumo de la droga que conducen al "craving" y a la recaída.

6.- CONCLUSIONES FINALES

A partir de los trabajos realizados se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1.- La administración de 20 mg/kg de U-99194A maleato, un antagonista de los receptores D3, produce hiperactividad. Dosis menores (2.5, 5 y 10 mg/kg) no afectan la actividad motora espontánea.

2.- La administración de haloperidol (0.075 y 0.1 mg/kg), un antagonista mixto de los receptores D1/D2, y de sulpiride (20 y 40 mg/kg), un antagonista de los receptores D2, no afecta la actividad motora espontánea.

3.- La inhibición de la liberación de DA con el CGS 10746B (0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24 y 32 mg/kg reduce, de forma dependiente de la dosis, la actividad motora espontánea en ratones, siendo significativo este efecto a partir de 24 mg/kg.

4.- La administración de morfina (5, 10, 20 y 40 mg/kg) produce hiperactividad en ratones de forma dosis-dependiente, comenzando a ser significativo el efecto con dosis a partir de 20 mg/kg.

5.- Todos los antagonistas dopaminérgicos contrarrestan la hiperactividad inducida por morfina: el U-99194A maleato (20 mg/kg) y el sulpiride (40 mg/kg) contrarrestan la hiperactividad inducida por 20 mg/kg de morfina, mientras que el haloperidol (0.075 y 0.1 mg/kg) bloquea la hiperactividad inducida por 20 y 40 mg/kg de morfina.

6.- La inhibición de la liberación de DA con el CGS 10746B bloquea, de forma dependiente de la dosis, la hiperactividad inducida por 40 mg/kg de morfina, siendo significativo este efecto con dosis a partir de 2 mg/kg.

7.- En general, la administración de los siguientes antagonistas dopaminérgicos, SCH 23390 (0.5, 0.25 y 0.125), haloperidol (0.2 y 0.1 mg/kg), raclopride (1.2, 0.6 y 0.3 mg/kg), risperidona (0.4, 0.2 y 0.1 mg/kg), U-99194A maleato (40 y 20 mg/kg) y clozapina (2.5, 1.25

Conclusiones finales

y 0.625 mg/kg), no produce efectos en el condicionamiento de lugar, a excepción de la dosis alta de SCH 23390, haloperidol y clozapina y la dosis baja de risperidona que producen aversión condicionada al lugar.

8.- La inhibición de la liberación de DA con el CGS 10746B (0.5, 1, 3 y 10 mg/kg) no produce efectos en el condicionamiento de lugar.

9.- La administración de morfina (40 mg/kg) produce una preferencia por lugar donde ha sido administrada.

10.- Básicamente todos los antagonistas dopaminérgicos administrados bloquean el CPL inducido por 40 mg/kg de morfina, a excepción del U-99194A maleate, de la dosis baja de haloperidol y de las dosis altas de raclopride y clozapina.

11.- La inhibición de la liberación de DA con el CGS 10746B (0.5, 1, 3 y 10 mg/kg) deteriora, de forma dependiente de la dosis, el CPL inducido por 40 mg/kg de morfina, siendo significativo este efecto con dosis a partir de 1 mg/kg.

12.- La reexposición a una inyección de 40 mg/kg de morfina en animales que habían sido sometidos a una extinción del condicionamiento de preferencia de lugar inducido por 40 mg/kg de morfina reinstaura dicho condicionamiento, sugiriendo que el paradigma de condicionamiento de lugar puede ser un modelo para estudiar la recaída a los opiáceos en ratones.

13.- Estos resultados sugieren que la interferencia con el sistema dopaminérgico bloquea la hiperactividad y el condicionamiento de preferencia de lugar inducidos por la morfina, sugiriendo un importante papel de la dopamina en la mediación de estos efectos conductuales de la morfina.

7.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acquas, E. Carboni, E., Leone, P. y Di Chiara, G. (1989) SCH 23390 blocks drug-conditioned place-preference and place aversion: anhedonia (lack of reward) or apathy (lack of motivation) after dopamine-receptor blockade? *Psychopharmacology*, 99: 151-155.
- Acquas, E. y Di Chiara, G. (1994) D1 receptor blockade stereospecifically impairs the acquisition of drug-conditioned place preference and place aversion. *Behavioral Pharmacology*, 5: 555-569.
- Airio, J. y Ahtee, L. (1997) Role of cerebral dopamine and noradrenaline in the morphine-induced locomotor sensitisation in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 58: 379-386.
- Angulo, J.A. y McEwen, B.S. (1994) Molecular aspects of neuropeptide regulation and function in the corpus striatum and nucleus accumbens. *Brain Research Reviews*, 19: 1-18.
- Arnt, J. (1995) Differential effects of classical and newer antipsychotics on the hypermotility induced by two dose levels of D-amphetamine. *European Journal of Pharmacology* 283: 55-62.
- Bals-Kubick, R., Ableitner, A., Herz, A., Shippenberg, T.S. (1993) Neuroanatomical sites mediating the motivational effects of opioids as mapped by the conditioned place preference. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 264: 489-495.
- Bardo, M.T., Rowlett, J.K. y Harris, M.J. (1995) Conditioned place preference using opiate and stimulant drugs: a meta-analysis. *Neuroscience Biobehavioral Reviews* 19: 39-51.
- Bardo, M.T y Bevins, (2000) Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward?. *Psychopharmacology*, 153: 31-43.
- Bassareo, V., Tanda, G., Petromilli, P., Giua, C. y Di Chiara, G. (1996) Non-psychostimulant drugs of abuse and anxiogenic drugs activate with differential selectivity dopamine transmission in the nucleus accumbens and in the medial prefrontal cortex of the rat. *Psychopharmacology*, 124: 293-299.

Referencias bibliográficas

- Bauco, P., Wang, Y. y Wise, R.A. (1993) Lack of sensitization or tolerance to the facilitating effect of ventral tegmental area morphine on lateral hypothalamic brain stimulation reward. *Brain Research*, 617: 303-308.
- Beach, H.D. (1957) Morphine addiction in rats. *Canadian Journal of Psychology*, 11: 104-112.
- Bechara, A., Harrington, F., Nader, K. y van der Kooy, D. (1992) Neurobiology of motivation: double dissociation of two motivational mechanisms mediating opiate reward in drug-naive versus drug-dependent animals. *Behavioral Neuroscience*, 106: 798-807.
- Bechara, A., Nader, K. y van der Kooy, D. (1998) A two-separate-motivational-systems hypothesis of opioid addiction. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59: 1-17.
- Belzung, C. y Barreau, S. (2000) Differences in drug-induced place conditioning between BALB/c and C57B1/6 mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 65: 419-423.
- Beninger, R.J. (1983) The role of dopamine in locomotor activity and learning. *Brain Research Reviews*, 6: 173-196.
- Berke, J.D. y Hyman, S.E. (2000) Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron*, 25: 515-532.
- Bespalov, A.Y. y Zvartau, E.E. (1996) Intraaccumbens administration of NMDA receptor antagonist (+/-)-CPP prevents locomotor activation conditioned by morphine and amphetamine in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 55: 203-207.
- Bilsky, E.J., Hui, Y., Hubbell, C.L., Reid, L.D. (1990) Methylenedioxymethamphetamine's capacity to establish place preferences and modify intake of an alcoholic beverage. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 37: 633-638.
- Blander, A., Hunt, T., Blair, R., Amit, Z. (1984) Conditioned place preference: an evaluation of morphine's positive reinforcing properties. *Psychopharmacology*, 84: 124-127.

Referencias bibliográficas

- Bloom, F.E., Schulman, J.A. y Koob, G.F. (1989) Catecholamines and Behavior. En: Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 90/II. Trendelenburg, U. y Weiner, N. (Eds.) Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg.
- Bozarth, M.A. y Wise, R.A. (1986) Involvement of the ventral tegmental dopamine system in opioid and psychomotor stimulant reinforcement. En: Problems of drug dependence (NIDA Research Monograph, 67), Harris, L.S. (Ed) U.S. Government Printing Office. Washington D.C.
- Broekkamp, CL., LePichon, M. y Lloyd, K. G. (1984) Akinesia after locally applied morphine near the nucleus raphe pontis of the rat. Neuroscience Letters, 50: 313-318.
- Cadoni, C. y Di Chiara, G. (1999) Reciprocal changes in dopamine responsiveness in the nucleus accumbens shell and core and in the dorsal caudate-putamen in rats sensitized to morphine. Neuroscience, 90: 447-455.
- Calcagnetti, D.J. y Schechter, M.D. (1991) Conditioned place aversion following the central administration of a novel dopamine release inhibitor CGS 10746B. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 40: 255-259.
- Carr, G.D., Fibiger, H.C. y Phillips, A.G. (1989) Conditioned place preference as a measure of drug reward. En: The Neuropharmacological Basis of Reward, pp. 264-319. Eds. J.M. Liebman, S.L. Cooper, Clarendon Press: Oxford.
- Chaperon, F. y Thiebot, M.H. (1996) Effects of dopaminergic D3-receptor-preferring ligands on the acquisition of place conditioning in rats. Behavioral Pharmacology, 7: 105-109.
- Cheer, J.F., Kendall, D.A. y Marsden, C.A. (2000) Cannabinoid receptors and reward in the rat: a conditioned place preference study. Psychopharmacology, 151: 25-30.
- Ciccocioppo, R., Angeletti, S., Sanna, P.P., Weiss, F. y Massi, M. (2000) Effect of nociceptin/orphanin FQ on the rewarding properties of morphine. European Journal of Pharmacology, 404: 153-159.

Referencias bibliográficas

- Contarino, A., Zanotti, A., Drago, F., Natolino, F., Lipartiti, M. y Giusti, P. (1997) Conditioned place preference: no tolerance to the rewarding properties of morphine. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology* 355: 589-594.
- Coventry, T.L., D'Aquila, P.S., Brain, P. y Willner, P. (1997) Social influences on morphine conditioned place preference. *Behavioural Pharmacology*, 8: 575-584.
- Crowder, W.F. y Hutto, C.W. Jr. (1992a) Operant place conditioning measures examined using morphine reinforcement. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 41: 825-835.
- Crowder, W.F. y Hutto, C.W. Jr. (1992b) Operant place conditioning measures examined using two nondrug reinforcers. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 41: 817-824.
- Cunningham, C.L., Howard, M.A., Gill, S.J., Rubinstein, M., Low, M.J. y Grandy, D.K. (2000) Ethanol-conditioned place preference is reduced in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 67: 693-699.
- David, V. y Cazala, P. (1994a) A comparative study of self-administration of morphine into the amygdala and the ventral tegmental area in mice. *Behavioural Brain Research*, 65: 205-211.
- David, V. y Cazala, P. (1994b) Differentiation of intracranial morphine self-administration behavior among five brain regions in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 48: 625-633.
- David, V. y Cazala, P. (2000) Anatomical and pharmacological specificity of the rewarding effect elicited by microinjections of morphine into the nucleus accumbens of mice. *Psychopharmacology*, 150: 24-34.
- Devine, D.P. y Wise, R.A. (1994) Self-administration of morphine, DAMGO, and DPDPE into the ventral tegmental area of rats. *Journal Neuroscience*, 14: 1978-1984.
- Di Chiara, G. (1999) Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *European Journal of Pharmacology*, 375: 13-30.
- Di Chiara, G. (2000) Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. *European Journal of Pharmacology*, 393: 295-314.

Referencias bibliográficas

- Di Chiara, G. e Imperato, A. (1987) Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens by opiates, alcohol, and barbiturates: studies with transcerebral dialysis in freely moving rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 473: 367-381.
- Di Chiara, G. e Imperato, A. (1988a) Opposite effects of Mu and Kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 244: 1067-1080.
- Di Chiara, G. e Imperato, A. (1988b) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings National Academy of Sciences USA*, 85: 5274-5278.
- Di Chiara, G., Imperato, A. y Mulas, A. (1987) Preferential stimulation of dopamine release in the mesolimbic system: a common feature of drugs of abuse. En: *Neurotransmitter Interactions in the Basal Ganglia*. Sandler y cols., (Eds.) Raven Press, New York.
- Di Chiara, G. y North, R.A. (1992) Neurobiology of opiate abuse. *TiPS*, 13: 185-193.
- Di Scala, G. y Sandner, G. (1989) Conditioned place aversion produced by FG 7142 is attenuated by haloperidol. *Psychopharmacology*, 99: 176-180.
- Egger, M.D. y Miller, N.E. (1962) Secondary reinforcement in rats as a function of information value and reliability of the stimulus. *Journal of Experimental Psychology*, 64: 94-104.
- Fan, G-H., Wang, L-Z., Qiu, H-C., Ma, L. y Pei, G. (1999) Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in rat hippocampus attenuates morphine tolerance and dependence. *Molecular Pharmacology*, 56: 39-45.
- Funada, M., Suzuki, T., Narita, M., Misawa, M., Nagase, H. (1993) Blockade of morphine reward through the activation of κ -opioid receptors in mice. *Neuropharmacology*, 32: 1315-1323.

Referencias bibliográficas

- Garcia, J., Kimeldorf, D.J. y Hunt, E.L. (1957) Spatial avoidance in the rat as a result of exposure to ionizing radiation. *British Journal of Radiology*, 30: 318-321.
- Gerrits, M.A.F.M., Ramsey, N.F., Wolterink, G. y van Ree, J.M. (1994) Lack of evidence for an involvement of nucleus accumbens dopamine D1 receptors in the initiation of heroin self-administration in the rat. *Psychopharmacology*, 114: 486-494.
- Gray, A.M., Rawls, S.M., Shippenberg, T.S. y McGinty, J.F. (1999) The kappa-opioid agonist, U-69593, decreases acute amphetamine-evoked behaviors and calcium-dependent dialysate levels of dopamine and glutamate in the ventral striatum. *Journal Neurochemistry*, 73: 1066-1074.
- Gysling, K. y Wang, R.Y. (1983) Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat. *Brain Research*, 277: 119-127.
- Hand, T.H., Stinus, L. y Le Moal (1989) Differential mechanisms in the acquisition and expression of heroin-induced place preference. *Psychopharmacology*, 98: 61-67.
- Horvitz, J.C. (2000) Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience*, 96: 651-656.
- Ikemoto, S. y Panksepp, J. (1999) The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Research Reviews*, 31: 6-41.
- Johnson, D.W. y Glick, S.D. (1993) Dopamine release and metabolism in nucleus accumbens and striatum of morphine-tolerant and nontolerant rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 46: 341-347.
- Johnson, S.W. y North, R.A. (1992) Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *The Journal of Neuroscience*, 12: 483-488.
- Khroyan, T.V., Fuchs, R.A., Baker, D.A. y Neisewander, J.L. (1997) Effects of D3-preferring agonists 7-OH-PIPAT and PD-128,907 on motor behaviors and place conditioning. *Behavioral Pharmacology*, 8: 65-74.

Referencias bibliográficas

- Kimmel, H.L., Garrett, B.E. y Holtzman, S.G. (1995) Effects of acute and chronic morphine on rotational behavior in nigral-lesioned rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52: 397-401.
- Kivastik, T., Vuorikallas, K., Piepponen, T.P., Zharkovsky, A. y Ahtee, L. (1996) Morphine- and cocaine- induced conditioned place preference: effects of quinpirole and preclamol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54: 371-375.
- Kling-Petersen, T., Ljung, E., Wollter, L. y Svensson, K. (1995a) Effects of the dopamine D3- and autoreceptor preferring antagonist (-)-DS121 on locomotor activity, conditioned place preference and intracranial self-stimulation in the rat. *Behavioral Pharmacology*, 6: 107-115.
- Kling-Petersen, T., Ljung, E., Wollter, L. y Svensson, K. (1995b) Effects of dopamine D3 preferring compounds on conditioned place preference and intracranial self-stimulation in the rat. *Journal Neural transmission (General Section)* 101: 27-39.
- Koob, G.F. (1992) Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *TiPS* 13: 177-184.
- Koob, G.F. Sanna, P.P. y Bloom, F.E. (1998) Neuroscience of addiction. *Neuron*, 21: 467-476.
- Koob, G.F. y Le Moal, M. (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology*, 24: 97-129.
- Leone, P. y Di Chiara, G. (1987) Blockade of D-1 receptors by SCH 23390 antagonizes morphine- and amphetamine-induced place preference conditioning. *European Journal of Pharmacology*, 135: 251-254.
- Leone, P., Pocock, D. y Wise, R.A. (1991) Morphine-dopamine interaction: ventral tegmental morphine increases nucleus accumbens dopamine release. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 39: 462-472.
- Leri, F. y Franklin, K.B.J. (2000a) Effects of diazepam on conditioned place preference induced by morphine or amphetamine in the rat. *Psychopharmacology*, 150: 351-360.
- Leri, F. y Franklin, K.B.J. (2000b) Diazepam in the ventral striatum dissociates dopamine-dependent and dopamine-independent place conditioning. *Neuroreport*, 11: 2553-2557.

Referencias bibliográficas

- Li, Z., Wu, C.F., Pei, G., Guo, Y.Y. y Li, X. (2000) Antagonistic effect of pseudoginsenoside-F11 on the behavioral actions of morphine in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 66: 595-601.
- Longoni, R., Cadoni, C., Mulas, A., Di Chiara, G. y Spina, L (1998) Dopamine-dependent behavioural stimulation by non-peptide delta opioids BW373U86 and SNC 80:2. Place-preference and brain microdialysis studies in rats. *Behavioural Pharmacology*, 9: 9-14.
- Longoni, R., Spina, L. y Di Chiara, G. (1987) Dopaminergic D-1 receptors: essential role in morphine-induced hypermotility. *Psychopharmacology*, 93: 401-402.
- Lu, L., Ceng, X. y Huang, M. (2000a) Corticotropin-releasing factor receptor type I mediates stress-induced relapse to opiate dependence in rats. *Neuroreport*, 11: 2373-2378.
- Lu, L., Huang, M., Liu, Z. y Ma, L. (2000b) Cholecystokinin-B receptor antagonists attenuate morphine dependence and withdrawal in rats. *Neuroreport*, 11: 829-832.
- Lu, L., Liu, D. Y Ceng, X. (2001) Corticotropin-releasing factor receptor type 1 mediates stress-induced relapse of cocaine-conditioned place preference in rats. *European Journal of Pharmacology*, 415: 203-208.
- Lu, X.Y. Ghasemzadeh, M.B. y Kalivas, P.W. (1998) Expression of D1 receptor, D2 receptor, substance P and enkephalin messenger RNAs in the neurons projecting from the nucleus accumbens. *Neuroscience*, 82:767-780.
- Mackey, W.B. y van der Kooy, D. (1985) Neuroleptics block the positive reinforcing effects of amphetamine but not of morphine as measured by place conditioning. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 22: 101-105.
- Magnus-Ellenbroek, B. y Havemann-Reinecke, U. (1993) Morphine-induced hyperactivity in rats - a rebound effect? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacology*, 347: 635-642.

Referencias bibliográficas

- Maisonnette, I.M., Archer, S. y Glick, S.D., (1994) U50,488, a kappa opioid receptor agonist, attenuates cocaine-induced increases in extracellular dopamine in the nucleus accumbens of rats. *Neuroscience Letters*, 181: 57-60.
- Maldonado, R., Saiardi, A., Valverde, O., Samad, T.A., Roques, B.P. y Borrelli, E. (1997) Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature*, 388: 586-589.
- Manzanedo, C., Aguilar, M.A. y Miñarro, J. (1999) The effects of dopamine D2 and D3 antagonists on spontaneous motor activity and morphine-induced hyperactivity in male mice. *Psychopharmacology*, 143: 82-88.
- Manzanedo, C., Aguilar, M.A., Rodríguez-Arias, M., Miñarro, J. (2001) Conditioned place preference paradigm can be a mouse model of relapse to opiates. *Neuroscience Research Communications* 28: 23-29.
- Martin, J.L. e Itzhak, Y. (2000) 7-Nitroindazole blocks nicotine-induced conditioned place preference but not LiCl-induced conditioned place aversion. *Neuroreport*, 11: 947-949.
- Martin-Iverson, M.T. y Reimer, A.R. (1996) Classically conditioned motor effects do not occur with cocaine in an unbiased conditioned place preferences procedure. *Behavioral Pharmacology* 7: 303-314.
- Matthews, R.T. y German, D.C. (1984) Electrophysiological evidence for excitation of rat ventral tegmental area dopamine neurons by morphine. *Neuroscience*, 11: 617-625.
- McBride, W.J., Murphy, J.M. y Ikemoto, S. (1999) Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behavioural Brain Research*, 101: 129-152.
- Melis, M., Diana, M. y Gessa, L.G. (2000) Cyclo-oxygenase-inhibitors increase morphine effects on mesolimbic dopamine neurons. *European Journal of Pharmacology*, 387: R1-R3.
- Mucha, R.F. e Iversen, S.D. (1984) Reinforcing properties of morphine and naloxone revealed by conditioned place preferences: a procedural examination. *Psychopharmacology*, 82: 241-247.

Referencias bibliográficas

- Mueller, D. y Stewart, J. (2000) Cocaine-induced conditioned place preference: reinstatement by priming injections of cocaine after extinction. *Behavioral Brain Research*, 115: 39-47.
- Nader, K., Bechara, A., Roberts, D.C.S. y van der Kooy, D. (1994) Neuroleptics block high- but not low- dose heroin place preferences: further evidence for a two-system model of motivation. *Behavioral Neuroscience*, 108: 1128-1138.
- Nader, K. Y van der Kooy, (1997) Deprivation stateswitches the neurobiological substrates mediating opiate reward in the ventral tegmental area. *The Journal of Neuroscience*, 17: 383-390.
- Nakajima, S. (1989) Subtypes of dopamine receptors involved in the mechanism of reinforcement. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 13: 123-128.
- Nakajima, S. y Wise, R. A. (1987) Heroin self-administration in the rat suppressed by SCH 23390. *Society for Neuroscience Abstracts*, 429: 9
- Nestler, E.J. (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 2: 119-128.
- Olds M.E. (1982) Reinforcing effects of morphine in the nucleus accumbens. *Brain Research*, 237: 429-440.
- Olds, J. y Milner, P. (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 47: 419-427.
- Olmstead, M.C. y Franklin, K.B.J. (1997a) The development of a conditioned place preference to morphine: effects of microinjections into various CNS sites. *Behavioral Neuroscience*, 6: 1324-1334.
- Olmstead, M.C. y Franklin, K.B.J. (1997b) The development of a conditioned place preference to morphine: effects of lesions of various CNS sites. *Behavioral Neuroscience*, 111: 1313-1323.
- Ostrowski, N.L. y Caggiula, A. R. (1991) Correlation between locomotor stimulation and the electrophysiological effects of low doses of morphine on substantia nigra dopamine neurons. I. Acute drug administration. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 257: 72-81.

