

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA

FERNANDA LIBARDI GALESÍ

CONTROLE DE ESTÍMULOS E RESPOSTAS AO ESTRESSE NO MODELO DE RECAÍDA
AO ÁLCOOL *CUE-INDUCED*

São Paulo

2014

FERNANDA LIBARDI GALESÍ

CONTROLE DE ESTÍMULOS E RESPOSTAS AO ESTRESSE NO MODELO DE RECAÍDA
AO ÁLCOOL *CUE-INDUCED*

Versão corrigida

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Psicologia.

Área de concentração: Psicologia Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Miriam Garcia Mijares

São Paulo

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação

Biblioteca Dante Moreira Leite

Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Galesi, Fernanda Libardi .

Controle de estímulos e respostas ao estresse no modelo de recaída ao álcool *cue-induced* / Fernanda Libardi Galesi; orientadora Miriam Garcia Mijares. -- São Paulo, 2014.

97 f.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Psicologia Experimental) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Modelo animal 2. Recaída 3. Álcool 4. Estresse 5. Controle de estímulos I. Título.

HV4915

Fernanda Libardi Galesi

Controle de estímulos e respostas ao estresse no modelo de recaída ao álcool *cue-induced*

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Psicologia.
Área de Concentração: Psicologia Experimental.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, René e Luisa, por terem plantado a sementinha da pesquisa dentro de mim e por todo amor e carinho.

À Prof.^a Dr.^a Miriam Garcia Mijares pelos anos de ensinamentos e amizade. Por ter sido a grande responsável pela minha formação como pesquisadora e por ter me dado o privilégio de ser a sua primeira orientanda.

Ao Prof. Dr. Roberto Ciccocioppo por ser um exemplo de pesquisador e por ter me dado a chance de trabalhar em um laboratório de excelência em farmacologia.

Ao Prof. Dr. Júlio de Rose por ter sido o meu primeiro orientador, por ter me despertado para a análise do comportamento e para a pesquisa.

Às queridas alunas de iniciação científica Raquel e Raíssa. Obrigada por terem tornado a rotina de coleta mais fácil e por terem me dado a chance de participar da formação de vocês. Sem vocês esse doutorado não teria sido possível.

À todos os companheiros de laboratório Ana Torres (a primeira companheira), Fábio Leyser, Liane Dahás, Anderson, William, Yulla, Hernando, Fernanda Pezzato, Talita, Marina e Gabriela, muito obrigada pelos anos de convivência, colaboração e amizade. Vocês fizeram esses anos de pesquisa mais gostosos.

Aos colegas italianos Marsida, Giordano, Massimo, Serena, Laura, Giulia, Esi, Hung Wo e Lydia. Obrigada por terem feito os meus meses na Itália deliciosos, além de terem tido a paciência de me explicar tudo em inglês ou de se esforçarem para entender o meu italiano rudimentar.

Às amigas, irmãs, conselheiras e companheiras, Ariene e Liane. Obrigada por tudo! Vocês são muito mais do que uma família para mim aqui em São Paulo.

Ao Lucas, pelo amor, carinho e companherismo que me deram o alicerce que eu precisava para terminar o doutorado. Por sempre trazer paz à minha vida e ser meu porto-seguro.

Aos meus amigos queridos que os anos de doutorado me trouxeram Taty Porto, Rafael Modenesi, Heloísa Campos e Clarissa Pereira. Obrigada pelas risadas, pelos cafés e por todas as conversas de corredor.

Ao Lucas, pelo amor, carinho e companherismo que me deram o alicerce que eu precisava para terminar o doutorado. Por sempre trazer paz à minha vida e ser meu porto-seguro.

À minha irmã Soraya, que me acolheu no momento mais importante do meu doutorado. Sem você eu nunca teria ido pra Itália.

À Karine, amiga-irmã desde que eu me conheço por gente. Obrigada por mesmo tão longe se fazer tão presente.

À todos os funcionários da USP e da UNICAM que me deram o suporte necessário para que as coletas fossem realizadas. Obrigada especial à Rina que, além de ter toda a paciência do mundo comigo, fazia mímicas para eu entender o que eu precisava fazer com os ratos na Itália.

GALESI, F. L. **Controle de estímulos e respostas ao estresse no modelo de recaída ao álcool *cue-induced***. 2014. 95 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O modelo de recaída *cue-induced* é comumente utilizado para o estudo da recaída ao uso de drogas causada pela exposição dos animais à estímulos ambientais previamente associados à droga. Quando o álcool é a droga a ser estudada, um estímulo contextual (S) e um reforçador condicionado (Sr) são os estímulo frequentemente associados ao seu consumo. Embora esse modelo seja consolidado na área, sua validade de constructo vem sendo criticada; entre essas críticas estão o fato de que apenas o Sr adquire controle sobre a resposta de procura pela droga, além de que pouco se sabe sobre os sistemas neurais envolvidos nessa recaída. Portanto, este trabalho teve como objetivo principal avaliar o papel dos processos operantes no procedimento do modelo de recaída ao uso de álcool *cue-induced*, além de avaliar a participação de sistemas neurais ligados ao estresse nessa recaída. Ainda, este trabalho teve como objetivo melhorar o procedimento desse modelo animal. Os experimentos apresentados no Capítulo 1 tiveram como objetivo melhorar o controle exercido por S sobre a recaída, aprimorando o modelo, além de avaliar processos de aprendizagem associativa que ocorrem nesse modelo. Dois experimentos foram realizados para atingir esses objetivos. No primeiro, dois grupos de ratos foram treinados no modelo *cue-induced*, porém um grupo foi treinado sob o esquema de razão fixa 1 (FR1) e o outro sob o esquema de razão variável 5 (VR5). No segundo experimento, os ratos foram treinados nesse modelo, porém os estímulos S e Sr foram apresentados separadamente na fase de treino. Os resultados desses experimentos indicaram que o treino separado foi eficaz em melhorar o controle de S sobre a recaída e que a troca de esquema de reforço não foi eficaz para aumentar esse controle. Os resultados também mostraram que quando os estímulo são treinados em conjunto o Sr sombreia o S e quando eles são treinados separadamente e testados como um composto ocorre somação. Os experimentos apresentados no Capítulo 2 tiveram o objetivo de avaliar se eixos neurais ligados à resposta ao estresse estariam envolvidos na recaída mimetizada pelo modelo *cue-induced*. Ratos Marchigian Sardinian Preferring (msP) e Wistars foram treinados no modelo *cue-induced* e, na fase de testes, Antalarmin, Metirapona e corticosterona (CORT) foram injetados i.p. nos animais. Os resultados mostraram que o Antalarmin (dose 20 mg/kg) bloqueou a recaída em ambas as cepas, que a Metirapona (doses 50 mg/kg e 100 mg/kg) bloqueou a recaída nos ratos msP e apenas a dose de 100 mg/kg bloqueou a recaída nos ratos Wistars e que a CORT não teve efeito na em nenhuma das cepas. Esses resultados mostraram o procedimento do modelo de recaída *cue-induced* pode ser aprimorado principalmente no que tange ao controle do S sobre a recaída. Os resultados também mostraram que respostas ao estresse influenciam a recaída observada nesse modelo.

Palavras-chave: modelo animal, recaída, álcool, stress, controle de estímulos

GALESI, F. L. **Stimulus control and stress responses in the cue-induced model**. 2014. 95 f. Thesis (Doctoral) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The cue-induced relapse model is a model commonly used to study relapse caused by environmental stimuli. In its procedure, the environmental stimuli are usually a contextual stimulus (S) and a conditioned reinforcer (Sr). Although this model is extensively used its construct validity has been criticized. Between these critics are the fact that only the Sr controls the drug seeking responses because this stimulus overshadows the S, in addition to the fact that little is known about the neural systems that are involved in cue-induced relapse. Therefore, this work had as main purpose to evaluate operant process in the alcohol cue-induced relapse and evaluate the role of stress neural systems in this relapse. In addition, this work had also the purpose to improve the animal model procedure. The experiments presented in Chapter 1 had the purpose to increase the control exercised by S over relapse and to evaluate associative learned in this model procedure. Two experiments were conducted to achieve this goal. In the first one two groups of rats were trained in the cue-induced relapse model but one group was trained under the fixed ratio 1 (FR1) and the other under the variable ratio 5 schedule (VR5). In the second experiment, rats were trained in the cue-induced procedure, but the stimuli S and Sr were presented separately during the training phase. The results showed that separate training was effective in increase the S control over relapse and that changing the schedule of reinforcement was not effective in increase this control. Also, results showed that summation occurred when the stimuli are trained separately and tested as a compound. The experiments presented in Chapter 2 had the purpose to evaluate if neural axis related to organic stress responses are involved in cue-induced alcohol relapse. Also, it was investigated if the HPA is involved in relapse. Marchigian Sardinian Preferring (msP) rats and Wistars rats were trained in the cue-induced model and during the test phase Antalarmin, Metyrapone and corticosterone (CORT) were injected i.p. in the animals. The results showed that Antalarmin (dose 20 mg/kg) blocked relapse produced by environmental cues in both rats strains, Metyrapone (doses 50 mg/kg and 100 mg/kg) blocked relapse in msP rats and only dose 100 mg/kg blocked relapse in Wistar rats and CORT had no effect on relapse in both strains. These results showed that the procedure used in the cue-induced model can be improved mainly in regard to the control from S over relapse. The results also showed that stress responses influence relapse in this model.

Key words: animal model, alcohol, relapse, stress, stimuli control

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1**Artigo**

Tabela 1 Alcohol solutions concentration and period of administration during the alcohol self-administration phase.....	36
--	----

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1**Artigo**

Figura 1 Figure 1 – The data represents the average (mean \pm SEM) of responses and reinforcements at the last training sessions of both training contingencies for group VR5 and group FR1.	40
Figura 2 The data represents the average (mean \pm SEM) of responses in the last three extinction sessions (EXT) and each reinstatement session of the animals from groups VR5 and FR1.....	41
Figura 3 The data represents the average (mean \pm SEM) of responses in the last training session of each contingency.....	44
Figura 4 The data represents the average (mean \pm SEM) of responses emitted in the last three extinction sessions (EXT) and each reinstatement session.....	45

Capítulo 2

Figura 1 Ilustração do funcionamento do eixo HPA quando ele é estimulado por um evento estressante.....	51
--	----

Artigo

Figura 1 Effect of Antalarmin on cue-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior in Wistar and msP rats.....	70
Figura 2 Effect of Metyrapone on cue-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior in Wistar and msP rats.....	72

Figura 3 Effect of corticosterone on cue-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior in Wistar and msP rats.....	73
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 MODELOS ANIMAIS DE RECAÍDA AO USO DE ÁLCOOL.....	18
1.2 VALIDADE EXPERIMENTAL DO MODELO <i>CUE-INDUCED</i>	21
2 CAPÍTULO 1 – CONTROLE DE ESTÍMULOS E O MODELO DE RECAÍDA AO USO DE DROGAS <i>CUE-INDUCED</i>	27
2.1 ARTIGO 1 - ASSOCIATIVE LEARNING AND THE CUE-INDUCED RELAPSE MODEL.....	30
3 CAPÍTULO 2 – RESPOSTAS AO ESTRESSE E O MODELO DE RECAÍDA <i>CUE-INDUCED</i>	50
3.1 NEUROFISIOLOGIA DO ESTRESSE	50
3.2 O PAPEL DO ESTRESSE NA DEPENDÊNCIA DE ÁLCOOL.....	52
3.3 ARTIGO 2 - THE ROLE OF CRF STRESS SYSTEM IN THE CUE-INDUCED RELAPSE FOR ALCOHOL	61
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
5 REFERÊNCIAS	79

Consumir drogas psicoativas é um costume muito antigo da humanidade. Como grande parte das drogas provém de plantas, elas foram descobertas muito cedo pelas culturas mais primitivas e eram, geralmente, usadas em rituais sagrados (McKim, 2006). No entanto, atualmente as drogas são em sua minoria consumidas em rituais religiosos e seu consumo é realizado largamente por todas as classes sociais.

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais- IV (DSM-IV) a dependência de drogas é considerada um padrão mal-adaptativo do uso de substâncias psicoativas, levando a um prejuízo ou sofrimento significativos na vida do indivíduo. Dentro os critérios do DSM-IV para diagnóstico da dependência estão a presença de maior tolerância ao uso da droga e de sintomas de abstinência com a sua retirada, além de consumo da droga em maior quantidade ou por um período maior que o desejado, esforços mal sucedidos de retirar a droga, gasto de muito tempo em atividades necessários para obtenção e consumo da droga, prejuízos significativos das atividades sociais, ocupacionais ou recreativas e uso da substância a despeito dos prejuízos físicos, psicológicos e sociais (American Psychiatric Association, 2000).

Apesar do tratamento da dependência ter várias etapas, uma das mais importantes é evitar a recaída – emissão de comportamentos que tenham como consequência a obtenção e o consumo da droga mesmo após a desintoxicação e a abstinência. A prevenção à recaída se tornou importante à medida que foi sendo observado que apenas deixar o indivíduo abstinente não era suficiente para que ele interrompesse o uso da droga (Bachteler, Economidou, Danysz, Ciccocioppo, & Spanagel, 2005; Ciccocioppo, Sanna, & Weiss, 2001; Epstein, Preston, Stewart, & Shaham, 2006; O'Brien, Childress, Ehrman, & Robbins, 1998; Psiquiatria, 1994; Woody, McLellan, & O'Brien, 1990; Zironi, Burattini, Aicardi, & Janak, 2006).

Dentre os processos responsáveis pela recaída ao uso de drogas, estão respostas aprendidas (eliciadas e evocadas) por estímulos anteriormente associados ao seu consumo. Ou seja, tanto associações respondentes entre a droga e estímulos ambientais contingentes ao seu consumo, quanto processos de controle de estímulos estão profundamente relacionados com a recaída ao uso de drogas (Conklin & Tiffany, 2002; Koob, 2010; Siegel, 1979, 1983).

Um dos pioneiros a estudar como os comportamentos respondentes envolvidos na síndrome de abstinência, na fissura (forte desejo de usar a droga), na tolerância e, portanto, na recaída ao uso de drogas foi Shepard Siegel. De acordo com Siegel e cols. (Siegel, 1977, 1979, 1983, 1984; Siegel & Allan, 1998; Siegel, Hinson, Krank & McCully, 1982) a droga possui dois efeitos incondicionados no organismo: o seu efeito direto e a ativação das respostas de homeostase do organismo. Quando estímulos ambientais são apresentados contingentes ao consumo da droga eles tornam-se estímulos condicionados, não do efeito da droga, mas sim das respostas compensatórias de homeostase. Por exemplo, quando um indivíduo usa cocaína sempre na presença de uma nota de um dólar, a droga elicia respostas incondicionadas de taquicardia que, por sua vez, eliciam respostas compensatórias incondicionadas de bradicardia. É a essa resposta de bradicardia que a nota de dólar apresentada contingente ao uso da droga será condicionada. Portanto, após várias apresentações seguidas, a mera visão da nota de dólar já causará bradicardia no usuário de cocaína.

Siegel e Allan (1998) chamam esse processo de condicionamento de respostas compensatórias (CCRs). De acordo com os autores, essas CCRs atenuam o efeito da droga e contribuem para a tolerância – a diminuição nos efeitos iniciais da droga ao longo de sucessivas administrações. Com a atenuação dos efeitos da droga torna-se necessário uma dose cada vez maior da droga para que o usuário possa ter o efeito inicial. De acordo com Siegel (1979), um usuário de heroína pode chegar a consumir uma dose até cem vezes maior daquela utilizada inicialmente. Além da tolerância, a síndrome de abstinência e a fissura também podem ser explicadas pelo condicionamento de respostas compensatórias, pois quando os estímulos que antes eram contingentes ao consumo da droga (CSs) são apresentados, eles eliciam as respostas compensatórias condicionadas, sem que a droga seja administrada, causando assim a síndrome de abstinência e a fissura.

Ainda tratando-se dos comportamentos respondentes subjacentes à dependência de drogas, Robinson e Berridge (1993, 2001) propuseram um modelo teórico chamado de “Sensibilização do Incentivo”. Nesse modelo os autores propõe que no condicionamento respondente de estímulos contingentes ao uso da droga (CSs), ocorrem neuro-modulações no cérebro (sensibilização) e, em consequência disso, os indivíduos ficam mais sensíveis a efeitos da droga e aos estímulos associados a ela, que se tornam mais “salientes” (maior

grau de controle do estímulo sobre o comportamento). Tornando, portanto, os indivíduos mais suscetíveis a usarem a droga e mais sensíveis à recaída.

É importante notar que, embora a teoria de Robinson e Berridge (1993, 2001) não compreenda a parte operante da dependência, eles estão assumindo em seu modelo que um processo respondente está influenciando a emissão de um operante já que a exposição a estímulos que estariam mais “salientes” poderia aumentar a probabilidade de emissão de um operante.

Dentre os aspectos operantes da dependência de drogas estão os processos de controle de estímulos. Os estímulos que antecedem a resposta exercem um papel importante no controle do comportamento já que eles podem sinalizar para o organismo que, se a resposta for emitida na presença daquele estímulo, aumenta a probabilidade dela ser reforçada. As discriminações podem ser simples ou condicionais. Nas discriminações simples, como no exemplo acima, um estímulo discriminativo (SD ou S+) sinaliza para o organismo que se a resposta for emitida naquela ocasião, maior é a chance dela ser reforçada.

No entanto, as discriminações simples podem ser efetivas em algumas ocasiões, mas não serem em outras. Ou seja, para que o estímulo discriminativo seja eficaz pode ser necessário a presença de um outro estímulo que forneça o contexto em que ele será eficaz, a esse estímulo damos o nome de estímulo condicional e a essas discriminações formadas pelas relações entre estímulos, denominamos de discriminações condicionais. Por exemplo, estar no bar pode ser um estímulo discriminativo que aumente a probabilidade de emissão da minha resposta de pedir uma bebida. No entanto, pode haver um estímulo condicional como o fato de ser segunda-feira e eu ter que trabalhar no dia seguinte. Portanto, estar no bar só aumenta a probabilidade de eu emitir respostas de pedir uma bebida se eu estiver no bar na sexta-feira ou no sábado. Desta forma, o dia da semana seria um estímulo condicional.

Quando um estímulo adquire a função de estímulo discriminativo, ele torna-se também um reforçador condicionado (Sr), isto é, se ele for apresentado como consequência para uma respostas, ele aumentará a probabilidade dessa resposta ser emitida novamente (Sério, Andery, Micheletto & Gioia, 2002, p. 45). Como ocorre com qualquer outro comportamento, na dependência de drogas também há uma cadeia de

respostas até o reforçador final que é a droga e, portanto, vários estímulos discriminativos de algumas respostas tornam-se reforçadores condicionados de outras respostas. Assim, quando eu vou beber no bar o copo de bebida, o cheiro da bebida, o gosto da bebida, entre outros são todos estímulos discriminativos e reforçadores condicionados que fazem parte da cadeia de consumir álcool.

Embora os comportamentos operantes e respondentes tenham sido separados na explicação acima, é impossível separar um do outro na recaída ao uso de drogas. Da mesma forma que a visão da seringa é um CS pois é contingente ao uso da heroína, ela também é um SD para injetar a seringa no braço que terá como consequência a sensação de prazer causa pela droga no organismo. Além disso, se a visão da seringa se tornou um CS, quando ela ocorre ela deve iniciar a fissura. Como o desconforto causado pela fissura é, em geral, muito grande aumenta-se a probabilidade do adicto emitir respostas que possam resultar na obtenção e consumo da droga já que a sua ingestão age também como um reforçador negativo, pois atenua ou elimina esse desconforto (Conklin & Tiffany, 2002; Koob, 2010; Siegel, 1979, 1983).

Um procedimento, chamado de *Pavlovian-to-Instrumental Transfer* (PIT), têm sido muito utilizado para o estudo dessa interação entre respondentes e operantes na dependência de drogas. Em um procedimento típico de PIT, respostas dos animais em um *operandum* são seguidas pela apresentação de um estímulo (luz ou som) e pela disponibilidade da droga. Uma vez estabelecido esse comportamento, a droga é substituída por um veículo, o estímulo é retirado e é realizada a extinção da resposta treinada. Em seguida, o estímulo é reintroduzido, ainda em situação de extinção, e é verificado se há aumento da resposta em relação à extinção. O aumento da taxa de respostas é explicado pela função de reforçador condicionado adquirida pelo estímulo durante o treino da autoadministração da droga (Carroll & Comer, 1996).

O procedimento do PIT se assemelha muito à “desvalorização” estudada por Rescorla e colaboradores (Colwill & Rescorla, 1985; Holland & Rescorla, 1975). Em um procedimento típico utilizado para produzir “desvalorização”, ratos são treinados a pressionar a barra e recebem comida como consequência. Após esse treino, os animais são colocados na mesma caixa operante, porém, a barra é retirada e a comida continuou a ser liberada. Imediatamente após essa sessão os animais recebem injeções de cloreto de

lítico – substância nauseante que condicionou uma aversão à comida com a qual foi pareada. No dia seguinte, os animais são colocados novamente na caixa operante com a barra novamente acessível. O principal achado dos experimentos de “desvalorização” foi que a taxa de resposta dos animais caiu, embora a pressão à barra tivesse sido previamente pareada com a liberação de comida (Colwill & Rescorla, 1985). De acordo com os autores, esses dados revelam que associações resposta-reforçador (R-SR) efetivamente ocorrem no treino operante dado que as manipulações respondentes alteram o valor do estímulo reforçador causando diminuição na taxa de resposta, o que não aconteceria se associações R-SR não fossem estabelecidas na aprendizagem operante.

De fato, os experimentos que utilizam o PIT têm mostrado, com drogas, o fenômeno que Rescorla e colaboradores (Colwill & Rescorla, 1985; Holland & Rescorla, 1975) já haviam mostrado com comida: que associações respondentes entre a droga e os estímulos ambientais contingentes a ela podem alterar a probabilidade de emissão de um operante. Além disso, é importante notar que o procedimento de PIT pode estar mimetizando a recaída, pois, no procedimento descrito, a apresentação dos estímulos pareados com a droga após a extinção aumenta a emissão de respostas de procura por ela.

Donahoe e Palmer (1994) propuseram uma explicação sobre como os condicionamentos operante e respondente interagem no “princípio unificado do reforço”. De acordo com os autores, os condicionamentos operante e respondente não seriam processos distintos, como proposto por Skinner (1981). Para Donahoe e Palmer, os dois condicionamentos são produtos da seleção operada pelo reforço – chamado por eles de US – sobre eventos antecedentes, ou seja, é a mesma seleção que opera sobre os dois condicionamentos. Segundo o princípio unificado do reforço, um evento biologicamente relevante (US) seleciona as variações anteriores a ele, quer sejam variações ambientais (respondente), quer sejam variações de resposta (operante). Se o US seleciona eventos antecedentes, ele poderia selecionar ao mesmo tempo variações ambientais e variações de resposta. Dessa forma, no caso do PIT, a droga estaria selecionando ao mesmo tempo a luz (variação ambiental) e a pressão à barra (variação de resposta).

