

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TÍTULO

**FACTORES DE VULNERABILIDAD ASOCIADOS A LA
REACTIVIDAD HEDÓNICA AL ETANOL Y A LA INGESTA DE
ESTA DROGA EN RATAS ADOLESCENTES**

Por

Lic. María Belén Acevedo

Director: Dr. Ricardo Marcos Pautassi

Lugar de Trabajo

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA MERCEDES Y MARTÍN FERREYRA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2015

COMISIÓN ASESORA

Nombre y Apellido: Dr. Rubén N. MUZIO, **Lugar de Trabajo:** Instituto de Biología y Medicina Experimental [IBYME-CONICET]

Nombre y Apellido: Dra. Nancy A. SALVATIERRA, **Lugar de Trabajo:** Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas [IIBYT-CONICET]

Nombre y Apellido: Dr. Ricardo M. PAUTASSI, **Lugar de Trabajo:** Instituto de Inv. Médicas Mercedes y Martín Ferreyra [INIMEC-CONICET- Universidad Nacional de Córdoba]

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma: Aclaración: Dr. Rubén N. MUZIO

Firma: Aclaración: Dra. Nancy A. SALVATIERRA.

Firma: Aclaración: Dra. Irene D. MARTIJENA

Agradecimientos

Pensar que los agradecimientos suelen escribirse casi al último de todo, aunque uno los incorpora al principio. Y que difícil me resultó esta tarea. Quería agradecer y que al mismo tiempo se imprimiera toda la emoción asociada en esta hoja. Veremos que resulta de la intención.

En principio, gracias a las contingencias de la vida. Si algo es seguro es que no me figuré haciendo esta tarea. Una tarea larga, profunda, confusa a veces, con incertidumbres en un marco de supuestas certezas. Gracias a estas contingencias hube de revisar continuamente los postulados y las prácticas. Y en esta trayectoria también tuve el privilegio de ejercitar el acto de convivir con los semejantes.

Gracias Ricardo por brindarme el primer voto de confianza y creer que podíamos construir algo bueno de todo esto. Por apostar a lo incierto y que resultara sumamente enriquecedor. Y en este último tiempo por darme la libertad de disentir y de escoger mis propios intereses.

Gracias Juan y Pauli por abrirme la segunda puerta, renovar mis expectativas con esta reciente propuesta de trabajar juntos y por acompañarme en tantas otras cosas que no son fuero de la ciencia, aunque lo nutren a uno inconmensurablemente.

Gracias Betty por juzgarme bien, por atribuirme ignorancia y convertirme en una de mis mentoras favoritas. Gracias por regalarme tiempo, por invitarme a participar de las otras facetas de tu vida y por aceptar las incontables preguntas, anécdotas e historias, por esos mates hidratantes y por darme ánimo cuando ni yo creía que se podía.

Gracias a las generaciones del grupo Molina. Los que estaban a mi llegada: Mari, Samy, Seba, Marce; los que se continuaron: Caro, Pepi, Lari, Maca; y los más nuevitos aunque ya no tanto, Lu, Flor y Ari. Fabi te pongo en punto y aparte porque no fue sino también por las contingencias de esta trama de vida que nos tocó reintroducirnos. Gracias por hacerme sencillo el último tramo, por tener similar verborragia y por formar parte de ese grupo experimental con Flor tan ameno. Lo dije antes y lo digo ahora, hicieron que reformulara la concepción para bien. que tenia sobre trabajar en grupo.

Gracias Sole. Me pregunto por qué tocó que nos diéramos a conocer casi al final de este cuento. Te agradezco la rápida confianza y que me prestases además de atención y tiempo, el oído. Hiciste que el trabajo de mesada tuviera matices y que extrañara menos a mis amadas ratas. Ojala se generen nuevas situaciones para trabajar juntas o cerca.

Gracias a los demás técnicos del Instituto. Los que están y los que ya no. A pesar de los altibajos he valorado su trabajo y respecto el lugar que ocupan. Ustedes nos ven ingresar, nos ven partir y perciben la metamorfosis de nuestro accionar producto de los años. Espero que la que me corresponda no olvide sus raíces.

Agradecimientos

Gracias a las secretarias. A Lidia aunque ya no está supe quererla después del primer reto que me dio, grandiosa mujer. Silvina y Susana que aprendieron rápido y le dieron nombre a este rostro que veían por las mañanas, que saludaron la mayoría de las veces con una sonrisa y por estar ahí poniendo el rostro en la fachada del Instituto.

A la gente de limpieza y seguridad. Por ser los primeros rostros en saludar. Por dejarme pisar el piso mojado recién limpio, por darme una mano cada vez que lo precise, por perirme consejos y creer que podía ayudarles. Por llamarme doctora cuando no lo era aun. Esta quimera se vuelve realidad!

Gracias por los incontables almuerzos donde he compartido cosas increíbles. Confesiones que no reproduciré, anécdotas de infancia, de los hijos, de los maridos, de las mascotas, de hombres, de mujeres, de anhelos.....por Dios, esto es oro para nosotros los psicólogos. Desde los primeros almuerzos, chicas (ahora mujeres) Vivas alquilamos, contruimos casas, tuvimos perros y nacieron los bebes. La verdad es que silenciosamente fui soñando con ustedes y alegrándome por el progreso. Carlita, Flor, Cintia y chicas López son otros los sueños, también otras las generaciones pero igualmente fue tan grato reirme con ustedes. Bueno, quienes me conocen saben cuánto me gusta comer, comer variado y el postre, siempre que se pudo, ha sido su compañía.

Gracias a mi familia. Voy a ser un poquito egoísta. Primero mis bebes: Samuel, Irish, Annette, Chloe y Conny. Los amo profundamente y si uno pudiera elegir me gustaría estuvieran siempre. A mis padres por cometer éste error y entonces por defecto lanzarme a la oportunidad de vivir este proceso. Gracias por seguir creyendo que juego con las ratas y no adjudicarme con los años propiedad de asesina serial. A mis hermanos, a mi hermano postizo por elección y a Sol por ayudarme a terminar, por dictarme sugerencias técnicas, por las críticas, por aguantar las mías y por ser mi familia. A mi abuela que siempre le da importancia a lo que emprendo inclusive este viaje que duro mucho para mi gusto.

A mi madrina especialmente. Porque has sido y seguiras siendo el modelo, el parámetro, el faro a seguir. Porque creo que soy afortunada de contar con tu cuidado y porque en mis decisiones, mis argumentos y mis perspectivas siempre están teñidas de vos.

Gracias a toda la otra gente que forma parte de mi vida. A mis amigos de la infancia, de la adolescencia y a los compañeros de natación. Gracias por preguntar y volver a preguntar por las ratitas. Por no quitar la expresion de sorpresa cada vez que contaba anécdotas de ellas. Gracias por querer seguir siendo mis amigos a pesar de las incontables veces que falte por estar trabajando con ellas.

Agradecimientos

Y gracias a ellas, a cada una de las ratas que sirvieron para este fin. Podría decir que fueron la materia prima, aunque la verdad que fueron mucho más para mí. GRACIAS a todas ellas y gracias a ustedes por renovar su confianza.

Listado de Publicaciones derivadas de la Tesis

- Acevedo MB, Molina JC, Nizhnikov ME, Spear NE, Pautassi RM (2010) High ethanol dose during early adolescence induces locomotor activation and increases subsequent ethanol intake during late adolescence. *Dev Psychobiol*, 52: 424-40.
- Acevedo MB, Nizhnikov ME, Spear NE, Molina JC, Pautassi RM (2013) Ethanol-induced locomotor activity in adolescent rats and the relationship with ethanol-induced conditioned place preference and conditioned taste aversion. *Dev Psychobiol*, 55: 429-42.
- Acevedo MB, Pautassi RM, Spear NE, Spear LP (2013) Age-dependent effects of stress on ethanol-induced motor activity in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 230: 389-98.
- Acevedo MB, Nizhnikov ME, Molina JC, Pautassi RM (2014) Relationship between ethanol-induced activity and anxiolysis in the open field, elevated plus maze, light-dark box, and ethanol intake in adolescent rats. *Behav Brain Res*, 265: 203-15.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
SUMMARY	5
Introducción	6
Causas asociadas a los trastornos de consumo de alcohol	6
¿Por qué algunos de los adolescentes que comienzan a consumir alcohol desarrollan relaciones problemáticas con el alcohol mientras que otros conservan un consumo controlado de la droga?	17
El adolescente muestra un patrón específico de respuesta hacia el alcohol	23
Perfil de consumo de etanol del adolescente: factores ambientales y efectos motivacionales de la droga que pueden modificarlo.....	29
Objetivos	36
Sección I. Relación entre medidas de sensibilidad motivacional hacia el etanol en ratas adolescentes y la relación de éstas con el consumo posterior de la droga.	39
Consideraciones Generales.....	40
Materiales y Procedimientos Específicos.....	40
Análisis de Datos.....	41
Experimento 1: Activación Locomotora Inducida por el Etanol en Ratas Adolescentes	44
Introducción	44
Objetivo Específico	44
Diseño Experimental	44
Procedimientos Específicos y Evaluación:	44
Resultados	45
Experimento 2: Una Dosis Moderada de Etanol Temprana en la Adolescencia (DP28) induce Activación Locomotora e incrementa la Ingesta Posterior más tarde en la Adolescencia.	47
Introducción	47
Objetivo Específico	48
Diseño Experimental	48
Procedimientos Específicos de Entrenamiento y Evaluación.....	48
Resultados	51
Experimento 2a: Niveles de Etanol en Sangre (NES) en Ratas Adolescentes al DP28.	62
Introducción	62

<i>Diseño Experimental</i>	62
<i>Procedimientos Específicos de Condicionamiento y Evaluación</i>	62
<i>Resultados</i>	62
Experimento 3: <i>Relación entre Aversión Adquirida al Sabor y Actividad Locomotora espontánea o inducida por una Dosis elevada de Etanol en Ratas Adolescentes:</i>	64
<i>Introducción</i>	64
<i>Diseño Experimental</i>	64
<i>Procedimientos Específicos de Condicionamiento y Evaluación</i>	64
<i>Resultados</i>	65
Experimento 4: <i>Relación entre Condicionamiento de Preferencia al Lugar inducido por Etanol y Actividad Locomotora inducida por esta Droga en Ratas Adolescentes</i>	69
<i>Introducción</i>	69
<i>Diseño Experimental</i>	69
<i>Resultados</i>	71
Experimento 5: <i>Replicación del Condicionamiento de Preferencia al Lugar Inducido por Etanol en Ratas Adolescentes utilizando un control de mayor rigurosidad</i>	74
<i>Introducción</i>	74
<i>Diseño Experimental</i>	74
<i>Procedimientos Específicos de Condicionamiento y Evaluación</i>	74
<i>Resultados</i>	75
Conclusión de la Sección I	77
Sección II. Caracterización del efecto estimulante motor agudo del etanol	80
Consideraciones Generales de los Experimentos de la Sección II	83
Materiales y Procedimientos Específicos	83
Análisis de Datos	84
Experimento 6: <i>Rol de la novedad del contexto sobre la Actividad Locomotora inducida por Etanol en Ratas Adolescentes</i>	86
<i>Introducción</i>	86
<i>Diseño Experimental</i>	86
<i>Procedimientos Específicos</i>	86
<i>Resultados</i>	87
Experimento 7: <i>Estudio de los efectos estimulantes motores y de ansiedad inducidos por dosis variadas de etanol en ratas Wistar exocriadas adolescentes y adultas</i>	88
<i>Introducción</i>	88
<i>Diseño Experimental</i>	89
<i>Procedimientos Específicos</i>	90
<i>Resultados</i>	90

Experimento 7b: <i>Niveles de Etanol en Sangre (NES) en Ratas Wistar exocriadas adolescentes y adultas (DPs 28 o 74, respectivamente) en función de dosis variadas de etanol y en diferentes momento de la curva de etanol en sangre.</i>	95
<i>Introducción</i>	95
<i>Diseño Experimental</i>	95
<i>Procedimientos Específicos</i>	95
<i>Resultados</i>	96
Experimento 8: <i>Efectos de la exposición aguda al estrés sobre la activación motora inducida por etanol, en ratas machos Sprague-Dawley adultas y adolescentes.</i>	98
<i>Introducción</i>	98
<i>Diseño Experimental</i>	99
<i>Procedimientos Específicos y Evaluación</i>	100
<i>Resultados</i>	100
Experimento 8b: <i>Niveles de Etanol en Sangre y Cerebro, Corticosterona y Progesterona en ratas machos Sprague-Dawley adultas y adolescentes privadas socialmente.</i>	105
<i>Introducción</i>	105
<i>Resultados</i>	105
Experimento 9: <i>Efectos de la exposición a diferentes magnitudes de privación social sobre la actividad inducida por etanol en ratas Sprague-Dawley machos adultas y adolescentes</i>	107
<i>Introducción</i>	107
<i>Procedimientos Específicos y Evaluación:</i>	107
<i>Resultados</i>	108
Experimento 10: <i>Actividad Locomotora inducida por Etanol después de la Exposición a un Estrés Farmacológico (agonista kappa U62,066E) en ratas adolescentes Sprague-Dawley.</i>	112
<i>Introducción</i>	112
<i>Diseño Experimental</i>	112
<i>Procedimientos Específicos</i>	112
<i>Resultados</i>	112
Experimento 11. <i>Relación entre el efecto estimulante y ansiolítico inducido por el etanol en un campo abierto, un laberinto elevado en cruz y una caja de luz-oscuridad. Consumo de la droga tras una administración aguda de la misma en ratas adolescentes.</i>	117
<i>Introducción</i>	117
<i>Diseño Experimental</i>	118
<i>Aparatos Pruebas de Comportamiento al DP 28</i>	118
<i>Análisis de Datos</i>	122
<i>Resultados</i>	125
<i>Variables de actividad y ansiedad registradas en las pruebas de comportamiento: CA, LEC y LO</i>	125
<i>Campo Abierto</i>	125
<i>Caja de Luz-Oscuridad</i>	130
<i>Correlaciones entre las medidas de actividad y de ansiedad de las pruebas de CA, LEC y LO</i>	133
<i>Análisis univariados y multivariados de los patrones de ingesta en los animales controles (NT o tratados con vehículo 0,0 g/kg)</i>	137
<i>Regresión Múltiple</i>	137
<i>Ingesta de Etanol en sujetos agrupados en función de su respuesta a la ansiedad en: Alto-, Medio- y Bajo-respondedores</i>	140