Referencias bibliográficas

- Ostrowski, N.L. y Pert, A. (1995) Substantia nigra opiate receptors on basal ganglia efferents. *Brain Research Bulletin*, 38: 513-523.
- Panos, J.J., Rademacher, D.J., Renner, S.L. y Steinpreis, R.E. (1999) The rewarding properties of NMDA and MK-801 (Dizocilpine) as indexed by the conditioned place preference paradigm. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 64: 591-595.
- Parker, L.A. y McDonald, R.V. (2000) Reinstatement of both a conditioned place preference and a conditioned place aversion with drug primes. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 66: 559-561.
- Planeta, D.S.C., Aizenstein, M.L. y DeLucia, R. (1995) Reinforcing properties of fencamfamine: involvement of dopamine and opioid receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 50: 35-40.
- Piepponen, T.P., Honkanen, A., Kivastik, T., Zharkovsky, A., Turtia, A., Mikkola, J.A.V. y Ahtee, L. (1999) Involvement of opioid m₁-receptors in opioid-induced acceleration of striatal and limbic dopaminergic transmission. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 63: 245-252.
- Pontieri, F.E., Tanda, G. y Di Chiara, G. (1995) Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proceedings National Academy of Sciences USA*, 92: 12304-12308.
- Randall, C.K., Kraemer, P.J. y Bardo, M.T. (1998) Morphine-induced conditioned place preference in preweanling and adult rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 60: 217-222.
- Robinson, T.E. y Berridge, K.C. (2001) Mechanisms of action of addictive stimuli. Incentive-sensitization and addiction. *Addiction*, 96: 103-114.
- Rodríguez-Arias, M., Broseta, I., Aguilar, M.A. y Miñarro, J. (2000) Lack of specific effects of selective D₁ and D₂ dopamine antagonists vs. risperidone on morphine-induced hyperactivity. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 66: 189-197.

Referencias bibliográficas

- Schechter, M.D. y Calcagnetti, D.J. (1993) Trends in place preference conditioning with a cross-indexed bibliography; 1957-1991. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17: 21-41.
- Schechter, M.D. y Meehan, S.M. (1994) Conditioned place aversion produced by dopamine release inhibition. *European Journal of Pharmacology*, 260: 133-137.
- Schechter, M. D. y Calcagnetti D.J. (1998) Continued trends in the conditioned place preference literature from 1992 to 1996, inclusive, with a cross-indexed bibliography. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22: 827-846.
- Schwartz, R.K. y Huston, J.P. (1996) The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Progress Neurobiology*, 50: 275-331.
- Self, D.W. y Stein, L. (1993) Pertussis toxin attenuates intracranial morphine self-administration. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 46: 689-695.
- Sesack, S.R. y Pickel, V.M. (1992) Dual ultrastructural localization of enkephalin and tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the rat ventral tegmental area: multiple substrates for opiate-dopamine interactions. *Journal of Neuroscience*, 12: 1335-1350.
- Shimosato, K., y Ohkuma, S. (2000) Simultaneous monitoring of conditioned place preference and locomotor sensitization following repeated administration of cocaine and methamphetamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 66: 285-292.
- Shippenberg, T.S. y Elmer, G.I. (1998) The neurobiology of opiate reinforcement. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 12: 267-303.
- Shippenberg, T.S. y Herz, A. (1988) Motivational effects of opioids: influence of D-1 versus D-2 receptor antagonists. *European Journal of Pharmacology*, 151: 233-242.
- Shippenberg, T.S., Bals-Kubik, R. y Herz, A. (1993) Examination of the neurochemical substrates mediating the motivational effects of opioids: role of the mesolimbic dopamine system and D-1 vs. D-2 dopamine receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 265: 53-59.

Referencias bibliográficas

- Shippenberg, T.S., Bals-Kubik, R., Huber, A. y Herz, A. (1991) Neuroanatomical substrates mediating the aversive effects of D-1 dopamine receptor antagonists. *Psychopharmacology*, 103: 209-214.
- Shippenberg, T.S., Heidbreder, Ch. y Lefevour, A. (1996) Sensitization to the conditioned rewarding effects of morphine: pharmacology and temporal characteristics. *European Journal of Pharmacology*, 299: 33-39.
- Simón, V.M., Parra, A., Miñarro, J., Arenas M.C., Vinader-Caerols, C. y Aguilar M.A. (2000) Predicting how equipotent doses of chlorpromazine, haloperidol, sulpiride, raclopride and clozapine reduce locomotor activity in mice. *European Neuropsychopharmacology*, 10: 159-164.
- Skinner, B.F. (1938) *The behavior of organisms*. Appleton-Century-Crofts, New York.
- Sora, I., Hall, F.S., Andrews, A.M., Itokawa, M., Li, X.F., Wei, H.B., Wighems, C., Lesch, K.P., Murphy, D.L., Uhl, G.R. (2001) Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proceedings National Academy of Sciences USA*, 98: 5300-5305.
- Spanagel, R., Herz, A. y Shippenberg, T.S. (1990) The effects of opioid peptides on dopamine release in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *Journal of Neurochemistry*, 55: 1734-1739.
- Spanagel, R. y Shippenberg, T.S. (1993) Modulation of morphine-induced sensitization by endogenous κ opioid systems in the rat. *Neuroscience Letters*, 153: 232-236.
- Spanagel, R. y Weiss, F. (1999) The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neuroscience*, 22:521-527.
- Spanagel, R., Herz, A. y Shippenberg, T.S. (1992) Opposing tonically active endogenous opioid systems modulated the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proceedings National Academy of Sciences USA*, 89: 2046-2050.



Referencias bibliográficas

- Spanagel, R., Herz, A., Bals-Kubik, R. y Shippenberg, T. S. (1991) β -endorphin-induced locomotor stimulation and reinforcement are associated with an increase in dopamine release in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology*, 104: 51-56.
- Spielewoy, C., Gonon, F., Roubert, C., Fauchey, V., Jaber, M., Caron, M.G., Roques, B.P., Hamon, M., Betancur, C., Maldonado, R. y Giros, B. (2000) Increased rewarding properties of morphine in dopamine-transporter knockout mice. *European Journal of Neuroscience*, 12: 1827-1837.
- Spiteri, T., Le Pape, G. y Agmo, A. (2000) What is learned during place preference conditioning? A comparison of food- and morphine-induced reward. *Psychobiology*, 28: 367-382.
- Spyraki, C., Fibiger, H. C. y Phillips, A. G. (1983) Attenuation of heroin reward in rats by disruption of the mesolimbic dopamine system. *Psychopharmacology*, 79: 278-283.
- Stinus, L., Cador, M. y Le Moal, M. (1992) Interaction between endogenous opioids and dopamine within the nucleus accumbens. *The Neurobiology of Drug and Alcohol Addiction. Annals of the New York Academy of Sciences*, 654: 254-273.
- Stinus, L., Nadaud, D., Deminière, J.J., Jauregui, J., Hand, T.T. y Le Moal, M. (1989) Chronic flupentixol treatment potentiates the reinforcing properties of systemic heroin administration. *Biological Psychiatry*, 26: 363-371.
- Subhan, F., Pache, D.M. y Sewell, R.D.E. (2000) Potentiation of opioid-induced conditioned place preference by the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. *European Journal of Pharmacology*, 390: 137-143.
- Suzuki, T. y Misawa, M. (1995) Sertindole antagonizes morphine-, cocaine-, and methamphetamine-induced place preference in rat. *Life Sciences*, 57: 1277-1284.
- Suzuki, T., Funada, M., Narita, M., Misawa, M. y Nagase, H. (1993) Morphine-induced place preference in the CXBX mouse: characteristics of mu opioid receptor subtypes. *Brain Research*, 602: 45-52.

Referencias bibliográficas

- Suzuki, T., Takamori, K., Misawa, M. y Onodera, K. (1995) Effects of the histaminergic system on the morphine-induced conditioned place preference in mice. *Brain Research*, 675: 195-202.
- Tanda, G. y Di Chiara, G., (1998) A dopamine- μ 1 opioid link in the rat ventral tegmentum shared by palatable food (Fonzies) and non-psychostimulant drugs of abuse. *European Journal of Neuroscience*, 10: 1179-1187.
- Tolliver, B.K., Sganga, M.W. y Sharp, F.R. (2000) Suppression of *c-fos* induction in the nucleus accumbens prevents acquisition but not expression of morphine-conditioned place preference. *European Journal of Neuroscience*, 12: 3399-3406.
- 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: 613-672.
- Tzschentke, T.M. (2001) Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Progress in Neurobiology*, 63:241-320.
- Tzschentke, T.M. y Schmidt, W. J. (1995) N-Methyl-D-aspartic acid-receptor antagonists block morphine-induced conditioned place preference in rats. *Neuroscience Letters*, 193: 37-40.
- Tzschentke, T.M. y Schmidt, W. J. (1996) Morphine-induced catalepsy is augmented by NMDA receptor antagonists, but is partially attenuated by an AMPA receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology*, 295: 137-146.
- Tzschentke, T.M. y Schmidt, W. J. (1997) Interactions of MK-801 and GYKI 52466 with morphine and amphetamine in place preference conditioning and behavioural sensitization. *Behavioural Brain Research* 84: 99-107.
- Unterwald, E.M. y Cuntapay, M. (2000) Dopamine-opioid interactions in the rat striatum: a modulatory role for dopamine D₁ receptors in delta opioid receptor-mediated signal transduction. *Neuropharmacology*, 39: 372-381.
- Valjent, E. y Maldonado, R. (2000) A behavioural model to reveal place preference to Δ 9-tetrahydrocannabinol in mice. *Psychopharmacology*, 147: 436-438.

Referencias bibliográficas

- Van der Kooy, D. (1987) Place conditioning: a simple and effective method for assessing the motivational properties of drugs. In: Bozarth, M.A., ed. *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs*. New York: Springer-Verlag: 1987: 229-240.
- Van der Kooy, D., Mucha, R.F., O'Shaughnessy, M. y Bucenieks, P. (1982) Reinforcing effects of brain microinjection of morphine revealed by conditioned place preference. *Brain Research*, 243: 107-117.
- Vanderschuren, L.J.M.J. y Kalivas, P.W. (2000) Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology*, 151: 99-120.
- Wang, B., Luo, F., Zhang, W-T. y Han, J-S. (2000) Stress or drug priming induces reinstatement of extinguished conditioned place preference. *Neuroreport*, 11: 2781-2784.
- Wang, H., Moriwaki, A., Wang, J.B., Uhl, G.R. y Pickel, V.M. (1997) Ultrastructural immunocytochemical localization of mu-opioid receptors in dendritic targets of dopaminergic terminals in the rat caudate-putamen nucleus. *Neuroscience*, 81: 757-771.
- Wise, R.A. (1982) Neuroleptics and operant behavior: the anhedonia hypothesis. *Behavioral and Brain Sciences*, 5: 39-87.
- Wise, R.A. (1996) Neurobiology of addiction. *Current Opinión in Neurobiology*, 6: 243-251.
- Wise, R.A. (1998) Drug-activation of brain reward pathways. *Drug and Alcohol Dependence*, 51: 13-22.
- Wise, R.A. (2000) Interactions between medial prefrontal cortex and meso- limbic components of brain reward circuitry. *Progress Brain Research*, 126: 255-262.
- Wise, R.A., Bauco, P., Carlezon, W.A. y Trojnar, W. (1992) Self-stimulation and drug reward mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 654: 192-198.
- Wise, R.A. y Rompe, P.P. (1989) Brain dopamine and reward. *Annals of Review Psychology*, 40: 191-225.

Referencias bibliográficas

- Wu, W.R. y Zhu, X.Z. (1999) The amphetamine-like reinforcing effect and mechanism of L-deprenyl on conditioned place preference in mice. *European Journal of Pharmacology*, 364: 1-6.
- Xu, N-J., Wang, L-Z., Wu, C-F y Pei, G. (2001) Spatial learning and morphine-rewarded place preference negatively correlates in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 68: 389-394.
- Zahm, D.S. (1999) Functional-anatomical implications of the nucleus accumbens core and shell subterritories. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877: 113-128.

ANEXO:

Artículos publicados

ORIGINAL INVESTIGATION

C. Manzanedo · M.A. Aguilar · J. Miñarro

The effects of dopamine D₂ and D₃ antagonists on spontaneous motor activity and morphine-induced hyperactivity in male mice

Received: 19 June 1998 / Final version: 17 October 1998

Abstract Rationale: Dopaminergic neurotransmission, in particular the mesolimbic pathway, is involved in spontaneous locomotor activity and in morphine-induced hyperactivity, since the drugs acting on DA receptors can modify the action of morphine and this effect could be dependent on the type of DA receptor affected. **Objective:** In this study, the action of U-99194A maleate, haloperidol, sulpiride and morphine (5, 10, 20, 40 mg/kg) on locomotor activity in male mice was evaluated. Likewise, the effects of these dopaminergic antagonists on morphine-induced hyperactivity were studied. **Methods:** Animals treated with U-99194A maleate (2.5, 5, 10, 20 mg/kg), haloperidol (0.075, 0.1 mg/kg), sulpiride (20, 40 mg/kg), or morphine (5, 10, 20, 40 mg/kg), and animals treated with these neuroleptics plus morphine were tested in an actimetre at different time points. **Results:** It was found that an increase in locomotor activity was produced between 0 and 30 min after the administration of 20 mg/kg U-99194A maleate and between 30 and 60 min after the administration of 20 and 40 mg/kg morphine. This dose of U-99194A maleate and the high dose of sulpiride reverts the hyperactivity induced by 20 mg/kg morphine. Haloperidol reversed the hyperactivity induced by all doses of morphine. **Conclusions:** Our results confirm that the action of DA D₂ and D₃ receptors could be dependent on the dopaminergic state, in this case modified by the action of morphine.

Key words U-99194A-maleate · Morphine · Haloperidol · Sulpiride · Motor activity · Mice

Introduction

5,6-Dimethox 2-(di-*n*-propylamine) indan maleate (U-99194A), is a DA D₃ antagonist which has a 20-fold preference for the DA D₃ versus the DA D₂ receptor (Waters et al. 1993; Haadsma-Svensson et al. 1995). As with other DA D₃ antagonists, U-99194A maleate dose-dependently (1–100 mg/kg) increased locomotor activity in mice, this effect being significant with doses of 30 and 100 mg/kg (Fink-Jensen et al. 1998). In rats, the effects of U-99194A maleate on locomotor activity have been more frequently reported (Waters et al. 1993, 1994; Kling-Petersen et al. 1994; Haadsma-Svensson et al. 1995; Sautel et al. 1995). The stimulant effects of this drug are evident after intra-accumbens injections with doses between 0.8 and 12.5 nmol/side, with no effect at high doses (50 nmol/side). After ICV administration, U-99194A maleate produced a biphasic effect on locomotion: the activity was increased with low doses (62.5 and 250 nmol/kg) and decreased with high doses (1000 nmol/side). Local application into the ventral tegmental area did not significantly affect locomotor activity (Kling-Petersen et al. 1995b). Systemic administration also produced a biphasic response with hyperlocomotion and hypolocomotion produced by high doses, probably as a result of a postsynaptic dopamine D₂ receptor blockade (Waters et al. 1993, 1994; Haadsma-Svensson et al. 1995). In monkeys, U-99194A maleate also has antidyskinetic properties (Blanchet et al. 1997).

The behavioural stimulation elicited by DA D₃ antagonists has been attributed to a preferential dopamine autoreceptor blockade which resulted in enhanced dopamine release (Svensson et al. 1986; Gobert et al. 1995); however, other studies have shown that these drugs activated motor behaviours at dosages at which HVA levels or dopamine release were not affected (Waters et al. 1993, 1994; Svensson et al. 1994a, b; Sautel et al. 1995). Moreover, 7-OH-DPAT, a dopamine receptor agonist reported to have a preference for the

C. Manzanedo · M.A. Aguilar · J. Miñarro (✉)
Area de Psicobiología, Facultad de Psicología,
Universitat de Valencia, Aptdo. 22109,
E-46071 Valencia, Spain
e-mail: jose.minarro@uv.es, Fax: +34-96386-4668

DA D₃ receptor (Levesque et al. 1992), had opposite motor effects to those of the DA D₃ antagonists: it inhibited locomotor activity (Daly and Waddington 1993; Svensson et al. 1994a,b; Kling-Petersen et al. 1995a,b). This effect of the DA D₃ agonist was evident after low doses, while high doses produced a biphasic effect: a decrease followed by an increase in locomotor activity. Its action at low doses may be due to an interaction with DA D₃ receptors and at higher doses with other DA receptors such as D₁ and D₂ (Svensson et al. 1994a; Sethy et al. 1996; Khroyan et al. 1997).

Dopamine receptors are involved in morphine-induced hyperactivity, since the doses of morphine that induce hyperactivity produce an increase in the release of mesolimbic DA (Di Chiara et al. 1988a,b; Di Chiara 1995; Pontieri et al. 1995; Bassareo et al. 1996) and the DA D₁ and D₂ antagonists block these effects (Magnus-Ellenbroek and Havemann-Reinecke 1993; Narita et al. 1993; Funada et al. 1994; Imperato et al. 1996; Rodriguez-Arias, unpublished). The limbic location of DA D₃ receptors suggests their possible role in the mediation of some effects of the drugs of abuse, such as morphine. Moreover, the particular effects on locomotor behaviour of drugs acting on DA D₃ receptors could modify the effects of morphine on locomotor activity in a different way to that observed with other dopamine antagonists.

In this work, in an attempt to evaluate the nature of the interaction between the effects of the selective DA D₃ receptor antagonist U-99194A and morphine on locomotor activity in male mice, a series of experiments was performed sequentially. Firstly, the effects of several doses of U-99194A maleate on spontaneous locomotor activity shown by mice in an actimeter were studied during a period of 120 min, since the time-effects of this drug have not been well established. Secondly, the effects of morphine, haloperidol and sulpiride on spontaneous locomotor activity of mice were evaluated during a period of 60 min, since it is well reported that these drugs produce their maximal effects in this time. Haloperidol and sulpiride were chosen to make a comparison with the effects of DA D₃ antagonist, due to the fact that they represent a classical and atypical dopamine antagonist and differ in their affinity for DA D₂ versus D₃ receptors. In the third experiment, the influence of the blockade of DA D₃ receptors with U-99194A maleate on the effect of morphine were studied, while in the fourth experiment the effects of haloperidol and sulpiride on morphine-induced hyperactivity were evaluated, to compare the effects of these neuroleptics with those of U-99194A maleate.

Materials and methods

Subjects

Three hundred and fifty-two male mice of the OF1 strain acquired commercially in CRIFFA SA (France) were used. The animals

arrived in the laboratory at 42 days of age and were housed in groups of 11, in plastic cages (22 × 38 cm) 10 days before experiments, under the following conditions: constant temperature (21 ± 2°C), a reversed light schedule (white lights on: 1930–0730 hours, and food and water available ad libitum, except during behavioural tests).

Apparatus

An actimetre was employed (Actisystem II, Panlab S.L., Barcelona) for the measurement of spontaneous motor activity shown by the animals. The actimetre has four sensory plates 35 × 35 cm (pb 46603) which register the activity of the animals through an electromagnetic system, an interface (pb 40035), and a computer (Olivetti PCS 286) with the DAS 16 program (v.1.0.) which allows the acquisition and storage of the data from the sensory plates. Between subjects, the apparatus was cleaned with water.

Drugs

Animals were injected IP with U-99194A maleate (Research Biochemical International, Natick, Mass., USA), haloperidol (Laboratorios Sintex Latino S.A, Madrid, Spain), sulpiride (Dogmatil Laboratorios Delagrangre S.A, Madrid, Spain) and morphine (Laboratorios Alcaliber, Toledo, Spain) in a volume of 0.01 ml/g. Control groups were injected with physiological saline (NaCl 0.9%), also used to dissolve the drugs.

Procedure

After the adaptation period in the laboratory, animals were divided depending on the treatment. In the first experiment, animals were allocated to five groups ($n = 11$); experimental animals receiving 2.5, 5, 10 or 20 mg/kg U-99194A maleate (U2.5, U5, U10, U20 groups). The control group received physiological saline (SAL group). Immediately after drug administration, animals were placed onto the sensory plates for a period of 120 min. The computer registered activity every 30 min, i.e. at 30, 60, 90 and 120 min after drug administration. In the second experiment, animals were allocated to nine groups ($n = 11$); experimental animals receiving 5, 10, 20 or 40 mg/kg morphine (M5, M10, M20, M40 groups); 0.075 or 0.1 mg/kg haloperidol (H0.075, H0.1 groups); or 20 or 40 mg/kg sulpiride (S20, S40 groups). The control group received physiological saline (SAL group). Immediately after drug administration, animals were placed onto the sensory plates for a period of 60 min. The computer registered activity every 30 min, i.e. at 30 and 60 min after drug administration.

In the third experiment, animals were allocated to five groups ($n = 11$); control animals received two injections of physiological saline also separated by 30 min (SAL + SAL group). Experimental animals received a first injection of 20 or 40 mg/kg morphine and 30 min later a second injection of saline (M20 + SAL, M40 + SAL groups) or 20 mg/kg U-99194A maleate (M20 + U20, M40 + U20 groups). The interval between both injections was determined in function of the results obtained in the first and second experiments in which the effects of U-99194A maleate are produced in the first 30 min, while the hyperactivity induced by morphine is maximal between 30 and 60 min after administration. Each animal was placed onto the sensory plates for a period of 60 min. The computer registered the activity between 30 and 60 min after the last drug administration. In the fourth experiment, animals were allocated to 13 groups ($n = 11$). Control animals received two simultaneous injections of physiological saline (SAL + SAL). Experimental animals received an injection of 10, 20 or 40 mg/kg morphine immediately followed by an injection of 0.075 or 0.1 mg/kg haloperidol (M10 + H0.075, M20 + H0.075, M40 + H0.075, M10 + H0.1, M20 + H0.1,

M40 + H0.1 groups) or 20 or 40 mg/kg sulpiride (M10 + S20, M20 + S20, M40 + S20, M10 + S40, M20 + S40, M40 + S40 groups). The coadministration of morphine and haloperidol or sulpiride was decided due to the results obtained in the second experiment, in which it was evident that the effects of these drugs are maximal between 30 and 60 min after administration. Each animal was placed onto the sensory plates for a period of 60 min. The computer registered activity between 30 and 60 min after the drug administration.

Statistical treatment

To evaluate differences between groups, analyses of variance (ANOVAs) and post-hoc Newman-Keuls and Simple Effects tests were carried out.