Somando as teorias de Siegel e de Donahoe e Palmer podemos supor que, durante o treino de PIT, ocorrem associações respondentes entre a luz (CS) e as respostas compensatórias do organismo à ingestão da droga. Além disso, no PIT o rato também

aprendeu que as respostas de pressão à barra tem a droga como consequência. Diante disso, podemos presumir que, quando a luz é apresentada na fase de testes, ela elicia respostas compensatórias (fissura) e, portanto, aumenta a probabilidade de emissão de respostas que acabem com o desconforto da fissura que são as respostas de pressão à barra (busca pela droga). Desta forma, o procedimento de PIT é um procedimento que além de mostrar como os comportamentos operante e respondente interagem, também mostra um dos mecanismos que leva à recaída ao uso de drogas.

MODELOS ANIMAIS DE RECAÍDA AO USO DE ÁLCOOL

Entre as drogas que causam dependência uma das mais comuns e que acarreta maiores prejuízos é o álcool (McKim, 2006). De acordo com o Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (Cebrid) cerca de 5% a 10% da população adulta brasileira é dependente do álcool (Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, 2005).

Quando aborda-se a recaída ao uso de álcool, existem três variáveis que têm sido apontadas como as principais causas da recaída: o consumo de uma pequena quantidade de álcool, a exposição a eventos estressantes e a exposição a estímulos ambientais anteriormente associados ao consumo de álcool (Le et al., 1998; Ciccocioppo, Lin, Martin-Fardon & Weiss, 2003; Liu & Weiss, 2002; para revisão ver Sanchis-Segura & Spanagel, 2006). Para o estudo dessas três variáveis foram criados três modelos animais com o objetivo de avaliar a recaída causada por cada uma delas: o modelo *priming-injection*, que mimetiza o efeito da ingestão de uma pequena dose da droga na recaída, o modelo de *stress*, que investiga o papel da exposição a estímulos estressantes na recaída, e o modelo *cue-induced*, que investiga o papel de estímulos ambientais na recaída, e tem um procedimento muito semelhante ao PIT (Epstein & Preston, 2003; Sanchis-Segura & Spanagel, 2006).

Modelo de estresse

O modelo animal de recaída pelo *estresse* tem como principal objetivo mimetizar o papel da exposição a eventos estressantes na recaída ao uso de álcool. Nesse modelo os

animais primeiramente passam por um treino onde aprendem a pressionar a barra da caixa operante e tem como consequência a liberação da solução de álcool. Em seguida passam por uma fase de extinção da resposta de pressão à barra e, posteriormente, os animais são expostos a um evento estressante (em geral, choque na pata). Após a exposição ao evento estressante, observa-se que os animais voltam a emitir as respostas de pressão à barra, apesar delas já não terem mais como consequência a solução de álcool. Essas respostas são consideradas respostas de procura pelo álcool e indicativas de que a exposição ao evento estressante levou à recaída (Liu & Weiss, 2003; Mason, Shaham, Weiss, & Le, 2009; Sanchis-Segura & Spanagel, 2006).

Modelo priming-injection

Esse modelo animal tem como principal objetivo mimetizar o papel do “primeiro gole” na recaída. Assim como nos outros modelos, nesse modelo ratos são treinados a consumir álcool e posteriormente são treinados a pressionar a barra da caixa operante e tem a liberação de uma solução de álcool como consequência. Após essa resposta ter sido estabelecida ela é colocada em extinção, ou seja, os animais são colocados na caixa operante, porém não há consequência para a resposta de pressão à barra. Em seguida, os animais recebem uma pequena quantidade de álcool, em geral por gavagem, e são colocados na caixa operante. O que observa-se é que os animais retornam a pressionar a barra, apesar dessa resposta não ter mais a solução de álcool como consequência (Le et al., 1998).

Modelo cue-induced¹

Existem muitas variações do modelo de recaída *cue-induced*, mas uma das mais usadas é chamada de “*contextual model*” (Weiss, 2010). Esse modelo tem um procedimento muito parecido com o procedimento apresentado anteriormente do PIT, pois nesse procedimento também há um respondente aumentando a probabilidade de um

¹ A tradução correta do nome desse modelo animal seria “modelo de indução pela dica”, nome que não condiz com o vocabulário de análise do comportamento. Como traduzir ele para os termos comportamentais desconfiguraria muito o nome do modelo já muito utilizado na área, optou-se aqui por não traduzir o termo, assim como é feito no *Chronic Mild Stress*.

operante.

Nesse modelo os animais são treinados a responder diferencialmente a duas situações de treino, cada uma sinalizada por um estímulo contextual diferente. Desta forma, numa contingência as respostas de pressão à barra, sob algum esquema de razão, na presença de um estímulo contextual (S1) têm como consequência a apresentação de um reforçador condicionado (Sr1) e a liberação de uma solução de álcool (SR1). Na outra contingência, pressões à barra, também sob algum esquema de razão, na presença de outro estímulo contextual (S2) têm como consequência a apresentação de outro reforçador condicionado (Sr2) e a liberação de água (SR2). Em seguida, é realizada a fase de extinção, onde a resposta de pressão à barra é colocada em extinção na ausência dos estímulos utilizados no treino. Após a fase de extinção os animais são submetidos à fase de testes, chamada de teste de reinstalação², na qual as condições da fase de treino são reintroduzidas, então as respostas de pressão à barra na presença do S1 têm como consequência a apresentação de Sr1 e as respostas de pressão à barra na presença do S2 têm como consequência a apresentação de Sr2, porém os reforçadores primários (álcool ou água) não são liberados. Nessa última fase, se os animais respondem na presença de S1 e Sr1, mas não na presença de S2 e Sr2, é considerado que os animais retornaram a emitir comportamentos de procura pela droga³ contingentes à apresentação dos estímulos ambientais (Bachteler, et al., 2005; Cannella et al., 2009; Ciccocioppo, Angeletti & Weiss, 2001; Ciccocioppo et al., 2003; Ciccocioppo, et al., 2004; Stopponi et al, 2011; Vengeliene, Heidbreder & Spanagel, 2007, para revisão ver Sanchis-Segura & Spanagel, 2006; Weiss, 2010).

² Como será discutido a seguir, o nome “reinstalação” não é muito apropriado para essa fase. Como a fase de extinção é feita na ausência dos estímulos utilizados no treino, a classe de respostas de procura pela droga na presença dos estímulos ambientais não está sendo “reinstalada” já que ela nunca foi extinta. Apesar disso, esse é um termo muito difundido na área e será utilizado nesse trabalho.

³ Alguns autores argumentam que, o que o modelo *cue-induced* mimetiza não é a recaída em si, mas sim a retomada da resposta de procura pela droga (*drug seeking*) (Sanchis-Segura & Spanagel, 2006; Weiss, 2010). Como essa posição não é consenso na área, a grande maioria dos autores utiliza o termo “recaída” como sinônimo dessa retomada da resposta de procura pela droga, assim como será feito neste trabalho.

VALIDADE EXPERIMENTAL DO MODELO *CUE-INDUCED*

Um modelo animal efetivo em mimetizar os transtornos mentais e em rastrear medicações para tratá-los requer que as contingências específicas que mantêm o comportamento em estudo controlem “desempenhos específicos comuns ao homem e ao animal, de maneira que possamos reconhecer a forma e a função do comportamento” (Guerra & Silva, 2002). Isso significa que deve haver uma similaridade do processo básico que determina os comportamentos animal e humano; e é esta similaridade que irá determinar a validade dos procedimentos experimentais usados como modelos do comportamento humano no laboratório.

Willner (1991) propõe o uso de três critérios para avaliar a validade dos modelos animais. O primeiro critério – chamado de validade nominal ou de face – postula que a topografia da resposta que o animal deve emitir na situação de laboratório seja similar à topografia da resposta que o ser humano apresenta na condição a ser mimetizada. Isto é, a validade de face requer que o modelo animal produza os mesmos “sintomas” no animal. No caso de um modelo animal de recaída, esse modelo deve produzir recaída nos animais.

O segundo critério proposto por Willner (1991) é a validade preditiva. Ela estabelece que haja um isomorfismo farmacológico entre o modelo animal e o transtorno mental, ou seja, que as manipulações farmacológicas que produzem alterações no comportamento humano a ser modelado também produzam alterações no comportamento dos animais. Desta forma, medicamentos que diminuem a recaída em ratos também devem diminuir a recaída em humanos.

O terceiro e último critério – a validade de construto – estabelece que deve haver similaridade entre o processo básico (etiologia) que determina os comportamentos animal e humano. Isto é, o transtorno que está sendo modelado deve ter as mesmas bases empíricas e teóricas que o transtorno a ser modelado. Este critério é o mais difícil de ser alcançado na medida em que muitos transtornos mentais não têm a sua etiologia bem definida (Sanchis-Segura & Spanagel, 2006; Sinha, 2013).

É importante lembrar que, apesar dos critérios propostos por Willner (1991) serem fundamentais para o estabelecimento de um bom modelo animal e serem muito

utilizados como medida de avaliação dos modelos animais, é muito difícil que todos eles sejam atingidos já que alguns comportamentos que podem estar alterados em um transtorno mental são muito complexos para serem mimetizados num modelo animal.

A validade do modelo animal de recaída *cue-induced* é controversa já que modelo tem recebido críticas e defesas em praticamente todos os tipos de validade experimental (Epstein & Preston, 2003; Sanchis-Segura & Spanagel, 2006; Spanagel, 2000; Weiss, 2010). Em geral, as análises feitas acerca do modelo compreendem o modelo como um todo e não as variações do modelo quando ele é utilizado para o estudo do álcool como droga de abuso.

Aqui será realizada a análise deste modelo animal apenas quando o procedimento do modelo é utilizado para estudar os comportamentos e aspectos fisiológicos relacionados ao uso, abuso e adicção ao álcool. É importante fazer essa distinção já que o uso de odores como estímulos contextuais e de reforçadores condicionados durante o treino é peculiar do procedimento desse modelo apenas quando o álcool é o estímulo reforçador.

Os autores concordam que o modelo tem uma boa validade de face, na medida em que o modelo consegue reproduzir em laboratório: a) a recaída por estímulos ambientais; e b) é consistente com os achados de laboratório com humanos que mostram que os estímulos associados ao uso de álcool como latas de bebidas, bares, cigarros, entre outros, podem provocar a recaída (Epstein *et al.*, 2006; Sinha, 2013).

Porém, Sanchis-Segura e Spanagel (2006) e Weiss (2010) lembram que a recaída ao uso de álcool em humanos se caracteriza pelo consumo da droga e não apenas pela procura por esta. Já no modelo animal, a fase de testes é feita sem a droga, fato que, segundo os autores, pode mostrar que este modelo mimetiza bem a procura pela droga ou “*drug seeking*” e não a recaída em si. De fato, nos humanos o retorno à procura da droga é reforçado pelo consumo da droga já que, para haver recaída, o indivíduo deve voltar a consumir a droga. Entretanto, nesse modelo animal, para que o efeito da exposição aos estímulos ambientais possa ser analisado sem a intervenção dos efeitos comportamentais e fisiológicos do álcool (por exemplo, o efeito reforçador da droga), é importante que os testes sejam feitos em extinção.

Outro problema com a validade de face indicado por Sanchis-Segura e Spanagel

(2006) e Weiss (2010) é a fase de extinção que é implementada pelo modelo. Segundo os autores, quando os alcoolistas param de beber, eles dificilmente passam por um processo de extinção dos estímulos ambientais pareados ao álcool e sim tentam se manter o mais longe possível das situações e coisas pareadas ao consumo do álcool. Portanto, o modelo não deveria ter uma fase de extinção e sim uma fase de abstinência antes do teste. Porém, essa crítica não parece apropriada, pois é importante lembrar que, embora essa fase seja chamada de “fase de extinção”, os estímulos ambientais utilizados no treino não estão presentes nela e as relações de contingência entre a resposta, os estímulos ambientais e o reforçador primário não estão sob extinção. De fato, a única extinção que ocorre nessa fase é a da relação do ambiente da caixa com o reforçador, então essa fase apesar de ser chamada de fase de extinção, nada mais é que uma fase de abstinência forçada do rato, fato que não interfere na validade de face do modelo animal.

A validade preditiva é a validade mais consolidada deste modelo animal. Embora alguns estudos mais antigos tenham colocado essa validade em xeque, principalmente pelo número de falsos positivos – medicamentos que funcionam no modelo animal, mas que falham em estudo com humanos (Epstein & Preston, 2003), atualmente ela é bem estabelecida principalmente com álcool (Epstein et al., 2006; Martin-Fardon & Weiss, 2013; Weiss, 2010). Estudos atuais mostram que a administração de antagonistas opiáceos pode reduzir a recaída em ratos (Bienkowski, Kostowski & Koros, 1999; Burattini, Gill, Aicard & Janak, 2006; Ciccocioppo, Martin-Fardon & Weiss, 2002, Ciccocioppo et al., 2003; Weiss, 2010) e que esses mesmos antagonistas atenuam a recaída em humanos (Dayas, Liu, Simms & Weiss, 2007; Volpicelli, Alterman, Hayashida & O'Brien, 1992; Zhao et al., 2006, para revisão ver O'Brien, 1996). Além disso, têm sido mostrado que os mesmos circuitos neurais ativados pelas “pistas” pareadas ao álcool em ratos (Dayas et al., 2007; Zhao et al., 2006), em humanos são ligadas a auto-relatos de craving (Braus et al., 2001; Kareken et al., 2004; Myrick et al., 2004; Schneider et al., 2001).

A validade de constructo desse modelo animal é a mais controversa de todas. A principal crítica à validade de constructo é o fato do modelo não requerer que os ratos utilizados nos estudos sejam ratos dependentes de álcool (Spanagel, 2000; Weiss, 2010). Argumentos contra e a favor dessa crítica podem ser levantados. Um importante

argumento contra é o fato de que mesmo indivíduos que não são considerados dependentes de álcool podem apresentar fissura quando expostos a estímulos pareados com o consumo do mesmo (Greeley, Swift, Prescott & Heather, 1993; Streeter et al., 2002), além de já ter sido demonstrado que ratos não dependentes também podem ter alterações no SNC devido ao consumo do álcool. Porém, a favor dessa crítica estão os dados demonstrando que a recaída mimetizada pelo modelo *cue-induced* depende do condicionamento dos estímulos ambientais com os efeitos reforçadores do álcool, o que é feito apenas modestamente em ratos não dependentes, sendo bem diverso da vasta história de condicionamento de um alcoolista com um histórico longo de abuso de álcool (Weiss, 2010).

Alguns autores também chamam a atenção para o fato de que a abstinência acontece por motivos diferentes nos ratos e nos humanos (Epstein et al., 2006). Em geral, em humanos, a escolha por ficar abstinente pode passar por processos comportamentais muito complexos que nunca poderão ser mimetizados em ratos, portanto, nesse modelo – e em todos os que trabalham com abstinência de drogas – os animais ficam em abstinência forçada. Apesar dessa ser uma crítica plausível, é importante lembrar que em humanos também é possível que haja a abstinência forçada, como é o caso da internação compulsória.

Um outro item na crítica à validade de constructo desse modelo surgiu após o estudo de Galesi, Silva & Garcia-Mijares (2012), mostrando que o estímulo treinado como estímulo contextual no procedimento do modelo não adquire controle sobre a resposta de pressão à barra. Como esse modelo clama por mimetizar o papel de estímulos ambientais na recaída ao uso de álcool, defendendo que apenas o estímulo treinado como reforçador condicionado está controlando a resposta de pressão à barra, esse achado prejudica a validade de constructo do modelo.

Na verdade, para mimetizar a etiologia de um transtorno mental em laboratório é importante que essa etiologia seja bem estabelecida em humanos, fato que não acontece com a recaída ao uso de álcool (Sinha, 2013). Por exemplo, a descoberta recente de que há sensibilização das respostas a eventos estressantes que levam à recaída em ratos ainda não foi bem estabelecida em laboratório com humanos (Sinha, 2013). Apesar disso, estudos mostram que indivíduos alcoolistas apresentam uma maior reação à estímulos

associados ao consumo de álcool do que indivíduos não alcoolistas (Glautier, Drummond & Remington, 1992; Greeley et al., 1993; Kaplan et al., 1985; Pomerleau, Fertig, Baker & Cooney, 1983; Willner et al., 1998).

Embora os processos subjacentes à recaída por estresse ainda não estejam bem documentado em humanos, apesar de estarem bem documentados em animais, alguns processos subjacentes à recaída induzida por estímulos ambientais sequer foram estudados em animais. Por exemplo, a participação dos sistemas neurais relacionados aos estresse na recaída mimetizada pelo modelo *cue-induced* foi muito pouco estudada (Liu & Weiss, 2003).

Como será detalhado no Capítulo 2, muitos argumentos levam a crer que há um envolvimento abrangente dos sistemas neurais que regulam as respostas orgânicas ao estresse na recaída induzida pelos estímulos ambientais. Portanto, o estudo desses sistemas neurais é muito importante para se desvendar quais são os mecanismos subjacentes à recaída produzida por estímulos ambientais. Entender quais são esses mecanismos ajudam a melhorar a validade de constructo do modelo, além de auxiliar na busca de novas medicações.

O fato de ser necessário que um modelo animal tenha uma boa validade de constructo para ser um bom modelo animal têm sido questionada por alguns autores. Eles propõem que, para um modelo animal ser capaz de mapear tratamentos farmacológicos para os transtornos mentais, é apenas necessário que esse modelo tenha uma boa validade preditiva, sendo desnecessária a validade de constructo (Epstein & Preston, 2003; Epstein et al., 2006).

No entanto, é importante lembrar que um modelo animal com boa validade preditiva, mas sem validade de constructo, pode achar medicações certas por razões erradas (Sarter & Bruno, 2002). Logo, é fundamental que o modelo de recaída *cue-induced* tenha uma boa validade experimental para que esse modelo seja efetivo em rastrear medicamentos que tratem o alcoolismo além de elucidar alguns processos comportamentais envolvidos nesse transtorno.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar e aprimorar o modelo *cue-induced*. Dois aspectos foram avaliados: o comportamental e o neurológico. No aspecto comportamental foi avaliado se os dois estímulos ambientais

utilizados no treino estavam de fato exercendo controle sobre a resposta de recaída; e no aspecto neurológico foi avaliado se o eixo HPA e o “sistema CRF” participam da recaída mimetizada por esse modelo. Quanto ao aprimoramento do modelo, foram feitas mudanças no procedimento do modelo com o objetivo de aprimorar o controle que o estímulo antecedente tem sobre a recaída.

Mais especificamente, os experimentos apresentados no Capítulo 1 tiveram como objetivo avaliar e aprimorar aspectos comportamentais da recaída. Foram realizadas manipulações no procedimento desse modelo com o objetivo de que o odor (estímulo antecedente) passasse a adquirir controle sobre a resposta de recaída. Além disso, foi avaliada a influência de processos de aprendizagem associativa (somação e sombreamento) na recaída mimetizada por esse modelo.

Já os estudos apresentados no Capítulo 2 tiveram como objetivo principal avaliar os aspectos neurobiológicos da recaída mimetizada por esse modelo, portanto, avaliando se a ativação do eixo HPA e do “sistema CRF” são necessários para que a recaída mimetizada por esse modelo ocorra.

Todos os experimentos realizados neste trabalho serão apresentados em formato de artigo dentro de cada capítulo.

CAPÍTULO 1 – CONTROLE DE ESTÍMULOS E O MODELO DE RECAÍDA AO USO DE DROGAS *CUE-INDUCED*

No procedimento do modelo *cue-induced* de recaída ao uso de álcool são utilizados dois tipos de estímulos: um odor treinado como estímulo contextual e uma luz treinada como reforçador condicionado (Bachteler, et al., 2005; Cannella et al., 2009; Ciccocioppo et al., 2001; Ciccocioppo et al., 2003; Ciccocioppo, et al., 2004; Stopponi et al., 2011; Vengeliene, Heidbreder & Spanagel, 2007). Embora esse procedimento seja muito utilizado, nunca havia sido testado como ocorre o controle desses estímulos sobre a resposta de recaída. Isto é, não se sabe se ambos estão controlando a resposta de pressão à barra ou se apenas um deles assume esse controle (Fuchs, Lasseter, Ramirez & Xie, 2009; Galesi et al., 2012).

Com o objetivo de entender o controle desses estímulos sobre a resposta de recaída Galei et al. (2012) programaram um experimento no qual ratos foram submetidos ao procedimento clássico do modelo *cue-induced* com álcool, porém, na fase de reinstalação os estímulos foram apresentados em conjunto e separadamente aos animais. Os resultados obtidos com essa manipulação indicaram que, ao contrário do esperado (Bachteler et al., 2005), apenas a apresentação da luz controla a resposta de pressão de recaída. Portanto, as autoras argumentaram que, como os estímulos são treinados em conjunto, é possível que haja “sombreamento” da luz sobre o odor (Galesi et al., 2012).

Como mostrado por uma extensa literatura em aprendizagem associativa, quando dois estímulos são treinados em conjunto para predizer a mesma relação resposta-consequência, é possível que um dos estímulos exerça maior controle sobre essa resposta, quando esses estímulos são treinados separadamente, fenômeno chamado de “sombreamento” (Chase & Heinemann, 1972; Claire-Smith, 1979; Dinsmoor, 1995; Honig & Urcuioli, 1981; Mackintosh, 1975; Miles & Jenkins, 1973; Thein, Westbrook & Harris, 2008; Williams, 1984).

Comumente, o estímulo que é melhor relacionado com o reforço (tem uma relação mais forte de contingência) é o estímulo que adquire maior controle sobre a resposta (Mackintosh, 1975; Rescorla & Holand, 1982; Thein, Westbrook & Harris, 2008;). Porém, no modelo *cue-induced*, ambos os estímulos poderiam ter uma relação

maior de contingência com o reforço, pois o odor é um estímulo muito saliente para os ratos (Lionello-DeNolf & Mihalick, 2006; Slotnick, 2001; Slotnick, Hanford & Hodos, 2000), enquanto a luz passa por um pareamento respondente com o álcool.

Na verdade, o sombreamento entre os estímulos só passou a ocorrer após o início do uso do reforçador condicionado no procedimento do modelo, pois, nos primeiros experimentos realizados com esse modelo, apenas o estímulo contextual era utilizado (Katner & Weiss, 1999; Katner, Magalong & Weiss, 1999). Embora o treino fosse mais simples nesses primeiros experimentos, a frequência de respostas produzida pela apresentação do estímulo contextual na fase de testes era baixa (pouco maior que a frequência obtida durante a fase de extinção), portanto, a recaída produzida nesses experimentos era pouco expressiva.

Não há na literatura uma explicação do motivo que levou à introdução dos reforçadores condicionados no treino e teste do modelo de recaída *cue-induced*. É bem provável que o objetivo tenha sido aumentar o controle dos estímulos ambientais sobre a resposta de pressão à barra na fase de treino e, portanto, aumentar a frequência de respostas dos animais na fase de testes. De fato, todos os estudos atuais passaram a adotar o procedimento com o reforçador condicionado e eles obtêm frequências de respostas maiores na treino e no teste que as obtidas pelos estudos iniciais sem a presença desse estímulo (Bachteler, et al., 2005; Cannella et al., 2009; Ciccocioppo et al., 2001; Ciccocioppo et al., 2003; Ciccocioppo, et al., 2004; Stopponi et al., 2011; Vengeliene, Heidbreder & Spanagel, 2007).