Conclusión de la Sección II	142
Sección III: Rol predictivo de los niveles de Ansiedad sobre el Patrón de Consumo de Etanol durante la Adolescencia.	147
Experiencia Piloto: Primera aproximación sobre cómo el patrón de consumo de alcohol puede alterarse en función de los niveles de respuesta de ansiedad en ratas adolescentes.	149
<i>Introducción</i>	149
<i>Resultados</i>	152
Experimento 12. Niveles de respuesta de ansiedad y estrés inducido por inmovilización afectan diferencialmente el consumo de alcohol en ratas hembras adolescentes	154
<i>Introducción</i>	154
<i>Diseño experimental</i>	156
<i>Procedimientos Generales</i>	156
Sujetos.....	156
Condiciones Experimentales y Pruebas de Comportamiento	156
Procedimientos de Ingesta de Etanol	157
Estrés inducido por Inmovilización (i.e., restricción del movimiento)	158
<i>Análisis de Datos y asignación de grupos en función de la respuesta de ansiedad en LEC y LO.</i>	158
<i>Resultados</i>	160
Conclusión de la Sección III	168
Discusión General	171
BIBLIOGRAFÍA	193

ABREVIATURAS

% = *Porcentaje*

% V/V = *Porcentaje Volumen-Volumen*

< = *menor*

> = *mayor*

≥ = *mayor o igual*

μl = *microlitro*

“AA” = *Línea de ratas criadas selectivamente por preferir y aceptar alcohol (accepting/alcohol-preferring, según la literatura anglosajona)*

AA = *Alto-Ansioso*

AAS = *Aversión Adquirida al Sabor*

ACD = *Acetaldehído*

ADE = *Efecto de la Privación de Alcohol (Alcohol Deprivation Effect, según la literatura anglosajona)*

ADH = *Enzima de alcohol deshidrogenasa*

ALDH = *Enzima aldehído deshidrogenasa hepática*

AM = *Anti Meridiano*

ANOVA = *Análisis de la Varianza (Analysis of Variance, según la literatura anglosajona)*

AR = *Alto-Respondedor*

ATV = *Área Tegmental Ventral*

ATVp = *Área Tegmental Ventral Posterior*

AUDIT = *Test de Identificación de los Trastornos debidos al Consumo de Alcohol (Alcohol Use Disorders Identification Test, según la literatura anglosajona)*

BA = *Bajo-Ansioso*

BR = *Bajo-Respondedor*

bra = *Brazos Abiertos*

brc = *Brazos Cerrados*

CA = *Campo Abierto*

ClNa = *Cloruro de Sodio*

cm = *Centímetros*

CORT = *Corticosterona*

CPF = *Corteza Prefrontal*

CPL = *Condicionamiento de Preferencia al Lugar*

CSO = *Condicionamiento de Segundo Orden*

CTRL = *Control*

D1 = *Receptor de dopamina 1*

D2 = *Receptor de dopamina 2*

DA = *Dopamina*

DBA/2 = *Cepa de ratón consanguínea llamada así por portar alelos mutantes (recesivos) en tres loci del color del pelaje: dilute (d), brown (b) y non-agouti (a) (Dilute Brown Non-Agouti según la literatura anglosajona)*

DP = *Día Postnatal*

e.g. = *Por ejemplo*

EC = *Estímulo Condicionado*

EEM = *Error estándar de la media*

EI = *Estímulo Incondicionado*

EVA = *Etilvinilacetato*

FAST = *Respuesta motora rápida inducida por etanol en ratones*

g = *gramos*

g/kg = *gramos por kilogramos*

GABA = *ácido gamma-aminobutírico*

HAB = *high anxiety-related behavior*

HAD = *Línea de ratas de alto consumo de alcohol (high-alcohol-drinking, según la literatura anglosajona)*

HAP = *Línea de ratones de alta preferencia por alcohol (high-alcohol preferring, según la literatura anglosajona)*

HARF = *High Addiction Research Foundation*

i.e. = *Esto es o es decir*

i.g. = *intragástrica*

i.p. = *intraperitoneal*

ICV = *Intracerebroventricular*

INIMEC-CONICET-UNC = *Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra*

LAB = *Bajo comportamiento relacionado a la ansiedad (low anxiety-related behavior, según la literatura anglosajona)*

LAD = *Bajo consumo de alcohol en ratas (low-alcohol-drinking, según la literatura anglosajona)*

Abreviaturas

LAP = *Baja preferencia por el alcohol en ratones (low-alcohol preferring, según la literatura anglosajona)*

LEC = *Laberinto Elevado en Cruz*

LO = *Caja de Luz-Oscuridad*

LOW = *Respuesta motora lenta inducida por etanol en ratones*

MA = *Medio Ansioso*

mg = *miligramos*

mg/kg = *miligramos por kilogramos*

min = *minutos*

ml = *mililitros*

NACC = *Núcleo Accumbens*

NEC = *Niveles de Etanol en Cerebro*

NES = *Niveles de Etanol en Sangre*

NIH = *Institutos Nacionales de la Salud (National Institutes of Health según la literatura anglosajona)*

nmol = *Nano mol*

NT = *No Tratado*

P/v = *Porcentaje masa-volumen*

PM = *Post Meridiano*

PROG = *Progesterona*

RES = *Estresado por restricción del movimiento*

RT = *Reducción de la tensión*

SD = *cepa de ratas Sprague-Dawley, según la literatura anglosajona)*

SEDRONAR = *Secretaría de Programación para la Prevención de la Drogadicción y la Lucha contra el Narcotráfico*

sP = *Ratas criadas selectivamente por alta preferencia y consumo de alcohol (Sardinian alcohol-preferring, según la literatura anglosajona)*

U62,066E = *Espiradolina, agonista opiáceo kappa*

UChB = *Líneas de ratas criadas selectivamente por preferir alcohol (alcohol-preferring University of Chile B)*

WHP = *Warsaw High preferring*

WKAH/Hok = *Wistar-King Aptekman Hokkaido*

RESUMEN

La iniciación en el consumo voluntario de alcohol y la eventual escalada se manifiesta primordialmente durante la adolescencia. Esta es un período particularmente crítico y vulnerable para desarrollar problemas con la droga. Los cambios típicos de esta etapa del desarrollo y las experiencias con drogas contribuyen a incrementar dicha vulnerabilidad. Dados estos antecedentes, es importante estudiar la respuesta hedónica hacia el alcohol en adolescentes, la cual regula el acercamiento y consumo de la droga.

En este trabajo analizamos la reactividad hedónica a los efectos motivacionales del alcohol y el perfil de consumo de la droga en ratas adolescentes. Los adolescentes fueron sensibles a los efectos apetitivos, aversivos y ansiolíticos del alcohol. En comparación con los adultos, fueron más sensibles a los efectos estimulantes motores y más resistentes a los efectos sedativos del alcohol. La exploración en un ambiente nuevo estuvo asociada positiva y negativamente a los efectos motivacionales apetitivos y aversivos del alcohol, respectivamente.

Se caracterizó subpoblaciones de adolescentes en situación de riesgo para el inicio y posterior consumo de alcohol. Específicamente, las ratas adolescentes con niveles más altos de ansiedad exhibieron mayor consumo de etanol que pares con niveles medios de ansiedad, pero sólo si no eran expuestos estrés. Del mismo modo, una breve exposición al etanol durante la adolescencia temprana indujo activación motora e incrementó, particularmente en aquellos más sensibles al efecto estimulante, el consumo de etanol durante la adolescencia tardía. Se desarrolló un modelo de predicción de consumo en función de marcadores comportamentales que discriminó individuos propensos a iniciarse y desarrollar un consumo exacerbado de la droga.

Este trabajo brinda información sobre algunos factores que estarían mediando la relación entre iniciación temprana al etanol, marcadores de comportamiento y la vulnerabilidad al consumo exacerbado de la droga. Asimismo, mediante herramientas comportamentales se diseñaron estrategias para la detección de sujetos a riesgo de iniciarse y progresar desde un consumo controlado hacia uno elevado y eventualmente problemático con la droga durante la adolescencia.

Palabras Claves: adolescencia, rata, alcohol, efectos motivacionales.

SUMMARY

The onset and escalation of voluntary alcohol use commonly occur during adolescence; a critical period in which drug-taking interacts with a still maturing brain. This interaction may enhance the risk for development of alcohol drinking problems later in life. Normative developmental changes, subsequent experiences with the drug, and enhanced sensitivity to the motivational effects of the drug during adolescence may contribute to this vulnerability. It is therefore important to understand factors promoting vulnerability to elevated alcohol consumption, and those underlying the facilitative effects of alcohol initiation upon later drug use. We hypothesized that the inherent variability in motivational sensitivity to the drug influences alcohol use patterns.

To this end, we examined the relationship between measures of motivational sensitivity to ethanol and ethanol intake in adolescent rats; and analyzed susceptibility to ethanol intake in subpopulations of rats that differed in their experience with ethanol as well as in motivational response to the drug. Animals were screened for ethanol-induced behavioral activation, and sensitivity to the aversive, appetitive and anxiolytic effects of ethanol. Adolescents exhibited, when compared to adults, greater ethanol-induced motor stimulation and reduced sensitivity to ethanol-induced motor sedation. They were also sensitive to the anxiolytic, and to the aversive and appetitive effects of ethanol. Spontaneous motor activity in a novel environment was negatively and positively associated with ethanol-induced aversive and appetitive reinforcement, respectively.

This work also provided information towards the characterization of subpopulations of adolescents at risk for initiating alcohol drinking. Adolescents with higher levels of inborn anxiety exhibited higher ethanol consumption than counterparts with average levels of anxiety, but only if they did not suffer stress exposure. Similarly, a brief ethanol exposure during early adolescence induced motor stimulation and increased subsequent ethanol consumption during late adolescence. Moreover, those adolescents with higher sensitivity to the motor-stimulating effects of ethanol consumed more ethanol than those with lower sensitivity to the motor-stimulating effects of the drug.

Although further work is needed to better identify the conditions promoting ethanol intake during adolescence, some of the findings of this work should facilitate detection of adolescents that might quickly engage in alcohol self-administration.

Keywords: adolescent, rat, alcohol, motivational effects.

Introducción

Causas asociadas a los trastornos de consumo de alcohol

Tradicionalmente los problemas relacionados con el alcohol [(i.e., abuso y dependencia, según han sido clasificados por la Asociación Psiquiátrica Americana (1994) han sido explicados en función de factores genéticos. Al respecto, se ha sugerido que existiría aproximadamente entre un 40-70% de componente hereditario en la dependencia hacia el alcohol (nótese que esta droga será denominada de manera indistinta como alcohol o etanol en esta tesis) (Dick y Agrawall, 2008; Ducci y Goldman, 2008, 2012; Enoch, 2003; McGue, 1999). Sin embargo, hasta el momento los predictores genéticos disponibles son pocos y explican sólo una pequeña parte de la patología, sin haber sido aún integrados en la nosología y la atención clínica (Ducci y Goldman, 2012). No obstante, investigaciones recientes han indicado que una parte significativa de la variabilidad en los patrones de consumo de alcohol en la vida adulta podría explicarse en función de la naturaleza y extensión de la exposición temprana con la droga (Baer et al., 1998; 2003). En cierta medida, las investigaciones han comenzado a descentralizar el abordaje de los problemas asociados al consumo de alcohol como exclusivo del sujeto maduro y adulto. Específicamente, han comenzado a focalizar las investigaciones en períodos previos a la adultez e inclusive durante la lactancia o gestación, cuando la exposición temprana al alcohol, otras drogas o es provocada indirectamente por consumo materno y cuando puede existir exposición a otras noxas, como estrés o negligencia parental. Existe evidencia en la literatura humana que señala la exposición o experiencia prenatal como un factor de alta relevancia para modular el consumo de etanol (Alati et al., 2006; Baer et al., 1998, 2003; Yates et al., 1998). Específicamente, estudios epidemiológicos, al igual que numerosas investigaciones pre-clínicas, han indicado que la exposición temprana al alcohol (pre- o postnatal) predice significativamente el uso de esta droga durante la adolescencia y, a veces, en la adultez. Más en detalle, Baer et al. (2003) por medio de la información obtenida de 439 familias analizaron la relación entre la historia familiar de consumo de alcohol, la exposición prenatal al alcohol y el consumo posterior en la adolescencia temprana (14 años) y tardía (21 años). Los resultados indicaron que el mejor predictor de consumo de alcohol parecía ser la experiencia gestacional con esta droga, más que la historia familiar o parental de consumo. Otros autores (Alati et al., 2006) examinaron el efecto del uso materno de alcohol en diferentes momentos de la gestación (temprana y tardía) y posteriores a la misma sobre el desarrollo de trastornos asociados al consumo de alcohol. Los autores encontraron que la exposición intrauterina en la gestación temprana - tres o más vasos por ocasión-

era un predictor más importante que la exposición etílica al final del embarazo para el desarrollo de problemas en el consumo de la droga de sus hijos a la edad de 21 años. Esta relación también ha alcanzado confirmación experimental en trabajos con roedores observándose que los animales expuestos a la droga durante la gestación muestran luego un comportamiento alterado frente al sabor y olor del alcohol, como así también un mayor consumo de esta droga (Spear y Molina, 2005; Youngentob et al., 2009)

Otro de los factores que ha sido relacionado con los trastornos de consumo de la droga es la *edad de inicio* al consumo de alcohol. Se ha observado que la probabilidad de desarrollar problemas con el alcohol disminuye con la edad y que mantendría una relación inversa con la edad del primer episodio de consumo. Esto es, mientras menor la edad de inicio al consumo de alcohol tanto mayor la probabilidad de ocurrencia de abuso o dependencia hacia el alcohol (deWit et al., 2000; Pitkänen et al., 2005). Numerosos estudios consideran la iniciación temprana -“debut temprano” (Pedersen y Skrondal, 1998)- como un factor de vulnerabilidad para la ingesta posterior de esta droga, que en ciertas ocasiones (pero no siempre, véase Pilatti et al., 2014) parece actuar de forma independiente a la historia positiva de dependencia al alcohol en el grupo familiar -usualmente considerada un indicador de riesgo genético-.