Results

Experiment 1 (Fig. 1)

ANOVA showed that the variable Time was significant [$F(3,150) = 121.959$; $P < 0.0001$] but not Treatment [$F(4,50) = 1.017$; $P < 0.4079$]. Interaction was also significant [$F(12,150) = 2.897$; $P < 0.001$]. Post-hoc comparisons showed that the animals presented more activity the first 30 min of the test than in the following time periods (30–60 min, 60–90 min, 90–120 min) ($P < 0.01$), and more activity between 30 and 60 min than in the remaining time of test ($P < 0.01$); there was no difference in motor activity between the last two time points. Simple effects showed that Treatment was only significant the first 30 min of test ($P < 0.002$) and that the effect of Time elapsed after administration was significant in all treatments ($P < 0.001$). To evaluate the effects of Treatment in the first 30 min of test, we performed a separate ANOVA which indicated that Treatment was significant [$F(4,50) = 3.013$; $P < 0.0265$]. A post-hoc comparison showed that the dose

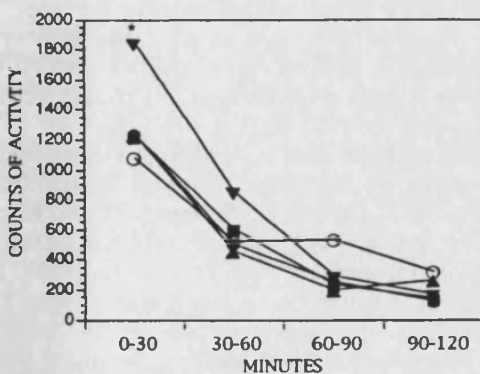


Fig. 1 Effects of U-99194A maleate on spontaneous locomotor activity of mice during 120 min after administration. SAL, saline (○); U 2.5, U-99194A 2.5 mg/kg (●); U-99194A 5 mg/kg (●); U 10, U-99194A 10 mg/kg (▲); U 20, U-99194A 20 mg/kg (▼); * $P < 0.05$ differences between U 20 and SAL groups

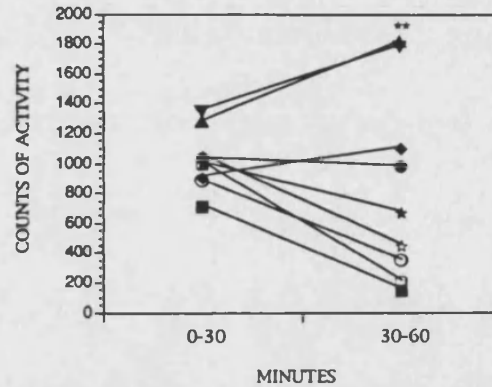


Fig. 2 Effects of morphine, haloperidol and sulpiride on spontaneous locomotor activity of mice during 60 min after administration. SAL, saline (○); M5, morphine 5 mg/kg (●); M10, morphine 10 mg/kg (▲); M20, morphine 20 mg/kg (▲); M40, morphine 40 mg/kg (▼); H 0.075, haloperidol, 0.075 mg/kg (□); H 0.1, haloperidol 0.1 mg/kg (■); S 20, sulpiride 20 mg/kg (☆) S 40, sulpiride 40 mg/kg (●); ** $P < 0.01$ differences between M20/M40 and SAL groups

of 20 mg/kg U-99194A maleate increased motor activity with respect to the control group ($P < 0.05$).

Experiment 2 (Fig. 2)

ANOVA showed that Treatment [$F(8,90) = 6.744$; $P < 0.0001$], Time [$F(1,90) = 15.771$; $P < 0.0001$] and Interaction [$F(8,90) = 11.528$; $P < 0.0001$] were significant. Newman-Keuls post-hoc analysis of Treatment revealed that the animals receiving 20 and 40 mg/kg morphine presented an increase of motor activity with respect to the control group ($P < 0.01$). Simple effects indicated that 1) Treatment was only significant in the last time point, between 30 and 60 min after administration ($P < 0.01$); 2) control animals presented less motor activity between 30 and 60 min than between 0 and 30 min of test ($P < 0.01$) and 3) animals treated with 20 and 40 mg/kg morphine presented more activity between 30 and 60 min than between 0 and 30 min after administration ($P < 0.01$).

Experiment 3 (Fig. 3)

ANOVA showed that Treatment was significant [$F(4,50) = 12.975$; $P < 0.0001$]. Post-hoc comparison indicated that animals treated with 20 and 40 mg/kg morphine presented more activity than controls ($P < 0.01$) and that there was a significant difference between them ($P < 0.05$). The mice treated with 40 mg/kg morphine plus U-99194A maleate also presented more activity than controls and animals receiving 20 mg/kg morphine plus U-99194A maleate ($P < 0.01$). Furthermore, animals treated with 20 mg/kg morphine plus U-99194A maleate showed less activity than

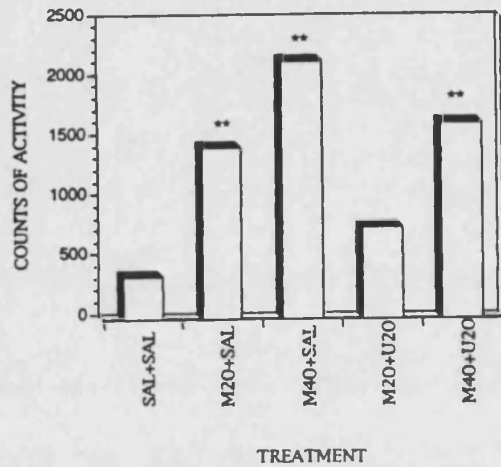


Fig. 3 Effects of U-99194A maleate on morphine-induced hyperactivity. SAL + SAL, saline plus saline; M20 + SAL, morphine 20 mg/kg plus saline; M40 + SAL, morphine 40 mg/kg plus saline; M20 + U20, morphine 20 mg/kg plus U-99194A 20 mg/kg; M40 + U20, morphine 40 mg/kg plus U-99194A 20 mg/kg. ** $P < 0.01$ differences between M20 + SAL, M40 + SAL, M40 + U20 and SAL + SAL groups

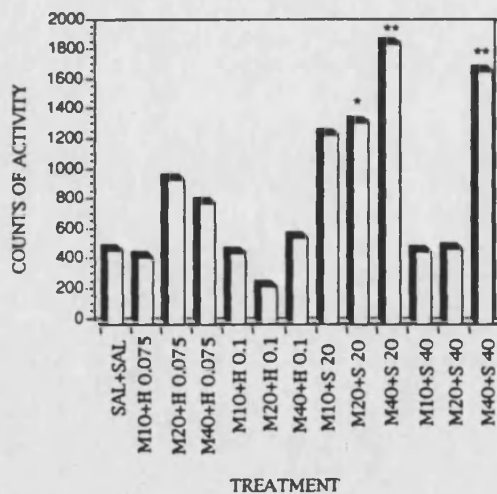


Fig. 4 Effects of haloperidol and sulpiride on morphine-induced hyperactivity. SAL + SAL, saline plus saline; M10 + H0.075, morphine 10 mg/kg plus haloperidol 0.075 mg/kg; M20 + H0.075, morphine 20 mg/kg plus haloperidol 0.075 mg/kg; M40 + H0.075, morphine 40 mg/kg plus haloperidol 0.075 mg/kg; M10 + H0.1, morphine 10 mg/kg plus haloperidol 0.1 mg/kg; M20 + H0.1, morphine 20 mg/kg plus haloperidol 0.1 mg/kg; M40 + H0.1, morphine 40 mg/kg plus haloperidol 0.1 mg/kg; M10 + S20, morphine 10 mg/kg plus sulpiride 20 mg/kg; M20 + S20, morphine 20 mg/kg plus sulpiride 20 mg/kg; M40 + S20, morphine 40 mg/kg plus sulpiride 20 mg/kg; M10 + S40, morphine 10 mg/kg plus sulpiride 40 mg/kg; M20 + S40, morphine 20 mg/kg plus sulpiride 40 mg/kg; M40 + S40, morphine 40 mg/kg plus sulpiride 40 mg/kg. * $P < 0.05$ differences between M20 + S20 and SAL + SAL groups, ** $P < 0.01$ differences between M40 + S20/M40 + S40 and SAL + SAL groups

animals receiving 20 mg/kg morphine plus saline ($P < 0.05$).

Experiment 4 (Fig. 4)

ANOVA showed that Treatment was significant [$F(12,117) = 7.276$; $P < 0.0001$]. Post-hoc comparison revealed that animals treated with 40 mg/kg morphine plus sulpiride presented more motor activity than controls ($P < 0.01$). The same effect was observed in the animals treated with 20 mg/kg morphine and 20 mg/kg sulpiride ($P < 0.05$).

Discussion

Our results show that the administration of U-99194A maleate has a slight effect on motor activity. The higher dose significantly increases the activity of the animals between 0 and 30 min after administration, while lower doses have no effect. This increase in locomotor activity after U-99194A maleate administration has been previously observed in mice (Fink-Jensen et al. 1998) and rats (Waters et al. 1993; Kling-Petersen et al. 1994; Waters et al. 1994; Haadsma-Svensson et al. 1995b; Sautel et al. 1995), which suggests that the blockade of DA D_3 receptors can produce stimulant effects on motor activity and that these receptors have an inhibitory role in the control of motor behaviour (Waters et al. 1993, 1994; Svensson et al. 1994,a,b; Fink-Jensen et al. 1998). Furthermore, due to the habituation of the mice to the environment, we observed that there was a decrease in locomotion after the first 30 min of test in all animals, irrespective of group of treatment. Some studies have indicated that U-99194A maleate can produce more stimulant effects in animals habituated to the environment (Svensson et al. 1991,1993; Kling-Petersen et al. 1994); however, we have not observed these results, since the activity of treated animals is superior to the controls at first but similar after a period of habituation to the activity cages.

In the second experiment, we observed that doses of 20 and 40 mg/kg morphine produce a significant increase in locomotor activity between 30 and 60 min after administration, when the cerebral concentration of morphine is maximal (Miyamoto et al. 1993). The hyperactivity observed in our study is in agreement with the results obtained in other investigations on the effects of morphine on locomotor activity in mice, which showed an increase in this behaviour after the administration of a wide range of doses (Longoni et al. 1987; Narita et al. 1993; Funada et al. 1994; Kuribara 1995; Yakimovskii 1995; Aguilar et al. 1998; Rodriguez-Arias et al., Unpublished). On the other hand, the administration of haloperidol or sulpiride did not produce

significant effects on motor behaviour. The lack of effect of these drugs observed in our study could be due to the low doses used, since the impairing effects of these neuroleptics on locomotor behaviour of mice is well reported (Fujiwara 1992; Aguilar et al. 1995; Storey et al. 1995; Conceicao and Frussa-Filho 1996; Gleason and Shannon 1997). In some of these studies a clear difference between the effects of haloperidol and sulpiride was also observed, the latter producing a less notable motor impairment evident only with high doses (Aguilar et al. 1995; Storey et al. 1995). In our study, the effects of haloperidol and sulpiride are also different: haloperidol decreases and sulpiride increases motor activity with respect to control, although not significantly. Moreover, similar to the first experiment, the animals (with exception of those receiving morphine) presented less activity after the first 30 min of test due to the habituation.

In the last two experiments, we observed the effects of the administration of morphine plus neuroleptics on motor behaviour. The results obtained in the third experiment show that the administration of 20 mg/kg U-99194A maleate reverts the hyperactivity induced by 20 mg/kg morphine, since the animals treated with this dose showed a level of activity similar to that of the controls and significantly less than that of animals treated only with 20 mg/kg morphine. The administration of 20 mg/kg U-99194A maleate also decreased, although not significantly, the hyperactivity induced by 40 mg/kg morphine. These results suggest that the effects of U-99194A on morphine-induced hyperactivity could be dose-dependent and probably a higher dose of this drug would be necessary to revert the effect of the high dose of morphine. Two possible mechanisms could explain the fact that U-99194A maleate reverses morphine-induced hyperactivity: antagonism of DA D₃ receptors; or a different mechanism independent of the DA D₃ receptor, probably antagonism of DA D₂ receptors.

In the fourth experiment, we observed that the administration of haloperidol reverses the hyperactivity induced by 20 and 40 mg/kg morphine, since morphine-plus-haloperidol-treated mice do not change their activity significantly with respect to control animals. The effect of the administration of morphine plus sulpiride is dependent on the doses used. The high dose of sulpiride reverses the hyperactivity induced by 20 mg/kg morphine, since animals treated with 40 mg/kg sulpiride plus this dose of morphine present a level of activity similar to controls. However, this dose of sulpiride does not significantly decrease the hyperactivity induced by 40 mg/kg morphine. The administration of the lower dose of sulpiride has no effect on morphine-induced hyperactivity, while animals treated with 20 mg/kg sulpiride plus morphine present an increase in locomotor activity similar to those observed after morphine administration. As with U-99194A maleate, the results obtained with sulpiride suggest that

the effect of this drug on morphine-induced hyperactivity are dose-dependent and higher doses of sulpiride could be necessary to revert the hyperactivity induced by the high dose of morphine.

On the whole, our results suggest that the treatment with neuroleptics blocks the hyperactivity induced by morphine, since the animals which received U-99194A maleate plus sulpiride (40 mg/kg) before the administration of 20 mg/kg morphine show a level of locomotor activity similar to those of control animals and less than those of morphine-treated animals; moreover, the administration of haloperidol before the administration of 20 and 40 mg/kg morphine produce the same result. Different studies have found that the administration of dopamine antagonists, such as haloperidol or SCH 23390, can produce a blockade of the morphine-induced hyperactivity in mice and rats (Magnus-Ellenbroek and Havemann-Reinecke 1993; Funada et al. 1994; Imperato et al. 1996; Rodriguez-Arias et al, unpublished), supporting the idea that this effect of morphine is mediated by the dopaminergic mesolimbic system (Narita et al. 1993; Spanagel et al. 1993; Bespalov and Zvartau 1996; Pearl et al. 1997).

It is interesting to note that there are differences in the blockade of morphine-induced hyperactivity in function of the neuroleptic used, since the effects of haloperidol are greater than those of sulpiride and U-99194A maleate. The difference between the effects of these drugs could be due to their differential blockade of DA D₂ and DA D₃ receptors. U-99194A is a preferential DA D₃ antagonist (Waters et al. 1993; Haadsma-Svensson et al. 1995) and sulpiride is almost as potent at DA D₃ receptors as at DA D₂ receptors (2–3 times more potent at DA D₂ than at DA D₃). In contrast, haloperidol displays higher affinity for DA D₂ than DA D₃ receptors (10–20 times more potent at DA D₂ than at DA D₃) (Sokoloff et al. 1990). This atypical profile of U-99194A maleate and sulpiride could be responsible for the lack of effects of these drugs on the hyperactivity induced by the high dose of morphine, and probably it would be necessary to employ high doses of these compounds to obtain significant effects.

It is very interesting to note that the administration of 20 mg/kg U-99194A maleate produces stimulant effects on motor activity but reverses the hyperactivity induced by 20 mg/kg morphine. Although it has been shown that U-99194A maleate has a synergistic effect with *d*-amphetamine and *N,N*-dipropyl-2-amino-5,6-dihydroxy-tetralin (DP-5,6-ADTN) inducing hyperactivity in rats (Waters et al. 1993, 1994), results similar to ours have been obtained using other DA D₃ antagonists, such as UH-232, AJ-76 and DS-121. These drugs produce an increase in spontaneous motor activity in rats but block the hyperactivity induced by DA agonists (apomorphine, *d*-amphetamine, cocaine and DP-5,6-ADTN). It has been proposed that these drugs seem to have a normalizing effect on animal behaviour

and produce stimulation or inhibition depending on whether the baseline activity is low or high, respectively: when the animals are habituated to the environment and their activity level is low, DA D₃ antagonists increase activity while when the animals are treated with dopamine agonists and their activity level is high, DA D₃ antagonist decrease activity (Svensson et al. 1986, 1991; 1993 Kling-Petersen and Svensson 1992; Piercey et al. 1992; Kling-Petersen et al. 1994). The behavioural stimulation produced by the DA D₃ antagonists seems to be produced through a preferential antagonism of DA autoreceptors. This antagonism would produce an increased release of DA which, in turn, would produce an activation of postsynaptic receptors and, thus, behavioural stimulation. Moreover, these drugs could antagonize DA postsynaptic receptors (Svensson et al. 1986) and it has been proposed that when the dopaminergic tone is elevated, the properties of the postsynaptic blocker become apparent (Kling-Petersen and Svensson 1992).

Our results support the idea that the DA D₃ receptor, like the D₂ receptor, seems to be both an autoreceptor and a postsynaptic receptor. However, the most important feature is that the predominant role of this receptor seems to be dependent on the dopaminergic baseline level. When the animals are exploring a new environment, this level is low and the autoreceptor antagonism predominates, producing behavioural stimulation. In contrast, when the animals receive morphine, the dopaminergic level increases and the postsynaptic antagonism becomes predominant, producing similar effects to other dopamine antagonists and blocking the morphine-induced hyperactivity. Recent *in vivo* and *in vitro* neurochemical studies suggest a role for the D₃ site as an autoreceptor that modulates dopaminergic activity (Shafer and Levant 1998), but more investigation is necessary to establish the role of this receptor, which may contribute to an improvement in the treatment of mental diseases or addictive behaviour.

Acknowledgements This work was supported by grant PS95-0123 from Dirección General de Enseñanza Superior (DGES), Ministerio Educación y Cultura, Spain.

References

- Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (1995) Efectos del haloperidol y del sulpiride sobre la conducta motora en ratones macho. *Psicológica* 18:429-439
- Aguilar MA, Miñarro J, Simón VM (1998) Dose-dependent impairing effects of morphine on avoidance acquisition and performance in male mice. *Neurobiol Learn Mem* 69:92-105
- Bassareo V, Tanda G, Petromilli P, Giua C, Di Chiara G (1996) Non-psychostimulant drugs of abuse and anxiogenic drugs activate with differential selectivity dopamine transmission in the nucleus accumbens and in the medial prefrontal cortex of the rat. *Psychopharmacology* 124:293-299
- Bespalov AY, Zvartau EE (1996) Intraaccumbens administration of NMDA receptor antagonist (+/-)-CPP prevents locomotor activation conditioned by morphine and amphetamine in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 55:203-207
- Blanchet PJ, Konitsiotis S, Chase TN (1997) Motor response to a dopamine D₃ receptor preferring agonist to apomorphine in levodopa-primed 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 283:794-799
- Conceicao IM, Frussa-Filho R (1996) Effects of microgram doses of haloperidol on open-field behavior in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 53:833-838
- Daly SA, Waddington JL (1993) Behavioural effects of the putative D-3 dopamine receptor agonist 7-OH-DPAT in relation to other "D-2-like" agonist. *Neuropharmacology* 32:509
- Di Chiara G (1995) Psychobiology of the role of DA in drug abuse and addiction. *Psychopharmacology* 124:293-299
- Di Chiara G, Imperato A (1988a) Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine-release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 244:1067-1080
- Di Chiara G, Imperato A (1988b) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5274-5278
- Fink-Jensen A, Nielsen EB, Hansen L, Scheideleer MA (1998) Behavioral and neurochemical effects of the preferential dopamine D₃ receptor agonist cis-8-OH-PBZI. *Eur J Pharmacol* 342:153-161
- Fujiwara H (1992) Comparative studies of sulpiride and classical neuroleptics on induction of catalepsy, locomotor activity, and brain dopamine metabolism in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 41:301-308
- Funada M, Suzuki T, Misawa M (1994) The role of dopamine D₁-receptors in morphine-induced hyperlocomotion in mice. *Neurosci Lett* 169:1-4
- Gleason SD, Shannon HE (1997) Blockade of phencyclidine induced hyperlocomotion by olanzapine, clozapine and serotonin receptor subtype selective antagonists in mice. *Psychopharmacology* 129:79-84
- Gobert A, Rivet JM, Audinot V, Cistarelli L, Spedding M, Vian J, Peglion JL, Millan MJ (1995) Functional correlates of dopamine D₃ receptor activation in the rat *in vivo* and their modulation by the selective antagonist, (+)-S 14297: II. Both D₂ and "silent" D₃ autoreceptors control synthesis and release in mesolimbic, mesocortical and nigrostriatal pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 275:899-913
- Haadisma-Svensson SR, Svensson KA, Waters N, Smith MW, Huff RF, Lin C-H, Carlsson A (1995) Identification of the D₃ preferring antagonist (5,6-dimethoxy-2-(dipropylamino) indan). *J Med Chem*
- Imperato A, Obinu MC, Casu MA, Mascia MS, Carta G, Gessa GL (1996) Chronic morphine increases hippocampal acetylcholine release: possible relevance in drug dependence. *Eur J Pharmacol* 302:21-26
- Khroyan TV, Fuchs RA, Baker DA, Neisewander JL (1997) Effects of D₃ preferring agonists 7-OH-PIPAT and PD-128, 907 on motor behaviors and place conditioning. *Behav Pharmacol* 8:65-74
- Kling-Petersen T, Svensson K (1992) Effects of the preferential dopamine autoreceptor antagonist (+)-AJ76 in the intracranial self-stimulation paradigm. *Pharmacol Biochem Behav* 43:495-501
- Kling-Petersen T, Ljung E, Svensson K (1994) The preferential dopamine autoreceptor antagonist (+)-UH232 antagonizes the positive reinforcing effects of cocaine and *d*-amphetamine in the ICSS paradigm. *Pharmacol Biochem Behav* 49:345-351
- Kling-Petersen T, Ljung E, Svensson K (1995a) Effects on locomotor activity after local application of D₃ preferring compounds in discrete areas of the rat brain. *J Neural Transm [Gen Sect]* 102:209-220

- Kling-Petersen T, Ljung E, Wollter L, Svensson K (1995b) Effects of the dopamine D₃- and autoreceptor preferring antagonist (-)-DS121 on locomotor activity, conditioned place preference and intracranial self-stimulation in the rat. *Behav Pharmacol* 6:107-115
- Kuribara H (1995) Caffeine enhances acute stimulant effect of morphine but inhibits morphine sensitization when assessed by ambulation of mice. *Progr Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 19:313-321
- Levesque D, Diaz J, Pilon C, Martres MP, Giros BSE, Schott D, Morgat JL, Schwartz JC, Sokoloff P (1992) Identification, characterization, and localization of the dopamine D₃ receptor in rat brain using 7-(3H) hydroxy-*N*, *N*-di-*n*-propyl-2-aminotetraline. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8155-8159
- Longoni R, Spina L, Di Chiara G (1987) Dopaminergic D-1 receptors: essential role in morphine-induced hypermotility. *Psychopharmacology* 93:401-402
- Magnus-Ellenbroek B, Havemann-Reineche U (1993) Morphine induced hyperactivity in rats - a rebound effect? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 343:635-642
- Miyamoto Y, Morita M, Nakamura N, Yamanishi T, Kishiora S, Yamamoto H (1993) Effect of naloxone on the morphine concentration in the central nervous system and plasma in rats. *Jpn J Pharmacol* 63:235-240
- Narita M, Suzuki T, Funada M, Misawa M, Nagase H (1993) Involvement of δ -opioid receptors in the effects of morphine on locomotor activity and the mesolimbic system in mice. *Psychopharmacology* 111:423-426
- Pearl SM, Hough LB, Boyd DL, Glick SD (1997) Sex difference in ibogaine antagonism of morphine-induced locomotor activity and in ibogaine brain levels and metabolism. *Pharmacol Biochem Behav* 57:809-815
- Piercey MF, Lum JT, Hoffmann WE, Carlsson A, Ljung E, Svensson K (1992) Antagonism of cocaine's pharmacological effects by the stimulant dopaminergic antagonists, (+)-AJ 76 and (+)-UH 232. *Brain Res* 588:217-222
- Pontieri FD, Tanda G, Di Chiara G (1995) Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:12304-12308
- Sautel F, Griffon N, Sokoloff P, Schwartz JC (1995) Nafadotride, a potent preferential dopamine D-sub-3 receptor antagonist, activates locomotion in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 275:1239-1246
- Sethy VH, Ellerbrock BR, Fici GJ, Wu H (1996) D₂ and D₁ dopaminergic activity of 7-OH-DPAT. *Brain Res* 733:41-45
- Shafer RA, Levant B (1998) The D₃ dopamine receptor in cellular and organismal function. *Psychopharmacology* 135:1-16
- Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC (1990) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D₃) as a target for neuroleptics. *Nature* 347:146-151
- Spanagel R, Almeida OFX, Shippenberg TS (1993) Long lasting changes in morphine-induced mesolimbic dopamine release after chronic morphine exposure. *Synapse* 14:243-245
- Storey VJ, Middlemiss DN, Reavill C (1995) Effect of haloperidol and (-)-sulpiride on dopamine agonist-induced hypoactivity. *Neuropharmacology* 34:449-455
- Svensson K, Johanson AM, Magnusson T, Carlsson A (1986) (+)-AJ76 and (+)-UH 232: central stimulants acting as preferential dopamine autoreceptor antagonists. *Arch Pharmacol* 334:234-245
- Svensson K, Kling-Petersen T, Waters N, Ekman A, Carlsson A (1991) The preferential dopamine autoreceptor antagonist (+)-AJ76 increases motor activity in habituated rats and antagonizes δ -amphetamine-induced hyperactivity. *Posters Neurosci* 1:75-79
- Svensson K, Waters N, Sonesson C, Wikström H, Nichols NF, Carlsson A (1993) (-)-DS 121, a novel dopamine D₃ and autoreceptor preferring antagonist: effects on locomotor activity in the rat. *Soc Neurosci Abstr* 19:80
- Svensson K, Carlsson A, Huff RM, Kling-Petersen T, Waters N (1994a) Behavioral and neurochemical data suggest functional differences between dopamine D₂ and D₃ receptors. *Eur J Pharmacol* 263:235-243
- Svensson K, Carlsson A, Waters N (1994b) Locomotor inhibition by the D₃ ligand R-(+)-7-OH-DPAT is independent of changes in dopamine release. *J Neural Transm [Gen Sect]* 95:71-74
- Waters N, Svensson K, Haadsma-Svensson SR, Smith MW, Carlsson A (1993) The dopamine D₃-receptor: a postsynaptic receptor inhibitory on rat locomotor activity. *J Neural Transm [Gen Sect]* 94:9-11
- Waters N, Lofberg L, Haadsma-Svensson SR, Svensson K, Sonesson C, Carlsson A (1994) Differential effects of dopamine D₂ and D₃ receptor antagonists in regard to dopamine release, in vivo receptor displacement and behaviour. *J Neural Transm [Gen Sect]* 98:39-55
- Yakimowskii AF (1995) Behavior of rats during chronic activation and blockade of the neostriatal opiate system. *Neurosci Behav Physiol* 25:171-177