É importante notar que os dados de Galesi et al. (2012) mostraram que o procedimento do modelo *cue-induced* se assemelha muito com o procedimento de PIT. Já que o antecedente não está controlando a resposta de pressão à barra e a resposta de recaída está sendo controlada apenas pela luz, tem-se um caso em que o comportamento respondente (associação luz-álcool) está aumentando a probabilidade de emissão de um comportamento operante (resposta de pressão à barra). Pode-se especular que a apresentação da luz elicie algumas respostas de fissura no animal e que para diminuir essas sensações desagradáveis, aumenta-se a probabilidade de emissão da resposta que antes tinha o álcool como consequência.

Os dados de Galesi et al. (2012) deram origem à questão de como realizar o treino desse modelo animal de forma que a frequência de respostas seja alta nos testes e que ambos os estímulos controlem essas respostas já que esse é um modelo animal que mimetiza o papel dos estímulos ambientais na recaída. Dessa forma, os estudos apresentados neste capítulo tiveram o objetivo de avaliar e aprimorar aspectos do controle de estímulos sobre a recaída mimetizada pelo modelo *cue-induced* com álcool.

Assim, foram realizadas manipulações no procedimento desse modelo com o objetivo de que o odor, treinado como estímulo contextual, passasse a adquirir controle sobre a resposta de recaída e, além disso, foi avaliada a influência de processos de processos de aprendizagem associativa (somação e sombreamento) na recaída mimetizada por esse modelo.

Mais especificamente, no Experimento 1 o esquema de reforço foi manipulado com o objetivo de aumentar o controle do odor sobre a resposta de recaída. Tal alteração ocorreu em função do FR1 dificultar controle do estímulo contextual sobre a resposta de pressão à barra uma vez que este esquema parece facilitar o controle pela consequência (Jenkins, 1965) e, portanto, o controle da resposta pelo reforçador condicionado. Além disso, o Experimento 1 teve como objetivo replicar os dados de Galesi et al. (2012) e verificar se, no procedimento utilizado nesse modelo, pode mesmo ocorrer sombreamento do reforçador condicionado sobre o estímulo contextual.

No Experimento 2 os estímulos foram treinados separadamente, com o objetivo de evitar o sombreamento e aumentar o controle do odor sobre a resposta de recaída. Com o treino separado dos estímulos houve a possibilidade de verificar se ocorreria somação com a apresentação deles em conjunto na fase de testes e, portanto, esse foi o segundo objetivo desse experimento. Embora a somação pareça ser um processo importante que está envolvido na recaída ao uso de drogas poucas pesquisas têm sido realizadas para estudá-lo (Panlilio, Schindler & Weiss, 1996; See, Grimm, Kruzich & Rustay, 1999).

ASSOCIATIVE LEARNING AND THE CUE-INDUCED RELAPSE MODEL

Abstract

Rationale: The cue-induced relapse model is a model commonly used to study alcohol relapse caused by environmental stimuli. In this model procedure, the environmental stimuli are usually a contextual stimulus (S) and a conditioned reinforcer (Sr). Despite this model be used to study alcohol relapse caused by these stimuli, it was recently shown that only the conditioned reinforcer controls the relapse responses observed in test phase. This occurs because the Sr overshadows the contextual stimulus.

Objectives: The experiments in this paper had the purpose to increase the control exercised by S over the drug seeking responses. Also, these experiments aimed to study associative learned process as overshadow and summation in this animal model.

Methods: In the first experiment two groups of rats were trained under the cue-induced relapse model: one was trained under the fixed ratio 1 schedule (FR1) and the other under the variable ratio 5 schedule (VR5). In the second experiment, Wistar rats were trained in the cue-induced procedure, but the stimuli were presented separately during the training phase. In both experiments, the stimuli were presented alone and as a compound in the reinstatement phase.

Results: Results from Experiment 1 showed that changing the schedule used in this model from FR1 to VR5 did not improve the S control over the relapse responses and replicated data showing that overshadowing is occurring during the training phase. Results from Experiment 2 showed that, when trained alone, the S acquired control over the relapse response. Also, results showed that summation occurred when the stimuli are trained separately and tested as a compound.

Conclusions: these findings indicate that the procedure used during the training phase of the cue-induced relapse model produce overshadowing of Sr over S and that training these stimuli alone can be a way to avoid overshadowing.

Key words: cue-induced, alcohol, relapse, contextual stimulus, conditioned reinforcer, associative learning

An important aspect about alcoholism is relapse – a recurrent regress to alcohol consumption after detoxification and abstinence (American Psychiatry Association, 2000; Bachteler, Economidou, Danysz, Ciccocioppo, & Spanagel, 2005; Epstein, Preston, Stewart, & Shaham, 2006; O'Brien, Childress, Ehrman, & Robbins, 1998; Woody, McLellan & O'Brien, 1990; Zironi, Burattini, Aicardi & Janak, 2006). Some of the key factors that lead to relapse are learned responses, elicited and evoked by stimuli previously associated with alcohol consumption. Exposing the addict to these stimuli can elicit conditioned responses (drug craving) and evoke operant responses (drug self-administration). Therefore, understanding the role of environmental stimuli in alcohol intake is crucial to the effectiveness of treatments for alcoholism.

The most used animal model that examines the relapse caused by alcohol-associated stimuli is the “cue-induced relapse model” (Sanchis-Segura & Spanagel, 2006). This model has three phases: training, extinction and reinstatement. During the training phase the animals are trained to self-administrate the drug in the presence of environmental stimuli. When alcohol is used as reinforcer a stimulus compound is usually used during the training phase. During the entire session an odor is presented as contextual stimuli (S) and a light is used as conditioned reinforcer (Sr) (presented together with alcohol in consequence to lever-press responses). After training, extinction sessions of operant response are conducted without the presentation of training stimuli. Finally, at the reinstatement phase, the training phase conditions are reintroduced, but there is no consequence to lever-press response. If the animals return to press the lever during this phase, it is considered that occurred relapse induced by environmental cues (Bachteler, et al., 2005; Cannella et al., 2009; Ciccocioppo, Angeletti & Weiss, 2001; Ciccocioppo, Lin, Martin-Fardon & Weiss, 2003; Ciccocioppo, et al., 2004; Stopponi et al., 2011; Vengeliene, Heidbreder & Spanagel, 2007, to revision see Epstein et al., 2006; Sanchis-Segura & Spanagel, 2006; Weiss, 2010).

Despite the procedure described above be extensively used to study the role of environmental stimuli in alcohol relapse, such procedure does not allow to identify if responses emitted during the reinstatement phase are function of the discriminative stimulus, the conditioned reinforcer or both (Fuchs, Lasseter, Ramirez & Xie, 2009; Galesi, Silva & Garcia-Mijares, 2012).

The first experiments that studied alcohol relapse by using the cue-induced relapse model had a simpler training procedure, where only the odor stimulus was associated to alcohol delivery. Their results showed that the odor acquired control over the relapse response, even though this control was weak (Katner & Weiss, 1999; Katner, Malagong & Weiss, 1999). However, almost every recent experiment in the area uses the conditioned reinforcer together with the contextual stimulus during the training (Bachteler, et al., 2005; Cannella et al., 2009; Ciccocioppo et al., 2001; Ciccocioppo et al., 2003; Ciccocioppo, et al., 2004; Stopponi et al., 2011; Vengeliene et al., 2007).

As shown by an extensive literature regarding instrumental learning, when two stimuli are trained together to predict the same response-consequence relation, it is possible that one stimuli might exert greater control over the response than the other when they are tested separately – this phenomenon is typically called “overshadowing” (Chase & Heinemann, 1972; Claire-Smith, 1979; Dinsmoor, 1995; Honig & Urcuioli, 1981; Mackintosh, 1975; Miles & Jenkins, 1973; Thein, Westbrook & Harris, 2008; Williams, 1984). Usually, if a stimulus is better correlated with the reinforcer or is more salient than the other one, this stimulus will acquire greater control over the response (Mackintosh, 1975; Rescorla & Holand, 1982; Thein, Westbrook & Harris, 2008). Whereas in the cue-induced relapse model with alcohol an odor is frequently used as contextual stimuli, it is expected that the odor overshadow the conditioned reinforcer during the training phase because odor is a very salient stimulus to rats (Cohn & Weiss, 2007; Lionello-DeNolf & Mihalick, 2006; Slotnick, 2001; Slotnick, Hanford & Hodos, 2000). However, the odor is presented during the entire session and the conditioned reinforcer is presented just when alcohol is delivered, thus the conditioned reinforcer could be a better predictor for the alcohol delivery than the odor. Thereby, once the stimuli are trained and tested together it is impossible to know which stimulus is controlling the relapse responses.

Galesi et al. (2012) examined the independent role of each environmental stimulus used in the cue-induced relapse model. The training, extinction and two first sessions of reinstatement phase were similar to the procedure described above; however, the standard procedure was followed by reinstatement sessions where each stimulus used at training phase was presented alone. The results showed that animals relapse when the

compound (S/Sr) and the light (Sr) were presented but they did not relapse when the odor (S) was presented alone, suggesting that the odor has not acquired a cue function. The results also suggest that overshadowing of light over odor could occur using this training procedure.

It is well accepted that the cue-induced relapse model with alcohol has a good predictive value once opioid antagonist administration can reduce relapse in rats submitted to this procedure (Bienkowski, Kostowski & Koros, 1999; Burattini, Gill, Aicard & Janak, 2006; Ciccocioppo, Martin-Fardon & Weiss, 2002, Ciccocioppo et al., 2003; to revision see Weiss, 2010) and attenuates craving and relapse in humans (Dayas, Liu, Simms & Weiss, 2007; Volpicelli, Alterman, Hayashida & O'Brien, 1992; Zhao et al., 2006; to revision see O'Brien, 1996). Moreover, it has been shown that the same neurocircuitry activated by alcohol cues in rats (Dayas et al., 2007; Zhao et al., 2006), is linked with self-reports of craving in humans (Braus et al., 2001; Kareken et al., 2004; Myrick et al., 2004; Schneider et al., 2001).

On the other hand, its construct validity might be not so good since it is a model created to reproduce the control exerted by environmental stimuli (i.e. conditioned reinforcer, discriminative stimulus, contextual stimulus) over the relapse to drug use and the way the model is currently done might merely be reproducing just the control that conditioned reinforcers have over alcohol relapse (Galesi et al., 2012).

The present experiments had the purpose to evaluate and to improve aspects of the stimulus control over the relapse mimicked by the cue-induced model. Manipulations were done in the procedure with the purpose to improve the control over relapse responses. Also, it was evaluated the influence of associative learning processes as overshadowing and summation over relapse responses. Understand what are the operant processes underlying relapse mimicked by this model is indispensable to evaluate its experimental validity and to improve it.

The first experiment, had the purpose to improve the odor control over the relapse responses and to reply Galesi et al. (2012) results that showed overshadowing of one stimuli over another in this model procedure. Therefore, the schedule of reinforcement used in the cue-induced relapse model was changed from FR1 (fixed ratio 1) to VR5 (variable ratio 5), as it is widely known that FR1 schedule increases the likelihood that the

animal behavior will be controlled by the consequence, making it difficult for the acquisition of the discriminative stimulus function (Jenkins, 1965). Thus, if the odor become a better predictor of reinforcement it is possible that the overshadowed effect from light to odor will decrease.

Experiment 2 was also designed to improve the odor control over the relapse responses. Thus, the stimuli S and Sr were trained separately. In addition, this experiment evaluated if presenting the stimuli together in the reinstatement phase would increase the relapse response (summation effect). As compound stimuli have a central role in drug addiction and relapse (Panlilio, Schindler & Weiss, 1996; See, Grimm, Kruzich & Rustay, 1999), and there has been little research examining the role of compound stimuli in alcohol relapse, this experiment is crucial to better comprehend the process involved in this phenomenon.

EXPERIMENT 1

METHOD

Subjects

Twenty naïve male Wistar rats, with 160-day-old at the start of the experiment and mean body weight = 235 g (range = 202 g to 269 g), were housed in transparent polyurethane cages, measuring 16 X 32 X 38 cm (height X length X depth) in a room with artificial 12:12 h light/dark cycle (lights off at 8 a.m.), constant temperature between 20 to 22°C and humidity between 45 to 55%. All training, extinction and test sessions were conducted once a day during the nocturnal phase of the light/dark cycle. The Ethical Committee on Animal Research approved the procedures.

Apparatus

During the Alcohol Self-administration phase, twenty volumetric drinking tubes of 50 mL manufactured by Med AssociatesTM were used to monitor liquids consumption. Training, Extinction and Reinstatement sessions were conducted in standard operant

conditioning chambers from Med AssociatesTM placed inside sound attenuating boxes with an exhauster that provided air circulation. Each chamber was equipped with two dippers (with 0.1 mL capacity each) placed on the right and left side of one wall 5 cm from the floor. In the same wall, there were two levers of approximately 5 cm width, placed 8 cm from the floor. The right lever was above the right drinker, and the left lever was above the left drinker. The right drinker was not active during the experiment, so the right lever was used as a control bar. There was also a luminous stimulus of 1 W (light), placed 7 cm above the left lever, and a sonorous stimulus of 2,900 Hz/ 65 dB (sound) placed right behind the wall, 6 cm above the same lever. The floor was a stainless steel grid and under it a tray was always filled with shaving woods. A microcomputer with software and interface manufactured by Med AssociatesTM controlled the operation of the boxes and behavioral data recording. To produce the odor stimuli used for training and reinstatement sessions, five drops (approximately 0.1 mL) of orange or anise extract were placed in the wood shavings of the tray of the experimental box before sessions beginning.

Procedure

Alcohol Self-administration

The objective of this phase was to achieve voluntary alcohol consumption by the rats. The procedure, showed in Table 1, lasted 39 days and was modified from Burattini et al. (2006). The drinking tubes containing ethanol solutions were available for 23 hours every day and changed daily.

Table 1. Alcohol solutions concentration and period of administration during the alcohol self-administration phase.

Time	Solution
2 weeks	10E/10S*
1 week	10E/5S
1 week	10E/2S
11 days	10E

*10E/10S = the number represents the solution concentration, the letter E represents ethanol and the letter S represents sucrose. In this case, read 10% ethanol and 10% sucrose in the solution.

Shaping

Following the Self-administration phase, the animals were trained for three days to press the left lever under a FR1 schedule and had as consequence 0.1 mL of 10% ethanol solution (10E). All animals were food-deprived 23h before the first shaping session. On the second and third days they had access to food for 1h after the sessions.

Once responding under FR1 had been established, the animals were allocated into two groups: FR1 (n=10) and VR5 (n=10). The VR5 group was trained to press the left lever under a fixed ratio 2 (FR2) schedule and next under variable ratio 5 (VR5) schedule for ten consecutive sessions (five sessions each). The animals from the FR1 group remained under FR1 schedule in all sessions. At this stage all animals had free access to food and lever press responses of animals from both groups was reinforced by the delivery of 0.1 mL of 10E.

Training

Training consisted in a multiple schedule of reinforcement with two contingencies. Each contingency was presented in separate sessions (which occurred in separate days). Animals from VR5 group were submitted to a multiple VR5/VR5

schedule and animals from the FR1 group were submitted to a multiple FR1/ FR1 schedule. In one contingency, lever-pressing under VR5 schedule (VR5 group) or FR1 schedule (FR1 group) in the presence of an orange odor (S1)⁴ had as consequence light (Sr1) activation and delivery of 0.1 mL of 10E solution. After 4s the dipper and the light were turned off. In the other contingency, lever pressing under VR5 schedule (VR5 group) or FR1 schedule (FR1 group) in the presence of an anise odor (S2) had as consequence sound activation and delivery of 0.1 mL of water. The dipper and the sound were turned off after 4s.

For five days a week, twenty training sessions were performed, ten for each contingency. The contingencies were presented in separate sessions, with a 24h interval between them. The contingencies presentation was randomized, but with the restriction that no more than three consecutive sessions of each contingency could be successively presented.

Extinction

Animals were submitted to daily extinction sessions of lever-pressing responses, without the presentation of all training stimuli (odor stimuli, light, sound, water and ethanol). The only consequence for lever pressing under extinction was the activation of the empty dipper. This condition remained for 10 daily sessions (30 min each).

Reinstatement test

At this phase, the odor stimuli and the conditioned reinforcers used during the Training Phase were reintroduced, but lever-pressing responses were not followed by

⁴ The stimuli in this paper are named S1, S2, Sr1 and Sr2 instead of S+, S-, CS+ and CS- as they are usually named (Bachteler, et al., 2005, Ciccocioppo et al., 2004, Vengeliene et al., 2007; Stopponi et al., 2012). The symbol “-“ is usually used to denote extinction (S-) or inhibitory conditioning (CS-) (Catania, 1999) and since there is neither of these situations during the procedure it is better to use numbers to distinguish between the stimuli associated to alcohol (number 1) and stimuli associated to water (number 2) (Matos, 1999). In addition, the stimuli presented together with the reinforcer are better called conditioned reinforcers (Sr1 and Sr2) since: a) their properties as CS are not measured by the model; b) it is the consequence to the response that is under study (lever-press) and the stimulus acquires control over it (Galesi et al., 2012).

alcohol solution or water. Six sessions were performed daily with each one lasting 30min. Sessions were separated by a 24h interval.

In the first session, half of the animals of each experimental group ($n=5$ per group) was submitted to the test condition S1/Sr1. Thus, lever pressing under VR5 schedule (VR5 group) or FR1 schedule (FR1 group) in orange odor (S1) presence had as consequence activation of light (Sr1) and the empty dipper. The other half ($n=5$ per group) was submitted to condition S2/Sr2. Therefore, lever pressing under VR5 schedule (VR5 group) or FR1 schedule (FR1 group) in anise odor (S2) presence had as consequence the activation of sound (Sr2) and the empty dipper. In the second session, animals submitted to S1/Sr1 in the first day were now submitted to the condition S2/Sr2 and *vice versa*. In the remaining sessions, each stimulus was presented alone and the sessions were conducted daily. The order of stimuli presentation was S1, Sr1, S2 and Sr2. The presentation order was not randomized and was purposely chosen to reduce the effect of extinction over the performance under S1 and Sr1 presentation, as these sessions were critical to the experiment.

At S1 and S2 sessions, lever-pressing under VR5 schedule (VR5 group) or FR1 schedule (FR1 group) were followed by the activation of the empty dipper. At Sr1 and Sr2 sessions lever pressing under VR5 schedule (VR5 group) or FR1 schedule (FR1 group) were followed by the activation of the light (Sr1 session) or the sound (Sr2 session) and the empty dipper.

Data analysis

The number of responses in the last training phase session with each reinforcer, alcohol or water, was analyzed by a mixed ANOVA with one factor between subjects (group) and one factor within subjects (alcohol or water). As the mixed ANOVA showed that there was an interaction between variables, two separated repeated measures ANOVA were performed one for the VR5 group and other for the FR1 group.

The mean number of responses emitted during the last three extinction sessions and all reinstatement sessions were analyzed by a mixed ANOVA with one factor between-subjects with two-levels (FR1 and VR5 groups) and one factor within-subject

with seven-levels (the mean of three last sessions of extinction and six reinstatement sessions). Mauchly's test was performed in order to verify the sphericity assumption and, when sphericity was not assured, the Greenhouse-Geisser correction was used. As the mixed ANOVA showed that there was an interaction between variables, two separated repeated measures ANOVA were performed one for the VR5 group and other for the CRF group. Bonferroni was used as post-hoc test. Values of p lower than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Alcohol Self-Administration

The subjects learned to orally self-administrate 10E solution. In the last three days of self-administration phase, the rats consumed an ethanol average dose of 1.05 ± 0.36 g/kg (mean \pm SEM). This amount of oral consumption is considered to be an "effective dose" as it produces significant changes in rats central nervous system (Williams-Hemby and Porrino, 1997a, 1997b).

Training

Figure 1 shows the average (mean \pm SEM) of lever-pressing responses during the last training session of each contingency (alcohol or water) for both groups (VR5 and FR1). The repeated-measures ANOVA showed significant differences between responses emitted for alcohol and water on the last training sessions for both groups, VR5 [$F(1, 9) = 23.98$; $p < 0.001$] and FR1 [$F(1, 9) = 5.77$; $p = 0.039$]. Moreover, it showed that the number of responses emitted by the animals in VR5 group was higher than responses emitted by rats from FR1 group. Nevertheless, rats from both groups were receiving a similar amount of reinforcer since all responses from group FR1 were reinforced, while every 5 responses in average were reinforced for subjects from group VR5.

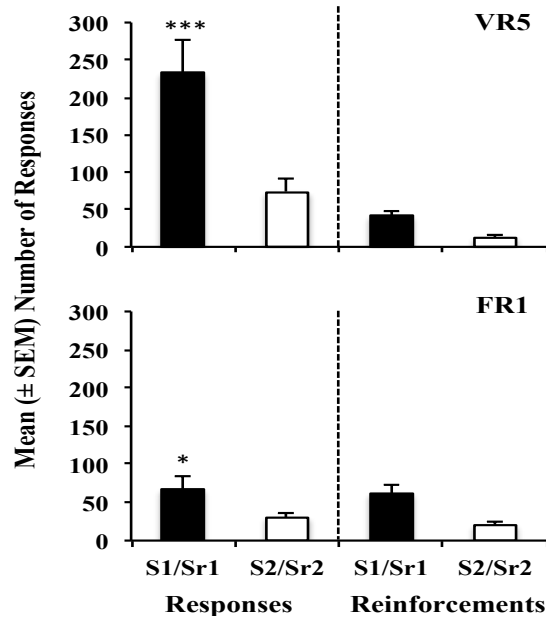


Figure 1 – The data represents the average (mean \pm SEM) of responses and reinforcements at the last training sessions of both training contingencies for group VR5 and group FR1. The repeated-measures ANOVA showed significant differences between the last training session from both contingencies for group VR5 ($F(1, 9) = 23.98$; $***p < 0.001$) and for group FR1 ($F(1,9) = 5.77$; $*p = 0,039$).

Reinstatement test

The repeated measures ANOVA indicated that relapse did not occur for VR5 group. As the number of variables was very high and the variance was also high, but the responses average for each stimuli was very different, a T-tests were used to investigate the relapse occurrence, although, comparisons two by two are not indicated because they increase the chance of a type 1 error. The t-test revealed that relapse occurred when S1/Sr1 was compared to EXT [$T(9) = 0.022$] and compared to S2/Sr2 [$T(9) = 0.04$]. The T-test also showed that Sr1 was different from EXT [$T(9) = 0.02$] and that there were no differences between S1 and EXT.

For FR1 group (Fig. 2), repeated measures ANOVA revealed that relapse occurred when alcohol previously associated cues were presented during reinstatement sessions [$F(6, 114) = 4.54$, $p = 0.033$]. The post-hoc test showed differences between S1/Sr1 presentation ($p = 0.002$) and the last three extinction days (EXT). Also, there were

differences between S1/Sr1 and S2/Sr2 ($p = 0.028$) and differences between Sr1 and EXT ($p = 0.042$) but that were no differences between S1 and EXT.