La iniciación en el consumo voluntario de alcohol y la eventual escalada se presenta primordialmente durante la adolescencia (Windle et al., 2008). Los adolescentes exhiben tasas de uso y abuso de alcohol más elevadas que los adultos habiéndose observado además que los sujetos que comienzan a beber antes de los 14 años son más susceptibles de desarrollar abuso y dependencia hacia el alcohol en la vida adulta; que aquellos que comienzan luego de los 20 años (Buchmann et al., 2009; deWit et al., 2000, Grant y Dawson, 1997; Grant et al., 2008; U.S. Department of Health, 2008; Pitkänen et al., 2005). Una de las primeras aproximaciones en estudiar los efectos de la edad de inicio fue el trabajo de Pedersen y Skrondal (1998) sobre una cohorte basada en 465 adolescentes. Definieron "edad de inicio" como el consumo de la mitad de una botella de cerveza, cien mililitros de vino o veinticinco mililitros de licor e indicaron que la edad media de inicio era aproximadamente a los 15 años. Trazaron una trayectoria del consumo realizando registros de datos anuales (años: 1987, 1988, 1989, 1990, 1993). Observaron que el inicio temprano incidía sobre el consumo posterior y sobre el desarrollo de los problemas asociados a la droga; y que estos efectos no variaban en función del sexo. Un resultado de suma importancia en aquel estudio fue que señalaban que al retrasarse aproximadamente un 10% la edad de inicio, esto podía implicar la reducción de hasta un 35% del consumo posterior esperado del alcohol. De este modo el debut temprano resultaba un excelente predictor de consumo y problemas asociados al mismo. Un año antes, Grant y Dawson

(1997) indicaban que la tasa de dependencia hacia el alcohol se reducía de un 40% en los individuos que comenzaron a beber a los 14 años a un 10% en aquellos que comenzaron más tarde, aproximadamente de los 20 años en adelante. En tanto la tasa de abuso se reducía de un 17% a un 4% en aquellos iniciados a los 16 años o menor, respecto de los iniciados a los 20 años. Aproximadamente una década posterior los autores volvían abordar dicha temática, aunque en esta ocasión indagaban también la repercusión de la edad de inicio en un subgrupo de la población general. Más en detalle, examinaron una sub-muestra de individuos de aparente bajo riesgo para el consumo problemático de alcohol ya que carecían de historia familiar positiva de alcoholismo, desórdenes de personalidad y factores de riesgo de la infancia (Dawson et al., 2008). Observaron que las personas que comenzaron a beber antes de los 15 años de edad resultaron significativamente más propensas a experimentar la incidencia de la dependencia y abuso del alcohol en la edad adulta, que aquellos donde la edad de inicio se hubiese producido más tarde en la adolescencia (18 años o más). Siguiendo esta línea de pensamiento Hingson et al. (2006) reportaron un aumento creciente en la prevalencia de la dependencia del alcohol a los largo de la vida cuando el primer episodio de consumo se daba temprano en la adolescencia. Un 47% de los que informaban haber comenzado a consumir antes de los 14 años cumplían los criterios de dependencia del alcohol, en comparación con sólo un 9% de los que iniciaban después de los 21 años. A diez años transcurridos desde el primer episodio el porcentaje en estos individuos alcanzaba un 27% en contraste a un 4%, y a los 25 años un 33% versus un 2%; respectivamente. En Europa, más específicamente en Finlandia, Pitkänen et al. (2005) analizaron la relación que existía entre la edad de inicio de consumo de alcohol y el uso de alcohol en la edad adulta. El trabajo implicó un seguimiento longitudinal de los individuos a partir de los 8 años. Los datos sobre el consumo de alcohol se registraron a los 14, 20, 27, 36 y 42 años. En congruencia, también, con los demás estudios mencionados, los autores indicaron que la edad de inicio era un fuerte predictor de uso y consumo excesivo de la droga. Aquellos individuos que se iniciaron temprano en el consumo, alrededor de los 14 años mostraron mayor puntuación en los indicadores de consumo de alcohol en la vida adulta que los que comenzaron a beber a los 18 años o más tarde e incluso obtuvieron puntuaciones más altas que aquellos que comenzaron a beber a la edad 16-17 años. Estos sujetos también presentaban mayor riesgo que los que comenzaban a consumir a los 16 años o después de desarrollar un consumo excesivo de la droga. El inicio temprano en el consumo de alcohol no se vio alterado por características socio-emocionales o el éxito escolar evaluado antes de la iniciación del consumo de alcohol, ni tampoco por la situación laboral de sus padres.

Los estudios en alusión parecen apoyar la idea que habría una relación inversamente proporcional entre el inicio temprano -como factor de vulnerabilidad- y el uso problemático de la

droga más tarde en la vida. Se podría también considerar que el tiempo que ha transcurrido desde el primer consumo de alcohol es un indicador más preciso de progresión de dependencia o abuso que la edad de inicio de consumo. Quienes se inician antes tendrían más tiempo de exposición a la droga y por tanto mayor posibilidad de desarrollar las neuro-adaptaciones asociadas a la transición desde un consumo regular al consumo problemático (véase Alaux-Cantin et al., 2013; Depoy et al., 2013). Al respecto, deWit et al. (2000) a través de un estudio poblacional de 5856 individuos desestimaron parcialmente esta posibilidad. Estos investigadores observaron que tras diez años transcurridos de haber comenzado a beber el 13,5% y 13,7% de los individuos que habían empezado a consumir a los 11-12 y 13-14 años, respectivamente habían progresado a un diagnóstico de abuso en comparación con solo un 2% registrado en los individuos que habían demorado el consumo hasta al menos los 19 años. El grupo de mayor riesgo de cumplir con el criterio para el diagnóstico de dependencia hacia el alcohol una vez pasados diez años desde la edad de inicio había tenido su primer contacto con el alcohol entre los 11-12 años y representaba un 15,9%. En tanto que aquellos iniciados a los 19 años o mayores, la probabilidad de dependencia era solo de un 1%. A diferencia de los resultados de riesgo de abuso de alcohol, el riesgo de dependencia para los iniciados en los 13 o 14 años resultó menor (9%) al riesgo que quienes comenzaron a beber a los 11-12 años. El resultado, quizá más llamativo, fue el retraso significativo observado en el desarrollo del abuso y dependencia de alcohol entre los individuos que habían reportado el primer consumo antes de los 11 años. Una década posterior al inicio en este grupo de individuos alcanzó similar probabilidad que el grupo de 13-14 años. Los autores postularon que dicha diferencia pudo deberse a que los menores tendrían mayores limitaciones y restricciones por parte de su familia y sociedad que sus pares más grandes (13-14 años).

Como señaláramos anteriormente, los hallazgos de los diferentes estudios parecen compartir como denominador común la idea que la demora en el inicio del consumo de alcohol sería un eslabón importante para la prevención; aunque se entiende que no impediría en su totalidad el riesgo de alcoholismo (Prescott y Kendler, 1999), ya que existen otros elementos involucrados en los problemas asociados a la droga. No obstante, para algunos individuos podría ser un elemento de peso, y parece haber suficiente literatura que corrobora el poder predictivo de la edad de inicio sobre la trayectoria y consumo de la droga; independientemente de la historia familiar de alcoholismo, del género, vinculación de la escuela, la iniciación de alcohol entre pares y la percepción nociva del consumo de alcohol. Pese a esto, existen trabajos que desestiman la asociación entre la iniciación temprana y los problemas asociados a la droga más tarde; y descartan la estrategia del retraso o demora en el inicio como política preventiva para disminuir la frecuencia de consumo y/o los

problemas asociados al consumo de la droga. Por el contrario, sugieren que las relaciones encontradas entre la edad de inicio y subsecuentes trastornos con la droga se han observado porque los estudios sufrieron en parte sesgo, por ejemplo, en la selección de la muestra, porque recurren a una memoria retrospectiva para recordar el primer episodio de consumo –generalmente muy alejado temporalmente del momento actual del individuo, o no cuentan con controles específicos. Recientemente, Maimaris y McCambridge (2014) publicaron una revisión sistemática de estudios prospectivos que abordan la temática de la *edad de inicio y los problemas con el alcohol en la vida adulta*. Los autores concluyen que no habría evidencia suficientemente fuerte que respalde la idea que el inicio temprano en el consumo conduzca a problemas con el alcohol en la vida adulta; y por tanto, debiera desestimarse la estrategia de retrasar el inicio de consumo como política preventiva redestinando el interés de los estudios sobre los daños graves y agudos que se generan por el consumo temprano de la droga. En la revisión se pueden identificar una serie trabajos que pretenden describir los aspectos de la primera experiencia de uso de alcohol como Warner y White (2003), quienes también examinaron las relaciones entre la edad de inicio del consumo, el contexto en que se producía y los problemas con el consumo de alcohol con y sin controles para los factores de riesgo psicosocial. Los individuos del estudio fueron entrevistados por primera vez a los 12 años, luego a los 15 y 18 años, más tarde a los 25 y 30-31 años. Independientemente del contexto de iniciación, los jóvenes que se iniciaban tempranamente eran más propensos a convertirse en bebedores con problemas, aunque el riesgo era relativamente mayor para los jóvenes que se hubieran sentido borrachos durante el primer episodio de consumo y que este se hubiese experimentado fuera del contexto familiar. El estado de embriaguez de la primera experiencia de consumo de la droga resultó la única variable asociada de forma significativa a los problemas con el alcohol, respecto de otros factores de riesgo como el género, estado socio-económico, religión, etc.

Asimismo, Guttmanova et al. (2011) a partir de una muestra de adolescentes en Noruega investigaron la dependencia al alcohol en adultos que se habían iniciado tempranamente y que habían empezado a consumir de forma regular antes de la edad legal permitida (21 años). La muestra fue reagrupada en función de cuatro rangos de edades: < a 11, 11 a 14, 15 a 17 y 18 a 20 años. La información se recolectaba cada tres años a partir de los 21 hasta los 33 años. Los resultados indicaron ausencia de relación entre la edad de inicio y el mal uso de la droga. Pese a ello, el consumo regular de la droga entre los 15 a 17 años presentaba una relación sólida con el mal uso y dependencia del alcohol. Paralelamente, Rossow y Kuntsche (2013) en el mismo país, sobre la base de una muestra de 1311 estudiantes y en el transcurso de trece años analizaron esta relación. El primer registro se dio a los 13-14 años donde se evaluaba sobre el inicio en el consumo (moderado y excesivo), problemas de conducta, otros problemas y consumo excesivo en los padres. El segundo

registro se dio a los 26-27 años donde se preguntó por el consumo excesivo en términos de frecuencia y por medio de la puntuación alcanzada en el cuestionario AUDIT (cuestionario de identificación de los trastornos debidos al consumo de alcohol). Observaron que el inicio temprano estaba asociado a los problemas de conducta, otras conductas problemáticas y al consumo excesivo de los padres en la adolescencia temprana. El riesgo mayor de consumo excesivo era en la vida adulta entre los que se iniciaban tempranamente, aunque cuando ajustaban el modelo de predicción por los problemas de conducta, esta asociación se debilitaba perdiendo significancia estadística. Solo aquellos que mostraban problemas de conducta preservaban el panorama de riesgo. Por tanto, la iniciación temprana en sí misma no pareciera ser el único elemento involucrado y responsable del consumo excesivo de la droga en la vida adulta, sino que formaría parte de una variedad más amplia de factores que requieren ser incorporados en los próximos estudios.

El consumo de alcohol en los adolescentes es un fenómeno que se observa en muchas culturas. De hecho, actualmente en la mayoría de los países occidentales el consumo de alcohol se considera un problema de importancia para la salud pública. Por ejemplo, estudios epidemiológicos realizados en Estados Unidos durante el 2012 indicaron que un 11%, 28% y 42%, entre la población de 14, 16 y 18 años, respectivamente, había consumido bebidas con contenido alcohólico en los últimos 30 días (Johnston et al., 2013).

En Argentina, en un estudio realizado entre jóvenes de 13 a 17 años indicaron que la edad de inicio se concentra alrededor de los 13 años (SEDRONAR, 2011). Aproximadamente un 69% de todos los adolescentes reportaron haber consumido bebida alcohólica alguna vez. El 41,6% de las mujeres y el 47,5% de los varones indicaron haber consumido alcohol en los últimos 30 días. A su vez, el 62% de los individuos reconoce haber tomado cinco vasos o más en una misma ocasión durante las últimas dos semanas, en particular durante los fines de semanas. En la provincia de Jujuy, un estudio realizado por Alderete et al. (2008) en una muestra de jóvenes de entre 12 a 17 años indicó que el 9,3% y 10,6% de las mujeres y varones de su muestra, respectivamente, presentaban síntomas de dependencia. Se suma a estos antecedentes el trabajo de Pilatti et al. (2013) llevado a cabo en la ciudad de Córdoba. Los autores reportaron que el 47% de los niños entre 8 y 9 años habían tenido acceso alguna vez a pequeñas cantidades “*sorbos*”, por ejemplo de bebidas como vino o cerveza. La gran mayoría ellos indicaban que el primer episodio de consumo se producía en ambientes familiares durante fiesta, o bien era provisto por algún adulto. El 82% de los individuos de 12 años habían probado alguna vez alcohol. También encontraron que la naturaleza hedónica de esta primera experiencia con el alcohol resultaba, ya fuera placentera o no, un buen predictor del consumo posterior. El 80% de los niños que reportó haberle gustado el alcohol la primera vez continuó consumiendo. Solo un 30% expresó disgusto asociado a la primera experiencia de consumo

de la droga. Asimismo, los niños más impulsivos y extravertidos y que exhibieron mayores expectativas positivas hacia los efectos del consumo presentaron mayor probabilidad de consumo que sus pares. En contraste, aquellos categorizados como responsables mostraron menor probabilidad de consumir alcohol.