Research report

Effects of dopamine antagonists with different receptor blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice

Carmen Manzanedo, María A. Aguilar, Marta Rodríguez-Arias, José Miñarro *

Area de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universitat de Valencia, Aptdo. 22109, 46071 Valencia, Spain

Received 21 May 1999; received in revised form 2 January 2001; accepted 3 January 2001

Abstract

The effects of dopamine (DA) antagonists with different selectivity for the DA receptors (SCH 23390, 0.5, 0.25, 0.125 mg/kg; haloperidol, 0.2, 0.1 mg/kg; raclopride, 1.2, 0.6, 0.3 mg/kg; risperidone, 0.4, 0.2, 0.1 mg/kg; U-99194A maleate, 40, 20 mg/kg; clozapine, 2.5, 1.25, 0.625 mg/kg) on the acquisition of place conditioning and morphine-induced conditioned place preference (CPP) were explored in male mice. Morphine (40 mg/kg) produced CPP while SCH 23390, haloperidol and clozapine (highest dose) and risperidone (lowest dose) produced conditioned place aversion (CPA). Raclopride and U-99194A maleate did not produce CPP or CPA. Morphine-induced CPP was reversed by the administration of SCH 23390 and risperidone (all doses), haloperidol (highest dose) and raclopride and clozapine (intermediate and lowest doses). U-99194A maleate did not reverse morphine-induced CPP. These results suggest that the conditioned rewarding effects of morphine are mediated by the different subtypes of DA receptors. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Morphine; SCH 23390; Haloperidol; Raclopride; Risperidone; U-99194A maleate; Clozapine; CPP

1. Introduction

The mesolimbic dopamine (DA) system is a major neural substrate of the rewarding effects produced by morphine [32,68]. It has been shown that the administration of morphine increases the extracellular DA in the nucleus accumbens [3,40,41,63,70] and it is hypothesized that this stimulation of DA transmission plays a crucial role in the liability of abuse of drugs [13–15,68].

Numerous studies indicate that morphine induces a conditioned preference for the place in which it has been administered in rats [37,42,46,51,65–67] and in mice [6,7,11,12,28,58,59,61,62,71]. It is generally agreed that morphine-induced conditioned place preference (CPP) depends critically on the dopamine mesolimbic system since the DA antagonists [2,8,26,35,50,51] or 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens [51,54] can block this effect. However, other authors have reported

opposite effects [37,38] and it has been shown that the dopamine antagonist haloperidol blocks the morphine-induced CPP only in dependent rats [4,5,34]. Moreover, it must be noted that studies examining the role of DA receptors in this effect yield inconsistent results. While DA D₁ receptors appear to play an important role [2,26,50,58,60], the influence of DA D₂ receptors is not so clear, since DA D₂ antagonists block morphine-induced CPP in some studies [26,57], but are without effect in others [27,50]. However, a total suppression of morphine-induced CPP in mice with a genetic disruption of the DA D₂ receptors has been reported recently, suggesting that these receptors play a crucial role in the rewarding effects of morphine [28]. The influence of DA D₃ receptors has been only partially addressed [46] and the functional relevance of DA D₄ receptors in the rewarding effects of morphine remains to be studied.

In this experiment, we have studied the effects on the acquisition of place conditioning, in male mice, of morphine and six DA antagonists with different biochemical profiles: SCH 23390, which preferentially acts

* Corresponding author. Tel.: +34-96-3864420 ext 6293; fax: +34-96-3864668.

E-mail address: jose.minarro@uv.es (J. Miñarro).

at DA D₁ receptors, haloperidol (at DA D₁ and D₂ receptors), raclopride (preferentially at DA D₂ receptors), risperidone (at DA D₂ and 5-HT₂ receptors), U99194-A maleate (preferentially at DA D₃ receptors) and clozapine (preferentially at DA D₄ receptors). Moreover, the effects of these neuroleptics on the acquisition of morphine-induced CPP were studied. It is assumed that the conditioned place paradigm offers a simple method of assessing the conditioned reward induced by different stimuli. In this paradigm a previously neutral set of environmental stimuli (CS) acquire secondary motivational properties, a positive valence or salience, in the course of conditioning through the pairing with the rewarding effects of the drug (UCS). The purpose of the present work was to examine the role of the main subtypes of DA receptors in the reinforcing properties of morphine.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Albino male mice (33) of the OF1 strain acquired commercially in CRIFFA (Barcelona, Spain) were used, although only 280 completed the study. The animals arrived at the laboratory at 42 days of age and were housed in groups of five, in plastic cages (25 × 25 cm), for an adaptation time of 15 days, under the following conditions: constant temperature (21 ± 2°C), a reversed light schedule (white lights on: 19:30–07:30 h), and food and water available ad libitum, except during behavioral tests. Procedures involving mice and their care were conducted in conformity with national, regional and local laws and regulations, which are in accordance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC, 24 November 1986).

2.2. Apparatus

Four identical plexiglas boxes with two equal size compartments (30.7 cm long × 31.5 cm wide × 34.5 cm high) separated by a gray central area (13.8 cm long × 31.5 cm wide × 34.5 cm high) were used. The compartments had different colored walls (black vs white) and also distinct floor textures (fine grid in the white compartment and wide grid in the black one).

2.3. Drugs

Animals were injected IP with morphine (Laboratorios Alcaliber, Toledo, Spain), SCH 23390 (Research Biochemical International, Natick, USA), haloperidol (Laboratorios Sintex Latino S.A, Madrid, Spain), raclopride tartrate (Astra Laboratory, Södertälje, Sweden), risperidone (Janssen, Madrid, Spain), U-99194A

maleate (Research Biochemical International, Natick, USA) and clozapine (Sandoz Pharma, S.A.E., Valencia, Spain). All compounds were injected in a volume of 0.01 ml/g and dissolved in physiological saline (NaCl 0.9%), with the exception of risperidone and clozapine which were dissolved in a solution of 98.5 ml physiological saline (NaCl 0.9%) plus 1.5 ml tartaric acid (100 mg/10 ml saline). A group of control animals were injected with this vehicle and another control group with physiological saline (NaCl 0.9%).

2.4. Procedure

The experiment, consisting of three phases, was carried out following an unbiased procedure. During the first phase (pre-conditioning), mice were given access to both compartments of the apparatus for 15 min (900 s) each day for 2 days. On day 3, the time spent by the animal in each compartment was recorded for 900 s. Animals showing strong unconditioned aversion (less than 33% of the session time, i.e., 300 s) or preference (more than 67%, i.e., 600 s) for any compartment were discarded. One compartment was chosen to be paired with drug and the other with vehicle, taking into account that in each group, half the animals received the treatment in the most preferred compartment and the other half in the least preferred. After assigning the between compartments, there were no significant differences between time spent in the drug-paired and the vehicle-paired compartments during the preconditioning phase. This is an important step in the experimental procedure that avoids any preference bias before conditioning.

In the second phase (conditioning), which had a duration of 4 days, animals received an injection of physiological saline before being confined to the vehicle-paired compartment for 1 h, and after an interval of 4 h, received the drugs immediately before confinement in the drug-paired compartment for 1 h.

During the third phase (post-conditioning), on day 8 the guillotine door separating the two compartments was removed and the time spent by the untreated mice in each compartment was recorded during 900 s of observation. The time spent in the central area in pre- and post-conditioning sessions was proportionally divided between both conditioning compartments by means of the application of a factor of correction, which resulted from the division of the total time (900 s) between the sum of the time spent in each conditioning compartment (factor of correction = 900/time spent in drug-paired + time spent in vehicle paired compartment). Afterwards, the time spent in each compartment was multiplied by this factor of correction. The application of this corrector makes it possible to take into account the time spent in the central area and facilitates the statistical analysis of the data and the representation of the results. Since the time spent in drug-paired

plus vehicle-paired compartments always add up to the total time of the test (900 s), it is sufficient to work with the time spent in just one compartment.

The difference in seconds between the time spent in the drug-paired compartment in the post-conditioning test and that spent there in the pre-conditioning one is a measure of the degree of conditioning induced by the drug. If this difference is positive then the drug has induced a preference for the drug paired compartment, while the opposite indicates the induction of an aversion. To evaluate the effects of dopamine antagonists on the acquisition of place conditioning and on morphine-induced CPP, animals were divided into 35 groups ($n = 8$) according to the treatment received during the conditioning phase: saline + saline; saline + SCH 23390 0.5, 0.25 or 0.125 mg/kg; saline + haloperidol 0.2 or 0.1 mg/kg; saline + raclopride 1.2, 0.6 or 0.3 mg/kg; saline + saline with tartaric acid; saline + risperidone 0.4, 0.2 or 0.1 mg/kg; sa-

line + U-99194A maleate 20 or 40 mg/kg; saline + clozapine 2.5, 1.25 or 0.625 mg/kg; morphine 40 mg/kg + saline; morphine + SCH 23390 0.5, 0.25 or 0.125 mg/kg; morphine + haloperidol 0.2 or 0.1 mg/kg; morphine + raclopride 1.2, 0.6 or 0.3 mg/kg; morphine + risperidone 0.4, 0.2 or 0.1 mg/kg; morphine + U-99194A maleate 40 or 20 mg/kg; morphine + clozapine 2.5, 1.25 or 0.625 mg/kg.

2.5. Statistical treatment

Data of the time spent in the drug-paired compartment were analyzed with a mixed analysis of variance (ANOVA) with a variable between treatment with 35 levels (groups of treatment) and a variable within days with two levels (pre and post-conditioning). To make post-hoc comparisons Newman-Keuls and Simple Effects tests were used.

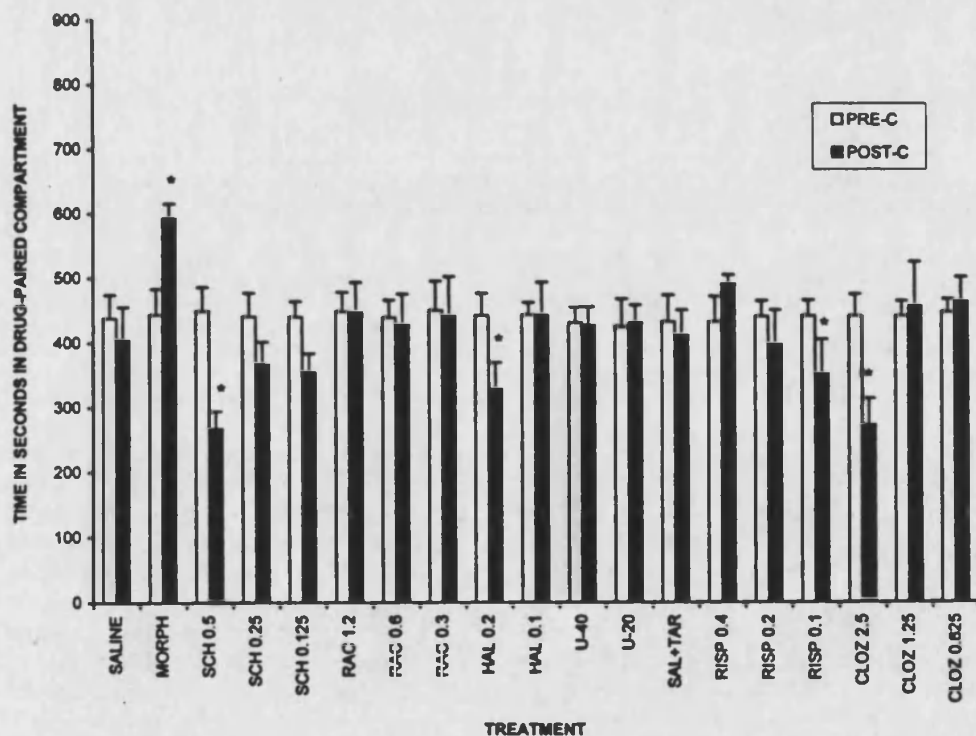


Fig. 1. Effects of morphine and DA antagonists on place conditioning. During the phase of conditioning, animals were divided into the following treatment groups: SALINE, saline plus saline; MORPH, saline plus morphine 40 mg/kg; SCH 0.5, SCH 23390 0.5 mg/kg plus saline; SCH 0.25, SCH 23390 0.25 mg/kg plus saline; SCH 0.125, SCH 23390 0.125 mg/kg plus saline; RAC 1.2, raclopride 1.2 mg/kg plus saline; RAC 0.6, raclopride 0.6 mg/kg plus saline; RAC 0.3, raclopride 0.3 mg/kg plus saline; HAL 0.2, haloperidol 0.2 mg/kg plus saline; HAL 0.1, haloperidol 0.1 mg/kg plus saline; U-40, U-99194A maleate 40 mg/kg plus saline; U-20, U-99194A maleate 20 mg/kg plus saline; SAL + TAR, saline with tartaric acid plus saline; RISP 0.4, risperidone 0.4 mg/kg plus saline; RISP 0.2, risperidone 0.2 mg/kg plus saline; RISP 0.1, risperidone 0.1 mg/kg plus saline; CLOZ 2.5, clozapine 2.5 mg/kg plus saline; CLOZ 1.25, clozapine 1.25 mg/kg plus saline; CLOZ 0.625, clozapine 0.625 mg/kg plus saline. The bars represent the time in seconds spent in the drug-paired compartment before conditioning sessions in pre-conditioning test (white bars) and after conditioning sessions in post-conditioning test (black bars). * $P < 0.01$, significant difference in the time spent in the drug-paired compartment in pre-conditioning vs post-conditioning tests.

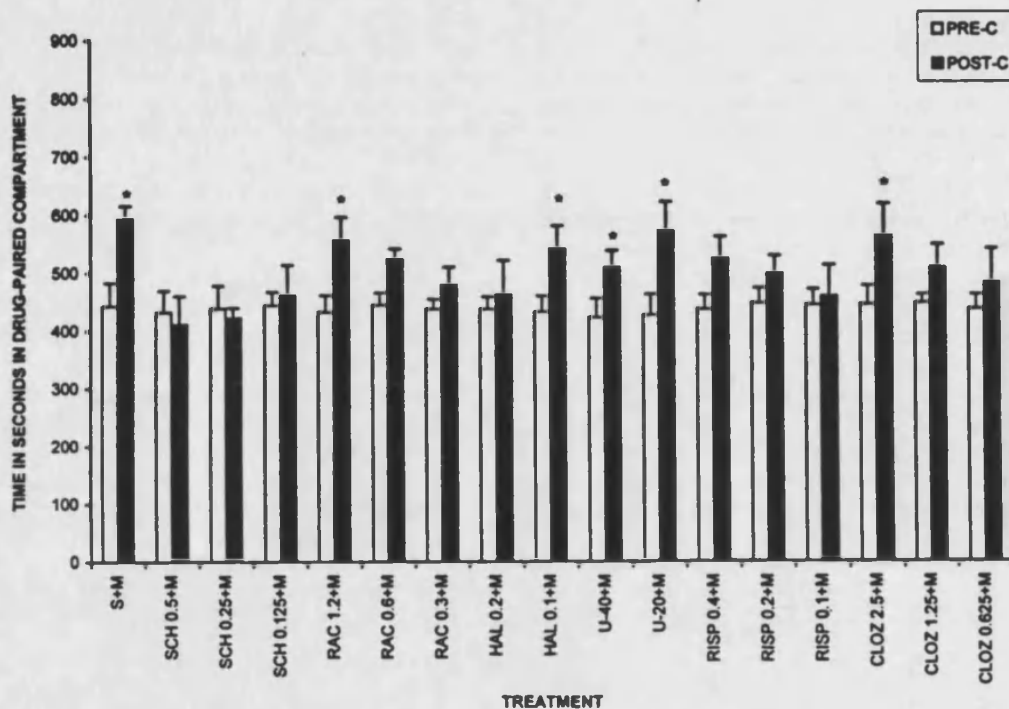


Fig. 2. Effects of DA antagonists on morphine-induced CPP. During the phase of conditioning, animals were divided into the following treatment groups: S + M, saline plus morphine 40 mg/kg; SCH 0.5 + M, SCH 23390 0.5 mg/kg plus morphine 40 mg/kg; SCH 0.25 + M, SCH 23390 0.25 mg/kg plus morphine 40 mg/kg; SCH 0.125 + M, SCH 23390 0.125 mg/kg plus morphine 40 mg/kg; RAC 1.2 + M, raclopride 1.2 mg/kg plus morphine 40 mg/kg; RAC 0.6 + M, raclopride 0.6 mg/kg plus morphine 40 mg/kg; RAC 0.3 + M, raclopride 0.3 mg/kg plus morphine 40 mg/kg; HAL 0.2 + M, haloperidol 0.2 mg/kg plus morphine 40 mg/kg; HAL 0.1 + M, haloperidol 0.1 mg/kg plus morphine 40 mg/kg; U-40 + M, U-99194A maleate 40 mg/kg plus morphine 40 mg/kg; U-20 + M, U-99194A maleate 20 mg/kg plus morphine 40 mg/kg; RISP 0.4 + M, risperidone 0.4 mg/kg plus morphine 40 mg/kg; RISP 0.2 + M, risperidone 0.2 mg/kg plus morphine 40 mg/kg; RISP 0.1 + M, risperidone 0.1 mg/kg plus morphine 40 mg/kg; CLOZ 2.5 + M, clozapine 2.5 mg/kg plus morphine 40 mg/kg; CLOZ 1.25 + M, clozapine 1.25 mg/kg plus morphine 40 mg/kg; CLOZ 0.625 + M, clozapine 0.625 mg/kg plus morphine 40 mg/kg. The bars represent the time in seconds spent in the drug-paired compartment before conditioning sessions in pre-conditioning test (white bars) and after conditioning sessions in post-conditioning test (black bars). * $P < 0.01$, significant difference in the time spent in the drug-paired compartment in pre-conditioning vs post-conditioning tests.

3. Results

The results obtained are shown in Figs. 1 and 2. The ANOVA revealed that the variable Treatment [$F(34,245) = 1.911$; $P < 0.0028$] and the Interaction Treatment \times Days [$F(34,245) = 3.025$; $P < 0.0001$] were significant. The variable Days was not significant [$F(1,245) = 2.025$; $P < 0.1560$]. Post-hoc comparisons indicated that the effect of Treatment was significant in the post-conditioning phase ($P < 0.001$) but not in the pre-conditioning one ($P < 1$). The effect of Days was significant in the animals treated with saline + 0.5 mg/kg SCH 23390 ($P < 0.001$), saline + 0.2 mg/kg haloperidol ($P < 0.014$), saline + 0.1 mg/kg risperidone ($P < 0.05$) and saline + 2.5 mg/kg clozapine ($P < 0.001$), which spent less time in the drug-paired compartment in post-conditioning in comparison to pre-conditioning days (see Fig. 1). There was no significant difference between the time spent in this compartment in pre- and post-conditioning days in the animals treated with sa-

line + saline, saline + saline with tartaric acid, saline + 0.25 and 0.125 mg/kg SCH 23390, saline + 0.1 mg/kg haloperidol, saline + 1.2, 0.6 and 0.3 mg/kg raclopride, saline + 0.4 and 0.2 mg/kg risperidone, saline + 40 and 20 mg/kg U-99194A maleate, and saline + 1.25 and 0.625 mg/kg clozapine.

In contrast, the effect of Days was also significant in the animals treated with Morphine + Saline ($P < 0.001$), Morphine + 0.1 mg/kg haloperidol ($P < 0.02$), Morphine + 1.2 mg/kg raclopride ($P < 0.008$), Morphine + 40 mg/kg U-99194A maleate ($P < 0.05$), Morphine + 20 mg/kg U-99194A maleate ($P < 0.002$) and Morphine + 2.5 mg/kg clozapine ($P < 0.011$), which spent more time in drug-paired compartment in post-conditioning in comparison to pre-conditioning days (see Fig. 2). There was no significant difference between the time spent in this compartment in pre- and post-conditioning days in the animals treated with Morphine + 0.5, 0.25 and 0.125 mg/kg SCH 23390, Morphine + 0.2 mg/kg haloperidol, Morphine + 0.6

and 0.3 mg/kg raclopride, Morphine + 0.4, 0.2 and 0.1 mg/kg risperidone, Morphine + 1.25 and 0.625 clozapine (P s values < 1).

4. Discussion

Our results have shown that, as expected, morphine induces a CPP for the drug-associated place in male mice. However, some dopamine antagonists acting preferentially at DA D_1 , D_1 - D_2 , D_4 and D_2 -5HT₂ receptors, such as SCH 23390, haloperidol and clozapine (at the highest dose) and risperidone (at the lowest dose), produce conditioned place aversion (CPA). Other DA antagonists which act preferentially at DA D_2 or D_3 receptors, such as raclopride and U-99194A maleate, have no effect on place conditioning at the doses tested in this study. We have also observed that all DA antagonists, with the exception of U-99194A maleate, block morphine-induced CPP: SCH 23390 and risperidone at all doses, haloperidol at the highest dose, and raclopride and clozapine at the intermediate and lowest doses. These results suggest that the different subtypes of DA receptors have an essential role in the rewarding effects of morphine in place conditioning.

It is assumed that the place conditioning paradigm reflects the secondary motivational properties of drugs and their liability of abuse [13–15,67]. In agreement with this hypothesis, some DA antagonists produce CPA, while the administration of 40 mg/kg morphine causes CPP, an effect that has been repeatedly reported in mice [6,7,11,12,28,59,61,62,71].