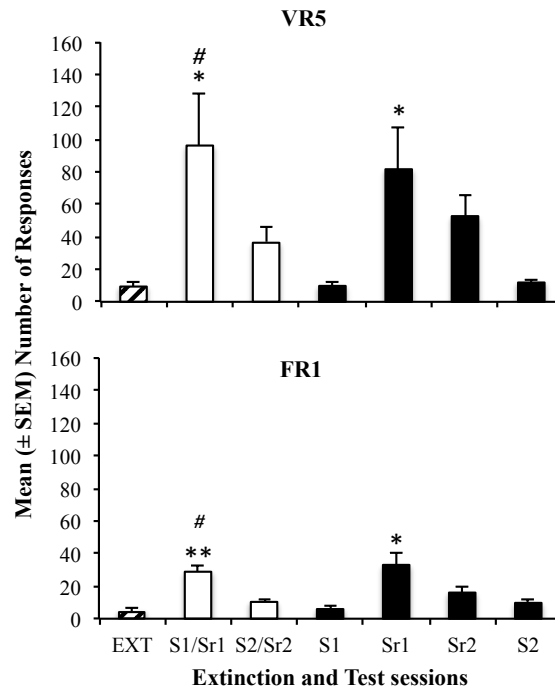


Figure 2 – The data represents the average (mean \pm SEM) of responses in the last three extinction sessions (EXT) and each reinstatement session of the animals from groups VR5 and FR1. The compound orange odor and light (S1/Sr1) were presented in the first session, and the compound anise odor and sound (S2/Sr2) were presented in the second session. In the remaining sessions, each stimulus was presented alone. The sessions are represented in the sequence that they were done. For VR5 * $p = 0.022$ for differences between EXT and S1/Sr1 and * $p = 0.020$ for differences between EXT and Sr1 and # $p = 0.040$ for differences between S1/Sr1 and S2/Sr2. For FR1 group ** $p = 0.002$ for differences between EXT and S1/Sr1 and * $p = 0.042$ for differences between EXT and Sr1 and * $p = 0.028$ for differences between S1/Sr1 and S2/Sr2.

EXPERIMENT 2

METHOD

Subjects and Apparatus

Twenty one naïve male Wistar rats, 150-day-old at the start of the experiment,

with a mean body weight 182 g, range 155 g to 218 g were housed in the same manner as in Experiment 1 and maintained on the same feeding schedule. The apparatus was the same as Experiment 1.

Procedure

Alcohol Self-administration

This phase was equal to Experiment 1, with the difference that the 10% ethanol solution at the end of the phase was given to the rats for 8 days instead of 11 days.

Shaping

After Alcohol Self-administration phase, animals were trained to press the left lever under a FR1 schedule. At the first day, they were placed into the operant boxes for 13h and 0.1 mL of water was given as consequence to lever-pressing responses. In this session, food was placed above the tray. After the session, animals were left for 24h in their home-cages. The second session was the same as described above, but had 2h length and no food was given during the session. The third session was exactly the same as the second but was just 1h length. The fourth session was 30 min length and 0.1 mL of ethanol given as consequence to lever-pressing responses instead of water. The animals were not food or water deprived during this phase.

Training

During training sessions four contingencies were trained. Each contingency was presented in separate sessions and in all of them the responses were reinforced under a FR1 schedule. In the first contingency, lever-pressing response in the presence of the orange odor (S1) had as consequence the delivery of 0.1 mL of 10E solution for 4s. In the second contingency, lever-pressing response in the presence of the anise odor (S2) had as consequence the delivery of 0.1 mL of water for 4s. In the third contingency, lever-

pressing response had as consequence light (Sr1) activation and delivery of 0.1 mL of 10E solution for 4s. In the fourth contingency, lever-pressing response had as consequence sound (Sr2) activation and delivery of 0.1 mL of 10E solution for 4s.

Forty sessions, ten of each contingency, were conducted in 8 weeks (one session daily for five days a week). The sessions order was randomized, but had the restriction that no more than three consecutive sessions of each contingency could be successively presented.

Extinction

Daily extinction sessions of lever-pressing responses followed the last training session. On extinction sessions, the training stimuli (odor stimuli, light, sound, water and ethanol) were not presented. Under extinction, the only consequence of lever pressing was the activation of the empty dipper. This phase had five daily sessions of 30 min each.

Reinstatement

At this phase, the odor stimuli and conditioned reinforcers used during the Training Phase were reintroduced, but lever-pressing responses were not followed by alcohol or water. The sessions were performed daily for six days and had 30 min length. The reinstatement conditions were determined using a 6 x 6 (session x stimulus) *Latin square* design in order to avoid extinction and order effect of stimulus presentation.

Data Analysis

The last training sessions responses with alcohol and water were analyzed by repeated-measures ANOVA. Relapse was analyzed by a repeated measure ANOVA with seven levels (extinction and six reinstatement sessions). Summation was analyzed by a two-factor mixed ANOVA with one-factor between-subjects (order effect) and one factor within subject with three levels (number of responses emitted in the presence of S1, Sr1

and S1/Sr1. Bonferroni was used as post-hoc test. Values of p lower than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Alcohol Self-administration

The animals learned to orally self-administrate the 10E solution. In the last three days of self-administration phase, rats consumed an ethanol average dose of 1.15 ± 0.30 g/kg (mean \pm SEM).

Training

As showed in Figure 3, the repeated-measures ANOVA did not show significant differences between the last training session from the four training contingencies ($F(3, 60) = 1.35$; $p = 0.27$). This occurred because the criterion to change the phase was the number of sessions (10 to each contingency) and not the statistical difference between the contingencies. Although it is desirable to have this difference, the best way to know if the stimuli acquired control over the lever press response is testing them in extinction as was done in the reinstatement phase.

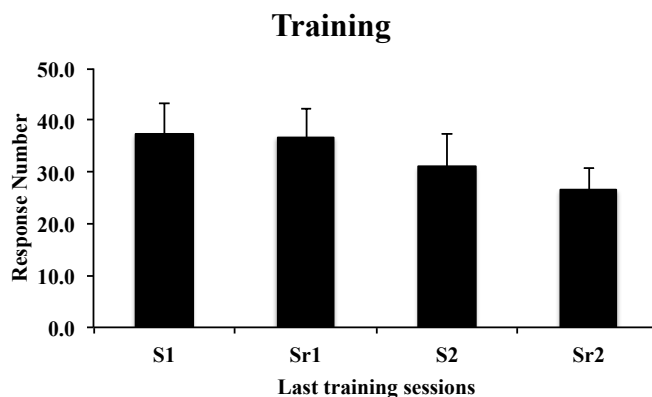


Figure 3 - The data represents the average (mean \pm SEM) of responses in the last training session of each contingency. During training, four contingencies were trained. In the first, responses in the presence of the orange odor (S1) had as consequence ethanol delivery. In the second, responses in the presence of the anise odor (S2) had as consequence water

delivery. In the third, responses followed by a light stimulus (Sr1) and ethanol delivery. In the fourth responses were followed by a sound (Sr2) and water delivery. The repeated-measures ANOVA did not show significant differences between the last training sessions from the four training contingencies ($F(3, 60) = 1.35$; $p = 0.27$).

Reinstatement

For reinstatement (Fig. 4), repeated measures ANOVA revealed that reinstatement of alcohol seeking occurred when alcohol previously associated cues were presented during reinstatement sessions [$F(6, 114) = 7.67$, $p < 0.001$]. The post-hoc test showed a robust reinstatement of responding under S1/Sr1 presentation ($p < 0.001$), under Sr1 presentation ($p < 0.001$) and under S1 presentation ($p = 0.046$).

The mixed ANOVA did not show a significant between effects, that is, the order in which the stimuli were presented did not alter summation results [$F(2, 18) = 0.09$; $p = 0.91$]. A significant within subjects effect was found [$F(2, 36) = 3.4769$; $p = 0.0416$], but Bonferroni post-hoc test showed that only differences between S1/Sr1 and S1 were significant ($p = 0.0474$). Differences between S1 and Sr1 ($p = 0.3884$) and Sr1 and S1/Sr1 ($p = 0.999$) were not significant.

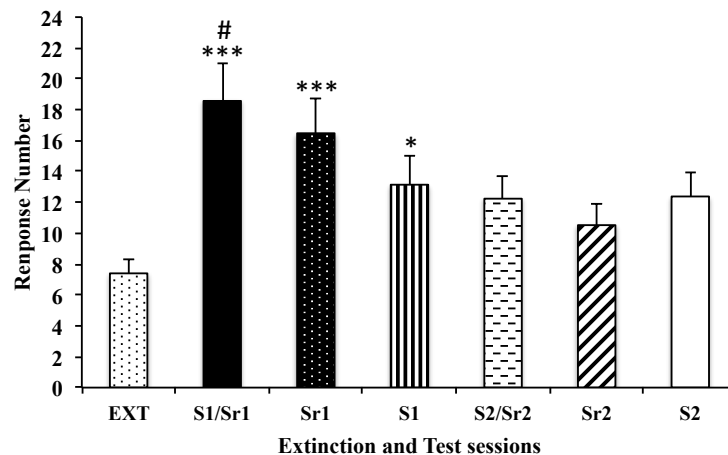


Figure 4 – The data represents the average (mean \pm SEM) of responses emitted in the last three extinction sessions (EXT) and each reinstatement session. The stimuli and the stimuli compound were present in a Latin square during the reinstatement test. The stimuli and the compounds were as follows: orange odor/light (S1/Sr1), anise odor/sound (S2/Sr2), orange odor (S1), anise odor (S2), light (Sr1) and sound (Sr2). *** $p < 0.001$ for differences between EXT and S1/Sr1 and EXT and Sr1. * $p = 0.038$ for differences between EXT

and S1. Comparisons between the stimuli that were associated to alcohol showed difference only between S1/Sr1 and S1 presentation (#p = 0.047).

GENERAL DISCUSSION

Many critics have been made about the construct validity of the cue-induced relapse model in several aspects of its procedure, as the use of animals that are not necessarily dependents (Spanagel, 2000; Weiss, 2010), the fact that abstinence occurs for different reasons in humans and in rats in this model (Epstein et al., 2006) and the fact that the stimulus used as contextual stimulus is not controlling the relapse (Galesi et al., 2012).

The experiments presented here had the purpose to improve the construct validity of cue-induced relapse model trying to increase the control that the contextual stimulus has over the lever-press response. Also, the experiments in this paper had the purpose to evaluate associative learning processes that might be involved in the procedure of this model.

Based on this concern, Experiment 1 was designed to evaluate if changing the schedule of reinforcement could produce greater contextual control over the lever-press response during the reinstatement phase and to reply the results from Galesi et al. (2012) showing overshadowing during the training phase. The results showed that the intermittent and the continuous schedule produced a similar pattern of reinstatement responses: the light that followed the lever-press response (Sr1), but not the odor (S1), controlled lever pressing in the test phase. Therefore, the results showed that the schedule of reinforcement was not the key variable to explain the lack of contextual control over the reinstatement response in the cue-induced relapse model, although others schedules of reinforcement could be tested.

Nevertheless, the results were similar to that obtained by Galesi *et al.* (2012) showing that overshadowing occurs when this procedure is used to access relapse to alcohol and, consequently, compromising the construct validity of this model. This points out the fact that the results found by other authors using the same procedure (Bachteler, et al., 2005; Cannella et al., 2009; Ciccocioppo et al., 2001; Ciccocioppo et al., 2003;

Ciccocioppo et al., 2004, Vengeliene et al., 2007; Stopponi et al., 2012) could be results from the control exercised only from the conditioned reinforcer over the relapse response, and with no participation of the contextual stimulus, as discussed previously by Galesi et al. (2012).

Finally, despite using an intermittent schedule has not improved the control that the contextual stimulus exert over the relapse, use this kind of schedule seems to be more suitable to the model because although the number of alcohol reinforcements be very similar for both groups during the training phase, VR5 group showed greater frequency of relapse responses to alcohol, indicating that, when alcohol access is done in an intermittent schedule, the response is more resistant to extinction. Also, this is a schedule that better mimics drug-seeking responses made by humans.

Results from Experiment 2 showed that training the odor (contextual stimulus) and the light (conditioned reinforcer) separately favored the acquisition of lever-press control by both stimuli, although this control was weak (the frequency of responses obtained during the reinstatement test was slightly higher than the frequency obtained during the extinction phase). Katner and Weiss (1999) and Katner et al. (1999), after training rats to self-administrate alcohol in the presence of an odor, also observed a weak control of the odor when using a discriminative training similar to used here, but in their procedures the conditioned reinforcer was not used. However, if the odor acquires a weak control over the relapse response, why is it used as discriminative stimulus in the cue-induced model? It seems that the alcohol smell is an important cue that guides the animal's behavior (Katner et al., 1999; Katner & Weiss, 1999) and probably overshadows the control of other non-odor cues. So, using odors as contextual stimuli permits to hide the alcohol smell (Katner & Weiss, 1999).

We did not find within the literature the reason why the conditioned reinforcers were introduced in the odor-induced relapse training as consequences of the self-administration response, but it is very likely that it was due to the control exercised by the odor over the lever-pressing responses being weak. Therefore, using odor as contextual cue and light or sound as conditioned reinforcers had two advantages: hiding the alcohol smell and greater relapse effect. The problem is that, since the light and sound began to be used as conditioned reinforcers alongside odor being used as contextual stimulus, it

was never tested which stimuli was controlling the relapse responses and was assumed that the odor was exercising greater control (Bachteler, et al., 2005).

Data from Experiment 2 also showed that responses emitted during the reinstatement test in the presence of the stimulus compound (S1/Sr1) were similar from responses emitted in the presence of Sr1 and different from responses emitted in the presence of S1. Usually, it is assumed that summation occurred only when responses in the presence of the compound are different from responses in the presence of both stimuli when they are presented alone (Panlilio et al., 1996), but it is possible that the relapse responses have a ceiling effect and this effect could be close to the responses emitted when Sr1 was presented alone. Furthermore, if the control that S1 exercises over the relapse response is weak, it is expected that, when this stimulus is presented together with Sr1, its presence will increase slightly the relapse response. Therefore, it is possible to say that summation occurred using this procedure.

Summation using odor in the procedure was showed by Cohn & Weiss (2007) using food as reinforcer. They made an equipment that could put the odor into the operant chamber and then take it out in a few seconds, thus, allowing them to use a multiple schedule and train the odor and a sound as discriminative stimuli. After the training phase they carried out a test in extinction in which the stimuli were presented alone and together as a compound and their results showed that the rats responded more when the compound was presented in the test.

Therefore, it is possible that the weak control of the orange odor observed here, by Katner and Weiss (1999) and by Katner et al. (1999) were due to the training procedure; more specifically, the procedure used by the traditional cue-induced model does not allow the odor to be used as discriminative stimulus since the odor remains present during the entire session and requires that the odors that are associated with water and alcohol are presented in separated sessions. Perhaps a better way to make the odor a good predictor of the drug effect is not just to avoid the overshadowing effect produced by the presentation of conditioned reinforcers, but also by improving the discriminative training of the antecedent stimuli using a special operant chamber with an olfactometer performing a typical discriminative training, as was done by Cohn and Weiss (2007).

Summation was also showed with other drugs as cocaine (Panlilio et al., 1996; See et al., 1999), but associative learning processes were never studied using the cue-induced model although this is a model used to study how environmental stimuli are involved in relapse and associative learning processes are deeply involved in relapse in humans.

In summary, the results obtained in this paper showed that changing the continuous reinforcement schedule to an intermittent schedule was not effective in establishing the odor as a discriminative stimulus of the lever-pressing response for alcohol. However, if the odor is trained separately from the conditioned reinforcer it can acquire control over the lever-pressing response, although this control is weak. The results also showed that, when the stimuli are trained alone and tested together, occurs summation of their control over the response it increased relapse responses.

An animal model needs to have predictive and construct validity for the development of the appropriate pharmacological and behavioral treatments (Epstein & Preston, 2003). As Sarter and Bruno (2002) argue, a model with predictive validity, but without construct validity, may find the right medications for the wrong reasons. Thus, improving the antecedent stimuli control over the lever-pressing response is critic to improve the construct validity of the cue-induced relapse model with alcohol. Therefore, further efforts are strongly encouraged in the development of procedure refinements so that it may be possible to properly study the function of the antecedent and consequent stimuli over the alcohol relapse response.

CAPÍTULO 2 – RESPOSTAS DE ESTRESSE E O MODELO *CUE-INDUCED*

Neurofisiologia do Estresse

Um evento é considerado estressante quando elicia uma série de respostas de alerta e fuga no organismo, mediadas pelo Sistema Nervoso Autônomo (SNA) e pelo Sistema Nervoso Central (SNC). Entre essas respostas estão o aumento da frequência cardíaca e pressão arterial, a liberação de glicose pelo fígado, a redistribuição sanguínea (o sangue vai da pele e vísceras para os músculos e cérebro), o aumento da frequência respiratória, a dilatação das pupilas, o aumento do número de linfócitos na corrente sanguínea, entre outros. Além disso, as respostas de reação ao estresse mediadas pelo SNC ocorrem principalmente no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), mas também há uma participação de sítios extra-hipotalâmicos como o neocórtex, o hipocampo, a área tegmental ventral, o núcleo mediano da raphe, o locus coeruleus, o núcleo accumbens (NAc) e a amígdala (principalmente a divisão central da amígdala estendida e o núcleo intersticial lateral da estria terminal) (Carrasco & Van de Kar, 2003; Charlton, Nicol-Ferrier, & Perry, 1987; Curtis & Valentino, 1994; Curtis, Pavcovich, Grigoriadis, & Valentino, 1995; Curtis, Pavcovich & Valentino, 1999; Swanson, Sawchenko, Rivier & Vale, 1983; Zorrilla, Heilig, Wit & Shaham, 2013).

O eixo HPA é responsável pela resposta hormonal ao estresse (Figura 1) e é composto por três estruturas principais: o PVN, o lobo anterior da pituitária (ou hipófise) e pelas glândulas adrenais (para revisão ver Smith & Vale, 2006). A cadeia fisiológica de reação ao estresse regulada pelo eixo HPA se inicia quando os neurônios do PVN são estimulados e liberam nos vasos sanguíneos o neuropeptídeo “Fator Liberador de Corticotropina” (CRF em inglês)⁵. Após liberado, o CRF se liga ao receptor CRF1 presente na pituitária anterior e estimula a pituitária a produzir e a secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação. Por sua vez, o ACTH estimula o córtex

⁵ O CRF é um neuropeptídeo que controla as respostas hormonais, simpáticas e comportamentais ao estresse. Ele atua como neuro-hormônio no eixo HPA e como neurotransmissor em sítios extra-hipotalâmicos. Em geral, sua ação na neurotransmissão é mais prolongada que aquela mediada por neurotransmissores não-petídicos, embora eles possam coexistir em um espaço sináptico, atuando em integração. Assim como os neurotransmissores, os neuropeptídeos precisam se ligar aos seus receptores espalhados pelo SNC para ativar o neurônio seguinte (Carrasco & Van de Kar, 2003).

adrenal que responde liberando o cortisol em humanos ou a corticosterona (CORT) em ratos⁶. Os níveis de cortisol e CORT no sangue são usualmente considerados como marcadores confiáveis de que estímulos ambientais eliciaram respostas de estresse no organismo (Ciccocioppo et al., 2009; Kawasakit & Iwasaki, 1997; Touma, Palme, & Sachsera, 2004).

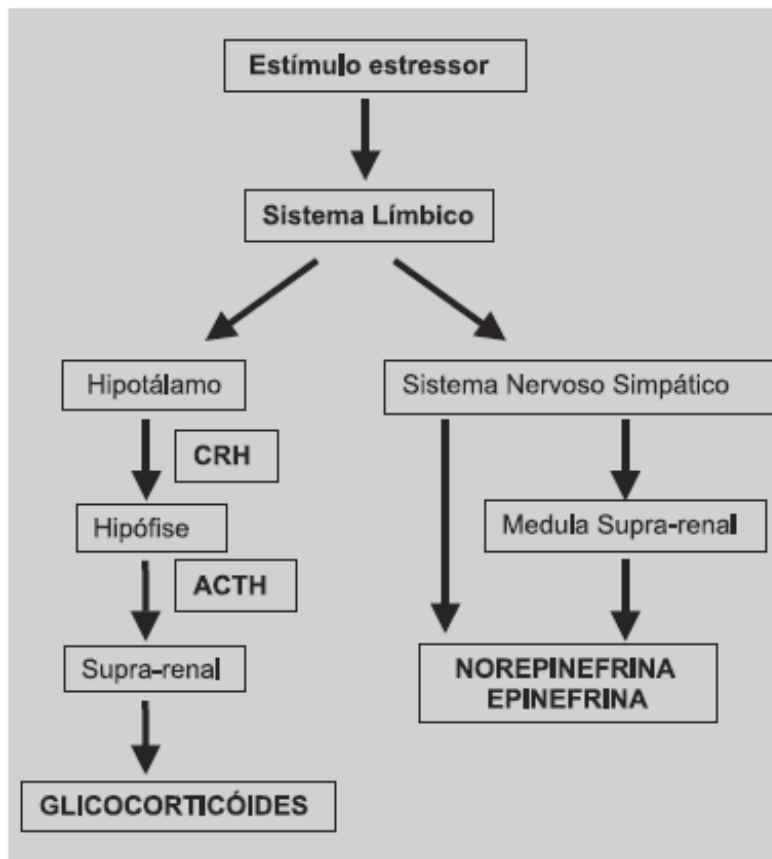


Figura 1 – Ilustração do funcionamento do eixo HPA quando ele é estimulado por um evento estressante. Retirado de Tanno & Marcondes (2002).

Após liberados, os corticoides estimulam a glicogênese (produção de glicose no fígado), diminuem a utilização da glicose celular inibindo os efeitos da insulina, aumentando assim a glicemia (hiperglicemia) e preparando o organismo para a “fuga”.

⁶ O cortisol e a CORT são hormônios glicocorticoides, da família dos esteroides que são produzidos a partir do colesterol nas adrenais e têm como sua principal função atuar na reação fisiológica ao estresse aumentando a pressão arterial e o açúcar no sangue. É importante lembrar que além da resposta ao estresse esses hormônios são produzidos durante o ciclo circadiano e um dos seus principais papéis é atuar no despertar (Marinelli *et al.*, 1994; Touma, Palme, & Sachsera, 2004).

Os corticoides também atuam no sistema circulatório aumentando o número plaquetas e de leucócitos circulantes, além de estimular a liberação de substâncias vasoativas para aumentar a pressão arterial.

Como o eixo HPA funciona por feedback negativo, assim que os corticoides são liberados eles também atuam nos receptores CRF no PVN e no hipocampo com o objetivo de retornar o organismo à homeostase (Carrasco & Van de Kar, 2003; Funk, Zorrilla, Lee, Rice & Koob, 2007).