Hasta el momento hemos hecho énfasis en la importancia de la iniciación temprana en el consumo de alcohol y la relación que mantiene con los problemas asociados al consumo de la droga. Asimismo, se ha detectado que el consumo de tipo voluntario y excesivo, al igual que la continuidad en el mismo, se producen principalmente durante la adolescencia. Específicamente, las tasa de abuso y dependencia al alcohol alcanzan su pico máximo durante la adolescencia tardía (18-24 años) y luego caen de manera progresiva. Al parecer, la adolescencia es un período crítico y vulnerable para los problemas con el alcohol. Los cambios típicos de la etapa podrían contribuir a esta vulnerabilidad. A nivel del comportamiento se incrementan rasgos como la impulsividad, la conductas de búsqueda de novedad, la toma de riesgos y la búsqueda de nuevas sensaciones, y las interacciones con pares adquieren mayor valor (Crews et al., 2007; McCrae et al., 2000; Spear, 2000). Estos comportamientos se cree permitirían al adolescente desarrollar habilidades fuera del núcleo familiar y por lo tanto facilitarían la transición hacia la adultez (Larson y Richards, 1991). Paralelamente, el cerebro sufre una re-estructuración en anatomía y transmisión neuronal que implican cambios estructurales y funcionales (Crews et al., 2007; Witt, 1994; 2010) en regiones como la corteza prefrontal (CPF), la cual ha sido asociada a funciones ejecutivas como flexibilidad cognitiva, autorregulación y evaluación de riesgo (Steinberg, 2009). Se ha mencionado por ejemplo formación de nuevas células (neurogénesis); que a pesar de ser un proceso del desarrollo que se expresa tempranamente en la ontogenia se ha visto continúa también en la adultez en regiones específicas del cerebro como la subventricular anterior y el giro dentado del hipocampo (He y Crews, 2007). El hipocampo contribuye en los procesos de aprendizaje y la memoria (Shors et al., 2001). El cerebro adolescente sería particularmente sensible a la inhibición en la neurogénesis inducida por la exposición al etanol (Crews et al., 2006). La interrupción de la neurogénesis por el empleo de drogas, entre ellas el alcohol, durante la adolescencia podría generar cambios duraderos en la edad adulta. Otros factores como el estrés y/o el aumento de hormonas alteran el proceso de neurogénesis y precipitan cambios en el estado de ánimo (Malberg y Duman, 2003; McEwen, 2000; Gregus et al., 2005).

En el curso natural de desarrollo del cerebro durante la adolescencia se han descrito dos procesos. El primero implica una sobreproducción y eliminación de sinapsis, conocidos como “sinaptogénesis y podado” que ocurre primordialmente en la CPF observándose un aumento inicial en la densidad sináptica seguido de un período de poda (Witt, 2010). La ventaja evolutiva de estos

cambios es aún desconocida, pero se ha sugerido que puede permitir reestructuraciones en respuesta a nuevas demandas ambientales (Spear, 2000). Por medio de resonancia magnética se observa que el patrón estos cambios en la corteza no es lineal, puesto que el volumen de la materia gris se expande alrededor de la adolescencia, y posteriormente disminuye entre este período y la adultez (Giedd et al., 2004; Sowell et al., 2004; 2007). El volumen absoluto de la CPF disminuye durante la adolescencia; específicamente en la tercera capa de la corteza frontal. Aproximadamente un 40% de las sinapsis se pierden entre los 7 y 15 años de edad (Andersen, 2010). La retracción sináptica no es uniforme en todas las estructuras. Por ejemplo, en la corteza visual primaria se pierden todas las capas a excepción de la cuarta después de la adolescencia en ratas (Yates y Juraska, 2008). Esta pérdida representa aproximadamente un 18-20 %, comparado a un 5% de pérdida celular en la corteza prefrontal ventromedial (Markham et al., 2007).

Los cambios en la corteza siguen un patrón específico que comienzan desde la parte trasera en dirección delantera. Las áreas que sirven a funciones primarias (sensoriales y motoras), maduran primero y las de asociación de orden superior que integran las funciones primarias, maduran más tarde; siendo los lóbulos frontales la últimas regiones del cerebro en desarrollarse (Giedd et al., 2008; Godtay et al., 2004; Paus et al., 2008; Sowell et al., 2001). Por ejemplo, en los lóbulos temporales la última parte en alcanzar los niveles adultos es el giro temporal superior que integra la memoria, aferencias audio-visuales, y la función de reconocimiento de objetos (a lo largo de las cortezas parietal inferior y pre-frontal). El lóbulo frontal alcanza su máximo volumen a los 11 y 12 años en las mujeres y varones; respectivamente. El lóbulo temporal alcanza su máximo volumen a los 16,7 y 16,2 años en las mujeres y varones; respectivamente. El lóbulo parietal alcanza su mayor volumen a los 10,2 y 11,8 años en las mujeres y varones; respectivamente (Lenroot et al., 2006).

Asimismo, las regiones subcorticales se desarrollan antes que las corticales. La amígdala puede ser una de las regiones que se desarrollan más temprano. En las niñas alcanza su máximo volumen a los 4 años de edad, durante la adolescencia muestra un cambio relativamente pequeño; en tanto que en los niños aumenta progresivamente hasta los 18 años aproximadamente un 53% (Durston et al., 2001). La amígdala tiene proyecciones hacia el hipotálamo, el cual regula funciones autonómicas como ritmo cardíaco, presión sanguínea, respiración. La interconexión entre las estructuras es importante para movilizar las funciones del cuerpo en respuesta a las potenciales amenazas y estímulos perjudiciales. La amígdala está muy conectada con la corteza prefrontal y los sistemas de reforzamiento del cerebro. Estas interconexiones son cruciales en proveer las aferencias emocionales hacia la CPF que brinda valor a las decisiones (Walker y Bollini, 2002). Otras regiones como el caudado, putamen y el cerebelo muestran un desarrollo en la sustancia gris que alcanza su

máxima expresión durante la adolescencia seguida de una reducción del volumen de aproximadamente un 15% posteriormente (Durston et al., 2001).

El desarrollo de las regiones límbicas, temporales y prefrontales del cerebro durante la adolescencia cobra importancia en la integración de los comportamientos de carácter emocional con los procesos cognitivos (Walker y Bollini, 2002). Muchos autores sugieren que el refinamiento sináptico, es decir, la eliminación de las conexiones neuronales se produce solo en aquellas sinapsis que no se activan con frecuencia y que, por tanto, resultan innecesarias (Casey et al., 1997; Giedd et al., 1999; Sowell et al., 2004b).

En este período de la ontogenia se producen cambios también en la sustancia blanca que aumenta mediante un proceso conocido como mielinización de los axones. Las vainas de mielina hacen las veces de aislantes y permiten que el impulso nervioso viaje a lo largo del cerebro más rápido y eficiente, al mismo tiempo que facilita que se integre mejor la actividad del cerebro (Hüppi y Dubois, 2006; Luna y Sweeney, 2004; Sowell et al., 2004a). Este proceso ocurre primordialmente en los tractos que conectan las áreas frontales y temporales, y las estructuras límbicas del cerebro. La mielinización procede en general desde la parte inferior a superior y desde la porción trasera a anterior del cerebro. Las vías proximales tienden a mielinizarse antes que las distales, las vías sensoriales antes que las motores, y las proyecciones antes que las asociaciones (Volpe, 2000). Aunque la mielinización se completa en las cortezas sensoriales y motoras durante los primeros años de vida, la formación de las vainas de mielina alrededor de los axones continúa en la corteza parietal y frontal hasta la tercera década (Giedd et al., 2006; Yakovlev y Lecours, 1967), al igual que la región periférica del hipocampo entre la primera y segunda década de vida (Benes et al., 1994).

El sistema de neurotransmisión también sufre cambios estructurales durante este período. Ocurre una eliminación sináptica de las aferencias excitatorias glutamatérgicas hacia la CPF (Crews et al., 2007). La eliminación tiene implicancias funcionales. Por ejemplo, mediante la prueba “go/no go”, que analiza las capacidades de atención sostenida y el control de la respuesta; se ha visto una mayor activación de la corteza frontal dorsolateral y orbitofrontal en los niños, que en los adolescentes, y mayor en estos últimos que sus pares adultos (Casey et al., 1997). El exceso de sinapsis en los más jóvenes por la escasa maduración del cerebro hasta ese momento provoca mayor activación del cerebro aunque menos eficiente comparado con los adultos que han finalizado los procesos de maduración de la corteza frontal logrando una menor activación general, más focalizada, más rápida y con un mejor desempeño (Blakemore y Choudhury, 2006). Como en la CPF, los receptores de glutamato en el hipocampo sufren una reducción importante durante la adolescencia, aproximadamente un cuarto de los receptores NMDA en las regiones piramidales del hipocampo desaparecen entre los días postnatales (DP) 28 y 60 de la rata (Insel et al., 1990). También se produce

reducción sináptica de las aferencias excitatorias glutamatérgicas hacia el núcleo acumbens (NACC) durante este período (Frantz et al., 1999).

Además del cambio en las sinapsis glutamatérgicas durante la adolescencia, el ácido gamma-aminobutírico o GABA muestra cambios funcionales que dependen de la edad. Temprano en la ontogenia GABA ejerce una acción excitatoria, en tanto que adquiere capacidad inhibitoria por medio del desarrollo de los canales cloro, proceso que se da durante la segunda semana de la rata (Ben-Ari, 2002). La maduración de la neurotransmisión de GABA desde la infancia hacia la adolescencia y la adultez contribuye en parte al ajuste de las aferencias sinápticas de las interneuronas inhibitorias mejorando la discriminación de las señales y alcanzando procesos más eficientes (Crews et al., 2007). Las neuronas de GABA juegan un papel importante en la sincronización de la actividad cortical mediante un interjuego complejo de mecanismos que regulan el flujo espaciotemporal de la información entre las neuronas piramidales (Constantinidis et al., 2002). La capacidad inhibitoria de GABA madura paralelamente con el desarrollo de los procesos cognitivos complejos (Luna et al., 2010); en particular, aumenta durante la adolescencia tanto en los humanos como en las ratas (Lewis et al., 2004; Tseng y O'Donnell, 2007; respectivamente). GABA sincroniza la información de las células piramidales modulando la velocidad de las diferentes aferencias en las áreas de la corteza, muchas de ellas glutamatérgicas. Este proceso se hace más evidente cuando el individuo alcanza un mayor nivel cognitivo durante la transición entre la adolescencia y la adultez. En conjunto, el cerebro aun inmaduro se estructura en un comienzo por procesos excitatorios por la contribución temprana en la vida de GABA previo a que adquiera la capacidad inhibitoria durante la adolescencia (Brenhouse y Andersen, 2011).

En este período se produce también un incremento de dopamina (DA) en las aferencias hacia la CPF y hacia las regiones límbicas del cerebro (Andersen et al., 1997; Lewis, 1997). Por ejemplo, los niveles basales de síntesis de DA en la CPF aumentan para el DP30 antes de reducirse al DP40 (Andersen et al., 1997). En el estriado los sitios de unión de receptores D1 y D2 sufren una reducción del 30-45% posterior a haber alcanzado su mayor expresión al DP40 (Teicher et al., 1995) En el núcleo acumbens (NACC) los niveles al DP30 son menores que los alcanzados posterior al DP40.

En líneas generales se producen cambios sustanciales en la densidad y distribución de los receptores de DA en las vías que conectan el sistema límbico y a la CPF. Hay mayor actividad dopaminérgica en estas vías durante la primera parte de la adolescencia que en cualquier otro momento del desarrollo (Wahlstrom et al., 2010). La dopamina juega un papel fundamental sobre la valoración motivacional, y cambios en los niveles de DA tienen implicancias importantes para la búsqueda de sensaciones (Steinberg et al., 2009) y la respuesta a situaciones novedosas. En condiciones normales se espera una reacción precavida o de neofobia frente a estímulos novedosos

(Depue y Collins, 1999; Steimer, 2002). Durante la adolescencia, y quizás debido a estos cambios de DA, se observan respuestas de búsqueda (acercamiento- proximidad hacia los reforzadores) y toma de riesgo en mayor proporción que en cualquier otro momento de desarrollo.

Aunque habría otros neurotransmisores involucrados, la DA ha sido por excelencia el neurotransmisor asociado al funcionamiento del sistema de recompensa, que tiene basamento a lo largo del circuito mesocorticolímbico en las regiones límbicas, estriado y frontales, promoviendo comportamientos dirigidos a un estímulo y su regulación (Depue y Collins, 1999). Es un circuito implicado en los procesos de recompensa por drogas (Koob et al., 1994) y la integración de los sistemas motores y sensoriales que facilitan las respuestas (Ikemoto y Panksepp, 1996). Sirve a la integración de las aferencias que implican estados emocionales desde las diversas estructuras límbicas y transmite esta información a los sistemas motores (Kalivas et al., 1993) El NACC por su parte hace las veces de una fase intermedia entre el sistema límbico y motor (Depue y Iacono, 1989), y puede influir también en el procesamiento cortical de los estímulos sensoriales (Gray et al., 1997). Asimismo éste recibe aferencias inhibitorias de DA desde el área tegmental ventral (ATV). La mayoría de los cuerpos celulares de DA se originan en el ATV y Sustancia Negra. La DA que sale de estas regiones alcanza su meta por medio de la trayectorias axonales segregadas. Se han sugerido dos sistemas funcionando para DA. Uno tónico que liberaría de forma continua DA en el espacio extracelular y otro fásico que liberaría DA en respuesta a eventos de importancia comportamental (Grace et al., 2007).