Firstly, our results suggest that the effects of DA antagonists on place conditioning depend on their different selectivity for DA receptors. The blockade of DA D_1 and D_4 receptors seems to have aversive motivational properties, but not the blockade of DA D_2 and D_3 receptors. It is also possible that the blockade of 5-HT₂ receptors contributes to the aversive effects.

The administration of SCH 23390 (that preferentially blocks the DA D_1 receptors) has aversive effects at the highest dose (0.5 mg/kg). Previous studies on the effects of this drug have shown that it can induce CPA [1,10,19,49,50,52] or have no effect [1,2,20,26,39]. The same as with SCH 23390, the highest dose of haloperidol (0.2 mg/kg) induces CPA. This result has been previously reported by Risinger et al. [43] although other studies have observed no effects [21,69]. An explanation for the CPA induced by the highest dose and for the lack of effect of the lowest dose, could be focussed on the blockade of different DA receptors: the highest dose could affect DA D_1 receptors while the lowest dose could more selectively block DA D_2 receptors.

In this way, the preferential blockade of DA D_2 receptors seems to have no motivational effects, since

the administration of raclopride (1.2, 0.6 and 0.3 mg/kg) does not produce CPA or CPP. In accordance with these results, in previous studies no effect on place conditioning is observed for DA antagonists which preferentially act at DA D_2 receptors [21,55,57,69]. However, the addition of 5-HT₂ blockade could modulate the motivational properties of DA antagonists, since the lowest dose of risperidone, which preferentially acts at D_2 /5HT₂ receptors, induces CPA. Although a lack of effects of this drug on place conditioning has been previously reported in rats [21], it has been observed that olanzapine, a DA antagonist with a similar neurochemical profile to risperidone, can produce CPA [33], as can the 5HT₂ antagonist mianserin [44]. The lack of aversive effects of higher doses of risperidone could be due to the predominant blockade of DA D_2 receptors, which does not produce motivational effects.

The administration of the U-99194A maleate (40 and 20 mg/kg), that preferentially blocks DA D_3 receptors, has no effect on place conditioning. In contrast, in previous studies it has been shown that U-99194A maleate [22] and also other DA D_3 antagonists [23] produce CPP. Several studies indicate that the blockade of DA D_3 receptors has the opposite effect to the blockade of other DA receptors, suggesting that they have a predominantly inhibitory influence on motor and reward mechanisms [30,46]. The lack of motivational effects of U-99194A maleate in our study could be due to the doses or species used. It is possible that the doses of 40 and 20 mg/kg produce, in mice, a concomitant blockade of DA D_2 receptors. However, in a previous study it has been shown that the administration of 20 mg/kg in this strain of mice produces behavioural effects related to the preferential blockade of DA D_3 receptors [30].

The administration of clozapine that preferentially produces a blockade of DA D_4 receptors [48], induces CPA at the highest dose (2.5 mg/kg). This result is interesting as this effect on place conditioning has not been observed for clozapine in other studies [21,24,64] and suggests a possible role of DA D_4 receptors in motivation. Another possible explanation for the aversive effects of the highest dose of clozapine could be the blockade of other receptors, such as DA D_1 or non-DA receptors.

The functional relevance of DA D_4 receptors on the motivational processes still needs to be clarified when new, recently developed, D_4 -selective compounds [9,18,25,29,47] are used. To date, the effects of the new selective DA D_4 drugs have been exclusively tested in paradigms generally used to predict antipsychotic potential or the liability of side effects. L-745,870 does not attenuate amphetamine-induced hyperactivity and apomorphine-induced stereotypy, does not impair conditioned avoidance responding and also fails to produce

catalepsy [9]. However, this drug reverses apomorphine-induced blockade of prepulse inhibition, as do CP-293, 019 and U-101, 387, other new D_4 antagonists [29]. DA D_4 receptors also seem to play an important role in the induction of behavioural sensitisation to amphetamine because the administration of the highly selective DA D_4 antagonist PNU-101387G with amphetamine during a pretreatment blocks the sensitised response to an acute amphetamine challenge [18].

Secondly, the DA antagonists tested in the present study also differ in their effects on morphine-induced CPP although, in general, the blockade of the main DA receptors, with the exception of the inhibitory DA D_3 receptors, reverse the rewarding properties of morphine.

The blockade of DA D_1 receptors with the administration of SCH 23390 (0.5, 0.25 and 0.125 mg/kg) counteract morphine-induced CPP. Since the high dose of SCH 23390 produces CPA it is not possible to know if the elimination of the morphine-induced CPP is due to the blockade of the rewarding effect of morphine or to an aversive effect produced by an action on some unrelated substrate that competes with morphine's rewarding action. However, the fact that the intermediate and lowest doses, which by themselves do not produce CPA, also block morphine-induced CPP favours the hypothesis that the DA D_1 receptor blockade specifically impairs the rewarding effects of morphine. These results are in agreement with previous studies [1,2,26,51,52,57,58], showing the essential role of DA D_1 receptors in the rewarding properties of morphine. Haloperidol prevents morphine-induced CPP in a non specific way since it only produces this effect with the highest, aversive, dose (0.2 mg/kg). Previous studies on the effects of haloperidol on morphine-induced CPP have shown controversial results: Mackey and van der Kooy [27] observed no effects while Leone and Di Chiara [26] found a blockade of morphine-induced CPP. According to the results obtained in the present experiment, these discrepancies could be due to the different doses of haloperidol used in the studies. It is possible that haloperidol only blocks morphine-induced CPP at high doses acting on DA D_1 receptors but not at lower doses, acting at DA D_2 receptors. However, unlike the lack of motivational effects of DA D_2 antagonists, we have observed that these drugs can also block morphine-induced CPP.

The administration of raclopride (0.6 and 0.3 mg/kg) specifically blocks morphine-induced CPP. Although these effects have not been previously studied, it has been shown that other DA D_2 antagonists, such as α -flupenthixol, sulpiride or spiperone, fail to affect morphine-induced CPP [27,50]. For this reason, it has been assumed that DA D_2 receptors play a less important role in rewarding effects of morphine or other drugs. In contrast, more recently it has been observed that raclo-

pride can block amphetamine- and ethanol-induced CPP [21,31]. These results and those obtained in the present study support the hypothesis that DA D_2 receptors could be as important as DA D_1 receptors in reward. An unexpected result is that obtained with the highest dose of raclopride, which unlike the lower doses, does not block morphine-induced CPP. We suggest two possible explanations: firstly, it may be that as 1.2 mg/kg of raclopride is a high dose, it affects multiple receptors causing different behavioral effects; secondly, perhaps the strong blockade of DA D_2 receptors induced by this dose produces a compensatory increase in the rewarding effects of morphine. It is important to keep in mind that rewarding effects of opiates are increased in rats during chronic exposure to different neuroleptics and following lesions of mesolimbic DA neurons [56].

The administration of any of the doses of risperidone blocks morphine-induced CPP, this effect being specific with the intermediate and highest doses. No studies have evaluated the effects of this drug on morphine-induced CPP, although it has been observed that it blocks amphetamine-induced CPP [21]. The decrease in the rewarding effect of morphine observed in our study could be due to the blockade of DA D_2 receptors although the concomitant blockade of 5-HT₂ receptors could also contribute positively to this effect. In this way, it has been observed that morphine-induced CPP is attenuated by the 5-HT₂ antagonist ritanserin [36].

The blockade of DA D_3 receptors with the administration of 40 and 20 mg/kg of U-99194A maleate does not impair morphine-induced CPP. Studies on these effects have not been previously performed, but it has been observed that 7-OHDPAT, an agonist of DA D_3 receptors, blocks morphine-induced CPP [46]. These results support the idea that the DA D_3 receptors have an inhibitory role on rewarding processes and suggest that DA D_3 receptors are also involved in the rewarding effects of morphine.

With respect to the blockade of DA D_4 receptors, we have observed that the lowest and intermediate doses of clozapine selectively block morphine-induced CPP. Although no studies have previously evaluated these effects it has been observed that this drug effectively reduces cocaine- and amphetamine-induced CPP [21,24]. These results suggest that the rewarding effects of different drugs of abuse are mediated by similar receptor mechanisms and that the rewarding effect of morphine also seems to be dependent on DA D_4 receptors. As with raclopride, the highest dose has no effect on morphine-induced CPP, an unexpected result if it is considered that this dose of clozapine itself produces aversive effects. Again, it could be explained by the above mentioned hypotheses to account for the lack of effects of the highest dose of raclopride, i.e. actuation at multiple receptors or the increase of rewarding ef-

ffects of morphine. Unlike raclopride, clozapine is characterized by producing a blockade of a large number of DA and non-DA (muscarinic, adrenergic and histaminergic) receptors. The effects of clozapine on the histaminergic system could contribute to explaining why the highest dose has no effects. It has been observed that the histamine precursor L-histidine attenuates morphine-induced CPP, while the histidine decarboxylase inhibitor α -fluoromethylhistidine and the H₂ antagonist zolantidine increase morphine-induced CPP, an effect that was antagonized by SCH 23390 [60].

Other explanations for the effects of DA antagonists on morphine-induced CPP could be focused on the lack of specificity of these drugs since they could affect multiple processes (reward, motivation, learning, memory, discrimination, locomotion, etc). Firstly, Acquas et al. [2] have suggested that DA antagonists produce not only a blockade of reward but also cause a lack of motivation (apathy). In support of this hypothesis it has been shown that SCH 23390 and haloperidol also block place aversion induced by different drugs [2,17]. Secondly, other authors have suggested that DA antagonists could impair the associative learning necessary for the acquisition of place conditioning. Drug addiction could be considered as a disorder of associative learning dependent on DA [15] and the fact that the CPP induced by morphine is blocked by DA antagonists suggests that these drugs could interfere with the establishment of opiate addiction.

Opiates act at two different central reward systems, DA and opioid [16]. The stimulation of the opioid reward system could be responsible for the hedonic and consummatory properties of opiates, while the activation of the central DA reward system, which produces arousal and locomotion (approach behaviour) and facilitates the acquisition of secondary incentives (incentive learning), could have a role in the development of compulsive drug-seeking behaviour and dependence on opiates and other drugs of abuse. Moreover, neuroadaptive changes in midbrain DA neurons after chronic drug-administration might be involved in the generation of deficit states that enhance vulnerability to drug craving and relapse [53]. The results observed in the present study support the idea that the DA system plays a critical role in the incentive aspect of opiate reward since when DA receptors are blocked, morphine-induced place preference (which depends on the incentive aspect of opiate reward) is dramatically reduced. As predicted by the hypothesis of Di Chiara [15], an impairment in the ability of the drug to activate DA transmission in the nucleus accumbens 'shell' could impair the acquisition and maintenance of an excessive control over behaviour by drug-related stimuli.

On the other hand, it is also interesting to compare the effects of DA antagonists on morphine-induced hyperactivity and place preference. In previous works, using the

same strain of mice, we have evaluated the effects of the DA antagonists tested in the present experiment on morphine-induced hyperactivity. It has been observed that SCH 23390 blocks this hyperactivity at the highest dose (0.5 mg/kg) but not at lower doses (0.1 and 0.05 mg/kg), it being a non specific effect since the dose which reverses hyperactivity produces a decrease in spontaneous motor activity [45]. Since in the present study all doses of SCH 23390 reverse morphine-induced CPP, the blockade of DA D₁ receptors seems more effective in blocking the rewarding than motor effects of morphine. Haloperidol specifically blocks morphine-induced hyperactivity [30] at the lower dose (0.1 mg/kg) but has no effects on morphine-induced CPP, thus, this drug is more effective in the blockade of motor effects of morphine. Raclopride also antagonizes the motor effects of morphine with doses between 0.125 and 0.5 mg/kg but this effect is non specific since, although these doses do not produce effects on spontaneous motor activity, the administration of morphine plus raclopride produces catalepsy [45]. In contrast, risperidone specifically blocks morphine-induced hyperactivity at 0.05 and 0.1 mg/kg, but not at the lowest dose of 0.025 mg/kg [45]. With respect to the comparison with the doses which reverse morphine-induced CPP, it seems that the blockade of DA D₂ receptors has a similar efficacy in mediating the motor and rewarding effects of morphine. Unlike the DA D₁ and D₂ receptors, the blockade of DA D₃ receptors seems to have different effects on morphine-induced hyperactivity and CPP. Manzanedo et al. [30] observed that 20 mg/kg of U-99194A maleate produces an increase in motor activity, a result consistent with the hypothesis that DA D₃ are inhibitory receptors, but blocks morphine-induced hyperactivity. In contrast, in this study we have observed that the blockade of DA D₃ receptors does not reverse morphine-induced CPP. These results suggest that the rewarding and motor effects can be mediated, at least partially, by different mechanisms and that the blockade of DA D₃ receptors is more effective in reversing motor than rewarding effects of morphine. Finally, with respect to the blockade of DA D₄ receptors it is difficult to make comparisons between their role in motor and rewarding effects of morphine since the doses of clozapine used to reverse morphine-induced hyperactivity and CPP are very different. We have observed that 0.4 and 0.2 mg/kg of clozapine do not produce effects on morphine-induced hyperactivity (unpublished results) while higher doses (0.625 and 1.25 mg/kg) block morphine-induced CPP. In future studies it could be interesting to evaluate the effects of higher doses of clozapine on morphine-induced hyperactivity in order to clarify the role of DA D₄ receptors in the motor effects of morphine.

In summary, the present study suggests a critical role for the main subtypes of DA receptors in the incentive aspect of opiate reward. Although the DA D₃ antagonist does not produce effects, probably due to the inhibitory role of these receptors, the blockade of mor-

phine-induced CPP by DA D₃ agonists supports the idea that DA D₃ receptors have an important role in the mediation of the rewarding effects of morphine. Moreover, our results support the notion that the DA D₂ and D₄ antagonists are as effective in blocking the rewarding effects of morphine as DA D₁ antagonists and thus, the activation of different subtypes of DA receptors could be essential for the development of addiction to opiates.

Acknowledgements

This work was supported by grant PB98-1497 from Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica, Ministerio de Educación y Cultura, Spain. We would also like to thank Astra, Janssen and Sandoz Laboratories for their kind gift of raclopride, risperidone and clozapine.

References

- [1] Acquas E, Di Chiara G. D1 receptor blockade stereo-specifically impairs the acquisition of drug-conditioned place preference and place aversion. *Behav Pharmacol* 1994;5:555–69.
- [2] Acquas E, Carboni E, Leone P, Di Chiara G. SCH 23390 blocks drug-conditioned place-preference and place aversion: anhedonia (lack of reward) or apathy (lack of motivation) after dopamine receptor blockade? *Psychopharmacology* 1989;99:151–5.
- [3] Bassareo V, Tanda G, Petromilli P, Giva G, Di Chiara G. Non-psychostimulant drugs of abuse and anxiogenic drugs activate with differential selectivity dopamine transmission in the nucleus accumbens and in the medial prefrontal cortex of the rat. *Psychopharmacology* 1996;124:293–9.
- [4] Bechara A, van der Kooy D. A single brain stem substrate mediates the motivational effects of both opiates and food in nondeprived rats but not in deprived rats. *Behav Neurosci* 1992;106:351–63.
- [5] Bechara A, Harrington F, Nader K, van der Kooy D. Neurobiology of motivation: Double dissociation of two motivational mechanisms mediating opiate reward in drug-naïve versus drug-dependent animals. *Behav Neurosci* 1992;106:798–807.
- [6] Belzung C, Barreau S. Differences in drug-induced place conditioning between BALB/c and C57B1/6 mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;65:419–23.
- [7] Bepalov AY, Tokarz ME, Bowen SE, Balster RL, Beardsley PM. Effects of test conditions on the outcome of place conditioning with morphine and naltrexone in mice. *Psychopharmacology* 1999;141:118–22.
- [8] Bozarth MA, Wise RA. Heroin reward is dependent on a dopaminergic substrate. *Life Sci* 1981;29:1881–6.
- [9] Bristow LJ, Collinson N, Cook GP, Curtis N, Freedman SB, Kulagowski JJ, Leeson PD, Patel S, Ragan CI, Ridgill M, Saywell KL, Tricklebank MD. L-745,870, a subtype selective dopamine D4 receptor antagonist, does not exhibit a neuroleptic-like profile in rodent behavioral tests. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283:1256–63.
- [10] Cervo L, Samanin R. Effects of dopaminergic and glutamatergic antagonists on the acquisition and expression of cocaine conditioning place preference. *Brain Res* 1995;673:242–50.
- [11] Couderau JP, Debray M, Monier C, Bourre JM, Frances H. Isolation impairs place preference conditioning to morphine but not aversive learning in mice. *Psychopharmacology* 1997;130:117–23.
- [12] Del Pozo E, Barrios M, Baeyens JM. The NMDA receptor antagonist dizocilpine (MK-801) stereoselectively inhibits morphine-induced place preference conditioning in mice. *Psychopharmacology* 1996;125:209–13.
- [13] Di Chiara G. Psychobiology of the role of DA in drug abuse and addiction. *Psychopharmacology* 1995;124:293–9.
- [14] Di Chiara G. A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. *J Psychopharmacol* 1998;12:54–67.
- [15] Di Chiara G. Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *Eur J Pharmacol* 1999;375:13–30.
- [16] Di Chiara G, North RA. Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13:185–93.
- [17] Di Scala G, Sandner G. Conditioned place aversion produced by FG 7142 is attenuated by haloperidol. *Psychopharmacology* 1989;99:176–80.
- [18] Feldpausch DL, Needham LM, Stone MP, Althaus JS, Yakamoto BK, Svensson KA, Merchant KM. The role of dopamine D4 receptor in the induction of behavioral sensitization to amphetamine and accompanying biochemical and molecular adaptations. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;286:497–508.
- [19] Funada M, Shippenberg TS. Differential involvement of D1 and D2 dopamine receptors in the expression of morphine withdrawal in the rat. *Behav Pharmacol* 1996;7:448–53.
- [20] Hoffman DC, Beninger RJ. The effects of selective dopamine D1 or D2 receptor antagonists on the establishment of agonist-induced place conditioning in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1989;33:273–9.
- [21] Hoffman DC, Donovan H. Effects of typical, atypical, and novel antipsychotic drugs on amphetamine-induced place conditioning in rats. *Drug Dev Res* 1995;36:193–8.
- [22] Kling-Petersen T, Ljung E, Wolter L, Svensson K. Effects of dopamine D3 preferring compounds on conditioned place preference and intracranial self-stimulation in the rat. *J Neural Transm (Gen Sect)* 1995;101:27–39.
- [23] Kling-Petersen T, Ljung E, Wolter L, Svensson K. Effects of the dopamine D3- and autoreceptor-preferring antagonist (–)-DS121 on locomotor activity, conditioned place preference and intracranial self-stimulation in the rat. *Behav Pharmacology* 1995;6:107–15.
- [24] Kosten TA, Nestler EJ. Clozapine attenuates cocaine conditioned place preference. *Life Sci* 1994;55:9–14.
- [25] Kula NS, Baldessarini RJ, Keabian JW, Bakthavachalam V, Xu L. RBI-257: a highly potent dopamine D4 receptor-selective ligand. *Eur J Pharmacol* 1997;331:333–6.
- [26] Leone P, Di Chiara G. Blockade of D-1 receptors by SCH23390 antagonizes morphine- and amphetamine-induced place preference conditioning. *Eur J Pharmacol* 1987;135:251–4.
- [27] Mackey WB, van der Kooy D. Neuroleptics block the positive reinforcing effects of amphetamine but not of morphine as measured by place conditioning. *Pharmacol Biochem Behav* 1985;22:101–5.
- [28] Maldonado R, Salardi A, Valverde O, Samad TA, Roques BP, Borrelli E. Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 1997;388:586–9.
- [29] Mansbach RS, Brooks EW, Sanner MA, Zorn SH. Selective dopamine D4 receptor antagonists reverse apomorphine-induced blockade of prepulse inhibition. *Psychopharmacology* 1998;135:194–200.
- [30] Manzanedo C, Aguilar MA, Miñarro J. The effects of dopamine D₂ and D₃ antagonists on spontaneous motor activity and morphine-induced hyperactivity in male mice. *Psychopharmacology* 1999;143:82–8.
- [31] Matsuzawa S, Suzuki T, Misawa M, Nagase H. Involvement of dopamine D(1) and D(2) receptors in the ethanol-associated place preference in rats exposed to conditioned fear stress. *Brain Res* 1999;835:298–305.