Além das respostas de reação ao estresse que ocorrem no eixo HPA, existem algumas respostas que acontecem em sítios extra-hipotalâmicos, como os citados acima. Dentre eles, a amígdala⁷ tem um papel central na resposta neural à eventos estressantes, já que ela é a maior fonte extra-hipotalâmica de neurônios que expressam CRF mRNA e possui uma alta densidade de receptores desse neuropeptídeo (Gray, 1993). Além disso, o CRF presente na amígdala é responsável por mediar comportamentos de ansiedade em animais (Heinrichs, Pich, Miczek, Britton & Koob, 1992; Liang et al., 1992; Walker & Davis, 1997); e é por esse papel em mediar respostas de ansiedade e de estresse que a amígdala vem sendo muito estudada no campo da dependência de drogas (Funk, O'Dell, Crawford & Koob, 2006; Funk & Koob, 2007; Koob, 2003; See, Fuchs, Ledford & McLaughlin, 2003; Sommer et al., 2008; Zhao et al., 2006)

O papel do estresse na dependência de álcool

O estresse e, portanto, o “sistema CRF”⁸ estão profundamente envolvidos no alcoolismo (Heilig & Koob, 2007; Koob & Zorrilla, 2010; Le et al., 2000; Liu & Weiss, 2002; Logrip, Koob & Zorrilla, 2011; Sinha, 2001; Sinha et al., 2003) e têm sido relacionados à vários estágios da dependência de álcool como a aquisição e o escalonamento do consumo de álcool (Cippitelli et al., 2012; Mollenauer, Bryson, Robison, Sardo & Coleman, 1993; Nash & Maickel, 1988), a síndrome de abstinência (Breese, Sinha & Heilig, 2011; Koob, 2010) e a recaída ao uso de álcool (Breese et al.,

⁷ A amígdala é a região do SNC responsável por dar saliência afetiva à informação sensorial, entre elas a ansiedade, que é uma resposta emocional frequente durante a abstinência ao uso de drogas (Shekhar, Truitt, Rainnie & Sajdyk, 2005; Koob, 2009).

⁸ Nome dado ao papel geral – hormonal e de neurotransmissão – do CRF no SNC.

2011; Cooney, Litt, Morse, Bauer & Gaupp, 1997; Funk & Le, 2006; Gehlert et al., 2007; Koob, 2010; Le et al., 2000; Le & Shaham, 2002; Pickens, Hatsukami, Spicer & Svikis, 1985; Sinha, 2001); além de haverem indícios de um fator genético envolvendo o alcoolismo e as vias neurais ligadas às respostas ao estresse (Hansson et al., 2006).

Koob e colegas têm proposto que o início da adicção ao álcool é modulado pelo circuito do reforço e pela atuação do CRF como hormônio no eixo HPA (Heilig & Koob, 2007; Koob et al., 2004; Koob & Kreek, 2007; Koob, 2008; Koob, 2010; Koob & Zorrilla, 2010; Koob, 2013; Parylak, Koob & Zorrilla, 2011). O circuito do reforço está envolvido diretamente no início da adicção já que ele media os efeitos das drogas de abuso – assim como todos os estímulos reforçadores (Mijares & Silva, 2006). Porém, de acordo com Koob, conforme ciclos de intoxicação ocorrem, parte dos processos de homeostase do circuito do reforço falham em retornar aos níveis normais e, portanto, causam desregulações nesse circuito (Koob, 2008, 2010, 2013). Essa desregulação resulta em um estado emocional negativo, que contribui para o uso compulsivo do álcool. Segundo Koob, é nesse momento que o álcool passa a ser usado principalmente como reforçador negativo, com a função de aliviar esses estados emocionais e que o sistema de resposta ao estresse passa a ter um papel maior na adicção (Koob, 2013; Koob & Bloom, 1988; Koob & Le Moal, 1997; Koob & Le Moal, 2008).

Sobre esse papel do sistema do estresse na adicção, Koob (2010) afirma que a administração aguda da maioria das drogas de abuso ativa o eixo HPA e pode, inicialmente, facilitar a atividade do circuito do reforço e resultar na facilitação da aquisição do comportamento de procura pela droga (Fahlke & Hansen, 1996; Goeders & Guerin, 1996a; Piazza et al., 1993; Piazza & Le Moal, 1997). Porém, o uso crônico de álcool, e a sua abstinência, atenuam a atividade do eixo HPA (Koob & Kreek, 2007; Kreek & Koob, 1998; Rivier, Imaki & Vale, 1990; Zorrilla, Valdez & Weiss, 2001). Isso ocorre porque altas taxas circulantes de CRF exercem feedback negativo e “desligam” o eixo HPA, enquanto altas taxas circulantes de CRF “sensibilizam” a amígdala, aumentando o seu papel na modulação do estresse (Koob & Kreek, 2007; Kreek & Koob, 1998). Portanto, de acordo com Koob, conforme a dependência evolui são sistemas extra-hipotalâmicos que passam a ficar mais ativos e a atuar no seu agravamento (Kreek & Koob, 1998; Koob & Kreek, 2007; Koob & Le Moal, 2005; Koob, 2010).

Corroborando com a hipótese de Koob de que o circuito do reforço e o eixo HPA estão envolvidos no início da adicção às drogas, Piazza liderou vários estudos durante a década de 90 que tiveram como objetivo desvendar a relação entre o eixo HPA e a dependência de cocaína e que mostraram que a atuação do eixo HPA está profundamente ligada à ativação do circuito do reforço e, portanto, relacionada ao início da dependência por cocaína (Deroche, Marinelli, Le Moal & Piazza, 1997; Marinelli et al., 1994; Marinelli & Piazza, 2002; Piazza et al., 1993; Piazza et al., 1994; Piazza, Deroche, Rouge-Pont & Le Moal, 2000; Piazza & Le Moal, 1996).

Os estudos de Piazza mostraram, por exemplo, que a presença de CORT no plasma sanguíneo pode aumentar o valor reforçador da cocaína, pois ratos que passaram por ADX e, portanto, não tem CORT no plasma sanguíneo, reduziram a autoadministração dessa droga (Deroche et al., 1997), além desses animais sempre consumirem menos cocaína que animais que não passaram pela cirurgia, não importando qual dose de cocaína seja oferecida (Marinelli & Piazza, 2002; Piazza, Deroche, Rouge-Pont & Le Moal, 2000). Ainda, a supressão da CORT circulante pelo tratamento com Metirapona ou Cetoconazol⁹ também reduz a auto-administração de cocaína (Goeders, & Guerin, 1996b; Goeders & Clampitt, 2002; Marinelli & Piazza, 2002; Moffett & Goeders, 2007; Piazza et al., 1994).

Além disso, a resposta locomotora induzida pela injeção de psico-estimulantes no NAc, que é dopamina-dependente, é atenuada pela supressão de CORT através da ADX (Marinelli et al., 1994) e a injeção de CORT na mesma concentração em que esses hormônios são liberados no sangue diante de um evento estressante, tem efeito de reforçador positivo e estimula a liberação de dopamina no NAc (Deroche, Piazza, Le Moal & Simon, 1993; Piazza et al., 1993). Foi observado também que o bloqueio da liberação de CORT por ADX e o tratamento com Metirapona previnem o aumento de dopamina induzido por estresse no NAc (Rougé-Pont, Marinelli, Le Moal, Simon & Piazza, 1995; Rougé-Pont, Deroche, Moal & Piazza, 1998; to revision see Marinelli &

⁹ A metirapona (metyrapone, em inglês) atua nas adrenais inibindo o esteróide 11 β -hidroxilase, causando o bloqueio da síntese de cortisol ou CORT. O cetoconazol (ketoconazole, em inglês), bloqueia a 17-alfa-hidroxilase e 17,20-liase, inibindo a produção androgênica. Em doses maiores, bloqueia também a enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol e a 11 β -hidroxilase, reduzindo a síntese de cortisol ou CORT. A metirapona e o cetoconazol são utilizados para verificar não só o papel do CRF, mas, principalmente, o papel do eixo HPA já que eles bloqueiam hormônios que participam da resposta desse eixo ao estresse.

Piazza, 2002), além da AXD também diminuir a atividade basal dopaminérgica na área tegmental ventral (Piazza et al., 1996) e o número de receptores dopaminérgicos (Biron, Dauphin & Di Paolo, 1992).

Além dos estudos de Piazza com cocaína, experimentos que utilizaram o álcool como reforçador, mostraram que a Metirapona – inibidor da síntese de CORT nas adrenais – diminui o consumo de álcool em ratos geneticamente selecionados (Fahlke, Hard, Thomasson, Engel & Hansen, 1994), que a administração de CORT em ratos aumenta o consumo voluntário de álcool (Fahlke et al., 1994; Fahlke, Hård, Thomasson, Engel & Hansen 1994; Fahlke, Hård, Hansen, Eriksson & Engel, 1995) e que a exposição ao álcool ativa o eixo HPA através do receptor CRF (Krishnan, Nash & Maickel et al., 1991; Morrow, Porcu, Boyd & Grant, 2006; Rivier et al., 1984).

Além disso, sítios extra-hipotalâmicos, como o CeA e a amígdala basolateral (BAL), se tornam hiperativos (liberam maior quantidade de CRF) durante a abstinência (Imaki, Nahan, Rivier, Sawchenko & Vale, 1991; Makino, Gold & Schulkin, 1994; Schulkin, McEwen & Gold, 1994; Shepard, Barron & Myers, 2000) e injeções de antagonistas do receptor CRF1 (CRF1R) no CeA reduzem comportamentos de ansiedade, déficits motivacionais por outros reforçadores e a auto-administração excessiva de substâncias aditivas iniciada durante a abstinência aguda (Heilig & Koob, 2007; Heilig, Egli, Crabbe & Becker, 2010; Koob & Zorrilla, 2010; Parylak et al., 2011). Confirmando os estudos com animais, um estudo com humanos mostrou que os níveis de CRF no fluido cefalorraquidiano estão elevados em alcóolatras em abstinência (Adinoff et al., 1996).

Tomados em conjunto esses dados mostram que, conforme proposto por Koob, a amígdala e outros sítios extra-hipotalâmicos ficam sensibilizados em estágios mais avançados da dependência, fato que, por sua vez, pode tornar o indivíduo mais vulnerável à recaída (Breese et al., 2011; Breese, Knapp & Overstreet, 2004; Liu & Weiss, 2003; Sinha, 2001; Sinha et al., 2011; Sommer et al., 2008; Valdez et al., 2002).

Com a crescente preocupação com as interações entre o estresse e a recaída ao uso de drogas, foi criado na década de 90 um modelo animal para auxiliar nas investigações do papel do estresse na recaída ao uso de drogas. Esse modelo, chamado de “modelo de recaída pelo estresse”, tem a mesma lógica do modelo *cue-induced*. Na fase de treino os animais são ensinados a pressionar uma barra para receber a droga e em seguida essa

resposta é colocada em extinção. Então, os animais são submetidos a fase de testes de reinstalação na qual um estímulo estressor é inserido e é observado se os animais voltam a pressionar a barra que, nessa fase, não dá mais acesso à droga. Essas respostas são consideradas respostas de procura pela droga (*drug seeking*) e indicativas de que a exposição ao evento estressante levou à recaída (Liu & Weiss, 2003; Mason, Shaham, Weiss, & Le, 2009; Sanchis-Segura & Spanagel, 2006). Atualmente, os estressores mais utilizados nesse modelo são o choque na pata e a yohimbina, um antagonista do receptor noradrenérgico α_2 , que é ansiogênico e induz respostas de estresse em humanos e primatas (Le et al., 1998; Le et al., 1999; Le et al., 2011; Marinelli et al., 2007; Stopponi et al., 2011).

Estudos utilizando esse modelo têm mostrado que a recaída ao uso de álcool induzida por estímulos ambientais é mediada principalmente por sítios extra-hipotalâmicos (Le et al., 2000, 2002; Marinelli et al., 2007), portanto confirmando a hipótese de Koob sobre a evolução da adicção. Le et al. (2000) testaram o efeito de dois antagonistas do receptor CRF (D-phe-CRF e CP-154,526) e o efeito da adrenalectomia no modelo de recaída por estresse. A adrenalectomia (ADX), em geral, é realizada com a finalidade de eliminar a liberação de CORT do sangue e essa operação foi utilizada com o objetivo de checar se a recaída era função da ação do eixo HPA ou de eixos extra-hipotalâmicos. Os resultados desse estudo mostraram que os dois antagonistas do receptor CRF foram eficazes em bloquear a recaída produzida por choque na pata, mostrando que o sistema CRF está envolvido na recaída ao uso de álcool induzida por estresse. No entanto, a adrenalectomia não teve nenhum efeito na recaída por estresse, mostrando que a recaída induzida por estímulos estressantes parece ser principalmente mediada pelo CRF extra-hipotalâmico, já que a falta de CORT no sangue produzida pela ausência das adrenais não foi suficiente para bloquear a recaída.

Outros estudos têm dados coerentes com os resultados de Le et al. (2000). Marinelli et al. (2007) mostraram que o Antalarmin – antagonista seletivo do receptor CRF1 – não teve efeito na secreção de CORT induzida pela yohimbina. Além disso, o bloqueio dos receptores CRF no núcleo mediano da raphe, na área tegmental ventral e no núcleo intersticial lateral da estria terminal foi suficiente para atenuar a recaída por choque e por yohimbina (Le et al., 2002; Shaham et al., 2003).

Apesar de estar bem documentado que a atuação de sítios extra-hipotalâmicos fazem parte da recaída à procura de álcool induzida por estímulos estressantes, dados de Piazza e colegas mostraram que, na recaída à procura de cocaína, há um papel do sistema CRF e esse papel pode ser devido à atuação do CRF no eixo HPA (Deroche et al., 1997). Deroche et al. (1997) demonstraram que a recaída por cocaína pode ser induzida pela liberação de glicocorticoides, pois injeções de CORT foram suficientes para reinstalar a procura pela droga. Além disso, o tratamento com Metirapona, com Cetoconazol e com CP-154,526¹⁰ diminuiu a reinstalação da procura por cocaína induzida por estímulos ambientais anteriormente associados ao consumo de cocaína (Goeders, & Guerin, 1996b; Goeders & Clampitt, 2002; Marinelli & Piazza, 2002; Moffett & Goeders, 2007; Piazza et al., 1994).

Apesar desses dados demonstrarem que o eixo HPA pode estar envolvido na recaída à procura de cocaína, os próprios autores relatam que eles devem ser vistos com cautela uma vez que eles não só modificam a secreção de glicocorticoides, como também alteram a biossíntese de outros esteroides e neurotransmissores (Couch, Muller, Perry & Winter, 1987; Rupprecht et al., 1998).

Embora os dados citados anteriormente demonstrem que o eixo HPA pode estar envolvido na recaída do uso de cocaína, eles são contrários aos dados apresentados com álcool e à proposição de Koob, de que fases mais avançadas da adicção, como a síndrome de abstinência e a recaída, são principalmente mediadas por sistemas extra-hipotalâmicos que ficam mais sensíveis conforme o indivíduo é exposto a estresses mais crônicos e a adicção se torna mais profunda.

Essa diferença de pontos de vista pode ocorrer porque os estudos com álcool, citados anteriormente, usaram apenas adrenalectomia para estudar a participação do eixo HPA na síndrome de abstinência e na recaída por estresse. Porém, os estudos de Piazza utilizaram, além de adrenalectomia, a Metirapona, o Cetoconazol e injeções de CORT, mapeando com mais precisão o papel do eixo HPA nessas duas etapas da adicção.

¹⁰ O CP-154,526 é um antagonista não peptídico do receptor CRF1. Fármacos antagonistas dos receptores CRF, como o CP-154,526, são utilizados para verificar se há um papel global do sistema CRF no tema estudado.

Portanto, os resultados dos dois grupos de pesquisadores não são excludentes, pois não é improvável que o CRF atue no eixo HPA e em sítios extra-hipotalâmicos em todas as fases da adicção.

Um outro ponto importante é o fato de que a maioria dos estudos mencionados se focaram principalmente na atuação do sistema CRF na recaída induzida por estímulos estressantes, no entanto, a recaída é frequentemente associada a múltiplos fatores e, entre eles, aos estímulos ambientais previamente associados com o consumo do álcool (Bachteler, et al., 2005; Cannella et al., 2009; Ciccocioppo et al., 2001; Ciccocioppo et al., 2003; Ciccocioppo, et al., 2004; Cooney et al., 1997; Stopponi et al., 2011; Vengeliene et al., 2007).

Foi encontrado apenas um artigo na literatura que investigou a função do sistema CRF na recaída por álcool usando o modelo *cue-induced*. A falta de pesquisa referente à relação entre o estresse e recaída do modelo *cue-induced* chama a atenção, pois este mimetiza alguns aspectos importantes da adicção ao álcool nos quais sabe-se que o sistema CRF está envolvido como, por exemplo, a síndrome de abstinência.

Além disso, durante a fase de reinstalação as respostas são emitidas em extinção e é bem documentado que a remoção ou mesmo a redução de reforçadores apetitivos aumenta a concentração de CORT no plasma (Coover, Goldman & Levine, 1971; Kawasakit & Iwasaki, 1997), mostrando que procedimentos de extinção podem ser comparados a situações estressantes.

Nesse único artigo que encontrado que visou estudar se há alguma atuação do sistema CRF na recaída induzida por estímulos ambientais, Liu & Weiss (2003) dividiram os sujeitos em seis grupos experimentais. Para quatro desses grupos, durante a fase de treino as respostas de pressão à barra tinham como consequência a apresentação de um estímulo luminoso e a liberação de álcool. Para os dois últimos grupos a única consequência para as respostas de pressão à barra era a liberação de álcool. Após a fase de treino todos os animais passaram por uma fase de extinção na qual as respostas de pressão à barra não tinham como consequência nem o estímulo luminoso, nem a solução de álcool. Na fase de reinstalação dois grupos que haviam sido treinados com a luz foram testados apenas com a luz; os outros dois grupos foram testados com a luz e o choque na pata e, por fim, os dois grupos que não haviam passado pelo treino com a luz foram

testados apenas com o choque na pata. Além disso, dos fármacos foram utilizados na fase de testes, um antagonista não seletivo dos receptores opiáceos – Naltrexona – fármaco que é reconhecido pelo seu poder de bloquear a recaída no modelo *cue-induced* (Bienkowski *et al.*, 1999; Ciccocioppo *et al.*, 2003) e um antagonista não seletivo dos receptores CRF – D-Phe-CRF – conhecido por bloquear a recaída no modelo de recaída por estresse. A Naltrexona e o D-Phe-CRF foram aplicados cada um em três grupos (um grupo que passou pelo teste com a luz, um que passou pelo teste com o choque e um que passou pelos exposição com os dois estímulos).

Os resultados do estudo de Liu & Weiss (2003) mostraram que a recaída foi significativamente maior quando o choque e a luz foram apresentados em conjunto na fase de testes. Além disso, os dois fármacos bloquearam a recaída quando os dois estímulos foram apresentados em conjunto, o D-Phe-CRF bloqueou a recaída causada pelo choque e não pela luz e a Naltrexona bloqueou a recaída causada pela luz e não pelo choque. Esses resultados parecem indicar que a recaída por estresse e a recaída causada por estímulos ambientais são mediadas por substratos neuro-farmacológicos distintos e que, quando ativados em conjunto, exacerbam a recaída.

Embora o trabalho de Liu & Weiss (2003) tenha mostrado que não há uma relação entre a recaída causada por estímulos ambientais e o sistema CRF ainda resta muito a ser investigado, pois esse resultado é diverso de toda a literatura de recaída induzida por estresse que mostra que bloqueadores de CRF são muito eficazes em bloquear a recaída (Marinelli *et al.*, 2007; Moffett & Goeders, 2007; Le *et al.*, 2000). Além disso, como já mencionado, os estudos que utilizaram o modelo de recaída por estresse também não fizeram um mapeamento completo da atuação do eixo HPA na recaída por álcool, portanto, ainda há uma lacuna grande a ser preenchida acerca do papel do CRF na recaída, seja ela induzida por estresse ou por estímulos ambientais.

Se a exposição ao procedimento de extinção pode ser comparada a um evento estressante e se a apresentação de estímulos estressantes induz à recaída ao uso de álcool, é possível que a recaída observada no modelo *cue-induced*, não seja apenas função da exposição aos estímulos ambientais previamente pareados com o álcool, mas também função da estimulação aversiva presente na situação de teste. Isso pode comprometer a validade de constructo do modelo, já que o modelo é tido como um modelo reproduz

exclusivamente o papel de estímulos ambientais na recaída. Logo, o sistema CRF pode estar envolvido de duas formas no modelo *cue-induced*: a) em uma mediação momentânea de reação ao estresse causado por algumas etapas do procedimento desse modelo e b) num envolvimento mais geral do sistema CRF na adicção como um todo.

O objetivo dos estudos apresentados neste capítulo é avaliar o papel do sistema CRF e do eixo HPA na recaída ao uso de álcool mimetizada pelo modelo *cue-induced*. Portanto, foram realizados três experimentos nos quais ratos msP e Wistars foram treinados no procedimento clássico modelo *cue-induced* com álcool e, antes das sessões de testes, o Antalarmin (Experimento 1), a Metirapona (Experimento 2) e a CORT (Experimento 3) foram injetados nos animais antes das sessões de teste. As duas cepas de ratos foram utilizadas, pois os ratos msP foram selecionados pela sua alta preferência por álcool e junto com essa preferência por álcool foi selecionado um aumento da regulação da expressão do gene CRF1R, que codifica o receptor CRF1R (Hansson et al., 2006). Por causa desse aumento, esses ratos apresentam uma maior sensibilidade a estímulos estressantes, podendo assim fornecer informação adicional sobre o papel do sistema CRF na recaída por álcool.

THE ROLE OF CRF STRESS SYSTEM IN THE CUE-INDUCED RELAPSE FOR ALCOHOL

Rationale: Recent studies have shown that the CRF stress system is deeply involved in alcohol relapse produced by exposure to stressful events like foot shock or yohimbine injections. Exposure to environmental cues is also known to be a trigger for alcohol relapse, nevertheless, the relation between the relapse produced by the cue-induced model and the CRF stress systems remains unknown.

Objectives: This work had the purpose to evaluate if the CRF stress system or the HPA axis are involved in relapse produced by environmental cues.

Methods: Antalarmin, a selective CRH1R receptor antagonist, Metyrapone a corticosterone (CORT) synthesis inhibitor and CORT were injected i.p. in the animals (msP and Wistar rats) during the reinstatement test of the cue-induced relapse model.

Results: Antalarmin (dose 20 mg/kg) blocked relapse produced by environmental cues in both rats strains. Metyrapone (doses 50 mg/kg and 100 mg/kg) blocked relapse in msP rats and only dose 100 mg/kg blocked relapse in Wistar rats. CORT injections had no effect on relapse in both strains.

Conclusions: The results obtained in this work showed that the CRF stress system and the HPA axis are involved in cue-induced alcohol relapse.

Key words: cue-induced, alcohol, relapse, stress, CRF

Alcoholism is a chronic relapsing disorder characterized by compulsive alcohol intake and a loss of control over alcohol consumption with impairments in social and occupational functions (Koob, 2003; Koob et al., 2004; Koob & Kreek, 2007). Koob and colleagues have proposed that, as dependence develops, there is a shift from alcohol used as a positive reinforcer for its use as a negative reinforcer (Koob, 2003; Koob et al., 2004; Koob, 2010). With chronic alcohol consumption, use cessation starts to be accompanied by negative withdrawal symptoms and alcohol starts to be consumed to negative affect states alleviation (Koob, 2003; Koob, 2010).