En la medida en que se producen los cambios en estas áreas del cerebro, tanto para la dopamina como las aferencias a dichas regiones, se esperan alteraciones del desarrollo concomitantes sobre comportamientos de índole motivacional. De hecho, las modificaciones sobre el valor motivacional atribuido a los estímulos podrían explicar, en parte, los cambios de los comportamientos propios de la adolescencia; como el incremento en el valor atribuido a las interacciones sociales y la búsqueda de nuevos estímulos (Casey et al., 2008; Spear, 2000). Estos cambios, incluso, podrían facilitar el inicio y continuidad en el consumo de drogas alterando el desarrollo normal del cerebro (Pascual et al., 2009) como la habilidad del cerebro de transferir información entre las diferentes regiones eficientemente garantizando, por ejemplo, el control del impulso (Luna et al., 2001); que si bien los niños muestran capacidad de controlar los impulsos, con la edad y la neuromaduración emerge la habilidad de emplear dichas habilidades consistentemente (Luna et al., 2004). En otras palabras, la exposición a la droga interferiría con el curso normal del desarrollo del sistema nervioso central y esto, además, interferiría en los procesos cognitivos y sociales poniendo en riesgo a los adolescentes.

¿Por qué algunos de los adolescentes que comienzan a consumir alcohol desarrollan relaciones problemáticas con el alcohol mientras que otros conservan un consumo controlado de la droga?

Existen numerosos trabajos que han intentado estudiar los factores que podrían estar determinando que algunos individuos iniciados al consumo de alcohol, pero no todos, desarrollen problemas con la droga. Algunos de estos trabajos buscan analizar posibles diferencias en la sensibilidad hacia el alcohol entre los individuos y determinar en qué medida las diferencias individuales o grupales pueden ser predictivas del consumo adolescente. La búsqueda de diferencias individuales en la sensibilidad y/o respuestas comportamentales asociadas al consumo de alcohol y otras drogas ha sido una herramienta frecuentemente empleada. Por ejemplo, algunos trabajos encuentran relación entre la impulsividad, el uso y problemas con el alcohol (Congdon y Canli, 2005; Verdejo-Garcia et al., 2008) y la mayor propensión al consumo del psicotrópico (Zuckerman y Kuhlman, 2000). Las relaciones entre ambos constructos son, sin embargo, complejas. Por un lado, el consumo de la droga puede generar impulsividad; y por otro lado la *impulsividad* puede ser un factor que predice consumo y desórdenes asociados al consumo (Goldstein y Volkow, 2002). De la misma manera que con el factor edad de inicio, aún es incierto si la impulsividad contribuye directamente a aumentar el riesgo de desarrollar problemas con la droga, o bien si es simplemente una manifestación de otra causa etiológica anterior (Dick et al., 2010). Esta relación sería conveniente analizarla atendiendo al contexto de desarrollo en el cual se esté gestando, porque a pesar que la personalidad ha sido tradicionalmente entendida como una característica estable, los trabajos de carácter longitudinal dejan entrever que ocurren muchos cambios a lo largo del curso de la vida (Roberts et al., 2006).

Una limitante en el progreso para el entendimiento de la relación entre impulsividad y uso de alcohol ha sido la imprecisión que implica el término impulsividad y la multiplicidad de tareas que se han empleado para medir aspectos de la misma (Dick et al., 2010). En estudios con humanos, la impulsividad en general ha sido definida como la tendencia a reaccionar con prisa o sin planeamiento ante estímulos externos o internos sin considerar apropiadamente las consecuencias negativas o riesgos inherentes (Lejuez et al., 2010). Más recientemente, se han caracterizado cuatro rasgos o aspectos de la misma (no planeamiento, deliberación, urgencia, búsqueda de sensaciones) que estarían asociadas a diferentes consecuencias del empleo de alcohol; como la iniciación, la escalada, y desórdenes de uso de alcohol (Shin et al., 2012). Por ejemplo, la urgencia parece estar relacionada al consumo que se realiza para regular estados afectivos negativos; la búsqueda de sensaciones estaría más relacionada al uso para aumentar la estimulación y estados afectivos positivos. Esto

sugiere que la búsqueda de sensaciones implica una cierta incapacidad para inhibir comportamientos, mientras que la urgencia reflejaría una respuesta motivacional aversiva (Castellanos et al., 2011; Finn et al., 2000). Una limitante de los estudios de impulsividad en humanos es que generalmente trabajan con muestras que han estado expuestas a la droga por un tiempo prolongado y por lo tanto no es posible conocer si los rasgos de impulsividad han sido afectados por los efectos crónicos del consumo (Anestis et al., 2007; Quinn et al., 2011). Existe, sin embargo, evidencia que indica que aquellos genéticamente a riesgo de alcoholismo son más impulsivos y se ha visto relación, aunque modesta, entre la historia familiar previa y el rendimiento en la tarea de descuento asociado a la demora, una de las principales formas de medir impulsividad (Petry, 2001).

Estudios con animales han sugerido que la impulsividad podría estar genéticamente mediada. Poulos et al. (1995) evaluaron impulsividad en ratas mediante la tarea de descuento asociado a la demora de un reforzador y observaron una asociación significativa entre impulsividad y auto-administración de etanol. Cuando se han empleado líneas de ratas selectivamente criadas por diferencias en los niveles del consumo de alcohol (prefieren -P- o no prefieren -NP-); las primeras (P) evidencian cierta dificultad en aprender conductas que requieren inhibición de la respuesta en tareas múltiples, asimismo muestran déficit en la tarea de evitación pasiva, en donde la rata aprende a suprimir la conducta de descender a un recinto que le provee un shock eléctrico (Dick et al., 2010; Steinmetz et al., 2000). Whihelm y Mitchell (2008) también compararon ratas criadas selectivamente por su alto o bajo consumo de alcohol (HAD y LAD; respectivamente) y observaron que las HAD fueron más impulsivas que las LAD.

Oberlin et al. (2009) emplearon líneas de ratones criados selectivamente por su preferencia hacia el alcohol -alta o baja- (HAP o LAP, respectivamente). Los animales fueron evaluados en la tarea de descuento asociada a la demora de un reforzador. La tarea empleaba dos palancas donde exponían al sujeto ante dos opciones: recibir de inmediato un monto pequeño de sacarina; o uno mayor luego de un período de demora. Al regular la cantidad del reforzador en función de la respuesta de elección, la tarea permite estimar como el valor subjetivo del reforzador que es retrasado, se devalúa o disminuye a medida que la demora se extiende. Los resultados indicaron un componente hereditario en la impulsividad que precede al alcoholismo porque, al igual que se observan en líneas de ratas seleccionadas por su alto consumo, la línea de ratones HAP respecto de sus pares LAP se mostraron más impulsivos (es decir, preferían el monto menor aunque inmediato de sacarina). Se debe destacar que las HAP y LAP son descendientes de ratas con alta o baja preferencia, pero no son ellas mismas expuestas al alcohol.

En conjunto, esta evidencia parece indicar que la impulsividad sería un endofenotipo, o mediador comportamental entre riesgo genético y expresión de desórdenes (Gottesman y Gould,

2003). ¿Cuáles serían los mecanismos que subyacen a este comportamiento y cuál podría ser el origen de este endofenotipo como promotor de adicción? En algunos trabajos se han asociado el sistema corticoestriatal monoaminérgicos a los sustratos psicofarmacológicos de la impulsividad, en donde la dopamina incrementa la acción impulsiva aunque disminuye la aversión a la demora. Se observan alteraciones en diferentes regiones de la CPF (Wilbertz et al., 2012) y el circuito corticoestriatal (Carmona et al., 2009) en sujetos impulsivos. Sin embargo, también hay evidencia de la acción de mecanismos canabinoides, opiáceos, glutamatérgico en el comportamiento impulsivo (véase revisión; Pattij y Vanderschuren, 2008).

Otro factor de riesgo asociado a una amplia gama de comportamientos relacionados al consumo de alcohol (Whiteside y Lynam, 2001) ha sido la *búsqueda de sensaciones o novedad*. Esta es una tendencia a preferir comportamientos arriesgados, descrita inicialmente por Zuckerman (ver revisión en Zuckerman, 1986), que se magnifica primordialmente durante la adolescencia. En algunos trabajos se ha encontrado que la búsqueda de sensaciones se asocia particularmente con la frecuencia de consumo de alcohol (Fischer y Smith, 2008; Grau y Ortet, 1999), mientras que otros han observado que también es un factor importante para explicar el consumo excesivo (Carlson et al., 2010), los problemas (Finn et al., 2000; Read et al., 2003) y desórdenes asociados con la droga (Lejuez et al., 2010; Sher et al., 2000).

En animales esta característica se ha intentado modelar a partir del registro de los niveles de actividad espontánea en un ambiente inescapable (Dellu et al., 1996) o bien registrando la preferencia del animal por situaciones u objetos nuevos en contraposición a otros familiares (Bardo et al., 1996).

Las especies difieren ampliamente en su respuesta a la novedad y esta diferencia puede ser un predictor de diferencias individuales en la sensibilidad hacia el abuso de drogas. Uno de los primeros trabajos en corroborar este supuesto fue el de Piazza et al. (1989), en el cual mostraron como las diferencias individuales en respuesta al ambiente nuevo podían predecir diferencias individuales en la reactividad hacia la Anfetamina. En dicho estudio los individuos eran expuestos a un ambiente/contexto no familiar por dos horas. En función de los niveles de actividad en dicho recinto; y mediante un procedimiento de división por la mediana cada animal era categorizado como alto o bajo respondedor; y posteriormente era evaluado en su reactividad hacia la Anfetamina. Observaron que la inyección aguda de Anfetamina inducía mayor efecto estimulante motor en los animales categorizados como alto respondedores respecto a los bajos respondedores. Asimismo, los altos respondedores resultaron más sensibles a las propiedades reforzantes de las drogas de abuso. Cuando

se les proveía acceso voluntario intravenoso de anfetamina, rápidamente adquirirían la respuesta hacia la droga, mientras que los pares bajos respondedores a la novedad, no (Piazza et al., 1989).

Las diferencias individuales en la actividad en el contexto nuevo resultaron alteradas también por la secreción de corticosterona. Piazza et al. (1991) midieron los niveles de corticosterona (CORT) en animales que habían sido expuestos a un contexto nuevo. Las concentraciones séricas de CORT eran medidas antes, a la media y dos horas posteriores de haber sido expuestos al ambiente. El curso de secreción de CORT fue diferente entre los altos y bajos respondedores a la novedad. Mientras que las concentraciones de CORT habían caído al nivel inicial (50 ng/ml) después de las dos horas en los bajos respondedores, los niveles de CORT en los altos respondedores se mantienen elevados (150-200 ng/ml).

Otros estudios han confirmado la relación entre la reactividad motora a la novedad y la autoadministración de drogas además de la anfetamina (Klebaur et al., 2001; Piazza et al., 1989), incluyendo la cocaína (Bush y Vaccarino, 2007; Piazza et al., 2000), la nicotina (Redolat et al., 2009). En el caso del etanol la relación ha sido menos clara. Algunos laboratorios ha reportado falta de asociación (Bienkowski et al., 2001; Bisaga y Kostowski, 1993; Koros et al., 1999a; 1999b; Nielsen et al., 1999; Samson y Chappelle, 1995), asociación negativa (Gingras y Cools, 1995) y relación positiva (Nadal et al., 2002; Nowak et al., 2000). Posiblemente la disparidad entre los resultados se deba esencialmente a la diversidad de procedimientos que fueron empleados en dichos estudios.

A su vez se han detectado poblaciones que presentan *diferencias genéticas* (variaciones génicas o polimorfismos) en las enzimas involucradas en la metabolización de alcohol y que podrían actuar como una condición protectora para la progresión de consumo de la droga. El alcohol es metabolizado en el organismo fundamentalmente por oxidación en el hígado mediante la acción de algunas enzimas, entre ellas alcohol deshidrogenasa (ADH), que transforma el alcohol en acetaldehído (primer metabolito del mismo). En tanto que este metabolito es metabolizado a acetato y agua principalmente por la enzima aldehído deshidrogenasa hepática (ALDH). Aproximadamente un 50% de los asiáticos presentan insuficiencia en una de las isoenzimas mitocondriales de la ALDH (ALDH2) como consecuencia de una mutación puntual en el gen ALDH2 que hace que la enzima quede virtualmente inactiva (Hsu et al., 1988; Yoshida et al., 1984), y que los niveles de acetaldehído suban significativamente e induciendo reacciones fisiológicas adversas (enrojecimiento facial, taquicardia, hipotensión, náuseas, etc.) posterior al consumo del alcohol. De hecho, la prevalencia de problemas de consumo de alcohol en estos individuos es muy baja (Wall et al., 1994).

Otra forma de determinar individuos a riesgo de desarrollar problemas con el consumo de alcohol se deriva de analizar, ya no características que preceden a la experiencia con la droga, sino la reactividad a la misma; es decir, el nivel de *respuesta a uno o más efectos del alcohol*. En humanos Conrod et al. (2001) y más tarde King et al. (2002; 2011) indicaron que la sensibilidad a los efectos activadores estimulantes iniciales del alcohol se correlacionaba positivamente con la percepción de los efectos positivos (e.g., euforia) inducidos por la droga; y que esta sensibilidad estaba exacerbada en individuos a riesgo –consumidores pesados o con historia positiva de alcoholismo en el grupo familiar- particularmente durante la fase ascendente de la curva intoxicación de alcohol en sangre. Asimismo este grupo de individuos a riesgo mostró mayor tolerancia a los efectos sedativos de la droga y una menor respuesta de cortisol posterior a la intoxicación con el alcohol, respecto de sus pares consumidores livianos (King et al., 2002; 2011). En relación a la sensibilidad a la recompensa recientes trabajos sugieren que estaría particularmente involucrada en el mantenimiento de la adicción, en tanto que los factores de personalidad serían más relevantes para el inicio del consumo de alcohol y drogas durante la adolescencia (Nees et al., 2012). Aquellos individuos que perciben más los efectos estimulantes del alcohol durante la fase ascendente de la curva de intoxicación también parecen consumir más alcohol (Holdstock et al., 2000) al mismo tiempo que tienden a mostrar un perfil específico de personalidad caracterizado por una alta extroversión, búsqueda de novedad y sensaciones, y desinhibición (Assaad, 2002).