- [32] McBride WJ, Murphy JM, Ikemoto S. Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behav Brain Res* 1999;101:129–52.
- [33] Meil WM, Schechter MD. Olanzapine attenuates the reinforcing effects of cocaine. *Eur J Pharmacol* 1997;340:17–26.
- [34] Nader K, van der Kooy D. Deprivation state switches the neurobiological substrates mediating opiate reward in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 1997;17:383–90.
- [35] Nader K, Bechara A, Roberts DCS, van der Kooy D. Neuroleptics block high- but not low-dose heroin place preferences: further evidence for a two-system model of motivation. *Behav Neurosci* 1994;108:1128–38.
- [36] Nomikos GG, Spyraiki C. Effects of ritanserin on the rewarding properties of d-amphetamine, morphine and diazepam revealed by conditioned place preference in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1988;30:853–8.
- [37] Olmstead MC, Franklin BJ. Differential effects of ventral striatal lesions on the conditioned place preference induced by morphine or amphetamine. *Neuroscience* 1996;71:701–8.
- [38] Olmstead MC, Franklin BJ. The development of a conditioned place preference to morphine: effects of microinjections into various CNS sites. *Behav Neurosci* 1997;6:1324–34.
- [39] Planeta da Silva C, Aizenstein ML, De Lucia R. Reinforcing properties of fencamphamine: involvement of dopamine and opioid receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 1995;50:35–40.
- [40] Piepponen TP, Honkanen A, Kivastik T, Zharkowsky A, Turtia A, Mikkola JAV, Ahtee L. Involvement of opioid m1-receptors in opioid-induced acceleration of striatal and limbic dopaminergic transmission. *Pharmacol Biochem Behav* 1999;63:245–52.
- [41] Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G. Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the 'shell' as compared with the 'core' of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:12304–8.
- [42] Popik P, Danysz W. Inhibition of reinforcing effects of morphine and motivational aspects of naloxone-precipitated opioid withdrawal by N-Methyl-D-aspartate receptor antagonist, Memantine. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:854–65.
- [43] Risinger FO, Dickinson SD, Cunningham CL. Haloperidol reduces ethanol-induced motor activity stimulation but not conditioned place preference. *Psychopharmacology* 1992;107:453–6.
- [44] Rocha B, Di Scala G, Rigo M, Hoyer D, Sandner G. Effect of 5,7-dihydroxytryptamine lesion on mianserin induced conditioned place aversion and on 5-hydroxytryptamine 1C receptors in the rat brain. *Neuroscience* 1993;56:687–93.
- [45] Rodriguez-Arias M, Broseta I, Aguilar MA, Miñarro J. Lack of specific effects of selective D1 and D2 dopamine antagonists vs. Risperidone on morphine-induced hyperactivity. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;66:189–97.
- [46] Rodriguez de Fonseca F, Rubio P, Martin-Calderon JL, Caine SB, Koob GF, Navarro M. The dopamine receptor agonist 7-OH-DPAT modulates the acquisition and expression of morphine-induced place preference. *Eur J Pharmacol* 1995;274:47–55.
- [47] Schlachter SK, Poel TJ, Lawson CF, Dinh DM, Lajiness ME, Romero AG, Rees SA, Duncan JN, Smith MW. Substituted 4-aminopiperidines having high in vitro affinity and selectivity for the cloned human dopamine D4 receptor. *Eur J Pharmacol* 1997;322:283–6.
- [48] Seeman P, Corbett R, Van Tol HHM. Atypical neuroleptics have low affinity for dopamine D2 receptors or are selective for D4 receptors. *Neuropsychopharmacology* 1997;16:93–110.
- [49] Shippenberg TS, Hertz A. Place preference conditioning reveals the involvement of D1-dopamine receptors in the motivational properties of mu- and k-opioid agonists. *Brain Res* 1987;436:169–72.
- [50] Shippenberg TS, Hertz A. Motivational effects of opioids: influence of D-1 versus D-2 receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 1988;151:233–42.
- [51] Shippenberg TS, Bals-Kubik R, Herz A. Examination of the neurochemical substrates mediating the motivational effects of opioids: Role of the mesolimbic dopamine system and D-1 vs. D-2 dopamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;265:53–9.
- [52] Shippenberg TS, Balskubik R, Huber A, Herz A. Neuroanatomical substrates mediating the aversive effects of D-1 dopamine receptor antagonists. *Psychopharmacology* 1991;103:200–9.
- [53] Spanagel R, Weiss F. The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trend Neurosci* 1999;22:521–7.
- [54] Spyraiki C, Fibiger HC, Phillips AG. Attenuation of heroin reward in rats by disruption of the mesolimbic dopamine system. *Psychopharmacology* 1983;79:278–83.
- [55] Spyraiki C, Fibiger HC. A role of the mesolimbic dopamine system in the reinforcing properties of diazepam. *Psychopharmacology* 1988;94:133–7.
- [56] Stinus L, Nadaud D, Deminiere JM, Jauregui J, Hand TT, Le Moal M. Chronic flupentixol treatment potentiates the reinforcing properties of systemic heroin administration. *Biol Psychiatry* 1989;26:363–71.
- [57] Suzuki T, Misawa M. Sertindole antagonizes morphine-, cocaine-, and methamphetamine-induced place preference in the rat. *Life Sci* 1995;57:1277–84.
- [58] Suzuki T, Funada M, Narita M, Misawa M, Nagase H. Morphine-induced place preference in the CXBK mouse: characteristics of mu opioid receptor subtype. *Brain Res* 1993;602:45–52.
- [59] Suzuki T, Yoshiike M, Mizoguchi H, Kamei J, Misawa M, Nagase H. Blockade of d-opioid receptors prevents morphine-induced place preference in mice. *Jpn J Pharmacol* 1994;66:131–7.
- [60] Suzuki T, Takamori K, Misawa M, Onodera K. Effects of the histaminergic system on the morphine-induced conditioned place preference in mice. *Brain Res* 1995;675:195–202.
- [61] Suzuki T, Tsuji M, Mori T, Misawa M, Endoh T, Nagase H. Effect of the highly selective and non-peptide δ opioid receptor agonist TAN-67 on the morphine-induced place preference in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;279:177–85.
- [62] Suzuki T, Ikeda H, Tsuji M, Misawa M, Narita M, Tseng LF. Antisense oligodeoxynucleotide to δ opioid receptors attenuates morphine dependence in mice. *Life Sci* 1997;61:165–70.
- [63] Tanda G, Di Chiara G. A dopamine-m1 opioid link in the rat ventral tegmentum shared by palatable food (Fonzies) and non-psychostimulant drugs of abuse. *Eur J Neurosci* 1998;10:1179–87.
- [64] Thrasher MJ, Freeman PA, Risinger FO. Clozapine's effects on ethanol's motivational properties. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:1377–85.
- [65] Tsuji M, Nakagawa Y, Ishibashi Y, Yoshii T, Takashima T, Shimada M, Suzuki T. Activation of ventral tegmental gabaB receptors inhibits morphine-induced place preference in rats. *Eur J Pharmacol* 1996;313:169–73.
- [66] Tzschentke TM, Schmidt WJ. Interactions of MK-801 and GYKI 52466 with morphine and amphetamine in place preference conditioning and behavioral sensitization. *Behav Brain Res* 1997;84:99–107.
- [67] Tzschentke TM. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Progress Neurobiol* 1998;56:613–72.
- [68] Wise RA. Drug-activation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Dependence* 1998;51:13–22.
- [69] Wu WR, Zhu XZ. The amphetamine-like reinforcing effect and mechanism of L-deprenyl on conditioned place preference in mice. *Eur J Pharmacol* 1999;364:1–6.
- [70] Xi K, Fuller SA, Stein EA. Dopamine release in the nucleus accumbens during heroin self-administration is modulated by kappa opioid receptors: an in vivo fast-cyclic voltammetry study. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;248:151–61.
- [71] Zachariou V, Parikh K, Picciotto MR. Centrally administered galanin blocks morphine-place preference in the mouse. *Brain Res* 1999;831:33–42.

Effects of CGS 10746B on hyperactivity and place preference induced by morphine

Carmen Manzanedo, Amparo Serrano, María A. Aguilar,
Marta Rodríguez-Arias, José Miñarro *

Area de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universitat de Valencia, Aptdo. 22109, 46071 Valencia, Spain

Received 26 January 2001; received in revised form 27 March 2001; accepted 27 March 2001

Abstract

The effects of CGS 10746B, a dopamine release inhibitor, on spontaneous locomotor activity, morphine-induced hyperactivity, acquisition of conditioned place paradigm and morphine-induced conditioned place preference (CPP) was evaluated in male mice. In experiment 1, animals treated with CGS 10746B (0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24 and 32 mg/kg), morphine (40 mg/kg) or morphine (40 mg/kg) plus CGS 10746B (0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24 and 32 mg/kg) were placed in an actimeter during a period of 90 min. In experiment 2, animals treated with CGS 10746B (0.5, 1, 3 and 10 mg/kg), morphine (40 mg/kg) or morphine (40 mg/kg) plus CGS 10746B (0.5, 1, 3 and 10 mg/kg) were conditioned following a procedure unbiased in terms of initial spontaneous preference. In experiment 1, it was found that a decrease in spontaneous locomotor activity was produced between 0 and 45 min after administration of 24 and 32 mg/kg of CGS 10746B. In contrast, morphine induced hyperactivity between 45 and 90 min after administration. CGS 10746B reduced morphine-induced hyperactivity with doses of 2 mg/kg and higher. In experiment 2, CGS 10746B did not produce any effect on place conditioning but blocked morphine-induced CPP with doses from 1 mg/kg upwards. Our results confirm that an intact dopamine neurotransmission is critical for the manifestation of the motor and place preference conditioning effects of morphine. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Morphine; CGS 10746B; Motor activity; CPP

1. Introduction

The dopamine (DA) system is thought to be a major neural substrate of the motor and rewarding effects of morphine. This hypothesis is based on various lines of evidence. First, the DA system arising from the ventral tegmental area (VTA) and projecting to the nucleus accumbens (NAcc) is considered to be the substrate of opiate reward. Activation of μ and δ -receptors on afferent GABAergic neurons in the VTA is viewed as the primary substrate of opiate reward and the activation of μ and δ -receptors on efferent GABAergic neurons in the NAcc is viewed as the secondary site of opiate reward [36,57]. Second, it has been shown that the administration of morphine increases the extracellular DA in the NAcc preferentially in the 'shell' region

[4,41,42,54,60], and it is hypothesised that this stimulation of DA transmission plays a crucial role in the liability of abuse of drugs [14–16,57]. Moreover, exposure to morphine sensitises its NAcc DA stimulant effects, and withdrawal from morphine results in a decrease of DA in the NAcc [10,13]. Third, morphine facilitates intracranial self-stimulation and this effect is dependent upon an intact DA transmission [7,24]. Fourth, opiate-induced conditioned place preference (CPP) is impaired by DA receptor antagonists [1,9,32,35,37,46,47] or 6-OHDA lesions of NAcc [51].

In spite of this evidence, the exact role played by DA in the rewarding effect of opiates is unclear [3]. In contrast with the positive results observed in place conditioning and intracranial self-stimulation studies, the intravenous opiate-self administration experiments have failed to demonstrate a role of DA in positive motivational properties of opiates. Administration of DA antagonists does not alter the responses maintained by intravenous heroin [18,21,23,55] and when an im-

* Corresponding author. Tel.: +34-96-3864420, ext. 6293; fax: +34-96-3864668.

E-mail address: jose.minarro@uv.es (J. Miñarro).

pairing effect is observed it has been argued that this is likely to be due, not to a reduction in the rewarding impact of the opiate, but to some motor impairment. Selective 6-OHDA destruction of the NAcc also shows a discrepancy in the results, and impairments of self-administration have been observed [49] or no effects [22,40]. These data suggest that the maintenance of opiate self-administration can be mediated by DA-independent mechanisms, presumably opiate receptors localised post-synaptically in the NAcc [17,29].

Numerous studies in mice indicate that morphine induces hyperactivity [5,20,27,31,34,38,61] and a CPP for the place in which it has been administered [6,11,12,33,52,53,62], and it has been suggested that these effects could depend critically on the DA system [33–35,43].

In this work we have studied in male mice the effects of CGS 10746B, a DA release inhibitor [2,58,59], on several behaviours in which this neurotransmitter has been involved. In the first experiment, we evaluate the effects of CGS 10746B on spontaneous motor activity and on morphine-induced hyperactivity. The second experiment sought to assess the effects of CGS 10746B on the acquisition of place conditioning and evaluate its effect on acquisition of morphine-induced CPP. The purpose of the present study was to provide more evidence of the role of the DA system in the motor and rewarding properties of morphine in mice.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Two hundred and fifty-seven male mice of the OF1 strain acquired commercially in CRIFFA (Barcelona, Spain) were used. The animals arrived at the laboratory at 42 days of age and were housed in groups of ten, in plastic cages (22 × 38 cm) 10 days before experiments, under the following conditions, constant temperature (21 ± 2°C), a reversed light schedule (white lights on, 19:30–07:30 h), and food and water available ad libitum, except during behavioural tests. Procedures involving mice and their care were conducted in conformity with national, regional and local laws and regulations, which are in accordance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC, 24 November 1986).

2.2. Apparatus

In experiment 1, an actimeter was employed (ACTISYSTEM II, Panlab S.L., Barcelona) for the measurement of spontaneous motor activity shown by the animals. The actimeter has three sensory plates 35 × 35 cm (pb 46603) which register the activity of the animals

through an electromagnetic system, an interface (pb 40035), and a computer (Olivetti PCS 286) with the DAS 16 programme (v. 1.0.) which allows the acquisition and storage of the data from the sensory plates. Between each subject the apparatus was cleaned with water. In experiment 2, four identical plexiglas boxes with two equal size compartments (30.7 length × 31.5 width × 34.5 height) separated by a grey central area (13.8 length × 31.5 width × 34.5 height) were used. The compartments have different coloured walls (black vs. white) and also distinct floor textures (fine grid in the black compartment and wide grid in the white one).

2.3. Drugs

Animals were injected IP with CGS 10746B (Novartis Pharmaceuticals Corporation, Summit, NJ, USA) and morphine (Laboratorios Alcaliber, Madrid, Spain) in a volume of 0.01 ml/g. Control groups were injected with physiological saline (NaCl 0.9%), also used to dissolve the drugs.

2.4. Procedure

2.4.1. Experiment 1: Effects of CGS 10746B on morphine-induced locomotor activity.

After the adaptation period in the laboratory, animals were divided depending on the treatment into 19 groups ($n = 8$). The first group received physiological saline, the second received 40 mg/kg of morphine and the other eight groups received 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24 or 32 mg/kg of CGS 10746B, respectively. The remaining groups received an injection of morphine and 30 min afterwards, an injection of physiological saline, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24 or 32 mg/kg of CGS 10746B, respectively. The interval of 30 min between the administration of morphine and CGS 10746B was selected on the basis of the results obtained when both drugs are administered separately. In the groups receiving only one injection, animals were placed onto the sensory plates for a period of 90 min immediately after treatment. The computer registered the activity each 15 min, i.e. at 15, 30, 45, 60, 75 and 90 min. In the groups receiving two injections, animals were placed onto the sensory plates immediately after the first injection for a period of 30 min then after the second injection the motor activity was registered at 15, 30, 45 and 60 min. Moreover, two other groups of animals received 40 mg/kg of morphine and 30 min afterwards physiological saline or 32 mg/kg of CGS 10746B then their activity was evaluated every 15 min for 5 h (after the second injection).

2.4.2. Statistical treatment

To evaluate differences between groups, analyses of variance (ANOVAs) were carried out, (1) a mixed

ANOVA with a variable between treatment with nine levels (saline and the eight doses of CGS 10746B) and a variable within time with six levels (0–15, 15–30, 30–45, 45–60, 60–75, 75–90 min); (2) a mixed ANOVA with a variable between treatment with two levels (saline and morphine) and a variable within time with six levels (0–15, 15–30, 30–45, 45–60, 60–75, 75–90 min); (3) a mixed ANOVA with a variable between treatment with nine levels (morphine + saline and morphine + eight doses of CGS 10746B) and a variable within time with four levels (0–15, 15–30, 30–45, 45–60 min); (4) a mixed ANOVA with the data obtained with the separate groups of animals treated with morphine + saline or 32 mg/kg of CGS 10746B, with a variable between treatment with two levels (morphine + saline, morphine + 32 CGS) and a variable within time with 20 levels (5 h in fractions of 15 min). To make post-hoc comparisons Newman–Keuls and simple effects tests were used.

2.4.3. Experiment 2: Effects of CGS 10746B on morphine-induced place conditioning.

The experiment, consisting of three phases, was carried out following a procedure unbiased in terms of initial spontaneous preference. During the first phase (pre-conditioning) mice were given access to both compartments of the apparatus for 15 min (900 s) each day for 2 days. On day 3, the time spent by the animal in each compartment was recorded for 900 s. Nine animals showing strong unconditioned aversion (less than 33% of the session time, i.e. 300 s) or preference (more than 67%, i.e. 600 s) for any compartment were discarded. One compartment was chosen to be paired with drug and the other with vehicle, taking into account that in each group, half the animals received the drug or vehicle in the most preferred compartment and the other half in the less preferred. After assigning the compartments, there were no significant differences between time spent in the drug-paired and the vehicle-paired compartments during the pre-conditioning phase. This is an important step in the experimental procedure that avoids any preference bias before conditioning.

In the second phase (conditioning), which had a duration of 4 days, animals received an injection of physiological saline before being confined to vehicle-paired compartment for 1 h, and after an interval of 4 h, received the drugs immediately before confinement in the drug-paired compartment for 1 h.

During the third phase (post-conditioning), on day 8 the guillotine door separating the two compartments was removed and the time spent by the untreated mice in each compartment was recorded during 900 s of observation. The time spent in the central area in pre- and post-conditioning sessions was proportionally divided between both conditioning compartments by

means of the application of a factor of correction, which resulted from the division of the total time (900 s) between the sum of the time spent in each conditioning compartment (factor of correction = $900 / (\text{time spent in drug-paired} + \text{time spent in vehicle paired compartment})$). Afterwards, the time spent in each compartment was multiplied by this factor of correction. The application of this corrector makes it possible to take into account the time spent in the central area and facilitates the statistical analysis of the data and the representation of the results. Since the time spent in drug-paired plus vehicle-paired compartments always add up to the total time of test (900 s), it is sufficient to work with the time spent in just one compartment [35].

The difference in seconds between the time spent in the drug-paired compartment in the post-conditioning test and that spent in the pre-conditioning one is a measure of the degree of conditioning induced by the drug. If this difference is positive then the drug has induced a preference for the drug paired compartment, while the opposite indicates the induction of an aversion. To evaluate the effects of CGS 10746B on the acquisition of morphine-induced place preference, animals were divided into ten groups ($n = 8$) according to the treatment received during the conditioning phase, physiological saline + physiological saline; physiological saline + 40 mg/kg morphine; physiological saline + 0.5, 1, 3 or 10 mg/kg CGS 10746B; 40 mg/kg morphine + 0.5, 1, 3 or 10 mg/kg CGS 10746B.

2.4.4. Statistical treatment

Data of the time spent in drug-paired compartment were analysed with a mixed ANOVA with a between variable treatment with ten levels (saline + saline, saline + morphine, saline + 0.5, saline + 1, saline + 3, saline + 10, morphine + 0.5, morphine + 1, morphine + 3, morphine + 10) and a within variable days with two levels (pre- and post-conditioning). To make post-hoc comparisons Newman–Keuls and Simple Effects tests were used.

3. Results

3.1. Experiment 1: Effects of CGS 10746B on morphine-induced locomotor activity.

The results show that CGS 10746B dose-dependently reduces motor activity while morphine increases it (see Fig. 1). Moreover, CGS 10746B dose-dependently reduces morphine-induced hyperactivity (see Fig. 2). The ANOVA performed with the data obtained after the administration of CGS 10746B showed that the variables treatment [$F(8,63) = 2.635$; $P < 0.0147$], time [F

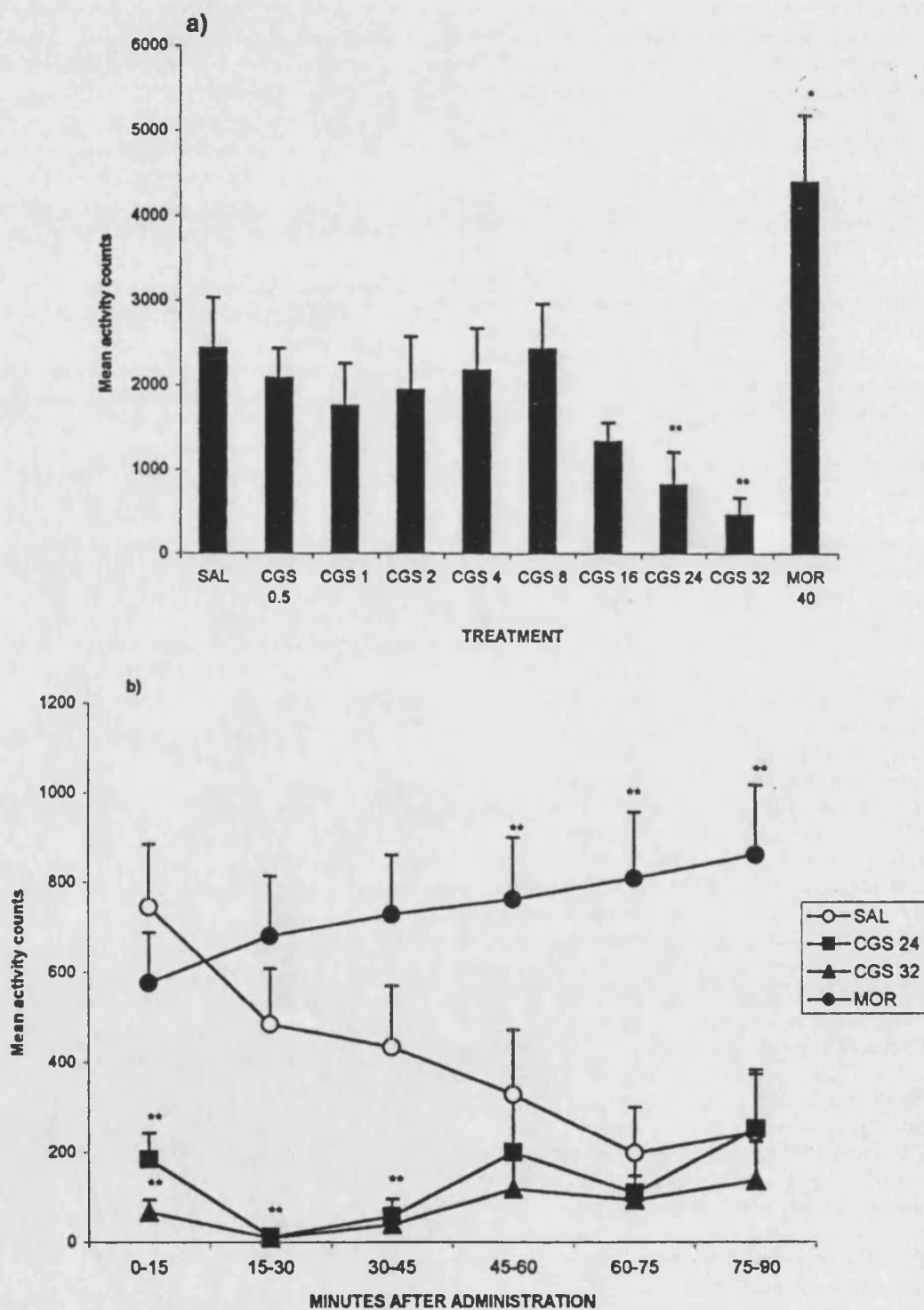


Fig. 1. Effects of CGS 10746B and morphine on spontaneous locomotor activity. (Graph a) Vertical bars represent the total counts of activity registered in a period of 90 min after administration of the following treatments, SAL, physiological saline; CGS 0.5, CGS 10746B 0.5 mg/kg; CGS 1, CGS 10746B 1 mg/kg; CGS 2, CGS 10746B 2 mg/kg; CGS 4, CGS 10746B 4 mg/kg; CGS 8, CGS 10746B 8 mg/kg; CGS 16, CGS 10746B 16 mg/kg; CGS 24, CGS 10746B 24 mg/kg; CGS 32, CGS 10746B 32 mg/kg; MOR 40, morphine 40 mg/kg. **, $P < 0.01$ significant difference with respect to SAL group. (Graph b) Time-course of the motor effects (activity counts registered in periods of 15 min) induced by the following treatments, SAL, physiological saline; CGS 24, CGS 10746B 24 mg/kg; CGS 32, CGS 10746B 32 mg/kg; MOR 40, morphine 40 mg/kg. **, $P < 0.01$ significant difference with respect to SAL group.

(5,315) = 18.851; $P < 0.0001$] and their interaction [$F(40,315) = 2.661$; $P < 0.0001$] were significant. Newman–Keuls post-hoc comparisons indicated that 24 and 32 mg/kg significantly reduced motor activity in comparison to the control and to the group receiving 0.5 mg/kg ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively), moreover, in the first 15 min animals showed more activity in comparison to the other times ($P < 0.01$). Simple effects showed that the effect of treatment was significant between 0–15 min ($P < 0.001$), 15–30 min ($P < 0.002$) and 30–45 min ($P < 0.001$) and that the effect of time was significant in the groups receiving saline, 0.5, 1, 2, 4 ($P < 0.001$) and 8 ($P < 0.03$) mg/kg of CGS 10746B (see Fig. 1b).

The ANOVA performed with the data obtained with morphine showed that the variable treatment was significant [$F(1,14) = 4.529$; $P < 0.05$] but not the variable time [$F(5,70) = 1.324$; $P < 0.264$]; their interaction was also significant [$F(5,70) = 10.467$; $P < 0.0001$]. Post-hoc comparisons indicated that morphine increased activity in comparison to controls between 45–60 min ($P < 0.02$), 60–75 min ($P < 0.002$) and 75–90 min ($P < 0.002$) (see Fig. 1b).