According to Koob and colleagues, during early stages of addiction, when alcohol is used as a positive reinforcer, the main neural systems that are involved in alcohol consumption escalation is the reward system and the HPA axis (Koob, 2003; Koob et al., 2004; Koob & Kreek, 2007).

Endorsing Koob's proposal researches have shown that glucocorticoids can interact with the dopaminergic system in the *nucleus accumbens* (NAcc) to give incentive value to drugs, what can lead to increased drug consumption in early stages of addiction (Deroche, Piazza, Le Moal & Simon, 1993; Deroche, Marinelli, Le Moal & Piazza, 1997; Piazza et al., 1993). Moreover, treatment with Metyrapone decrease alcohol consumption in rats genetically selected to their alcohol preference (Fahlke, Hard, Thomasson, Engel & Hansen, 1994), corticosterone (CORT) administration can increase alcohol self-administration (Fahlke et al., 1994; Fahlke, Hård, Thomasson, Engel & Hansen 1994; Fahlke, Hård, Hansen, Eriksson & Engel, 1995) and the HPA axis is regulated by feedback and chronic alcohol consumption, chronic stress and withdrawal can attenuate its activity (Koob & Kreek, 2007; Kreek & Koob, 1998; Rivier, Imaki & Vale, 1990; Zorrilla, Valdez & Weiss, 2001).

However, with the shift to negative reinforcement extra-hypothalamic systems begin to play a major role in alcohol addiction, what is called "the dark side of addiction" (Koob, 2003; Koob et al., 2004; Koob & Kreek, 2007). In fact, CRF1 receptor antagonists injections in the amygdala central nucleus reduced anxiety-like behaviors, motivational deficits by other reinforcers and the excessive drug self-administration initiated after acute abstinence (Heilig & Koob, 2007; Heilig, Egli, Crabbe & Becker, 2010; Koob & Zorrilla, 2010; Logrip, Koob & Zorrilla, 2011).

Recent studies have shown that alcohol relapse is also deeply connected with the CRF stress system. During abstinence amygdala and other extra-hypothalamic sites are sensitized increasing the susceptibility to stress-induced relapse because these systems threshold is decreased (Heilig & Koob, 2007; Heilig, Egli, Crabbe & Becker, 2010; Koob & Le Moal, 2008). Moreover, several studies using the stress reinstatement model have shown that CRF receptor antagonists as Antalarmin (Cippitelli et al., 2012; Marinelli et al., 2007), D-Phe-CRF (Le et al., 2000) and CP-154,526 (Le et al., 2000; Moffett & Goeders, 2007) can block stress-induced relapse to alcohol seeking.

In addition to stress, other factors are associated with drug seeking resumption during abstinence and one of them is the exposure to environmental cues (Bachteler, Economidou, Danysz, Ciccocioppo, & Spanagel, 2005; Cannella et al., 2009; Ciccocioppo, Angeletti & Weiss, 2001; Ciccocioppo, Lin, Martin-Fardon & Weiss, 2003; Ciccocioppo, et al., 2004; Stopponi et al., 2011; Vengeliene, Heidbreder & Spanagel, 2007). Although, is well demonstrated that exposure to environmental cues can lead to relapse and that the CRF system is involved in relapse to alcohol use, the relation between relapse induced by environmental cues and the CRF system remains little studied.

Lui & Weiss (2003) investigated the relation between stress, alcohol cues and relapse. Their results showed that relapse is greater when stress and alcohol cues are presented together. Moreover, they found that Naltrexone, a non-selective opioid receptor antagonist, was able to block cue-induced relapse when the alcohol cue was presented together with the foot shock and alone, but failed in blocking foot shock relapse when it was presented alone. On the other hand, D-Phe-CRF, a non-selective CRF receptor antagonist, blocked stress-induced relapse when foot shock was presented with alcohol cues and alone, but failed in blocking cue-induced relapse.

Although Liu & Weiss (2002) data seems to show that the CRF system is not involved in cue-induced relapse, the role of CRF system in alcohol addiction is well established and the cue-induced model mimics some important aspects of alcoholism in which this system is known to play an important role as withdrawal (Breese, Sinha & Heilig, 2011; Koob, 2010). Furthermore, responses emitted at the reinstatement test are under extinction (i.e. alcohol is not delivered as a consequence for responding) and

removal or even reduction of appetitive reinforcers results in increase of plasma CORT concentrations (Coover, Goldman & Levine, 1971; Kawasaki & Iwasaki, 1997) showing that extinction procedures can be closely related to stressful situations.

This work aimed to evaluate if the CRF stress system and the HPA axis are involved in the cue-induced relapse to alcohol use. Therefore, animals were trained in the cue-induced model and Antalarmin, a selective CRF1R receptor antagonist, Metyrapone, a CORT synthesis inhibitor, and CORT itself were injected i.p. before the reinstatement test. Moreover, two rats strains were used, the unselected Wistars and the Marchigian–Sardinian Preferring (msP) rats. The msP rats were used because together with their high alcohol preference an up-regulation in the expression of the CRFR1 gene which encodes the CRF1R was selected (Hansson et al., 2006). Consequently, the msP animals have anxiety and depression-like traits and their use in this study can provide additional information about the role of CRF system in alcohol relapse.

METHOD

Animals

Male msP rats used in Antalarmin and Metyrapone experiments were 106–129 days ($n=20$) at the beginning of the experiment and male msP rats ($n=10$) used in Corticosterone experiment were 42 old. Male Wistars rats ($n=30$) were 48 days at the beginning of all the experiments. They were kept in pairs in a room with a reverse 12:12 h light/dark cycle (lights off at 8:00 a.m.), in a temperature of 20–22°C and a humidity of 45–55%. The rats had free access to food and water except when described in the procedure. All the procedures were conducted in adherence with the *European Community Council Directive for Care and Use of Laboratory Animals* and the *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.

Drugs

Ethanol solutions were prepared by diluting 95% alcohol in tap water. As described by Cippitelli et al. (2012), the selective CRF1 receptor antagonist Antalarmin was suspended in a vehicle composed by 10% Tween® 80 and distilled water. It was given intraperitoneally (i.p.) at the doses of 10 mg/kg and 20 mg/kg in a volume of 1 ml/kg. The CORT synthesis inhibitor Metyrapone was dissolved in 40% propylene glycol and then diluted in physiological saline. It was administered i.p. at doses of 50 mg/kg and 100 mg/kg in a volume of 2ml/kg. The glucocorticoid CORT was dissolved in 1% Tween® 80, then diluted in distilled water and sonicated. It was administered i.p. at doses of 2.5 mg/kg and 5 mg/kg in a volume of 1 ml/kg.

Apparatus

During the Alcohol Self-administration phase, volumetric drinking tubes of 400 mL were used to monitor liquids consumption. Training, Extinction and Reinstatement sessions were conducted in standard operant conditioning chambers from Med Associates™ placed inside sound attenuating boxes with an exhauster that provided air circulation. Each chamber was equipped with a drinking reservoir (volume capacity 0.30 ml) positioned 4 cm above the grid floor in the center of the front panel of the chamber. Two retractable levers were located 3 cm to the right or to the left of the drinking receptacle. An infusion pump was activated only by responses on the right (active), while responses on the left (inactive) lever were recorded but do not resulted in the activation of the pump. Auditory and visual stimuli were presented via a speaker and a light located on the front panel. The floor was a stainless steel grid, under which a tray was always filled with shaving woods. A microcomputer with software and interface manufactured by Med Associates™ controlled the operation of the boxes and the recording of the behavioral data. To produce the odor stimuli used in training and reinstatement sessions, before sessions beginning sawdust was placed in the tray of the experimental boxes and five drops (approximately 0.1 mL) of orange or anise extract were placed in the sawdust.

Procedure

Alcohol Self-Administration Training

This phase had the purpose to develop voluntary alcohol self-administration (EtOH) on the animals. To achieve this objective the animals received a solution containing 10% EtOH (10E) in their home cages for seven days and had free access to this solution 23.5h/day. Alcohol consumption was measured every day.

Shaping

After the Alcohol Self-Administration phase, the animals were trained to press the right lever under a FR1 schedule. At the first day, they were placed into the operant boxes for 13h and 0.1 mL of water given as consequence to lever-pressing responses. In this session, food was placed above the tray. After the session, the animals were removed from the boxes and left for 24h in their home-cages. The second session was the same as described above, but had 2h length period and no food was given during the session. The third session was exactly the same as the second but was just 1h length. The fourth session was 30 min length and 0.1 mL of ethanol given as consequence to lever-pressing responses instead of water. In this sessions both lever were available, but just responses at the right lever had alcohol as consequence and the left lever was used as control bar. The animals were not deprived of food or water during this phase.

Training phase

During the training phase the rats were trained under a discriminative procedure. In the presence of an orange odor (S1), lever pressing responses under CRF schedule produced 0,1 mL of the 10E solution and the activation of a light stimulus (Sr1). Whereas in the presence of anise odor (S2), lever pressing responses under CRF produced 0,1 mL of water and the activation of a sound stimulus (Sr2). All stimuli that were consequence to lever pressing were available for 4 s.

Each training condition was presented in separate sessions, comprising 30 min each and with 24 h of interval between them. All animals were submitted to 20 training sessions, in which 10 sessions were done with EtOH 10% solution as consequence to

lever pressing responses and 10 sessions were done with water as consequence. After the training session all chambers were cleaned with water and soap.

Extinction phase

Rats were submitted to a daily 30-min extinction sessions on 10 consecutive days, without the presentation of discriminative stimuli and conditioned reinforcers used during the training phase. Responses at the previously active lever activated the syringe pump but had no scheduled consequences.

Experiment 1: Effect of Antalarmin on cue-induced reinstatement of alcohol seeking in msP and Wistars rats

The day after the last extinction session, msP rats ($n=10$) and Wistars rats ($n=10$) were submitted to the reinstatement test. This test lasted 30 min under conditions identical to those during the training phase, except that alcohol and water were not available. In the first session all animals were treated with vehicle and presented to S2/Sr2. In the second, third and fourth reinstatement sessions it was evaluated whether Antalarmin can block the cue-induced relapse. Rats were treated i.p. with vehicle or Antalarmin (10 and 20 mg/kg) 30 min before the reinstatement test. Animals received vehicle or Antalarmin treatments according to a counterbalance Latin square design. A 3-day interval, during which animals remained in their home cage, was allowed between drug tests.

Experiment 2: Effect of Metyrapone on cue-induced reinstatement of alcohol seeking in msP and Wistars rats

The procedure done here was very similar to procedure done at Antalarmin experiment. Wistars rats ($n=10$) and msP rats were submitted to the reinstatement test one day after the last extinction session. All reinstatement sessions lasted 30 min under conditions identical to those during the training phase, except that alcohol and water were

not made available. In the first session all animals were treated with vehicle and presented to S2/Sr2. In the second, third and fourth reinstatement sessions it was evaluated whether Metyrapone can block the cue-induced relapse. Rats were treated i.p. with vehicle or Metyrapone (50 and 100 mg/kg) 1h before the reinstatement test. Animals received vehicle or Metyrapone treatments according to a counterbalance Latin square design. A 3-day interval, during which animals remained in their home cage, was allowed between drug tests.

Experiment 3: Effect of CORT on cue-induced reinstatement of alcohol seeking in msP and Wistars rats

The procedure done here was very similar to procedure done at Antalarmin and Metyrapone experiments. After the last extinction session, msP rats ($n=10$) and Wistars rats ($n=10$) were submitted to the reinstatement test. All reinstatement sessions lasted 30 min under conditions identical to those during the training phase, except that alcohol and water were not available. In the first session all animals were treated with vehicle and presented to S2/Sr2. In the second, third and fourth reinstatement sessions it was evaluated whether CORT can increase the cue-induced relapse. Rats were treated i.p. with vehicle or CORT (2.5 and 5 mg/kg) 30 min before the reinstatement test. Animals received vehicle or CORT treatments according to a counterbalance Latin square design. A 3-day interval, during which animals remained in their home cage, was allowed between drug tests.

Data Analysis

For Antalarmin and Metyrapone experiments performance during training phase was analyzed by repeated measures ANOVA for msP and Wistars. Relapse in the vehicle group was analyzed by repeated measures ANOVA with three levels (extinction, S1/Sr1 and S2/Sr2) and drug effect was also analyzed by repeated measures ANOVA with three levels (vehicle, dose 1, dose 2) for msP and Wistars.

For CORT experiment, training phase was analyzed by mixed ANOVA with one

factor within (ethanol or water) and one factor between (msP or Wistars). Relapse in the vehicle group was analyzed by a mixed ANOVA with three factors within (extinction, and S1/Sr1 and S2/Sr2) and one factor between (msP or Wistars). The effect of corticosterone injections were analyzed by a mixed ANOVA with three factors within (vehicle, dose 1, dose 2) and one factor between (msP or Wistars).

For all experiments Analysis of variance was followed by the Bonferroni test when appropriate and statistical significance was set at $p < 0.05$.

It is worthy to remark that the statistical analysis of the data obtained in Antalarmin and Metyrapone experiments were different from the CORT experiment, because in the first experiments msP rats were much older than Wistar rats, so, any difference between these groups, could be explain by any or both of the two variables, strain or age. Consequently, strains were just compared in CORT experiment.

RESULTS

Experiment 1: Effect of Antalarmin on cue-induced reinstatement of alcohol seeking in msP and Wistars rats

During training phase, Wistars and msP animals learned to discriminate between alcohol- and water-paired conditions. At the end of the training phase lever pressing was significantly higher for alcohol than for water [$F(1, 9) = 11.40$, $p = 0.008$] for Wistars and $F(1,9) = 36.37$, $p < 0.001$] for msP. During the 10 extinction days, lever pressing at previously alcohol and water paired lever progressively decreased for both strains.

In reinstatement tests (Fig. 1), repeated measures ANOVA revealed that reinstatement of alcohol seeking occurred when alcohol previously associated cues were presented [$F(2, 9) = 11.46$, $p < 0.001$ for Wistars and $F(2,8) = 14.28$, $p < 0.001$ for msP]. The post-hoc test showed a robust reinstatement of responding under S1/Sr1 presentation ($p < 0.001$ for Wistars and msP) but not under S2/Sr2 presentation compared with the last three extinction days. Also, responses emitted during S1/Sr1 presentation were significantly different from responses emitted in the presence of S2/Sr2 ($p < 0.001$ for Wistars and msP).

Pre-treatment with Antalarmin when S1/Sr1 was presented at reinstatement sessions significantly reduced relapse [F(2,9)= 31.02; $p < 0.001$ for Wistars and F (2,8) = 3.46, $p = 0.05$ for msP]. Post-hoc analysis revealed that relapse responses were significantly reduced by Antalarmin dose 20 mg/kg ($p < 0.001$ for Wistars and $p = 0.05$ for msP) but the 10 mg/kg dose had no effect on relapse for both strains.

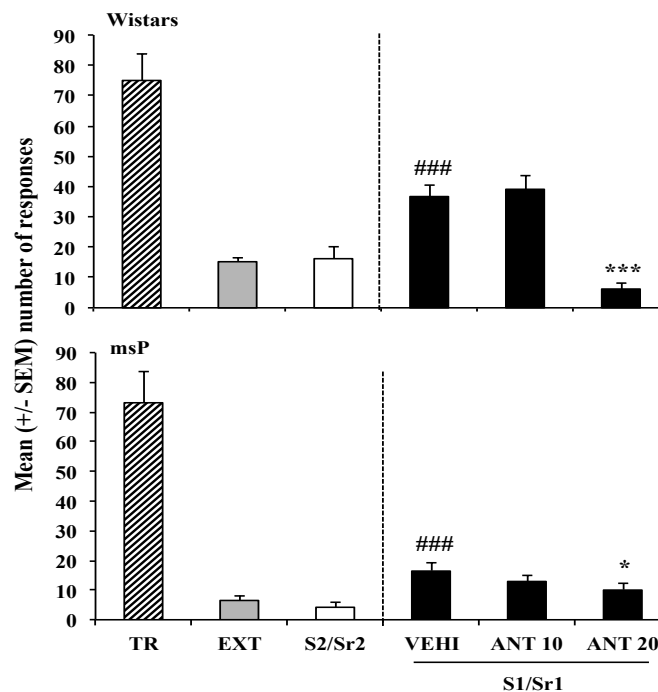


Figure 1 - Effect of Antalarmin on cue-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior in Wistar and msP rats. TR shows ethanol-reinforced responses at the end of training phase and EXT shows responses during the final three extinction sessions. During reinstatement sessions, animals were exposed to stimuli previous associated to alcohol intake (S1/Sr1). When vehicle (VEH) was administered, lever pressing responses increased compared with EXT and with stimuli previously associated to water (S2/Sr2) (### $p < 0.001$, for both comparisons in both groups). In Wistars rats, administration of Antalarmin 20 mg/kg blocked relapse (*** $p < 0.001$) while dose of 10 mg/kg had no effect on relapse. In msP rats, dose of 20 mg/kg also blocked relapse (* $p = 0.05$) and dose of 10 mg/kg had no effect on it.

Experiment 2: Effect of Metyrapone on cue-induced reinstatement of alcohol seeking in msP and Wistars rats

The repeated measures ANOVA showed that, during training phase, Wistars and

msP animals learned to discriminate between alcohol- and water-paired conditions, responding significantly more for alcohol than for water at the end of training phase [$F(1,9) = 30.95, p < 0.001$, for Wistars and $F(1, 9) = 52.89, p < 0.001$, for msP]. During the 10 extinction days lever pressing at previously alcohol and water paired lever progressively decreased for both strains.

For reinstatement (Fig. 2), repeated measures ANOVA revealed that the presentation of alcohol previously associated cues during reinstatement sessions reinstated alcohol seeking responses [$F(2, 9) = 13.84, p < 0.001$ for Wistars and $F(2,9) = 18.58, p < 0.001$ for msP]. The post-hoc test showed a robust reinstatement of responding under S1/Sr1 presentation ($p < 0.001$ for Wistars and msP) but not under the S2/Sr2 presentation compared with the last three extinction days. Also, responses emitted during S1/Sr1 presentation was significantly different from responses emitted in the presence of S2/Sr2 ($p < 0.001$ for Wistars and msP).

Metyrapone administration at reinstatement sessions (Fig. 2) significantly reduced relapse [$F(2,9) = 4.22; p = 0.031$ for Wistars and $F(2,9) = 8.18, p = 0.003$ for msP]. Post-hoc analysis revealed that for Wistars relapse responses were significantly reduced by Metyrapone dose 100 mg/kg ($p = 0.04$) but the 50 mg/kg dose had no effect on relapse. For msP rats, post-hoc analysis showed that relapse responses were significantly reduced by 50 mg/kg dose ($p = 0.003$) and by 100 mg/kg dose ($p = 0.003$).

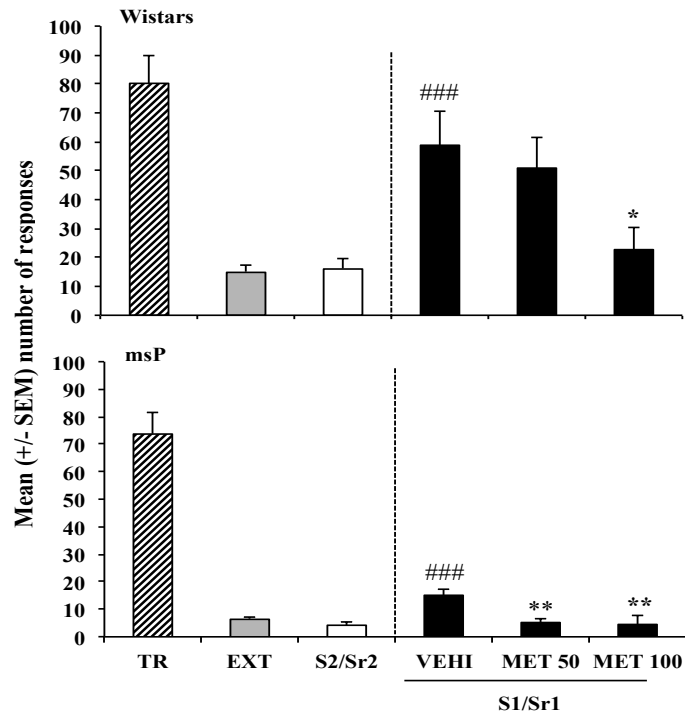


Figure 2 - Effect of Metyrapone on cue-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior in Wistar and msP rats. TR shows ethanol-reinforced responses at the end of training phase and EXT shows responses during the final three extinction sessions. During reinstatement sessions, animals were exposed to stimuli previous associated to alcohol intake (S1/Sr1). When vehicle (VEHI) was administered, lever pressing responses increased compared with EXT and with stimuli previously associated to water (S2/Sr2) (### $p < 0.001$, for both comparisons in both groups). In Wistars rats, administration of Metyrapone 100 mg/kg blocked relapse ($*p = 0.04$) while the dose of 50 mg/kg had no effect on relapse. In msP rats, the dose of 50 mg/kg and 100 mg/kg blocked relapse ($**p = 0.003$, for both doses).

Experiment 3: Effect of CORT on cue-induced reinstatement of alcohol seeking in msP and Wistars rats

During training phase, the animals learned to discriminate between alcohol- and water-paired conditions. The mixed ANOVA showed that at the end of the training phase the animals were responding more for alcohol than for water [$F(1, 18) = 36.37$, $p < 0.001$] and that there were no differences between groups [$F(1, 18) = 1.07$, $p = 0.32$].

For performance during reinstatement test, the mixed ANOVA showed that the animals relapsed when alcohol associated cues are presented in extinction [$F(2, 36) = 39.67$, $p < 0.001$]. This test also revealed that there were no differences between groups [F

(2, 36) = 0.33, $p = 0.72$]. The post-hoc test indicated differences between S1/Sr1 and extinction ($p < 0.001$) and differences between S1/Sr1 and S2/Sr2 ($p < 0.001$).

Also, the mixed ANOVA showed that CORT treatment had no effect in relapse [$F(2, 36) = 0.45$, $p = 0.64$] and that there were no differences between groups [$F(2, 36) = 0.15$, $p = 0.86$].

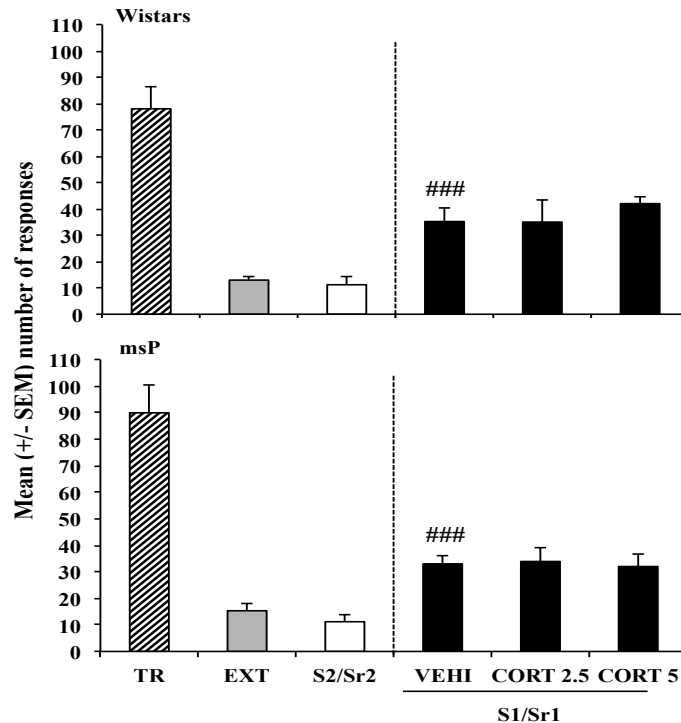


Figure 3 - Effect of CORT on cue-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior in Wistar and msP rats. TR shows ethanol-reinforced responses at the end of training phase and EXT shows responses during the final three extinction sessions. During reinstatement sessions, animals were exposed to stimuli previous associated to alcohol intake (S1/Sr1). When vehicle (VEHI) was administered, lever pressing responses increased compared with EXT and with stimuli previously associated to water (S2/Sr2) (### $p < 0.001$, for both comparisons). CORT administration had no effect on relapse responses for both doses used.