La teoría psicoestimulante motora de la adicción (Wise y Bozarth, 1987) indica que una mayor sensibilidad a las propiedades estimulantes motoras del alcohol, considerado como un proxy o indicador indirecto del efecto apetitivo de la droga, supone una condición de riesgo para el abuso de la droga. En los humanos la medición de la tasa cardíaca basal, particularmente, durante la fase ascendente de la curva de intoxicación de alcohol se utiliza como un índice de la activación del sistema reforzador. Como describiéramos, esta característica autonómica discrimina individuos genéticamente a riesgo de desarrollar dependencia (Conrod et al., 1998). Una posible vía de relación entre estimulación motora y reforzamiento es que la estimulación inducida por la droga active el sistema motivacional que responde a las señales de las claves apetitivas y reforzantes, incrementando las respuestas de acercamiento y potenciando la disponibilidad de neurotransmisores asociados con la recompensa (Brunelle et al., 2004). Más específicamente y en relación al etanol, el fundamento neurobiológico es que el etanol activa el haz medial del cerebro anterior, induciendo liberación de dopamina por una vía directa en el circuito mesocorticolímbico -en ATV y NACC- (Bunney et al., 2000; Imperato y Di Chiara, 1986; Morzorati et al., 2010), y también por una vía indirecta, activando receptores opioides μ e inhibiendo el control que las interneuronas GABAérgicas ejercen sobre ATV, permitiendo así la excitación de neuronas dopaminérgicas (Xiao et al., 2007). La

liberación de dopamina induciría actividad motora dirigida (usualmente llamada “psicomotora”) y paralelamente estaría asociada a la percepción de efectos reforzantes y/o a la atribución de incentivo motivacional a estímulos ambientales.

Otra estrategia empleada para discriminar sujetos y que comparte algunos aspectos de lo anterior se deriva del análisis de la *naturaleza hedónica* (positiva o negativa) de la experiencia con la droga (Schramm-Sapyta et al., 2006). Esto implica, por ejemplo, que si un individuo percibe inicialmente los efectos del alcohol como aversivos o desagradables probablemente disminuya la búsqueda y el posterior consumo de alcohol. Por el contrario, un individuo que encuentre placentera o apetitiva la droga será más propenso a su búsqueda y a incurrir en el consumo prolongado de la misma (Pilatti et al., 2013; Schramm-Sapyta et al., 2006). De hecho, Haertzen y colaboradores en 1983 encontraban en los hombres poli-consumidores que el nivel de agrado o apetencia de la droga en la primera ocasión resultaba el factor de mayor importancia asociado al hábito de consumo posterior. Los hallazgos y avances en función de la naturaleza hedónica de la experiencia con la droga serán abordados en detalle en el apartado siguiente en donde se describe la reactividad específica del adolescente hacia el alcohol.

Otro factor importante son las *expectativas asociadas al consumo* de la droga. Las expectativas asociadas a los efectos relacionados al alcohol pueden entenderse como creencias sobre los efectos del alcohol en el comportamiento, la cognición, los estados de ánimo, y las emociones (Leigh, 1989). La expectativa positiva se asocia frecuentemente más al consumo de alcohol que la expectativa negativa. En este sentido, Goldman et al. (1991), Stacy et al. (1990), Urbán et al. (2008) entre otros aportan evidencia a favor del supuesto la expectativa positiva ejerce mayor influencia en el consumo de alcohol que la expectativa negativa. Asimismo la expectativa se ha considerado un factor mediador importante entre la búsqueda de sensaciones y el uso de alcohol (Kuntsche et al., 2005), alterando no sólo el comportamiento sino también la percepción real de las experiencias posteriores con alcohol, que luego, a su vez, pueden fortalecer las expectativas originales (Oei y Morawska, 2004). A pesar de la importancia que resguarda el estudio de las mismas, no resulta tan sencillo sistematizarse en modelos animales.

En su conjunto la serie de antecedentes presentan como elementos en común la estrategia de indagar factores que, de manera previa a la iniciación a la droga, podrían modular la futura respuesta a la misma y el establecimiento de trayectorias de consumo (Crabbe et al., 2010; Duranceaux et al., 2006). Por ello, resulta importante conocer y comprender los factores que favorecen la vulnerabilidad hacia el consumo problemática de alcohol en los adolescentes y aquellos que subyacen a los efectos

facilitadores de la iniciación al consumo (Schramm-Sapyta et al., 2008). Esta perspectiva ofrece un marco con el cual examinar por qué ciertos individuos progresan rápidamente del uso controlado de alcohol al abuso y dependencia, mientras que otros continúan con un consumo controlado a pesar de la exposición repetida de la droga.

El adolescente muestra un patrón específico de respuesta hacia el alcohol

Los estudios en animales muestran que los adolescentes serían menos sensibles que sus pares adultos a una amplia variedad de efectos agudos del etanol como la sedación, la coordinación motora, hipotermia, narcosis (Spear y Varlinskaya, 2005; White et al., 2002), que en condiciones normales deberían servir para evitar el incremento en el consumo. Por ejemplo, Little et al. (1996) encontraron diferencias en la sensibilidad hacia los efectos sedativos del alcohol en ratas infantiles (DP20), adolescentes (DP30) y adultos (DP60) posterior a recibir una administración aguda de etanol (4,0 o 5,0 g/kg). Observaron que los más jóvenes (DP20 y 30) recuperaban antes el reflejo de enderezamiento (indicador de sedación) que las ratas de 60 días. Asimismo, en las ratas de 30 días de edad, las concentraciones séricas de etanol eran significativamente mayores al momento de la recuperación del reflejo de enderezamiento que los congéneres más grandes (DP60). Estos últimos demoraban más en alcanzar el pico de concentración sérica de etanol respecto de los más jóvenes (DP20 o DP30). De modo similar, Silveri y Spear (1998) observaron un marcado incremento en la sensibilidad a la hipnosis inducida por etanol en el transcurso de la ontogenia; en donde los más jóvenes exhibían tiempos más cortos de sueño y mayores niveles de alcohol en cerebro y sangre (NEC y NES, respectivamente) en la vigilia. El cambio observado en función de la edad se ha sugerido estaría, en parte, asociado a una disminución en la tolerancia aguda.

A su vez, los adolescentes serían más sensibles en relación a sus pares adultos al deterioro en la memoria espacial inducido por el alcohol (Markwiese et al., 1998; White et al., 2000), a la facilitación social en ambientes familiares cuando reciben administraciones de dosis bajas (0,25, 0,5, 0,75 g/kg); y serían menos sensibles a la inhibición social (Varlinskaya y Spear, 2002; 2004; 2006) y al deterioro motor inducido por el alcohol particularmente cuando se emplearan dosis moderadas-altas [2,0-3,0 g/kg] (White et al., 2002; 2005). Dadas estas diferencias, no es sorprendente que recientemente se haya encontrado que los ratones adolescentes, pero no los adultos, consumen más alcohol cuando son evaluados en presencia de un conspecífico que cuando la prueba de consumo de alcohol se da individualmente (Logue et al., 2014).

Entre los variados efectos del etanol, las consecuencias motivacionales -esto es, efectos apetitivos, aversivos y ansiolíticos- son factores de máxima importancia en la regulación de los

procesos de búsqueda e ingesta de este psicotrópico (Cunningham et al., 2000). Cuando el etanol ejerce efectos apetitivos, las conductas de búsqueda y contacto de la sustancia, o con estímulos apareados a la misma, aumentan significativamente; en tanto que conductas de evitación son evidentes cuando la droga induce efectos aversivos. Los efectos del etanol tienen la capacidad de actuar como un estímulo incondicionado (EI) aversivo, disminuyendo la preferencia por estímulos que fueran asociados con la administración de la droga.

Para evaluar los procesos de aprendizaje asociativos de naturaleza aversiva inducidos por el etanol se conoce, entre las metodologías más comúnmente empleadas, la aversión adquirida al sabor (AAS). En líneas generales, los sujetos consumen una solución gustativa saliente (i.e., sacarina; estímulo condicionado, EC) mientras experimentan los efectos del etanol (EI). Usualmente, este tratamiento resulta en un rechazo al sabor que previamente fue apareado a los efectos de la droga, el cual es interpretado como una respuesta condicionada aversiva (Pautassi et al., 2002). Para evaluar procesos de aprendizaje asociativos de naturaleza apetitiva, por otra, usualmente se emplea un condicionamiento de preferencia al lugar o a una textura (CPL; respectivamente). En este procedimiento un animal es entrenado repetidamente en un recinto (contexto) donde se le presentan estímulos o claves –EC- de tipo táctil, auditivo, olfativo o visual, mientras está experimenta o está bajo los efectos tóxicos de una droga –EI- mientras que en otro recinto recibe vehículo. Posterior al condicionamiento, cuando no se encuentra bajo los efectos tóxicos de la droga tiene acceso a ambos contextos. Se registra el tiempo que permanece en cada recinto. Este tiempo de permanencia sobre el contexto al que fueron apareados los efectos de la droga es considerado un indicador de preferencia. En contraste se considera que la droga tiene propiedades aversivas cuando el animal evita este contexto (Bardo y Bevins, 2000)

Los trabajos que han indagado los efectos motivacionales del etanol durante la adolescencia de la rata sugieren que los adolescentes expresan una sensibilidad particular hacia los efectos motivacionales del etanol. Se ha observado, por ejemplo, que las ratas adolescentes serían más resistentes que las adultas en adquirir aversiones al sabor mediadas por otras drogas de abuso, como cocaína, anfetamina, nicotina y etanol (Anderson et al., 2010; Laviola et al., 1999; Schramm-Sapyta, 2006; 2010; 2014; Shram et al., 2006; Vetter-O'Hagen et al., 2009). Las ratas adolescentes necesitan dosis significativamente más elevadas de etanol que las que requeridas en las ratas adultas para establecer un AAS (Anderson et al., 2010; Vetter-O'Hagen et al., 2009).

Ha sido, sin embargo, menos estudiado si los adolescentes perciben los efectos placenteros, apetitivos del alcohol de modo similar a los adultos. Aparentemente, la sensibilidad hacia estos

efectos estaría incrementada en las ratas adolescentes. Philpot et al. (2003) por medio de un procedimiento de condicionamiento de preferencia al lugar indagaron la capacidad apetitiva del alcohol (0,2, 0,5, 1,0, o 2,0 g/kg) en ratas adolescentes y adultas (DPs 25-35-45-60). Los autores indicaron que la droga inducía preferencia al lugar en ratas de 45 días, aunque no en ratas de 35 días, a las dosis de 0,5 o 1,0 g/kg. Incluso la última dosis indujo aversión al contexto asociado a los efectos de la droga. En las ratas adultas (DP60) ninguna de las dosis alteró la preferencia de los animales. La aversión provocada por el etanol es similar a lo que se observa en los trabajos en ratas adultas heterogéneas (Cunningham y Henderson, 2000; Gauvin et al., 1994; Stewart y Grupp, 1986; 1989). Cabe mencionar que si bien Philpot et al. (2003) observaron aversión al DP35 otro estudio encuentra lo contrario. A saber, Pautassi et al. (2008b) observan preferencia condicionada por una textura asociada a los efectos del etanol (0,5 o 2,0 g/kg) en ratas adolescentes (DP32), pero no en ratas adultas (DP70). Posiblemente, la diferencia entre ambos trabajos se explique por los procedimientos utilizados. Mientras que en Philpot et al. (2003) emplearon un paradigma clásico de condicionamiento de preferencia al lugar, Pautassi et al. (2008b) utilizaron un condicionamiento de segundo orden (CSO), el cual en otros trabajos ha resultado altamente sensible para detectar los efectos motivacionales apetitivos del etanol en ratas no destetadas (Molina et al., 2006; 2007). El CSO fue inicialmente adaptado por Molina et al. (2006; 2007) para evaluar los efectos hedónicos del etanol en ratas infantiles (DPs 14-15). En este paradigma un estímulo gustativo (pulsos intra-bucal de agua, EC1) es asociado a los efectos del etanol (0,5 o 2,0 g/kg, EI). Posteriormente, los animales son expuestos brevemente al EC1 mientras permanecen sobre una superficie de papel de lija (EC2). En estos trabajos se observó preferencia condicionada por la lija en los adolescentes. En otro trabajo Fernández-Vidal et al. (2003) los autores entrenaron ratas adolescentes para discriminar el estado tóxico inducido por el etanol. Las ratas tenían acceso a sacarosa después de una intubación de etanol (0,5 g/kg) o su vehículo. Inesperadamente, la búsqueda y el consumo de sacarosa aumentaron en aquellos animales donde la sacarosa había sido señalizada por el etanol. En conjunto, estos antecedentes indican que bajo ciertas circunstancias el alcohol tiene la capacidad de inducir preferencia a dosis bajas o moderadas, la que a su vez, se ve alterada en función período de la ontogenia donde se lo evalúe; sugiriendo particularmente que las propiedades reforzantes de la droga adquieren mayor relevancia para el organismo temprano en la ontogenia.