The ANOVA performed with the data obtained after the administration of morphine plus physiological saline or CGS 10746B showed that the variables treatment [$F(8,63) = 10.705$; $P < 0.0001$], time [$F(3,189) = 2.838$; $P < 0.0393$] and their interaction [$F(24,189) = 2.283$; $P < 0.0011$] were significant. Newman–Keuls post-hoc comparisons indicated that the group receiving morphine plus saline presented more activity than the groups receiving morphine plus 2 ($P < 0.05$), 4, 8, 16, 24 and 32 ($P < 0.01$) mg/kg of CGS 10746B. Moreover, the groups receiving morphine plus 0.5, 1 and 2 mg/kg of CGS 10746B presented more activity than the groups receiving morphine plus 4, 8, 16, 24 and 32 mg/kg ($P < 0.01$). Simple effects indicated that the effect of treatment was significant at all times ($P < 0.001$) and that the effect of time was significant in the groups receiving morphine plus saline, 0.5 and 1 mg/kg of CGS 10746B ($P < 0.05$).

The ANOVA performed with the data obtained during 5 h after administration of morphine plus physiological saline or 32 mg/kg of CGS 10746B showed that the effect of treatment [$F(1,14) = 5.451$; $P < 0.035$],

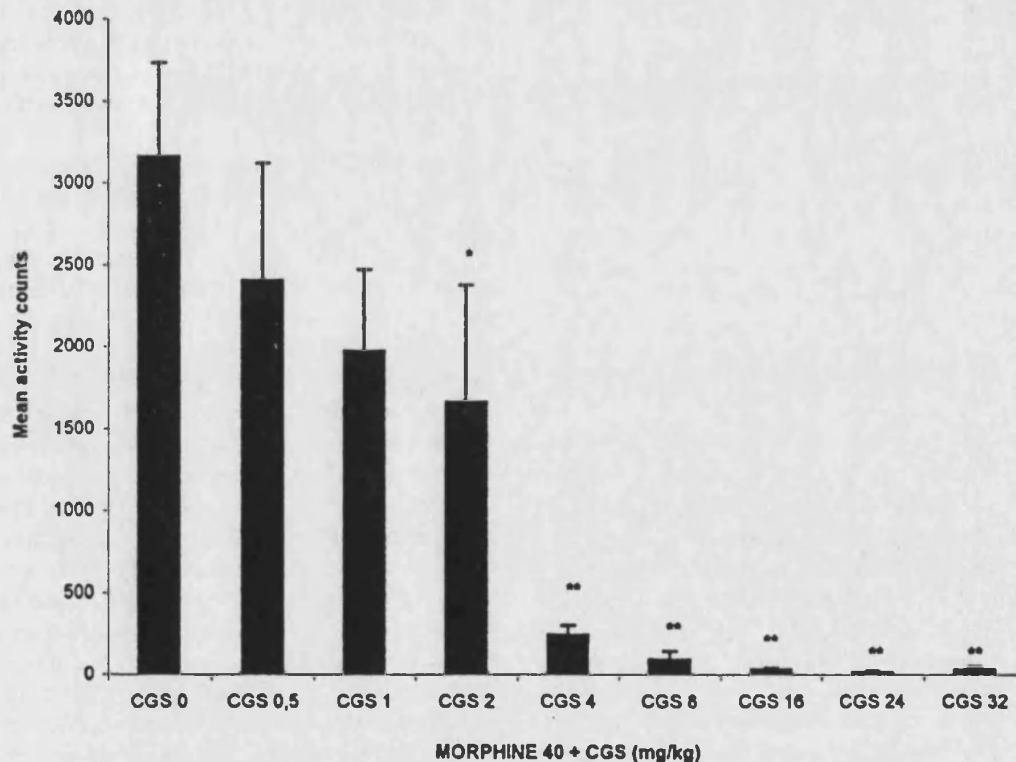


Fig. 2. Effects of CGS 10746B on morphine-induced hyperactivity. Vertical bars represent the total counts of activity registered in a period of 60 min after the administration of morphine plus different doses of CGS 10746B. Morphine (40 mg/kg) was administered 30 min before CGS 10746B. The register of activity started immediately after the administration of the second drug. Groups of treatment, CGS 0, morphine 40 mg/kg plus saline; CGS 0.5, morphine 40 mg/kg plus CGS 10746B 0.5 mg/kg; CGS 1, morphine 40 mg/kg plus CGS 10746B 1 mg/kg; CGS 2, morphine 40 mg/kg plus CGS 10746B 2 mg/kg; CGS 4, morphine 40 mg/kg plus CGS 10746B 4 mg/kg; CGS 8, morphine 40 mg/kg plus CGS 10746B 8 mg/kg; CGS 16, morphine 40 mg/kg plus CGS 10746B 16 mg/kg; CGS 24, morphine 40 mg/kg plus CGS 10746B 24 mg/kg; CGS 32, morphine 40 mg/kg plus CGS 10746B 32 mg/kg. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ significant differences with respect to the MOR 40 group.

Table 1
Time course of the effects of morphine (40 mg/kg) plus saline or CGS 10746B (32 mg/kg)*

Time (min)	0–30	30–60	60–90	90–120	120–150	150–180	180–210	210–240	240–270	270–300
M40+SAL	1763.3	1898.4	1821.9	1477.9	983.37	755.25	463	152.5	524.62	373.37
M40+CGS 32	27.12*	8.62*	11.24*	324.9*	627.24	835.12	884.57	662.62	514.75	448

* *, $P < 0.01$, significant difference with respect to M40+SAL group.

time [$F(19,266) = 3.185$; $P < 0.0001$] and interaction [$F(19,266) = 15.101$; $P < 0.0001$] were significant (see Table 1). Post-hoc comparisons indicated that the effect of treatment was significant between 0 and 120 min after administration ($P < 0.01$) and that the effect of time was significant in both groups ($P < 0.01$).

3.2. Experiment 2: Effects of CGS 10746B on morphine-induced place conditioning.

The administration of morphine induces CPP, an effect which is dose-dependently blocked by CGS 10746B, that by itself does not produce effects on place conditioning (see Fig. 3). The ANOVA performed with the data obtained in the drug-paired compartment showed that the effect of treatment [$F(9,70) = 0.685$; $P < 0.719$] and days [$F(1,70) = 0.474$; $P < 0.4934$] were not significant. In contrast, the interaction treatment \times days [$F(9,70) = 1.995$; $P < 0.05$] was significant. Post-hoc comparisons indicated that the effects of treatment were only significant on the post-conditioning day ($P < 0.03$). The effect of days were only significant in the groups which received morphine + saline and morphine + 0.5 mg/kg of CGS 10746B ($P < 0.001$, $P < 0.05$, respectively), in which there was a significant increase in the time spent in the drug-paired compartment in post-conditioning in comparison to pre-conditioning.

4. Discussion

Our results have shown that the DA release inhibitor CGS 10746B produces a dose-dependent decrease in spontaneous motor activity and blocks the morphine-induced hyperactivity. Moreover, this drug in itself has no effect on place conditioning but blocks the acquisition of morphine-induced CPP. These results support the idea that the motor and place preference conditioning effects of morphine are mediated by the DA system.

In the first experiment, we have observed that the administration of CGS 10746B produces a dose-dependent decrease in the spontaneous motor activity of the animals. Low doses (between 0.5 and 8 mg/kg) have no evident effects, but doses of 16 mg/kg and higher produce a clear reduction in activity, this effect being significant with 24 and 32 mg/kg during a period of 45

min after administration. This dose-dependent decrease in motor activity after the administration of CGS 10746B has previously been shown in rats with doses of 5, 10, 15 and 30 mg/kg [45] and in mice with doses of 30 and 100 mg/kg [19]. These results support the idea that CGS 10746B produces an inhibition of DA release since the effect of this drug on motor activity is produced immediately, having a duration of approximately 45 min. In contrast, the effect of neuroleptics, which block DA receptors, is generally evident 30 min after their administration, having a more prolonged duration [43,48]. The essential role of DA in the expression of spontaneous and stimulant-induced activity has been repeatedly reported [26,29,39,56]. The impairing effects of CGS 10746B on spontaneous locomotor activity could be explained by the disruption of DA transmission in the mesolimbic system since treatments which produce extensive destruction of this system cause hypoactivity [26,29], especially the lesion in the 'shell' of NAcc [39].

Moreover, our results show that the administration of 40 mg/kg of morphine induces hyperactivity and that this effect is blocked by the administration of CGS 10746B at doses of 2 mg/kg onwards. These results confirm those obtained in previous studies of our laboratory showing morphine-induced hyperactivity in mice and its blockade with DA antagonists [34]. Although no studies have evaluated the effects of CGS 10746B on morphine-induced hyperactivity, it has been shown that this DA inhibitor attenuates the hyperactivity induced by cocaine and metamphetamine with doses of 30 and 100 mg/kg, the same doses that produce a decrease in spontaneous motor activity [19]. In contrast, in our study the effects of CGS 10746B seem more specific since this drug attenuates morphine-induced hyperactivity at doses (2 mg/kg) ten times lower than those that produce a significant decrease in spontaneous motor activity (24 mg/kg). These results suggest that the hyperactivity induced by morphine depends critically on the DA system since this effect is reversed by the inhibition of DA release induced by the administration of CGS 10746B.

The administration of morphine plus CGS 10746B also produces another interesting result, animals which receive morphine plus 4 mg/kg or more of CGS 10746B present much lower levels of activity than animals

which receive only the corresponding dose of CGS 10746B. In fact, animals treated with morphine plus high doses of CGS 10746B present a state of strong sedation similar to catalepsy, which is prolonged during all the period of testing (60 min). For this reason, in separate groups of animals, the effects of morphine plus physiological saline or 32 mg/kg of CGS 10746B were tested for 5 h and it was observed that animals treated with morphine plus CGS 10746B showed slower activity during the first 120 min after administration than animals receiving morphine plus saline. Moreover, this state of catalepsy has a duration of approximately 90 min and afterwards animals slowly recover their normal level of activity. Kiritsy-Roy et al. [28] and Rodriguez-Arias et al. [43] also observed a strong catalepsy after

administration of morphine plus DA antagonists. A possible explanation of the effects observed after the administration of morphine plus drugs, which decrease DA neurotransmission could focus on the mechanisms of action of morphine. It is possible that this drug induces the activation of opiate receptors localised in at least two different sites, those placed in the VTA which inhibit gabergic interneurons producing DA release (and hyperactivity as behavioural response) and those placed in other areas (NAcc, striatum and tronco-encephalic structures) which have an inhibitory role on motor behaviour. Generally, the inhibitory effect of morphine is not evident, since it is masked by its effect on opiate receptors of VTA, however, when the DA system is blocked by the antagonism of their receptors

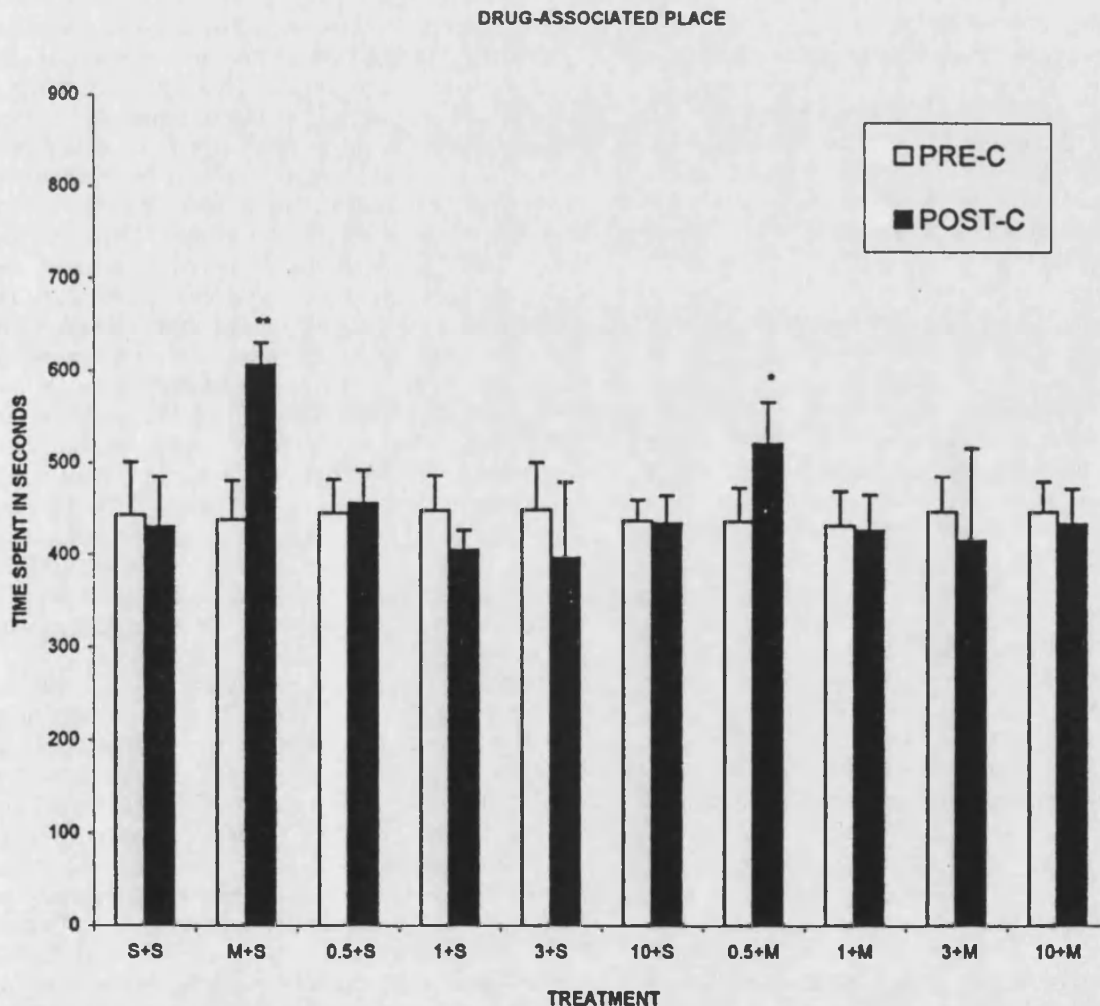


Fig. 3. Effects of CGS 10746B on place conditioning and on morphine-induced CPP. The bars represent the time in seconds spent in the drug-paired compartment before conditioning sessions (white bars) and after conditioning sessions (black bars). During conditioning, animals were divided into the following treatment groups, S + S, saline plus saline; M + S, morphine 40 mg/kg plus saline; 0.5 + S, CGS 0.5 mg/kg plus saline; 1 + S, CGS 1 mg/kg plus saline; 3 + S, CGS 3 mg/kg plus saline; 10 + S, CGS 10 mg/kg plus saline; 0.5 + M, CGS 0.5 mg/kg plus morphine 40 mg/kg; 1 + M, CGS 1 mg/kg plus morphine 40 mg/kg; 3 + M, CGS 3 mg/kg plus morphine 40 mg/kg; 10 + M, CGS 10 mg/kg plus morphine 40 mg/kg. **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$ significant difference in the time spent in pre-conditioning vs. post-conditioning sessions.

[28,43] or by the inhibition of its release (as in the present experiment), the action of morphine on inhibitory receptors becomes predominant and catalepsy appears.

On the other hand, it is assumed that the place preference paradigm reflects the motivational incentive properties of drugs and their liability of abuse [14,15]. In agreement with this idea, the administration of 40 mg/kg morphine causes CPP, an effect that has been repeatedly reported [6,11,12,33,35,52,53,62]. The administration of 0.5, 1, 3 and 10 mg/kg of CGS 10746B does not produce effects on place conditioning, suggesting that this drug, at the doses tested, has no rewarding or aversive properties. Previous studies have shown that the administration of CGS 10746B (at doses between 1.25 and 30 mg/kg) can induce conditioned place aversion or no effects in rats depending on the procedure used during the conditioning phase, when this drug is paired with the preferred side it produces aversion while no effect is observed when it is paired on the non-preferred side [45]. However, in the present experiment non-consistent decreases in the time spent in drug-paired compartment were observed in those animals that were conditioned with CGS 10746B to the preferred side (half the animals in each group). These contrasting results could be explained by differences in the species used (rats vs. mice).

Furthermore, we have observed that the administration of different doses of CGS 10746B (1, 3 and 10 mg/kg) block the acquisition of CPP induced by 40 mg/kg of morphine. The lowest dose of 0.5 mg/kg reduced, but does not eliminate, the preference for the morphine-paired compartment. These results suggest that there may be a dose–response effect of CGS 10746B. Although no studies have been performed on the effect of CGS 10746B on morphine-induced CPP, other works have shown that this drug also blocks the CPP induced by the DA agonists cathinone, cocaine and MDMA [8,44]. These results support the idea that the rewarding effects of morphine observed in place conditioning paradigm are essentially mediated by the DA system, and that the inhibition of DA liberation induced by CGS 10746B can reduce the reinforcing effects of different classes of drugs, such as DA agonists or opiates.

Alternatively, the blockade of morphine-induced CPP produced by CGS 10746B could be due to non-specific effects of the drug. When dopamine antagonists are used, there always remains a doubt on the specificity of the observed results, since these drugs can affect multiple processes (learning, memory, discrimination, locomotion, etc.). In the present work, we observed that CGS 10746B interferes with the morphine-induced CPP but we cannot be sure how the drug produces this effect with the experimental procedure used (place conditioning). In this paradigm, several processes are required

for the manifestation of a CPP, first, the stimulus must be rewarding; second, the animals must associate these rewarding effects with environmental cues (associative learning); third, they must retain this association (memory); fourth, they must be able to discriminate between reward- and neutral-paired cues (discrimination); and fifth, they must exhibit approach behaviour to reward cues. Disruption of one or more of these processes would be manifested as a reduced preference for the morphine-paired compartment. At least with low doses we can exclude the influence of the motor effects of the drug, however, the influence of learning, discrimination and memory effects of CGS 10746B remains to be evaluated. It could be very interesting to address these questions in future works using other more specific tests to study these processes.

The idea that mesolimbic DA has an essential role in the addiction to opiates and other drugs of abuse has evolved in the last years and new hypotheses and theories have been formulated [16,25,50]. According to these hypotheses, the role of DA continues to be essential in the mediation of some aspects of opiate reinforcement. It is believed that DA is involved in the incentive aspects rather than in rewarding effects. Opiates acts at two different central reward systems, DA and opioid [17], and opiate reward consists of two different aspects (incentive and consummatory). The stimulation of the opioid reward system could be responsible for the hedonic and consummatory properties of opiates, while the activation of central DA reward system, which produces arousal and locomotion (approach behaviour) and acquisition of secondary incentives (incentive learning), could have a role in the development of compulsive drug-seeking behaviour and dependence on opiates. Moreover, neuroadaptative changes in midbrain DA neurons after chronic drug-administration might be involved in the generation of deficit states that enhance vulnerability to drug craving and relapse [50].

The concept that opiate reward consists of two different aspects and that dopamine is involved only in its incentive aspect might explain the discrepancies observed between different paradigms. In paradigms that depend on the incentive aspect of opiate reward (intracranial electrical self-stimulation or CPP) dopamine receptor antagonists will readily interfere with opiate reward, but less so in those where consummatory aspects are more important (self-administration). In summary, the present study supports the idea that the DA system plays a critical role in the incentive aspect of opiate reward, since when the release of DA is inhibited by the administration of CGS 10746B the hyperactivity and place preference induced by morphine (which reflects arousal, approach behaviour and incentive learning) are dramatically reduced. As predicted by the hypothesis of Di Chiara [16], an impairment in the

ability of the drug to activate DA transmission in the NAcc 'shell' could impair the acquisition and maintenance of an excessive control over behaviour by drug-related stimuli. In this study, the impairment of the acquisition of morphine-induced CPP observed after the inhibition of DA release suggests that DA is essential to the development of addiction to opiates.

5. Uncited reference

[30]

Acknowledgements

This work was supported by grant PB98-1497 from Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica, Ministerio de Educación y Cultura, Spain. We would like to thank Novartis Pharma for their kind gift of CGS 10746B.

References

- [1] Acquas E, Carboni E, Leone P, Di Chiara G. SCH 23390 blocks drug-conditioned place-preference and place aversion: anhedonia (lack of reward) or apathy (lack of motivation) after dopamine receptor blockade? *Psychopharmacology* 1989;99:151–5.
- [2] Altar CA, Boyar WC, Wasley A, Gerhardt SC, Liebman JM, Wood PL. Dopamine neurochemical profile of atypical antipsychotics resembles that of D-1 antagonists. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1988;338:162–8.
- [3] Bardo MT. Neuropharmacological mechanisms of drug reward: beyond dopamine in the nucleus accumbens. *Crit Rev Neurobiol* 1998;12:37–67.
- [4] Bassareo V, Tanda G, Petromilli P, Giva G, Di Chiara G. Non-psychostimulant drugs of abuse and anxiogenic drugs activate with differential selectivity dopamine transmission in the nucleus accumbens and in the medial prefrontal cortex of the rat. *Psychopharmacology* 1996;124:293–9.
- [5] Belknap JK, Riggan J, Cross S, Young ER, Gallaher EJ, Crabbe JC. Genetic determinants of morphine activity and thermal response in 15 inbred mouse strains. *Pharmacol Biochem Behav* 1998;59:353–60.
- [6] Belzung C, Barreau S. Differences in drug-induced place conditioning between BALB/c and C57B1/6 mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;65:419–23.
- [7] Beshpalov A, Lebedev A, Panchenko G, Zvartau E. Effects of abused drugs on thresholds and breaking points of intracranial self-stimulation in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 1999;9:377–83.
- [8] Bilsky EJ, Montegut MJ, Nichols ML, Reid LD. CGS 10746B, a novel dopamine release inhibitor, blocks the establishment of cocaine and MDMA conditioned place preferences. *Pharmacol Biochem Behav* 1998;59:215–20.
- [9] Bozarth MA, Wise RA. Heroin reward is dependent on a dopaminergic substrate. *Life Sci* 1981;29:1881–6.
- [10] Cadoni C, Di Chiara G. Reciprocal changes in dopamine responsiveness in the nucleus accumbens shell and core and in the dorsal caudate-putamen in rats sensitized to morphine. *Neuroscience* 1999;90:447–55.
- [11] Coudereau JP, Debray M, Monier C, Bourre JM, Frances H. Isolation impairs place preference conditioning to morphine but not aversive learning in mice. *Psychopharmacology* 1997;130:117–23.
- [12] Del Pozo E, Barrios M, Baeyens JM. The NMDA receptor antagonist dizocilpine (MK-801) stereoselectively inhibits morphine-induced place preference conditioning in mice. *Psychopharmacology* 1996;125:209–13.
- [13] Diana M, Muntoni A, Pistis M, Melis M, Gessa GL. Lasting reduction in mesolimbic dopamine neuronal activity after morphine withdrawal. *Eur J Neurosci* 1999;11:1037–41.
- [14] Di Chiara G. Psychobiology of the role of DA in drug abuse and addiction. *Psychopharmacology* 1995;124:293–9.
- [15] Di Chiara G. A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. *J Psychopharmacol* 1998;12:54–67.
- [16] Di Chiara G. Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *Eur J Pharmacol* 1999;375:13–30.
- [17] Di Chiara G, North RA. Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13:185–93.
- [18] Etenberg A, Pettit HO, Bloom FE, Koob GF. Heroin and cocaine intravenous self-administration in rats: mediation by separate neural systems. *Psychopharmacology* 1982;78:204–9.
- [19] French D, Witkin JM. Effects of the dopamine release inhibitor, CGS 10746B on the locomotor stimulant and discriminative effects of cocaine and methamphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;46:989–93.
- [20] Funada M, Suzuki T, Misawa M. The role of dopamine D1-receptors in morphine-induced hyperlocomotion in mice. *Neurosci Lett* 1994;169:1–4.
- [21] Gerber CJ, Wise RA. Pharmacological regulation of intravenous cocaine and heroin self-administration in rats: a variable dose paradigm. *Pharmacol Biochem Behav* 1989;32:527–31.
- [22] Gerrits MA, van Ree JM. Effects of nucleus accumbens dopamine depletion on motivational aspects involved in the initiation of cocaine and heroin self-administration in rats. *Brain Res* 1996;713:114–24.
- [23] Gerrits M, Ramsey NF, Wolterink G, van Ree JM. Lack of evidence for an involvement of nucleus accumbens dopamine D1 receptors in the initiation of heroin self-administration in the rat. *Psychopharmacology* 1994;114:486–94.
- [24] Hand TH, Franklin KB. 6-OHDA lesions of the ventral tegmental area block morphine-induced but not amphetamine-induced facilitation of self-stimulation. *Brain Res* 1985;328:233–41.
- [25] Horvitz JC. Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience* 2000;96:651–6.
- [26] Jones GH, Robbins TW. Differential effects of mesocortical, mesolimbic, and mesostriatal dopamine depletion on spontaneous, conditioned, and drug-induced locomotor activity. *Pharmacol Biochem Behav* 1992;43:887–95.
- [27] Kamei J, Ohsawa M, Saitoh A, Iwamoto Y. Modification of m-opioid agonist-induced locomotor activity and development of morphine dependence by diabetes. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;274:700–6.
- [28] Kiritsy-Roy JA, Standish SM, Terry LC. Dopamine D-1 and D-2 antagonist potentiate analgesic and motor effects of morphine. *Pharmacol Biochem Behav* 1989;32:717–21.
- [29] Koob GF. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13:177–84.
- [30] Koob GF, Stinus L, Le Moal M. Hyperactivity and hypoactivity produced by lesions to the mesolimbic dopamine system. *Behav Brain Res* 1981;3:341–59.
- [31] Kuribara H. Caffeine enhances acute stimulant effect of morphine but inhibits morphine sensitization when assessed by ambulation of mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1995;19:313–21.