DISCUSSION

The purpose of this work was to evaluate if the CRF stress system and the HPA axis are involved in the cue-induced relapse to alcohol use. Results from Experiment 1

showed that pre-treatment with the CRF1 receptor antagonist Antalarmin at dose 20 mg/kg blocked cue-induced relapse in Wistars and msP rats. Then, activation of CRF1 receptors seems to be necessary for relapse occurs in the cue-induced model. This data are in agreement with all stress-induced relapse experiments (Cippitelli et al., 2012; Le et al., 2000; Marinelli et al., 2007; Moffett & Goeders, 2007) and suggest that there is a common mechanism in alcohol relapse.

Although the results are in agreement with stress-induced relapse experiments they disagree with Liu & Weiss (2002) results because their results showed that treatment with D-Phe-CRF was not able to block cue-induced relapse. Comparing only data from Wistars, same strain used by Liu and Weiss, the main difference between the experiments are the lever pressing responses. The number of lever pressing responses during the training phase was greater in the present experiment and, consequently, relapse was also greater here. If alcohol was more reinforcing here than in Liu and Weiss experiment, it is possible that presenting the stimuli associated to alcohol at reinstatement test was more aversive to rats and created greater abstinence symptoms. Therefore, it is possible that the CRF system plays a role in cue-induced relapse.

Moreover, results from Experiment 2 showed that pre-treatment with Metyrapone prevent drug-seeking reinstatement in both strains, indicating that HPA axis could be involved in drug-seeking relapse by alcohol cues and corroborating data obtained by Deroche, Marinelli, Le Moal & Piazza (1997) with cocaine. Also, a dose-dependent effect occurred with Wistars rats since only treatment with the dose 100 mg/kg blocked relapse in this animals, while both doses blocked relapse in msP rats.

However, CORT administration (Experiment 3) did not affect responses during the reinstatement tests as expected. In other words, increasing CORT in plasma did not make the animals more sensible to cue exposure. This result challenges those obtained in Experiment 2, as seems to indicated that the HPA axis activation is not necessary for cue-induced relapse. Nevertheless, it is important to notice that, in a study with cocaine, CORT dose-response curve induced by stress exposure had a bell shape form, what means that not the highest, but the middle dose of CORT in plasma is the most effective on reinstate cocaine seeking (Deroche et al., 1997). Therefore, it is possible that the exposure to environmental stimuli in the procedure used here was enough to increase

CORT plasma level at organic responses peak and, consequently, reaching a ceiling effect, what could prevent CORT injections to have any effect in animals.

This study also used two rats strains as a way to provide additional information about the role of CRF system in cue-induced alcohol relapse. Unfortunately, the age difference between Wistars and msP rats used in Antalarmin and Metirapone experiments may have contribute to msP rats poor performance in reinstatement test. So, any difference between these groups, could be explain by any or both of the two variables (age and strain). Rats used in CORT study were the same age, but no differences between msP and Wistar rats were observed, although it can also be due to the ceiling effect of CORT plasma level.

In summary, the results obtained here showed that the CRF stress system is involved in cue-induced alcohol relapse. Moreover, it suggest that HPA axis activation is also needed to cue-induced relapse, although this hypothesis needs more investigation, since results from Experiment 2 and Experiment 3 provided opposite information about the involvement of the HPA axis in cue-induced relapse.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar e aprimorar o modelo *cue-induced*. Dois aspectos foram avaliados: o comportamental e o neurológico. No aspecto comportamental foi avaliado se os dois estímulos ambientais utilizados no treino estavam de fato exercendo controle sobre a resposta de recaída; e no aspecto neurológico foi avaliado se o eixo HPA e o “sistema CRF” participam da recaída mimetizada por esse modelo. No que tange ao aprimoramento do modelo, o principal objetivo deste trabalho foi aumentar o controle que o odor, utilizado como estímulo contextual, adquire sobre a resposta de recaída. As principais manipulações realizadas para cumprir esse objetivo foram trocar o esquema de reforço utilizado no modelo e realizar o treino do estímulo contextual e do reforçador condicionado separadamente.

Os resultados mostraram que, quando o treino é realizado separadamente, o odor adquire controle sobre a respostas de pressão à barra e que a troca de esquema de reforço não foi eficaz em aumentar o controle do odor sobre a resposta. Embora os resultados mostrem que o odor, quando treinado separadamente, adquire controle sobre a resposta, esse controle ainda é fraco, pois a frequência de respostas quando ele é apresentado na fase de testes não é muito maior que a frequência de respostas emitidas no final da fase de extinção. Portanto, apesar dos resultados deste trabalho indicarem que realizar o treino dos estímulos separadamente tenha sido suficiente para que o odor adquirisse um maior controle sobre a resposta de recaída, é importante que outras mudanças no procedimento desse modelo sejam realizadas.

Uma delas poderia ser manipular o odor de uma forma mais eficaz com a utilização de um olfatômetro (Cohn & Weiss, 2007; Slotnick, Hanford & Hodos, 2000). Esse aparelho, que coloca e retira o odor da caixa experimental, possibilita que o odor seja treinado como estímulo discriminativo. Talvez, se o odor for treinado como estímulo discriminativo, sua presença se torne um melhor preditivo de que respostas de pressão à barra terão álcool como consequência e, portanto, aumente o controle desse estímulo sobre a resposta de recaída.

Além do procedimento do modelo ter sido manipulado para aprimorá-lo, foram realizadas avaliações acerca de quais processos de aprendizagem associativa poderiam

ocorrer no procedimento do modelo *cue-induced*. Os resultados mostraram que, quando os estímulos são treinados em conjunto, há sombreamento do reforçador condicionado sobre o estímulo contextual, corroborando os resultados de Galesi et al. (2012) e mostrando, novamente, que apenas o reforçador condicionado controla a recaída nesse modelo.

Além disso, os resultados mostraram que quando os estímulos são treinados sozinhos e apresentados em conjunto ocorre somação do controle deles sobre a resposta de procura pela droga. Isto é, após um período de abstinência, os animais respondem mais quando são apresentados ao conjunto do que quando são apresentados aos estímulos separadamente. Essa foi a primeira vez que a somação foi mostrada na recaída com álcool em ratos, embora ela possa ser um processo básico importante na recaída em humanos.

Na verdade, nem as pesquisas com animais e nem as pesquisas com humanos têm se debruçado sobre o estudo da influência da somação na recaída, embora alguns pesquisadores já tenham chamado atenção para o tema e inclusive demonstrado que a somação aumenta a recaída à procura de cocaína (Panlilio et al., 1996; See et al., 1999). Portanto, não se sabe se a somação é um fenômeno que aumenta a probabilidade de recaída em humanos.

Quanto aos mecanismos neurológicos subjacentes à recaída produzida nesse modelo animal, os resultados deste trabalho mostraram que a ação do CRF é fundamental para que a recaída ocorra no modelo *cue-induced*, já que quando a ação desse neuropeptídeo é bloqueada a recaída não ocorre. Isto é, os resultados mostraram que, nesse modelo animal, a ativação dos sistemas neurais relacionados ao estresse é fundamental para que a recaída ocorra, corroborando com toda a literatura de adicção ao álcool que mostra que a ativação de sistemas neurais de respostas ao estresse aumentam a probabilidade de recaída e que drogas que bloqueiam esses sistemas diminuem ela (Cippitelli et al., 2012; Le et al., 2000; Marinelli et al., 2007; Moffett & Goeders, 2007).

Ainda, os resultados dos estudos apresentados neste trabalho indicaram que o eixo HPA pode ser um dos sistemas neurais cuja ativação altera a probabilidade da recaída, pois a administração de Metirapona diminuiu a recaída. Esses resultados não são definitivos, pois o tratamento com CORT não foi eficaz em deixar os ratos mais sensíveis

à exposição aos estímulos ambientais e, portanto, aumentar a frequência de respostas de procura pelo álcool na fase de testes.

Além dos resultados dos estudos apresentados nesse trabalho terem ajudado a elucidar quais são os processos comportamentais e neurológicos subjacentes à recaída ao uso de álcool, eles também podem influenciar na busca por novas medicações para o alcoolismo, pois mostraram que o sistema CRF não só está envolvido na recaída induzida pelo modelo de estresse, mas também está envolvido na recaída induzida por estímulos ambientais.

Tomados em conjunto, os resultados deste trabalho indicaram que a validade de constructo do modelo *cue-induced* com álcool não é boa, pois apenas um dos estímulos utilizado nesse modelo adquire controle sobre a recaída. Um caminho para aprimorar essa validade pode ser o treino separado utilizado aqui, mas também novas formas de usar o odor na contingência de treino poderiam melhorar o procedimento desse modelo.

Embora os mecanismos subjacentes à recaída em humanos ainda não estejam bem mapeados (Sinha, 2013), é muito importante que esses mecanismos estejam bem compreendidos no modelo *cue-induced*, pois só assim é possível avaliar a validade de constructo desse modelo e, sem uma boa validade de constructo, esse modelo ajudando a estaria buscar as medicações certas, pelos motivos errados (Sarter & Bruno).

REFERÊNCIAS

- Adinoff, B., Anton, R., Linnoila, M., Guidotti, A., Nemeroff, C. B., & Bissette, G. (1996). Cerebrospinal fluid concentrations of corticotropin-releasing hormone (CRH) and diazepam-binding inhibitor (DBI) during alcohol withdrawal and abstinence. *Neuropsychopharmacology*, *15*(3), 288-295.
- American Psychiatric Association (2000). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th ed., text rev.). Washington, DC: Author.
- Bachteler, D., Economidou, D., Danysz, W., Ciccocioppo, R., & Spanagel, R. (2005). The effects of acamprosate and neramexane on cue-induced reinstatement of ethanol-seeking behavior in rat. *Neuropsychopharmacology*, *30*, 1104-1110.
- Bienkowski, P., Kostowski, W., & Koros, E. (1999). Ethanol-reinforced behaviour in the rat: effects of naltrexone. *European journal of pharmacology*, *374*(3), 321-327.
- Biron, D., Dauphin, C., & Di Paolo, T. (1992). Effects of adrenalectomy and glucocorticoids on rat brain dopamine receptors. *Neuroendocrinology*, *55*(4), 468-476.
- Braus, D. F., Wrase, J., Grüsser, S., Hermann, D., Ruf, M., Flor, H., ... & Heinz, A. (2001). Alcohol-associated stimuli activate the ventral striatum in abstinent alcoholics. *Journal of neural transmission*, *108*(7), 887-894.
- Breese, G. R., Knapp, D. J., & Overstreet, D. H. (2004). Stress sensitization of ethanol withdrawal-induced reduction in social interaction: inhibition by CRF-1 and benzodiazepine receptor antagonists and a 5-HT1A-receptor agonist. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *29*(3), 470.
- Breese, G. R., Sinha, R., & Heilig, M. (2011). Chronic alcohol neuroadaptation and stress contribute to susceptibility for alcohol craving and relapse. *Pharmacology & therapeutics*, *129*(2), 149-171.
- Burattini, C., Gill, T. M., Aicard, G., & Janak, P. H. (2006). The Ethanol Self-Administration Context as a Reinstatement Cue: Acute Effects of Naltroxone.

Neuroscience 139 (1) 877–887.

Cannella, N., Economidou, D., Kallupi, M., Stopponi, S., Heilig, M., Massi, M., & Ciccocioppo, R. (2009). Persistent increase of alcohol-seeking evoked by neuropeptide S: an effect mediated by the hypothalamic hypocretin system. *Neuropsychopharmacology*, 34(9), 2125-2134.

Carrasco, G. A., & Van de Kar, L. D. (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *European journal of pharmacology*, 463(1), 235-272.

Carroll, M. E., & Comer, S. D. (1996). Animal models of relapse. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 4(1), 11.

Catania, A. (1999). *Aprendizagem: Comportamento, Linguagem e Cognição* (D. d. G. d. Souza, Trans. 4 ed.). Porto Alegre: Artmed Editora.

Charlton, B. G., Nicol Ferrier, I., & Perry, R. H. (1987). Distribution of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in human brain. *Neuropeptides*, 10(4), 329-334.

Chase, S., & Heinemann, E. G. (1972). Choices based on redundant information: An analysis of two-dimensional stimulus control. *Journal of Experimental Psychology*, 92(2), 161.

Ciccocioppo, R., Angeletti, S., & Weiss, F. (2001). Long-lasting resistance to extinction of response reinstatement induced by ethanol-related stimuli: role of genetic ethanol preference. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 25, 1414-1419.

Ciccocioppo, R., Economidou, D., Fedeli, A., Angeletti, S., Weiss, F., Heilig, M., et al. (2004). Attenuation of ethanol self-administration and of conditioned reinstatement of alcohol-seeking behaviour by the antiopioid peptide nociceptin/orphanin FQ in alcohol-preferring rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 172, 170-178.

Ciccocioppo, R., Gehlert, D.R., Ryabinin, A., Kaur, S., Cippitelli, A., Thorsell, A., Le, A.D., Hipskind, P.A., Hamdouchi, C., Lu, J., Hembre, E.J., Cramer, J., Song, M., McKinzie, D., Morin, M., Economidou, D., Stopponi, S., Cannella, N., Braconi, S., Kallupi, M., de Guglielmo, G., Massi, M., George, D.T., Gilman, J., Hersh, J.,

- Tauscher, J.T., Hunt, S.P., Hommer, D., & Heilig, M. (2009) Stress-related neuropeptides and alcoholism: CRH, NPY, and beyond. *Alcohol*, 43, 491–498.
- Ciccocioppo, R., Lin, D., Martin-Fardon, R., & Weiss, F. (2003). Reinstatement of ethanol-seeking behavior by drug cues following single versus multiple ethanol intoxication in the rat: effects of naltrexone. *Psychopharmacology (Berl)*, 168, 208–215.
- Ciccocioppo, R., Martin-Fardon, R., & Weiss, F. (2002). Effect of selective blockade of μ 1 or delta opioid receptors on reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats. *Neuropsychopharmacology*, 27, 391–399.
- Cippitelli, A., Damadzic, R., Singley, E., Thorsell, A., Ciccocioppo, R., Eskay, R.L., & Heilig, M. (2012). Pharmacological blockade of corticotropin-releasing hormone receptor 1 (CRH1R) reduces voluntary consumption of high alcohol concentrations in non-dependent Wistar rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 100, 522–529.
- Claire-Smith, R. S. (1979). The overshadowing of instrumental conditioning by a stimulus that predicts reinforcement better than the response. *Animal Learning & Behavior*, 7(2), 224–228.
- Cohn, S. I., & Weiss, S. J. (2007). Stimulus control and compounding with ambient odor as a discriminative stimulus on a free-operant baseline. *Journal of the experimental analysis of behavior*, 87(2), 261–273.
- Colwill, R. M., & Rescorla, R. A. (1985). Instrumental responding remains sensitive to reinforcer devaluation after extensive training. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 11(4), 520.
- Conklin, C. A., & Tiffany, S. T. (2002). Applying extinction research and theory to cue-exposure addiction treatments. *Addiction*, 97(2), 155–167.
- Cooney, N. L., Litt, M. D., Morse, P. A., Bauer, L. O., & Gaupp, L. (1997). Alcohol cue reactivity, negative-mood reactivity, and relapse in treated alcoholic men. *Journal of abnormal psychology*, 106(2), 243.
- Coover, G. D., Goldman, L., & Levine, S. (1971). Plasma Corticosterone Increases

Produced by Extinction of Operant Behavior in Rats. *Physiology and Behavior*, 6 (3), 261-203.

Couch, R. M., Muller, J., Perry, Y. S., & Winter, J. S. D. (1987). Kinetic Analysis of Inhibition of Human Adrenal Steroidogenesis by Ketoconazole*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 65(3), 551-554.

Curtis, A. L., Pavcovich, L. A., Grigoriadis, D. E., & Valentino, R. J. (1995). Previous stress alters corticotropin-releasing factor neurotransmission in the locus coeruleus. *Neuroscience*, 65(2), 541-550.

Curtis, A. L., Pavcovich, L. A., & Valentino, R. J. (1999). Long-term regulation of locus ceruleus sensitivity to corticotropin-releasing factor by swim stress. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289(3), 1211-1219.

Curtis, A. L., & Valentino, R. J. (1994). Corticotropin-releasing factor neurotransmission in locus coeruleus: a possible site of antidepressant action. *Brain research bulletin*, 35(5), 581-587.

Dayas, C. V., Liu, X., Simms, J. A., & Weiss, F. (2007). Distinct patterns of neural activation associated with ethanol seeking: effects of naltrexone. *Biological psychiatry*, 61(8), 979-989.

Deroche, V., Marinelli, M., Le Moal, M., & Piazza, P. V. (1997). Glucocorticoids and behavioral effects of psychostimulants. II: cocaine intravenous self-administration and reinstatement depend on glucocorticoid levels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 281(3), 1401-1407.

Deroche, V., Piazza, P. V., Deminière, J. M., Moal, M. L., & Simon, H. (1993). Rats orally self-administer corticosterone. *Brain research*, 622(1), 315-320.

Deroche, V., Piazza, P. V., Le Moal, M., & Simon, H. (1993). Individual differences in the psychomotor effects of morphine are predicted by reactivity to novelty and influenced by corticosterone secretion. *Brain research*, 623(2), 341-344.

Dinsmoor, J. A. (1995). Stimulus control: Part I. *The Behavior Analyst*, 18(1), 51.

- Donahoe, J.W., & Palmer, D.C. (1994). Learning and complex behavior. Boston: Allyn & Bacon.
- Epstein, D.H., Preston, K.L. (2003). The reinstatement model and relapse prevention: a clinical perspective. *Psychopharmacology*, *168*, 31-41.
- Epstein, D. H., Preston, K. L., Stewart, J., & Shaham, Y. (2006). Toward a model of drug relapse: an assessment of the validity of the reinstatement procedure. *Psychopharmacology (Berl)*, *189*, 1-16.
- Fahlke, C., Hård, E., Hansen, S., Eriksson, C. J. P., & Engel, J. A. (1995). Consequence of long-term exposure to corticosterone or dexamethasone on ethanol consumption in the adrenalectomized rat, and the effect of type I and type II corticosteroid receptor antagonists. *Psychopharmacology*, *117*(2), 216-224.
- Fahlke, C., Engel, J. A., Peter Eriksson, C. J., Hård, E., & Söderpalm, B. (1994). Involvement of corticosterone in the modulation of ethanol consumption in the rat. *Alcohol*, *11*(3), 195-202.
- Fahlke, C., Hård, E., Thomasson, R., Engel, J. A., & Hansen, S. (1994). Metyrapone-induced suppression of corticosterone synthesis reduces ethanol consumption in high-preferring rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *48*(4), 977-981.
- Fahlke, C., & Hansen, S. (1996). Facilitation of ethanol consumption by intracerebroventricular infusions of corticosterone. *Psychopharmacology*, *127*(1-2), 133-139.
- Fuchs, R. A., Lasseter, H. C., Ramirez, D. R. & Xie, X. (2009). Relapse to drug seeking following prolonged abstinence: the role of environmental stimuli. *Drug Discovery Today: Disease Models* *5*, 251-258.
- Funk, C. K., & Koob, G. F. (2007). A CRF2 agonist administered into the central nucleus of the amygdala decreases ethanol self-administration in ethanol-dependent rats. *Brain research*, *1155*, 172-178.
- Funk, C. K., O'Dell, L. E., Crawford, E. F., & Koob, G. F. (2006). Corticotropin-releasing factor within the central nucleus of the amygdala mediates enhanced ethanol

self-administration in withdrawn, ethanol-dependent rats. *The Journal of neuroscience*, 26(44), 11324-11332.

Funk, C. K., Zorrilla, E. P., Lee, M. J., Rice, K. C., & Koob, G. F. (2007). Corticotropin-releasing factor 1 antagonists selectively reduce ethanol self-administration in ethanol-dependent rats. *Biological psychiatry*, 61(1), 78-86.

Galesi, F. L., Silva, M. T. A., & Mijares, M. G. (2012). Análise comportamental do modelo animal de recaída ao uso de drogas cue-induced. *Acta Comportamental*.

Garcia-Mijares, M. & Silva, M. T. A. (2006). Dependência de drogas. *Psicologia USP*, 17(4), 213-240.

Gehlert, D. R., Cippitelli, A., Thorsell, A., Lê, A. D., Hipskind, P. A., Hamdouchi, C., Lu, J., Hembre, E. J., Cramer, J., Song, M., McKinzie, D., Morin, M., Ciccocioppo, R. & Heilig, M. (2007). 3-(4-Chloro-2-morpholin-4-yl-thiazol-5-yl)-8-(1-ethylpropyl)-2,6-dimethyl-imidazo [1, 2-b] pyridazine: a novel brain-penetrant, orally available corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist with efficacy in animal models of alcoholism. *The Journal of neuroscience*, 27(10), 2718-2726.

Glautier, S., Drummond, D. C., & Remington, B. (1992). Different drink cues elicit different physiological responses in non-dependent drinkers. *Psychopharmacology*, 106(4), 550-554.

Goeders, N. E., & Clampitt, D. M. (2002). Potential role for the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the conditioned reinforcer-induced reinstatement of extinguished cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology*, 161(3), 222-232.

Goeders, N. E., & Guerin, G. F. (1996a). Role of corticosterone in intravenous cocaine self-administration in rats. *Neuroendocrinology*, 64(5), 337-348.

Goeders, N. E., & Guerin, G. F. (1996b). Effects of surgical and pharmacological adrenalectomy on the initiation and maintenance of intravenous cocaine self-administration in rats. *Brain research*, 722(1), 145-152.