Numerosos estudios han sugerido también que la sensibilidad hacia los efectos apetitivos de etanol sería diferente entre ratas y ratones. Por ejemplo, las ratas adultas generalmente desarrollan rechazo o evitación por el contexto o textura condicionada a la droga, particularmente a dosis $\geq 2,0$ g/kg (Cunningham et al., 1993). No obstante, si el etanol es administrado cuando los animales experimentan descargas eléctricas o junto a otros fármacos (Matsuzawa et al., 1998; Marglin, 1988;

respectivamente) la preferencia se expresa. También se ha observado CPL inducido por alcohol en ratas clasificadas como ansiosas (Blatt et al., 2009). Este resultado podría obedecer a un efecto ansiolítico de la droga, puesto que en dicho estudio el etanol revirtió la aversión natural que los roedores exhibían por un compartimento blanco. Es conocido que los espacios iluminados suelen ser fuentes de rechazo innato en los roedores-. No obstante, Matsuzawa et al. (1999) observaron que el etanol, pero no drogas ansiolíticas (buspirona y diazepam) inducía CPL en ratas expuestas a estrés de miedo condicionado. Morales et al. (2012) encuentran CPP al etanol en ratas adultas, aunque este condicionamiento no se expresa si los animales han sido familiarizados previamente al contexto. Los autores aducen que la preferencia responde más a una consecuencia ansiolítica del etanol, ya que la ansiedad que se despierta por la novedad del contexto al cual son expuestos y entrenados disminuye por estar bajo los efectos tóxicos de una dosis moderada (1,5 g/kg) de etanol. En favor de hipótesis el mismo grupo de trabajo ha observado previamente que la supresión de la actividad social inducida por la exposición a un ambiente de evaluación no familiar es revertido por la administración de etanol (Valinskaya y Spear, 2002).

Curiosamente, el perfil en ratones es diferente. Los ratones adultos expresan rápidamente preferencia por el lugar, en un amplio rango de dosis -0,5- 4,0 g/kg- (Cunningham et al., 2006). Mientras que los ratones adultos muestran CPP desde dosis $\geq 2,0$ g/kg de etanol, los pares más jóvenes no, a menos que se extiendan los días de entrenamiento y/o se incrementen las dosis empleadas (Dickinson et al., 2009) o bien los animales hayan sido pre-expuestos crónicamente a descargas eléctricas (Song et al., 2007).

El patrón general entre las especies es diferente, inclusive a lo largo de las etapas de la ontogenia. Entre las ratas y ratones adultos se han encontrado aversión y preferencia por el contexto donde el alcohol es señalizado, respectivamente; en tanto que las ratas adolescentes, aunque no los ratones, expresan aparentemente preferencia condicionada. Esto, sin embargo, es meramente una apreciación; puesto que son escasos aun los trabajos que han indagado sobre los mecanismos que subyacen a estas evidencias y/o, por ejemplo, la relación que mantienen con los procesos de iniciación de la ingesta de alcohol.

Otra medida, sin bien menos directa, que ha servido para analizar efectos motivacionales del etanol es la actividad locomotora aguda inducida por la droga, la cual como ya indicáramos puede considerarse como un proxy o indicador de reforzamiento apetitivo mediado por etanol (Meyer et al., 2009; Wise y Bozarth, 1987). Se ha visto que en ratones la droga induce efectos motores estimulantes y depresores (Cunningham et al., 1993), a dosis bajas $\leq 2,0$ g/kg (Faria et al., 2008) y dosis altas $> 2,0$ g/kg (Masur y Boerngen, 1980; Quoilin et al., 2010), respectivamente. Estos efectos parecen estar mediados por los sistemas transmisión opioide, dopaminérgico y glutamatérgico

(Pastor y Aragón, 2006). En este sentido, Camarini et al. (2000) encontraron activación motora aguda por etanol (2,0 g/kg) en ratones, efecto que fue contrarrestado en un sentido de dosis-respuesta tras la administración de un antagonista no selectivo opiáceo como la naloxona.

Los estudios en ratones han indicado, a su vez, existiría una relación inversa entre la sensibilidad motora inducida por etanol y la edad. Quoilin et al. (2010) encontraron que la activación motora inducida por etanol era significativamente mayor durante la adolescencia temprana, que durante la adolescencia tardía, incluso mayor que los ratones adultos. Estos últimos, sin embargo fueron mayormente sensibles a los efectos depresores inducidos por la droga. Por otro lado, en la rata generalmente se ha observado insensibilidad a la estimulación motora inducida por etanol. La administración de etanol en regiones específicas del cerebro se ha mostrado más eficaz para inducir efecto estimulante motor (Arizzi-LaFrance et al., 2006; Pastor y Aragón, 2008). Por ejemplo, el área tegmental ventral posterior (ATVp) es una de las regiones del cerebro implicadas en la activación motora después de la administración aguda intracerebroventricular (ICV) de dosis bajas de etanol (75 o 150 nmol) o de su primer metabolito, el acetaldehído (ACD, 25 o 250 nmol). Asimismo, en Sánchez-Catalán et al. (2009) observaron que dicho efecto se contrarrestaba cuando recibían administraciones de antagonistas opiáceos. Este mismo fenómeno se observó cuando se emplearon ratas criadas selectivamente por un alto consumo y preferencia de etanol - "*alcohol-preferring rats*"(P) o las "*Sardinian alcohol preferring rats –sP-*" (Agabio et al., 2001; Waller et al., 1986). Colombo et al. (1998) mostraron como la ingesta voluntaria de etanol en ratas *sP*, en virtud de un período de acceso al etanol de 15 minutos, era seguido por un incremento en la actividad motora en un campo abierto.

A nivel periférico, el resultado comúnmente encontrado tras la administración de etanol (0,0, 0,25; 0,5; 1,0 o 2,0 g/kg) en ratas heterogéneas es un efecto de depresión motora (Chuck et al., 2006). Son escasos los estudios que analizan las diferencias ontogenéticas asociadas a dicho efecto. Pese a ello, y quizá más importante a los fines de esta tesis, existen una serie de estudios realizados por Arias et al. (2008; 2009b,c) en ratas infantiles heterogéneas Wistar. En estos trabajos se analizó el efecto agudo motor del etanol en ratas no destetadas -8 a 12 días de edad-. Más en detalle, observaron que a dosis moderadas-altas (1,25 y 2,5 g/kg), aunque no a una dosis baja -0,5 g/kg- el etanol indujo estimulación motora, específicamente durante la fase ascendente del proceso de intoxicación (5-10 minutos después de la administración). En tanto que la dosis de 2,5 g/kg indujo sedación más tarde en la curva de intoxicación (30-35 minutos posteriores a la administración). Similar a lo observado por Silveri y Spear (1998), estos animales mostraron indicios de tolerancia aguda recuperándose rápidamente de la sedación inducida por la droga aun cuando los niveles de la droga continuaran altos y estables en el organismo (Arias et al., 2008). Si estos animales eran

tratados con el antagonista GABA baclofeno (0,5-2,5 mg/kg) o recibían, como se observara también en los ratones (Camarini et al., 2000), la administración de naloxona (1,0-2,0 mg/kg) el efecto estimulante motor disminuía significativamente. En los adolescentes, la administración del antagonista opiáceo, no solo suprime la estimulación motora inducida por el etanol sino que además inhibe la preferencia por la textura con la cual se asocian los efectos de la droga mediante un procedimiento de condicionamiento de segundo orden (Pautassi et al., 2012a) brindando apoyo a la participación del sistema opiáceo en estos comportamientos.

Los cambios en el cerebro producto de la maduración durante la adolescencia contribuyen a la expresión de varios comportamientos que son específicos a esta etapa de desarrollo y, en cierto modo, determinan el comportamiento y las respuestas neuroquímicas hacia etanol (Faria et al., 2008). El cerebro de los adolescentes es más sensible que el cerebro adulto a las adaptaciones neuronales inducidas por etanol y otras drogas (Crews et al., 2007). Esto podría implicar mayor vulnerabilidad de los más jóvenes a las consecuencias a largo plazo resultado del consumo crónico (repetido) de alcohol, al mismo tiempo que aumentaría la probabilidad de desarrollar abuso (Spear, 2000).

La exposición repetida o crónica de una droga psicoactiva induce un fenómeno conocido como sensibilización, que en términos generales implica un aumento progresivo y prolongado en el tiempo de una respuesta como resultado de la estimulación repetida. Esta última se ha convertido en un elemento fundamental de las teorías contemporáneas de la adicción a las drogas (Robinson y Berridge, 1993; 2000; 2001). La teoría propuesta por Robinson y Berridge (2008) sugiere que el patrón compulsivo de búsqueda de drogas que se observa en la adicción resulta de la sensibilización de un sistema motivacional que provee importancia (“salience”) a los estímulos asociados a las drogas. Este sistema sería diferente a nivel neural y funcional del sistema que se encarga de evaluar la calidad hedónica de un reforzador, luego que este se ha consumido. Si bien la sensibilización al estímulo no es exactamente una sensibilización motora; esta última es una de las consecuencias conocidas tras la exposición repetida -crónica o intermitente- de la droga. Además de la estimulación motora, la exposición repetida a las drogas de abuso produce adaptaciones neurobiológicas de larga duración en los sistemas de recompensa críticamente involucrados en la motivación, que persisten mucho tiempo, aun después que la exposición a la droga ha sido interrumpida o discontinuada (Nestler, 2000).

Se han observado marcadas diferencias entre adultos y adolescentes en el desarrollo y expresión de sensibilización motora al etanol. Los ratones adolescentes suizos (Carrara-Nascimento et al., 2011; Faria et al., 2008; Quoilin et al., 2012) y DBA/2 (Stevenson et al., 2008) son menos sensibles que sus pares adultos a la sensibilización motora inducida a dosis bajas de etanol (1,5-2,0

g/kg) y requieren dosis mayores de etanol (2,5 o \geq 3,5 g/kg; Stevenson et al., 2008; Quoilin et al., 2012; respectivamente) para desarrollar sensibilización motora. Generalmente, la administración repetida de dosis bajas de etanol (1,8 a 2,2 g/kg) induce sensibilización motora, mientras que dosis más altas parecen inducir tolerancia (Masur y Boerngen, 1980). Curiosamente, en ciertas ocasiones los adolescentes exhiben tolerancia a los efectos de activación de etanol a una dosis 2,0 g/kg, en la medida que dichas administraciones estuvieran asociadas a señales ambientales (Faria et al., 2008). Asimismo, Quoilin et al. (2014) observaron que la exposición previa a la droga antes de generar sensibilización a ella, tiene un efecto facilitador en el desarrollo del fenómeno, y que este efecto se magnifica si la pre-exposición tiene lugar en la adolescencia en vez de en la adultez.

En la rata, en cambio, lejos de generar sensibilización, se observa una drástica caída de la actividad motora a lo largo de las exposiciones por medio de administraciones sistémicas. En contraste, únicamente se encuentra sensibilización motora por medio de infusiones interventriculares (administración central) a dosis bajas de etanol (Correa et al., 2003).

Por otro lado, los ratones más jóvenes en ciertas ocasiones han resultado más sensibles a los efectos agudos motores de etanol que los adultos en dosis moderadas (1,25 - 2,5 g/kg; Quoilin et al., 2012). Todo parece indicar que las ratas no muestran sensibilización a la droga, si algo tolerancia a las administraciones repetidas. En tanto que el efecto agudo de la droga pareciera ejercer efecto depresor en los adultos y efecto estimulante en la rata infante. Poco se conoce sobre el efecto de la droga en la rata adolescente. Más precisamente, la mayor proporción de estudios tradicionalmente han indagado el efecto motor en animales adultos.

Perfil de consumo de etanol del adolescente: factores ambientales y efectos motivacionales de la droga que pueden modificarlo.

Una herramienta que ha resultado útil para el estudio de fenotipos asociados al consumo de alcohol ha sido la crianza bidireccional selectiva (Crabbe et al., 2008). Esta metodología resulta en la expresión de niveles altos y bajos de un fenotipo en particular, como el consumo y/o preferencia de alcohol. Por ejemplo, las “alcohol-preferring (P)” y las “high alcohol-drinking (HAD)” son líneas de ratas criadas selectivamente para preferir una solución de etanol al 10% sobre otra de agua; y consumen 5 o más gramos de alcohol por peso corporal por día (McBride et al., 2014). Se han empleado para investigar consumo continuo (24 h) y consumo excesivo "binge" de alcohol a través de la adolescencia y adultez (Bell et al., 2014). El consumo episódico elevado, o binge drinking (según la literatura anglosajona), ha sido definido en humanos como el consumo de 4/5 unidades de alcohol (en mujeres y varones, respectivamente) en un período de dos horas (Fillmore y Jude, 2011).

Existen también otras líneas de ratas criadas selectivamente por criterios similares respecto del alcohol como las “accepting/alcohol-preferring (AA)”, las “Sardinian alcohol-preferring (sP)”, las “alcohol-preferring University of Chile B (UChB,)” y más recientemente, la “Warsaw High preferring (WHP)”, las “High Addiction Research Foundation (HARF)”; para mayor información véase los trabajos de Bell et al. (2012); Colombo et al. (2006); Sommer et al. (2006); Quintanilla et al. (2006). Estos tipos de animales han permitido modelar el consumo excesivo tipo “binge”. Un protocolo que ha brindado excelentes resultados es uno que se realiza durante el ciclo de oscuridad, combinado con la modalidad de acceso limitado (Tipps et al., 2014). Este protocolo induce niveles de alcohol en sangre (NES) farmacológicamente relevantes (> 80 mg%). Cuando se extiende esta modalidad por unas cinco semanas consecutivas aproximadamente, las ratas llegan a consumir en tres o cuatro horas tanto, sino más, que lo que usualmente consumirían en una prueba de 24 h.

Aproximaciones similares con algunas variantes procedimentales se han llevado a cabo en ratas genéticamente heterogéneas. Simms et al. (2008) indicaron que las ratas Long Evans y Wistar que tienen acceso intermitente (ya no continuo) a una solución de etanol (20% v/v) en un procedimiento de doble vía, consumen niveles de alcohol próximos a los niveles obtenidos en ratas criadas selectivamente por alguno de los criterios mencionados, al igual que similares niveles de alcohol en sangre que aquellas (Bell et al., 2006; Dry y Kostowki, 2000). De hecho, en estas ratas los ciclos de repetición de consumo y abstinencia provocaron niveles altos y robustos de consumo de etanol que se conservan en el tiempo. A diferencia del acceso continuo, el procedimiento de ingesta intermitente consiste en ciclos repetidos de consumo excesivo y abstinencia. El efecto de privación de etanol (ADE, por sus siglas en inglés) se define como el incremento temporal en el consumo de etanol sobre la base del consumo anterior cuando el etanol se reintroduce después de un período de privación del mismo (Sinclair y Senter, 1968).