- [32] Leone P, Di Chiara G. Blockade of D-1 receptors by SCH23390 antagonizes morphine- and amphetamine-induced place preference conditioning. *Eur J Pharmacol* 1987;135:251–4.
- [33] Maldonado R, Salardi A, Valverde O, Samad TA, Roques BP, Borrelli E. Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 1997;388:586–9.
- [34] Manzanedo C, Aguilar MA, Miñarro J. The effects of dopamine D2 and D3 antagonists on spontaneous motor activity and morphine-induced hyperactivity in male mice. *Psychopharmacology* 1999;143:82–8.
- [35] Manzanedo C, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J. Effects of dopamine antagonists with different receptor blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice. *Behav Brain Res* 2001;1–2:189–97.
- [36] McBride WJ, Murphy JM, Ikemoto S. Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behav Brain Res* 1999;101:129–52.
- [37] Nader K, Bechara A, Roberts DCS, van der Kooy D. Neuroleptics block high- but not low-dose heroin place preferences: further evidence for a two-system model of motivation. *Behav Neurosci* 1994;108:1128–38.
- [38] Narita M, Suzuki T, Funada M, Misawa M, Nagase H. Involvement of d-opioid receptors in the effects of morphine on locomotor activity and the mesolimbic system in mice. *Psychopharmacology* 1993;111:423–42.
- [39] Parkinson JA, Olmstead MC, Burns LH, Robbins TW, Everitt BJ. Dissociation in effects of lesions of the nucleus accumbens core and shell on appetitive pavlovian approach behavior and the potentiation of conditioned reinforcement and locomotor activity by D-amphetamine. *J Neurosci* 1999;19:2401–11.
- [40] Petit HO, Eitenberg A, Bloom FE, Koob GF. Destruction of dopamine in the nucleus accumbens selectively attenuates cocaine but not heroin self-administration in rats. *Psychopharmacology* 1984;84:167–73.
- [41] Piepponen TP, Honkanen A, Kivastik T, Zharkowsky A, Turtia A, Mikkola JAV, Ahtee L. Involvement of opioid m1-receptors in opioid-induced acceleration of striatal and limbic dopaminergic transmission. *Pharmacol Biochem Behav* 1999;63:245–52.
- [42] Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G. Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the 'shell' as compared with the 'core' of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:12304–8.
- [43] Rodríguez-Arias M, Broseta J, Aguilar MA, Miñarro J. Lack of specific effects of selective D1 and D2 dopamine antagonists versus risperidone on morphine-induced hyperactivity. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;66:189–97.
- [44] Schechter MD. Effect of learned behaviour upon conditioned place preference to cathinone. *Pharmacol Biochem Behav* 1991;38:7–11.
- [45] Schechter MD, Meehan SM. Conditioned place aversion produced by dopamine release inhibition. *Eur J Pharmacol* 1994;260:133–7.
- [46] Shippenberg TS, Herz A. Motivational effects of opioids: influence of D-1 versus D-2 receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 1988;151:233–42.
- [47] Shippenberg TS, Bals-Kubik R, Herz A. Examination of the neurochemical substrates mediating the motivational effects of opioids: role of the mesolimbic dopamine system and D-1 versus D-2 dopamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;265:53–9.
- [48] Simón VM, Parra A, Miñarro J, Arenas MC, Vinader-Caerols C, Aguilar MA. Predicting how equipotent doses of chlorpromazine, haloperidol, sulpiride, raclopride and clozapine reduce locomotor activity in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 2000;10:159–64.
- [49] Smith JE, Guerin GF, Co TS, Barr TS, Lane JD. Effects of 6-OHDA lesions of the central medial nucleus accumbens on rat intravenous morphine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* 1985;23:843–9.
- [50] Spanagel R, Weiss F. The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci* 1999;22:521–7.
- [51] Spyrali C, Fibiger HC, Phillips AG. Attenuation of heroin reward in rats by disruption of the mesolimbic dopamine system. *Psychopharmacology* 1983;79:278–83.
- [52] Suzuki T, Funada M, Narita M, Misawa M, Nagase H. Morphine-induced place preference in the CXBK mouse: characteristics of μ -opioid receptor subtypes. *Brain Res* 1993;602:45–52.
- [53] Suzuki T, Yoshiike M, Mizoguchi H, Kamei J, Misawa M, Nagase H. Blockade of d-opioid receptors prevents morphine-induced place preference in mice. *Jpn J Pharmacol* 1994;66:131–7.
- [54] Tanda G, Di Chiara G. A dopamine-m1 opioid link in the rat ventral tegmentum shared by palatable food (Fonzies) and non-psychostimulant drugs of abuse. *Eur J Neurosci* 1998;10:1179–87.
- [55] Van Ree JM, Ramsey N. The dopamine hypothesis of opiate reward challenged. *Eur J Pharmacol* 1987;134:239–43.
- [56] Weissenborn R, Winn P. Regulatory behaviour, exploration and locomotion following NMDA or 6-OHDA lesions in the rat nucleus accumbens. *Behav Brain Res* 1992;51:127–37.
- [57] Wise RA. Drug-activation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend* 1998;51:13–22.
- [58] Wood PL, Altar CA, Kim HS. Presynaptic inhibition of nigrostriatal dopamine release in the mouse: lack of cross tolerance between apomorphine, GBL and CGS 10746B. *Life Sci* 1988a;42:1503–6.
- [59] Wood PL, Altar CA. Dopamine release in vivo from nigrostriatal, mesolimbic and mesocortical neurons: utility of 3-methoxytyramine measurements. *Pharmacol Rev* 1988b;40:163.
- [60] Xi K, Fuller SA, Stein EA. Dopamine release in the nucleus accumbens during heroin self-administration is modulated by κ -opioid receptors: an in vivo fast-cyclic voltammetry study. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;248:151–61.
- [61] Yakimovskii AF. Behavior of rats during chronic activation and blockade of the neostriatal opiate system. *Neurosci Behav Physiol* 1995;25:171–7.
- [62] Zachariou V, Parikh K, Picciotto MR. Centrally administered galanin blocks morphine place preference in the mouse. *Brain Res* 1999;831:33–42.

CONDITIONED PLACE PREFERENCE PARADIGM CAN BE A MOUSE MODEL OF RELAPSE TO OPIATES.

Carmen Manzanedo, María A. Aguilar, Marta Rodriguez-Arias, José Miñarro*

Area de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universitat de Valencia, Aptdo. 22109.
46071 Valencia, Spain.

(Accepted December 1, 2000)

SUMMARY

With the object of determining the usefulness of the conditioned place preference (CPP) paradigm as a model of relapse to opiates, the effects of the re-exposure to morphine are explored in male mice which had undergone a process of extinction of conditioning. Morphine (40 mg/kg) produces a CPP which lasts up to 15 days after conditioning. When it has completely extinguished (45 days), a non contingent re-exposure to the drug again produces the same preference. These results suggest that the CPP paradigm may be used in mice to study the mechanisms of relapse to opiates in addicts.

KEY WORDS: conditioned place preference, relapse, morphine, drug re-exposure, mouse

INTRODUCTION

Relapse to compulsive drug taking is a major problem in the treatment of drug addiction. Relapse is an operant event that can be measured directly when a laboratory animal re-initiates a particular behavioural response, such as a lever-press. In fact, self-administration has been almost exclusively the only paradigm used to study relapse (1) although it has the disadvantage of being a difficult, time absorbing procedure (surgery, implantation of intravenous catheters, training of lever-press response, etc.). Relapse to a prior behavioural response following extinction is known as reinstatement, and the stimuli that effectively induce it are called "primers" (2). One powerful trigger of relapse or "primer" is the injection of the self-administered drug, although the presentation of drug-associated stimuli or cues, and the exposure to stress can also produce relapse (3, 4, 5, 6, 7).

It is assumed that the conditioned place preference (CPP) paradigm offers a simple method of assessing the conditioned reward induced by different stimuli. A drug, which serves as an unconditioned stimulus (UCS), is paired several times with a previously neutral set of environmental stimuli which acquire secondary motivational properties in the course of conditioning (CS). In the same animal, a control treatment is paired with a different environment. During the test session the animals are allowed to explore both environments. If the primary motivational properties of the treatment are positive, the CS can elicit approach and the animal spends more time in the compartment associated with this treatment. The CPP can also show extinction when the animals are repeatedly exposed to the CS in the absence of the UCS. This property might make the CPP paradigm a potentially useful tool to test several aspects of drug craving and relapse.

Numerous studies indicate that morphine acts as a positive UCS and induces a conditioned preference for the place in which it has been administered (for a review see ref. 8). This morphine-induced CPP lasts for up to 12 days in rats and by the 28th day has disappeared (9). The purpose of the present work was to value the possible usefulness of the CPP paradigm to study the phenomenon of opiate relapse in mice. With this objective we evaluated the time-course of morphine-induced CPP in mice which underwent a process of extinction of conditioning, to determine whether the re-exposure to the drug produces the reinstatement of CPP.

MATERIAL AND METHODS

16 albino male mice of the OF1 strain (CRIFFA, Barcelona, Spain) of 42 days of age were housed in groups of five, in plastic cages (25 x 25 cm), under constant temperature ($21 \pm 2^\circ \text{C}$), a reversed light schedule (white lights on: CAPut!'.30-07.30 h), food and water available ad libitum, for 15 days before experiments. Procedures involving mice and their care were conducted in conformity with national, regional and local laws and regulations, which are in accordance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC, 24 November 1986). For conditioning, four identical plexiglas boxes with two equal size compartments (30.7 cm length x 31.5 cm width x 34.5 cm height) separated by a grey central area (13.8 cm x 31.5 cm x 34.5 cm) were used. The compartments have different coloured walls (black vs white) and also distinct floor textures (fine grid in the black compartment and wide grid in the white one).

The experiment, consisting of three phases, was carried out following the procedure used by Acquas et al. (10). During the first one (pre-conditioning), mice were given access

to both compartments of the apparatus for 15 min each day for 2 days. On day 3, the time spent by the animal in each compartment was recorded for 15 min to discover its "unconditioned" preference for a particular compartment. In the second phase (conditioning), which had a duration of 4 days, animals were divided into two groups. The experimental group (n=8) was injected IP with 40 mg/kg morphine (Laboratorios Alcaliber, Toledo, Spain), dissolved in physiological saline in a volume of 0.01 ml/g, and was immediately exposed for 1 h to the non-preferred compartment. After an interval of 4 h, mice were introduced into the preferred compartment after administration of vehicle; each day the order of the exposure to each compartment was reversed. The control group (n=8) were injected IP with physiological saline (NaCl 0.9%) immediately before the exposure to both compartments. During the third phase (post-conditioning), on day 8, mice were given access to both compartments of the apparatus for 15 min. On days 12, 22, 27, 42 and 52 (5, 15, 20, 35 and 45 days after last conditioning session), the time spent by the animal in each compartment was recorded for 15 min. The difference between time spent in the drug-paired compartment in the post-conditioning tests and that spent in the pre-conditioning one is a measure of the degree of conditioning induced by the drug. On day 53 (46 days after last conditioning session), all animals were treated with 40 mg/kg of morphine and 30 min afterwards the CPP was again measured.

To evaluate differences between groups, an analysis of variance (ANOVA) with a variable between Treatment with two levels (Saline and Morphine) and a within variable "Days" with 6 levels (Pre-conditioning [day 3] and Post-conditioning [days 12, 22, 27, 42, 52]) was carried out. To make post-hoc comparisons Newman-Keuls tests were used. Differences between groups on day 53 were analysed using unpaired t-tests.

RESULTS

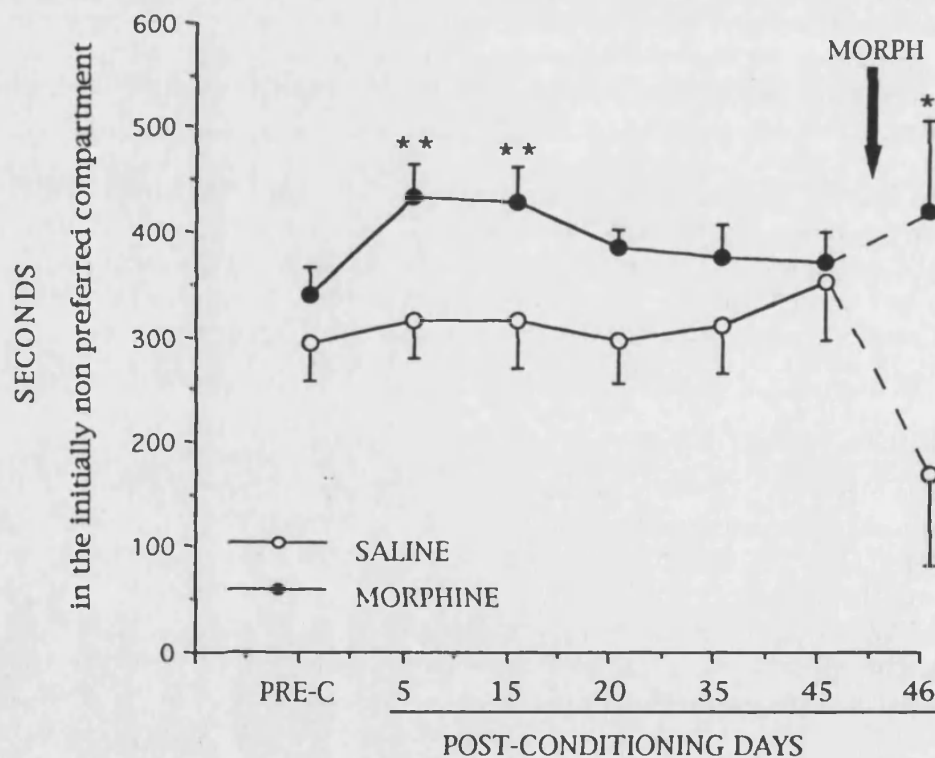
The ANOVA showed that the variable Days [$F(5,70) = 2.491$; $p < 0.0354$] was significant. The variable Treatment [$F(1,14) = 3.87$; $p < 0.0619$] and the Interaction [$F(5,70) = 1.739$; $p < 0.1316$] were not significant. Newman-Keuls test of the variable Days showed that in the experimental group, there was a significant increase in the preference for the drug-associated place on post-conditioning days 12 and 22 (5 and 15 days after conditioning) with respect to pre-conditioning day ($ps < 0.05$). Furthermore, on day 46, experimental and control group differed in their place preference ($t=2.2$; $p < 0.05$).

DISCUSSION

Our results suggest that the CPP paradigm can be used as a mouse model of relapse to opiates, since when morphine is no longer administered conditioning gradually disappears (extinction) and when the animals are re-exposed to the drug the CPP reappears (reinstatement). In this experiment we have observed that the administration of 40 mg/kg of morphine produces a significant CPP, which persists up to 15 days after the last conditioning session, showing a gradual decline until 45 days afterwards. Moreover, on day

46, a non-contingent exposure to morphine in the experimental group again increases the preference for the place in which the drug was administered during conditioning. In contrast, in the control animals (naive for morphine) this injection produces a decrease in the time spent in the non preferred compartment, i.e. an increase in the time spent in the naturally preferred compartment (see fig. 1).

FIGURE 1



Conditioned place preference induced by the administration of morphine (40 mg/kg) in the nonpreferred compartment. PRE-C: day 3 of pre-conditioning phase. MORPH ↓: administration of morphine (40 mg/kg) 30 min before test on day 46 in both groups (SALINE and MORPHINE).

** $p < 0.02$, * $p < 0.05$, significant difference with respect to pre-conditioning session of the same group (MORPHINE) and with respect to the SALINE group in the same day.

It is assumed that the CPP paradigm reflects the conditioned reward induced by the drugs and their liability of abuse (11, 12, 13). In agreement with this idea, the administration of 40 mg/kg morphine causes CPP, an effect that has been repeatedly reported (8). The duration of morphine-induced CPP found in the present study coincides with those reported by Tzschentke and Schmidt (9) in rats, who observed that this effect of morphine persists until 12 days post-conditioning but has disappeared 28 days afterwards. Once the conditioned effect of morphine has disappeared, we have observed that a non-contingent re-exposure to the drug (an injection in the home cage) causes an increase in the time spent in the initially nonpreferred compartment in the animals conditioned with morphine in this compartment, suggesting the reinstatement of CPP. These results are in agreement with those obtained in works studying relapse with the reinstatement paradigm of drug self-administration, which shows that a powerful trigger of relapse is an experimenter-delivered priming injection of the self-administered drug after extinction from drug self-administration (3, 4, 6, 7).

Recently, it has come to our knowledge that three other independent laboratories (14, 15, 16) have tested the possibility that the CPP paradigm can be used as a model for relapse of drug use. All of these studies, performed in rats, demonstrate that a priming injection of the drug can reinstate the previously extinguished CPP induced by morphine and cocaine. Moreover, the exposition to stress can also reinstate CPP (16). These results and those obtained in the present study suggested that the CPP paradigm might be an alternative to the intravenous self-administration procedure as an animal model of relapse in rats and mice.

In the CPP paradigm several neutral environmental stimuli (cues) acquire a positive valence or salience through the pairing with the rewarding effects of the drug. After the extinction of CPP, the reinstatement of this behaviour following a priming injection of the drug could be explained as a "renovation" or "restauration" of the significance or attractiveness of the drug-paired environmental stimuli that lead the animal to approach and stay in the presence of those cues. Moreover, the approach behaviour could reflect a reinstatement of craving that again leads the animal to look for those environmental stimuli

associated with the presence of the drug. Following Mueller and Stewart (14) the priming injection "reminds" the animal of the significance of those cues previously paired with the drug.

In conclusion, the results obtained in this study are the first step and stimulate the initiation of more studies to evaluate the effects of stress and drug-associated stimuli on reinstatement of the extinguished CPP, among other variables, to establish the usefulness of this paradigm in the study of the relapse to opiates in mice.

This work was supported by grant PB98-1497 from Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica, Ministerio de Educación y Cultura, Spain.

REFERENCES

1. Carroll ME, Comer SD. Animal models of relapse. *Exp Clin Psychopharmacol* 1996; 1:11-18.
2. Self DW, Nestler EJ. Relapse to drug-seeking: neural and molecular mechanisms. *Drug Alcohol Dependence* 1998; 51:49-60.
3. Ettenberg A, MacConell LA, Geist TD. Effects of haloperidol in a response-reinstatement model of heroin relapse. *Psychopharmacology* 1996; 124:205-210.
4. Shaham Y, Stewart J. Effects of opioid and dopamine receptor antagonists on relapse induced by stress and re-exposure to heroin in rats. *Psychopharmacology* 1996; 125:385-391.
5. McFarland K, Ettenberg A. Reinstatement of drug-seeking behavior produced by heroin-predictive environmental stimuli. *Psychopharmacology* 1997; 131:86-92.
6. De Vries TJ, Schoffelmeer ANM, Binnekade R, Mulder AH, Vanderschuren LJMJ. Drug-induced reinstatement of heroin- and cocaine- seeking behaviour following long-term extinction is associated with expression of behavioural sensitization. *Eur J Neurosci* 1998; 10:3565-3571.
7. Shaham Y, Erb S, Leung S, Buczek Y, Stewart J. CP-154,526, a selective, non-peptide antagonist of the corticotrophin-releasing factor1 receptor attenuates stress-induced relapse to drug seeking in cocaine- and heroin-trained rats. *Psychopharmacology* 1998; 137:184-190.
8. Tzschentke TM. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a

comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Progress Neurobiol* 1998; 56:613-672.

9. Tzschentke TM, Schmidt WJ. N-Methyl-D-aspartic acid-receptor antagonists block morphine-induced conditioned place preference in rats. *Neurosci Letters* 1995; 193:37-40.

10. Acquas E, Carboni E, Leone P, Di Chiara G. SCH 23390 blocks drug-conditioned place-preference and place aversion: anhedonia (lack of reward) or apathy (lack of motivation) after dopamine receptor blockade? *Psychopharmacology* 1989; 99:151-155.

11. Di Chiara G. Psychobiology of the role of DA in drug abuse and addiction. *Neurosci Res Com* 1995; 17: 133-143.

12. Di Chiara G. Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *Eur J Pharmacol* 1999; 375:13-30.

13. McBride WJ, Murphy JM, Ikemoto S. Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behav Brain Res* 1999; 101:129-152.

14. Mueller D, Stewart J. Cocaine-induced conditioned place preference: reinstatement by priming injections of cocaine after extinction. *Behav Brain Res* 2000; 115: 39-47.

15. Parker LA, McDonald RV. Reinstatement of both a conditioned place preference and a conditioned place aversion with drug primes. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 66: 559-561.

16. Wang B, Luo F, Zhang W-T, Han J-S. Stress or drug priming induces reinstatement of extinguished conditioned place preference. *NeuroReport* 11: 2781-2784.