- Gray, T. S. (1993). Amygdaloid CRF pathways: role in autonomic, neuroendocrine, and behavioral responses to stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 697(1), 53-60.
- Greeley, J. D., Swift, W., Prescott, J., & Heather, N. (1993). Reactivity to alcohol-related cues in heavy and light drinkers. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs*, 54(3), 359.
- Guerra, L. G. G. C. & Silva, M. T. A. (2002). Modelos animais de psicopatologia: fundamentos conceituais. In: H. J. Guilhardi; M. B. B. P. Madi; P. P. Queiroz; M. C. Scoz. (Ed.). *Sobre comportamento e cognição v. 9* (pp. 232-235). Santo André: ESETEC.
- Hansson, A. C., Cippitelli, A., Sommer, W. H., Fedeli, A., Björk, K., Soverchia, L., ... & Ciccocioppo, R. (2006). Variation at the rat Crhr1 locus and sensitivity to relapse into alcohol seeking induced by environmental stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(41), 15236-15241.
- Heilig, M., Egli, M., Crabbe, J. C., & Becker, H. C. (2010). REVIEW: Acute withdrawal, protracted abstinence and negative affect in alcoholism: are they linked?. *Addiction biology*, 15(2), 169-184.
- Heilig, M., & Koob, G. F. (2007). A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence. *Trends in neurosciences*, 30(8), 399-406.
- Heinrichs, S. C., Pich, E. M., Miczek, K. A., Britton, K. T., & Koob, G. F. (1992). Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action. *Brain research*, 581(2), 190-197.
- Holland, P. C., & Rescorla, R. A. (1975). The effect of two ways of devaluing the unconditioned stimulus after first-and second-order appetitive conditioning. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 1(4), 355.
- Honig, W. K., & Urcuioli, P. J. (1981). The legacy of Guttman and Kalish (1956): 25 years of research on stimulus generalization. *Journal of the experimental analysis of behavior*, 36(3), 405-445.

- Imaki, T., Nahan, J. L., Rivier, C., Sawchenko, P. E., & Vale, W. (1991). Differential regulation of corticotropin-releasing factor mRNA in rat brain regions by glucocorticoids and stress. *The Journal of neuroscience*, *11*(3), 585-599.
- Jenkins, H. M. (1965). Measurement of stimulus control during discriminative operant conditioning. *Psychological Bulletin*, *64*, 365-176.
- Katner, S. N., & Weiss, F. (1999). Ethanol-associated olfactory stimuli reinstate ethanol-seeking behavior after extinction and modify extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, *23*, 1751-1760.
- Katner, S. N., Magalong, J. G., & Weiss, F. (1999). Reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated discriminative stimuli after prolonged extinction in the rat. *Neuropsychopharmacology*, *20*, 471-479.
- Kaplan, R. F., Cooney, N. L., Baker, L. H., Gillespie, R. A., Meyer, R. E., & Pomerleau, O. F. (1985). Reactivity to alcohol-related cues: physiological and subjective responses in alcoholics and nonproblem drinkers. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs*, *46*(04), 267.
- Kareken, D. A., Claus, E. D., Sabri, M., Dzemic, M., Kosobud, A. E., Radnovich, A. J., ... & Li, T. K. (2004). Alcohol-Related Olfactory Cues Activate the Nucleus Accumbens and Ventral Tegmental Area in High-Risk Drinkers: Preliminary Findings. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *28*(4), 550-557.
- Kawasaki, K., & Iwasaki, T. (1997). Corticosterone levels during extinction of runway response in rats. *Life Sciences*, *61*, 1721-1728.
- Koob, G. F. (2003). Neuroadaptive mechanisms of addiction: studies on the extended amygdala. *European Neuropsychopharmacology*, *13*(6), 442-452.
- Koob, G. F. (2008). A role for brain stress systems in addiction. *Neuron*, *59*(1), 11-34.
- Koob, G. F. (2010). The role of CRF and CRF-related peptides in the dark side of addiction. *Brain research*, *1314*, 3-14.

- Koob, G. F. (2013). Theoretical frameworks and mechanistic aspects of alcohol addiction: alcohol addiction as a reward deficit disorder. In *Behavioral Neurobiology of Alcohol Addiction* (pp. 3-30). Springer Berlin Heidelberg.
- Koob, G. F., Ahmed, S. H., Boutrel, B., Chen, S. A., Kenny, P. J., Markou, O'Dell, L., Parsons, L. H. & Sanna, P. P. (2004). Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(8), 739-749.
- Koob, G. F., & Bloom, F. E. (1988). Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science*, 242(4879), 715-723.
- Koob, G., & Kreek, M. (2007). Stress, dysregulation of drug reward pathways, and the transition to drug dependence. *American Journal of Psychiatry*, 164(8), 1149-1159.
- Koob, G. F., & Le Moal, M. (2008). Addiction and the brain antireward system. *Annu. Rev. Psychol.*, 59, 29-53.
- Koob, G. F., & Zorrilla, E. P. (2010). Neurobiological mechanisms of addiction: focus on corticotropin-releasing factor. *Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)*, 11(1), 63.
- Kreek, M. J., & Koob, G. F. (1998). Drug dependence: stress and dysregulation of brain reward pathways. *Drug and alcohol dependence*, 51(1), 23-47.
- Krishnan, S., Nash, J. F., & Maickel, R. P. (1991). Free-choice ethanol consumption by rats: effects of ACTH₄₋₁₀. *Alcohol*, 8(5), 401-404.
- Le, A. D., Funk, D., Juzysch, W., Coen, K., Navarre, B. M., Cifani, C., & Shaham, Y. (2011). Effect of prazosin and guanfacine on stress-induced reinstatement of alcohol and food seeking in rats. *Psychopharmacology*, 218(1), 89-99.
- Le, A. D., Harding, S., Juzysch, W., Watchus, J., Shalev, U., & Shaham, Y. (2000). The role of corticotrophin-releasing factor in stress-induced relapse to alcohol-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology*, 150(3), 317-324.

- Le, A. D., Poulos, C. X., Harding, S., Watchus, J., Juzytsch, W., & Shaham, Y. (1999). Effects of naltrexone and fluoxetine on alcohol self-administration and reinstatement of alcohol seeking induced by priming injections of alcohol and exposure to stress. *Neuropsychopharmacology*, *21*(3), 435-444.
- Le, A. D., Quan, B., Juzytsch, W., Fletcher, P. J., Joharchi, N., & Shaham, Y. (1998). Reinstatement of alcohol-seeking by priming injections of alcohol and exposure to stress in rats. *Psychopharmacology*, *135*(2), 169-174.
- Le, A. D., & Shaham, Y. (2002). Neurobiology of relapse to alcohol in rats. *Pharmacology & therapeutics*, *94*(1), 137-156.
- Liang, K. C., Melia, K. R., Campeau, S., Falls, W. A., Miserendino, M. J., & Davis, M. (1992). Lesions of the central nucleus of the amygdala, but not the paraventricular nucleus of the hypothalamus, block the excitatory effects of corticotropin-releasing factor on the acoustic startle reflex. *The Journal of Neuroscience*, *12*(6), 2313-2320.
- Lionello-DeNolf, K. M., & Mihalick, S. M. (2006). An Automated Olfactory Discrimination Procedure with Rats. *Behavior Analyst Today*, *7*(4).
- Liu, X., & Weiss, F. (2002). Additive effect of stress and drug cues on reinstatement of ethanol seeking: exacerbation by history of dependence and role of concurrent activation of corticotropin-releasing factor and opioid mechanisms. *The Journal of neuroscience*, *22*(18), 7856-7861.
- Liu, X., & Weiss, F. (2003) Stimulus conditioned to foot-shock stress reinstates alcohol-seeking behavior in an animal model of relapse. *Psychopharmacology*, *168*, 184–191.
- Logrip, M. L., Koob, G. F., & Zorrilla, E. P. (2011). Role of corticotropin-releasing factor in drug addiction: potential for pharmacological intervention. *CNS drugs*, *25*(4), 271.
- Mackintosh, N. J. (1975). A theory of attention: Variations in the associability of stimuli with reinforcement. *Psychological Review*, *82*(4), 276.
- Makino, S., Gold, P. W., & Schulkin, J. (1994). Corticosterone effects on corticotropin-releasing hormone mRNA in the central nucleus of the amygdala and the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain*

research, 640(1), 105-112.

- Marinelli, P. W., Funk, D., Juzysch, W., Harding, S., Rice, K. C., Shaham, Y., & Le, A. D. (2007). The CRF1 receptor antagonist antalarmin attenuates yohimbine-induced increases in operant alcohol self-administration and reinstatement of alcohol seeking in rats. *Psychopharmacology*, 195(3), 345-355.
- Marinelli, M., & Piazza, P. V. (2002). Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. *European Journal of Neuroscience*, 16(3), 387-394.
- Marinelli, M., Piazza, P. V., Deroche, V., Maccari, S., Le Moal, M., & Simon, H. (1994). Corticosterone circadian secretion differentially facilitates dopamine-mediated psychomotor effect of cocaine and morphine. *The Journal of neuroscience*, 14(5), 2724-2731.
- Martin-Fardon, R., & Weiss, F. (2013). Modeling relapse in animals. In *Behavioral Neurobiology of Alcohol Addiction* (p. 403-432). Springer Berlin Heidelberg.
- Mason, B. J., Shaham, Y., Weiss, F., & Le, A. D. (2009). Stress, Alcohol Craving and Relapse Risk: Mechanisms and Viable Treatment Targets. *Alcohol (Fayetteville, NY)*, 43(7), 541.
- Matos, M. A. (1999). Controle de estímulo condicional, formação de classes conceituais e comportamentos cognitivos. *Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva*, 1(2), 159-178.
- McKim, W. (2006). *Drugs and Behavior* (6th Edition ed.). New Jersey: Prentice Hall.
- Miles, C. G., & Jenkins, H. M. (1973). Overshadowing in operant conditioning as a function of discriminability. *Learning and Motivation*, 4(1), 11-27.
- Moffett, M. C., & Goeders, N. E. (2007). CP-154,526, a CRF type-1 receptor antagonist, attenuates the cue-and methamphetamine-induced reinstatement of extinguished methamphetamine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology*, 190(2), 171-180.
- Mollenauer, S., Bryson, R., Robison, M., Sardo, J., & Coleman, C. (1993). EtOH self-administration in anticipation of noise stress in C57BL/6J mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 46(1), 35-38.

- Morrow, A. L., Porcu, P., Boyd, K. N., & Grant, K. A. (2006). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis modulation of GABAergic neuroactive steroids influences ethanol sensitivity and drinking behavior. *Dialogues in clinical neuroscience*, 8(4), 463.
- Myrick, H., Anton, R. F., Li, X., Henderson, S., Drobos, D., Voronin, K., & George, M. S. (2004). Differential brain activity in alcoholics and social drinkers to alcohol cues: relationship to craving. *Neuropsychopharmacology*.
- Nash Jr, J. F., & Maickel, R. P. (1988). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in post-stress induced ethanol consumption by rats. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 12(5), 653-671.
- O'Brien, C. P. (1996). Drug addiction and drug abuse. *The pharmacological basis of therapeutics*, 10, 621-42.
- O'Brien, C. P., Childress, A. R., Ehrman, R., & Robbins, S. J. (1998). Conditioning factors in drug abuse: can they explain compulsion? *Journal of Psychopharmacology*, 12, 15-22.
- Panlilio, L. V., Schindler, C. W., & Weiss, S. J. (1996). Cocaine self-administration increased by compounding discriminative stimuli. *Psychopharmacology*, 125(3), 202-208.
- Parylak, S. L., Koob, G. F., & Zorrilla, E. P. (2011). The dark side of food addiction. *Physiology & behavior*, 104(1), 149-156.
- Piazza, P. V., Deroche, V., Deminiere, J. M., Maccari, S., Le Moal, M., & Simon, H. E. R. V. (1993). Corticosterone in the range of stress-induced levels possesses reinforcing properties: implications for sensation-seeking behaviors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(24), 11738-11742.
- Piazza, P. V., Deroche, Rouge-Pont, F., & Le Moal, M. (2000). Vertical shifts in self-administration dose-response functions predict a drug-vulnerable phenotype predisposed to addiction. *The Journal of Neuroscience*, 20(11), 4226-4232.

- Piazza, P. V., & Le Moal, M. (1996). Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 36(1), 359-378.
- Piazza, P. V., Marinelli, M., Jodogne, C., Deroche, V., Rougé-Pont, F., Maccari, S., Le Moal, M. & Simon, H. (1994). Inhibition of corticosterone synthesis by metyrapone decreases cocaine-induced locomotion and relapse of cocaine self-administration. *Brain research*, 658(1), 259-264.
- Piazza, P. V., Rougé-Pont, F., Deroche, V., Maccari, S., Simon, H., & Le Moal, M. (1996). Glucocorticoids have state-dependent stimulant effects on the mesencephalic dopaminergic transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(16), 8716-8720.
- Pickens, R. W., Hatsukami, D. K., Spicer, J. W., & Svikis, D. S. (1985). Relapse by alcohol abusers. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 9(3), 244-247.
- Pomerleau, O. F., Fertig, J., Baker, L., & Cooney, N. (1983). Reactivity to alcohol cues in alcoholics and non-alcoholics: Implications for a stimulus control analysis of drinking. *Addictive Behaviors*, 8(1), 1-10.
- Rescorla, R. A., & Holland, P. C. (1982). Behavioral studies of associative learning in animals. *Annual review of psychology*, 33(1), 265-308.
- Rivier, C., Imaki, T., & Vale, W. (1990). Prolonged exposure to alcohol: effect on CRF mRNA levels, and CRF-and stress-induced ACTH secretion in the rat. *Brain research*, 520(1), 1-5.
- Rivier, J., Rivier, C., & Vale, W. (1984). Synthetic competitive antagonists of corticotropin-releasing factor: effect on ACTH secretion in the rat. *Science*, 224(4651), 889-891.
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev*, 18(3), 247- 291.
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (2001). Incentive-sensitization and addiction. *Addiction*, 96(1), 103-114.

- Rougé-Pont, F., Deroche, V., Moal, M. L., & Piazza, P. V. (1998). Individual differences in stress-induced dopamine release in the nucleus accumbens are influenced by corticosterone. *European Journal of Neuroscience*, *10*(12), 3903-3907.
- Rougé-Pont, F., Marinelli, M., Le Moal, M., Simon, H., & Piazza, P. V. (1995). Stress-induced sensitization and glucocorticoids. II. Sensitization of the increase in extracellular dopamine induced by cocaine depends on stress-induced corticosterone secretion. *The Journal of neuroscience*, *15*(11), 7189-7195.
- Rupprecht, R., Ströhle, A., Hermann, B., di Michele, F., Spalletta, G., Pasini, A., ... & Romeo, E. (1998). Neuroactive steroid concentrations following metyrapone administration in depressed patients and healthy volunteers. *Biological psychiatry*, *44*(9), 912-914.
- Sanchis-Segura, C., & Spanagel, R. (2006). Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addiction Biology*, *11*, 2-38.
- Sarter, M., & Bruno, J. P. (2002). Animal models in biological psychiatry. *Biological psychiatry*, 37-44.
- Schneider, F., Habel, U., Wagner, M., Franke, P., Salloum, J. B., Shah, N. J., Toni, I., Sulzbach, C., Höning, K., Maier, W., Gaebel, W. & Zilles, K. (2001). Subcortical correlates of craving in recently abstinent alcoholic patients. *American Journal of Psychiatry*, *158*(7), 1075-1083.
- Schulkin, J., McEwen, B. S., & Gold, P. W. (1994). Allostasis, amygdala, and anticipatory angst. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *18*(3), 385-396.
- See, R. E., Fuchs, R. A., Ledford, C. C., & McLaughlin, J. (2003). Drug addiction, relapse, and the amygdala. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *985*(1), 294-307.
- See, R. E., Grimm, J. W., Kruzich, P. J., & Rustay, N. (1999). The importance of a compound stimulus in conditioned drug-seeking behavior following one week of

extinction from self-administered cocaine in rats. *Drug and alcohol dependence*, 57(1), 41-49.

Shaham, Y., Shalev, U., Lu, L., de Wit, H., & Stewart, J. (2003). The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology*, 168(1-2), 3-20.

Shekhar, A., Truitt, W., Rainnie, D., & Sajdyk, T. (2005). Role of stress, corticotrophin releasing factor (CRF) and amygdala plasticity in chronic anxiety. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress*, 8(4), 209-219.

Shepard, J. D., Barron, K. W., & Myers, D. A. (2000). Corticosterone delivery to the amygdala increases corticotropin-releasing factor mRNA in the central amygdaloid nucleus and anxiety-like behavior. *Brain research*, 861(2), 288-295.

Siegel, S. (1977). Morphine tolerance acquisition as an associative process. *J Exp Psychol Anim Behav Process*, 3(1), 1-13.

Siegel, S. (1979). The role of conditioning in drug tolerance and addiction. *Psychopathology in Animals*, 143-167.

Siegel, S. (1983). Classical conditioning, drug tolerance, and drug dependence. In *Research advances in alcohol and drug problems* (pp. 207-246). Springer US.

Siegel, S. (1984). Pavlovian conditioning and heroin overdose: reports by overdose victims. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 22(5), 428-430.

Siegel, S., & Allan, L. G. (1998). Learning and homeostasis: drug addiction and the McCollough effect. *Psychol Bull*, 124(2), 230-239.

Siegel, S., Hinson, R. E., Krank, M. D., & McCully, J. (1982). Heroin "overdose" death: contribution of drug-associated environmental cues. *Science*, 216(4544), 436-437.

Sinha, R. (2001). How does stress increase risk of drug abuse and relapse?. *Psychopharmacology*, 158(4), 343-359.

- Sinha, R. (2013). Modeling relapse situations in the human laboratory. In *Behavioral Neurobiology of Alcohol Addiction* (pp. 379-402). Springer Berlin Heidelberg.
- Sinha, R., Fox, H. C., Hong, K. I. A., Hansen, J., Tuit, K., & Kreek, M. J. (2011). Effects of adrenal sensitivity, stress-and cue-induced craving, and anxiety on subsequent alcohol relapse and treatment outcomes. *Archives of general psychiatry*, archgenpsychiatry-2011.
- Sinha, R., Talih, M., Malison, R., Cooney, N., Anderson, G. M., & Kreek, M. J. (2003). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympatho-adreno-medullary responses during stress-induced and drug cue-induced cocaine craving states. *Psychopharmacology*, 170(1), 62-72.
- Skinner, B. F. (1981). Selection by consequences. *Science*, 213(4507), 501-504.
- Slotnick, B. (2001). Animal cognition and the rat olfactory system. *Trends in cognitive sciences*, 5(5), 216-222.
- Slotnick, B., Hanford, L., & Hodos, W. (2000). Can rats acquire an olfactory learning set?. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 26(4), 399.
- Smith, S. M., & Vale, W. W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in clinical neuroscience*, 8(4), 383.
- Sommer, W. H., Rimondini, R., Hansson, A. C., Hipskind, P. A., Gehlert, D. R., Barr, C. S., & Heilig, M. A. (2008). Upregulation of Voluntary Alcohol Intake, Behavioral Sensitivity to Stress, and Amygdala *Crhr1* Expression Following a History of Dependence. *Biological psychiatry*, 63(2), 139-145.
- Spanagel, R. (2000). Recent animal models of alcoholism. *Alcohol Research & Health*.
- Stopponi, S., Somaini, L., Cippitelli, A., Cannella, N., Braconi, S., Kallupi, M., ... & Ciccocioppo, R. (2011). Activation of nuclear PPAR γ receptors by the antidiabetic agent pioglitazone suppresses alcohol drinking and relapse to alcohol seeking. *Biological psychiatry*, 69(7), 642-649.

- Streeter, C. C., Gulliver, S. B., Baker, E., Blank, S. R., Meyer, A. A., Ciraulo, D. A., & Renshaw, P. F. (2002). Videotaped cue for urge to drink alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 26(5), 627-634.
- Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Rivier, J., & Vale, W. W. (1983). Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*, 36(3), 165-186.
- Tanno, A. P., & Marcondes, F. K. (2002). Estresse, ciclo reprodutivo e sensibilidade cardíaca às catecolaminas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(3).
- Thein, T., Westbrook, R. F., & Harris, J. A. (2008). How the associative strengths of stimuli combine in compound: Summation and overshadowing. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 34(1), 155.
- Touma, C., Palme, R., & Sachser, N. (2004). Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Hormones and Behavior*, 45, 10-22.
- Valdez, G. R., Roberts, A. J., Chan, K., Davis, H., Brennan, M., Zorrilla, E. P., & Koob, G. F. (2002). Increased Ethanol Self-Administration and Anxiety-Like Behavior During Acute Ethanol Withdrawal and Protracted Abstinence: Regulation by Corticotropin-Releasing Factor. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 26(10), 1494-1501.
- Vengeliene, V., Heidbreder, C. A., & Spanagel, R. (2007). The effects of lamotrigine on alcohol seeking and relapse. *Neuropharmacology*, 53(8), 951-957.
- Volpicelli, J. R., Alterman, A. I., Hayashida, M., & O'Brien, C. P. (1992). Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Archives of General Psychiatry*, 49(11), 876.
- Walker, D. L., & Davis, M. (1997). Double dissociation between the involvement of the bed nucleus of the stria terminalis and the central nucleus of the amygdala in startle increases produced by conditioned versus unconditioned fear. *The Journal of neuroscience*, 17(23), 9375-9383.

- Weiss, F. (2010). Advances in Animal Models of Relapse for Addiction Research. In: *Advances in Animal Models of Relapse for Addiction Research*. Edited by Cynthia M Kuhn and George F Koob. Ed: Boca Raton (FL).
- Williams, B. A. (1984). Stimulus control and associative learning. *Journal of the experimental analysis of behavior*, 42(3), 469-483.
- Williams-Hemby, L., & Porrino, L. J. (1997a). I. Functional consequences of intragastrically administered ethanol in rats as measured by the 2- [14C]deoxyglucose method. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 21, 1573-1580.
- Williams-Hemby, L., & Porrino, L. J. (1997b). II. Functional consequences of intragastrically administered ethanol in rats as measured by the 2- [14C]deoxyglucose method: the contribution of dopamine. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 21, 1581-1591.
- Willner, P. (1991). Behavioural models in psychopharmacology. In: P. Willner (Ed.) *Behavioural models in psychopharmacology: theoretical, industrial and clinical perspectives*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Willner, P., Benton, D., Brown, E., Cheeta, S., Davies, G., Morgan, J., & Morgan, M. (1998). "Depression" increases "craving" for sweet rewards in animal and human models of depression and craving. *Psychopharmacology*, 136(3), 272-283.
- Woody, G. E., McLellan, A. T., & O'Brien, C. P. (1990). Research on psychopathology and addiction: treatment implications. *Drug and Alcohol Dependence*, 25, 121-123.
- Zironi, I., Burattini, C., Aicardi, G., Janak, P.H. (2006). Context is a trigger for relapse to alcohol. *Behavioural Brain Research*, 167, 150-155.
- Zhao, Y., Dayas, C. V., Aujla, H., Baptista, M. A., Martin-Fardon, R., & Weiss, F. (2006). Activation of group II metabotropic glutamate receptors attenuates both stress and cue-induced ethanol-seeking and modulates c-fos expression in the hippocampus and amygdala. *The Journal of neuroscience*, 26(39), 9967-9974.
- Zorrilla, E. P., Heilig, M., de Wit, H., & Shaham, Y. (2013). Behavioral, biological, and chemical perspectives on targeting CRF (1) receptor antagonists to treat alcoholism. *Drug and alcohol dependence*, 128(3), 175-186.

Zorrilla, E. P., Valdez, G. R., & Weiss, F. (2001). Changes in levels of regional CRF-like-immunoreactivity and plasma corticosterone during protracted drug withdrawal in dependent rats. *Psychopharmacology*, *158*(4), 374-381.