Otra modalidad que ha servido para facilitar el inicio e incrementar el consumo ha sido el paradigma de sustitución de sacarosa; sin requerir por ello la privación de agua o comida para motivar el consumo (Samson, 1986). Los animales tienen acceso a dos soluciones, una de agua y otra con una concentración de etanol endulzado. Progresivamente puede aumentarse la concentración de etanol o disminuirse lentamente la sacarosa; y a su vez las sesiones de ingestas pueden ser de acceso continuo (24h) o bien limitado (horas) (Files et al., 1994; 1998; Maldonado et al., 2008; Samson, 1986; Samson et al., 1992).

Luego de esta breve introducción a los modelos de ingesta de alcohol podemos enfocarnos en estudios que han analizado el consumo de alcohol en la adolescencia. Los antecedentes indican que

las ratas adolescentes (DPs 20-60) consumen significativamente más alcohol que sus congéneres adultos (Brunell y Spear, 2005; Maldonado et al., 2008; Vetter et al., 2007) evaluados bajo diferentes regímenes y condiciones (Doremus et al., 2005). Los niveles alcanzados de consumo de alcohol en los adolescentes son similares a los vistos en los estudios que utilizan líneas de roedores seleccionados genéticamente como las ratas HAD y P evaluados en paradigmas ingesta de acceso continuo de doble vía (McKinzie et al., 1996). En pruebas de ingesta continua de 24 h de cuatro semanas de duración, las ratas P adolescentes consumen más de la droga que sus pares adultos a lo largo de las semanas (Bell et al., 2006). Las ratas alta consumidoras (HAD) en pruebas de acceso limitado (2 h) de doble vía (solución de etanol y agua) en la adolescencia y en la temprana adultez (DP30 y 60) también muestran un incremento en la preferencia y el consumo absoluto de etanol a lo largo de tiempo (Bell et al., 2004)

La mera interacción social pasiva con un par intoxicado con etanol aumenta el consumo voluntario de alcohol en ratones (Logue et al., 2014) y en ratas adolescentes heterogéneas (Maldonado et al., 2008). Asimismo, mientras que las ratas adolescentes hembras aumentan el consumo de la droga independientemente de la familiaridad del par-intoxicado con el que interactúan; los machos aumentan el consumo cuando el par-intoxicado con el que interactúan es familiar, pero disminuye si éste no es familiar (Maldonado et al., 2008). Brunell et al. (2001) observaron también que las ratas adolescentes consumen casi el doble de gramos por kilogramos de etanol en relación a los animales adultos, y esta diferencia desaparece si son expuestos crónicamente a un estresor (Brunell et al., 2005); aunque el mismo estresor no altera el perfil de ingesta si durante las sesiones de ingesta el animal permanece alojado individualmente (Brunell et al., 2001). Este cambio en las condiciones de alojamiento parece no ejercer un efecto tan sólido, puesto que en condiciones similares se ha encontrado que los adultos pero no los adolescentes disminuyen el consumo de la droga si permanecían individualmente alojados (Doremus et al., 2005).

Además de observar diferencias en el perfil de consumo de alcohol en función de la edad, se observan algunas en función del sexo. Las hembras generalmente exhiben mayor consumo de etanol que los machos adultos (Cailhol y Mormede, 2001; Chester et al., 2006; Le et al., 2001; Piano et al., 2005; Vetter et al., 2009), aunque esto no implique diferencias en los niveles alcanzados de alcohol en sangre (Piano et al., 2005); tanto en pruebas de consumo continuo de 24 horas (Doremus et al., 2005) como de acceso limitado de doble vía (Chester et al., 2006; Le et al., 2001; Vetter-O'Hagen et al., 2009) y/o en procedimientos auto-administración operante (Blanchard et al., 1993; Blanchard y Glick, 1995). Existe un antecedente en adolescentes que plantea la relación inversa de consumo en función del sexo (Vetter-O'Hagen et al., 2009); esto es, los machos adolescentes consumen más gramos absolutos de etanol que las hembras adolescentes en una prueba de doble vía de acceso

limitado; este cambio no se debió a una diferencia en la metabolización del alcohol (Silveri y Spear, 2000; Vetter-O'Hagen et al., 2009). No obstante, hasta el momento no se conocen más evidencias que apoyen la distinción en el perfil de ingesta de los adolescentes en función del sexo.

También se han reportado cambios en el perfil de consumo cuando son afectados por condiciones estresantes (Chester et al., 2004; Volpicelli et al., 1990). Los estudios en animales del efecto del estrés sobre el consumo de etanol son variados, algunos estudios indican supresión (Rockman et al., 1986; Sprague y Maickel, 1994; van Erp et al., 2001) otros incremento (Funk et al., 2004; Le et al., 2005; Roske et al., 1994; Siegmund et al., 2005; Wolffgramm y Heyne, 1991) o ningún cambio (Adams y Oldham, 1996; Fidler y LoLordo, 1996) en el consumo de la droga. No obstante, la evidencia clínica y pre-clínica indica que las situaciones estresantes aumentan el consumo de alcohol (Soderpalm y de Wit, 2002) ya fuera de tipo crónico o agudo (Caldwell y Riccio, 2010; Volpicelli et al., 1990), al igual que el riesgo de una recaída en su empleo (Overstreet et al., 2004). Se ha sugerido, además, que el estrés sería un factor fuertemente asociado al consumo exacerbado del alcohol (Aseltine y Gore, 2000). Se ha observado que el estrés puede sensibilizar los efectos reforzadores del etanol y que puede incrementar la locomoción inducida por la administración de dosis moderadas de etanol (Roberts et al., 1995), estimulación motora que podría servir como marcador comportamental de la sensibilidad a los efectos motivacionales de la droga (Kawakami et al., 2007). Es interesante también mencionar que, en comparación con sujetos adultos, los adolescentes muestran una mayor reactividad hacia el estrés sobre el consumo de sustancias (Dahl y Gunnar, 2009; Fishbein et al., 2006; McCormick y Mathews, 2007; McCormick et al., 2010, Romeo, 2010; Spear y Varlinskaya, 2005). Recientemente, Varlinskaya y Spear (2012) observaron que tanto los adultos como los adolescentes eran sensibles a los efectos un estresor (restricción del movimiento), medido a partir de alteraciones en la conducta social. Dicho efecto se vio revertido por los efectos de alcohol en los jóvenes y no en los pares mayores, sugiriendo que los adolescentes serían más sensibles que los adultos a los efectos ansiolíticos del alcohol. A su vez, en ratas adultas el estresor indujo un mayor consumo de g/kg del etanol (Lynch et al., 1999). Resta conocer aun si dicha sensibilidad al estresor se traduce en un mayor consumo de alcohol en los adolescentes.

Un elemento que resulta determinante para discriminar aquellos individuos que progresarán desde el consumo inicial hacia un consumo problemático de aquellos que exhibirán un consumo controlado aún luego de exposiciones repetidas con la droga, es analizar el equilibrio entre los diferentes efectos motivacionales -apetitivos, aversivos y ansiolíticos- (Cunningham et al., 2000, Pautassi et al., 2009). Tanto el equilibrio hedónico como la posible traducción de éste en procesos de ingesta pueden estudiarse mediante diseños intra-sujeto que evalúen medidas motivacionales y de ingesta de alcohol, la naturaleza hedónica de la primera experiencia con la droga (ej., positiva o

negativa) o bien como dicha sensibilidad es alterada por la exposición a manipulaciones ambientales, como por ejemplo la exposición a situaciones estresantes (Schramm-Sapyta et al., 2006).

Green y Grahame (2008) analizaron si los índices de efectos motivacionales del etanol y de consumo de la droga estaban relacionados entre sí. Encontraron relación positiva entre el consumo voluntario de dos vías y la auto-administración operante oral de etanol. Asimismo reportaron una leve aunque significativa correlación positiva entre el consumo de la droga y el condicionamiento de preferencia por el lugar inducido por el alcohol. Indicaron, a su vez, una correlación negativa entre el condicionamiento de aversión al sabor y el consumo de la droga (i.e., a mayor aversión, menor consumo de alcohol), sugiriendo que la relativa insensibilidad hacia las propiedades aversivas del etanol facilita el consumo posterior.

Sobre la base del mismo supuesto Schramm-Sapyta et al. (2010) trataron de evaluar dicha relación en ratas heterogéneas con el fin de examinar si la variación individual en la sensibilidad los efectos aversivos adquiridos al sabor (AAS) correlacionaba con la variación individual en el consumo voluntario de etanol. A su vez intentaron constatar si aquella relación podría cambiar en función de la edad. Los autores observaron que la aversión adquirida al sabor correlacionaba inversamente con el consumo de alcohol en las ratas adolescentes, aunque no en las adultas. Asimismo, los adolescentes consumieron significativamente más de la solución de etanol luego de un período de abstinencia forzada de la misma. Los adolescentes se mostraron menos sensibles a desarrollar AAS que los adultos. Esta diferencia no pudo atribuirse ni a diferencias en la respuesta de hipotermia o sedación inducida por la droga, incluso ni siquiera a una diferencia en la respuesta farmacocinética entre las edades,

Cabe recordar que los adolescentes parecen menos sensibles no sólo a la aversión adquirida al sabor inducida por la droga sino también a una serie de respuestas incondicionales como la hipnosis (Silveri y Spear, 1998), hipotermia (Silveri y Spear, 2000), deterioro motor (White et al., 2002), pudiendo representar dicha insensibilidad una suerte de factor permisivo para la continuidad en el consumo.

El contexto social además de promover el incremento del valor apetitivo por las drogas en los adolescentes, también parece atenuar las propiedades aversivas de la exposición al etanol. Por ejemplo, la presencia de un par –como contexto social- cuando un animal se encuentra bajo el proceso tóxico de la droga aminora significativamente la sensibilidad hacia los efectos aversivos de etanol, es decir son más resistentes para desarrollar AAS que sus pares adultos (Anderson et al., 2010; Vetter-O'Hagen et al., 2009).

Los adolescentes se muestran sensibles a los efectos positivos de la droga; incluso más sensibles que sus pares adultos (Pautassi et al., 2008b). Un estudio que apoya esta característica es el

de Ristuccia y Spear (2008). Estos autores evaluaron el efecto reforzador del alcohol mediante el registro de la taquicardia inducida por la droga en ratas adolescentes y adultas sujetas a un protocolo de ingesta limitada durante dos horas. La taquicardia inducida por la droga es una respuesta fisiológica que podría considerarse un buen indicador comportamental de la propiedad apetitiva del etanol, ya que se ha visto correlaciona positivamente con la liberación de dopamina en el cuerpo estriado ventral (Boileau et al., 2003) y con algunas medidas subjetivas de los efectos placenteros del etanol en los estudios en humanos (Conrod et al., 1998; Holdstock et al., 2000). En las condiciones del estudio, los autores encontraron que las ratas adolescentes no sólo consumían más de la droga que los adultos, sino que sólo los adolescentes consumían lo suficiente de la solución de etanol como para que éste indujera mayor respuesta cardíaca que la observada en respuesta al vehículo. Esta diferencia no se observó en los adultos. En conjunto los resultados parecen apoyar la idea que los adolescentes serían más propensos que los adultos a consumir voluntariamente una cantidad suficiente de etanol, en principio, para obtener sus propiedades reforzantes. En otras palabras, los trabajos sugieren que las diferencias ontogenéticas en los efectos hedónicos del etanol (i.e., adolescentes más y menos sensibles que los adultos a los efectos apetitivos y aversivos del alcohol, respectivamente) podrían mantener relación con la alta propensión al consumo que exhiben los más jóvenes.

En conjunto, los antecedentes revisados indican que la adolescencia es un período con una sensibilidad motivacional particular hacia propiedades del etanol, además de otras drogas. El aumento de la sensibilidad hacia las propiedades apetitivas de las drogas (Pautassi et al., 2008b) junto a la resistencia a las propiedades aversivas (Schramm-Sapyta et al., 2010; Vetter-O'Hagen et al., 2009), podría aumentar no sólo la probabilidad del consumo continuo dado la percepción placentera inicial, sino también la magnitud de la ingesta posterior producto de la baja sensibilidad a los componentes aversivos de la intoxicación.

Pese a la evidencia que la exposición al alcohol temprana estaría asociada a los problemas con el etanol, como la dependencia, más tarde en los seres humanos (deWit et al., 2000; Grant y Dawson, 1997) han sido pocos los estudios en animales que han examinado el impacto de la exposición -crónica o aguda- al etanol, o la presencia de marcadores comportamentales como la actividad espontánea en un ambiente nuevo (Nadal et al., 2002), o cómo la sensibilidad hacia los efectos motivacionales del etanol durante la adolescencia, repercuten sobre la subsiguiente búsqueda y consumo de alcohol (Green y Grahame, 2008; Schramm-Sapyta et al., 2010).

La adolescencia, según se ha indicado, se encuentra asociada a una vulnerabilidad incrementada al consumo de alcohol, como así también a la adquisición de aprendizaje motivacionales mediados por el etanol. Asimismo ambos factores podrían estar siendo modulados

por características – “endofenotipos” - de los organismos – que preceden a la experiencia con la droga (búsqueda de la novedad, impulsividad, sensibilidad a recompensas o condiciones estresantes). Es conocido que no siempre, ni todos aquellos adolescentes que se inician en el consumo de alcohol progresan hacia el abuso y dependencia (Schramm-Sapyta et al., 2008). Así entonces, resulta importante identificar, entre otras cosas, aquellos marcadores que posibiliten esto y analizar su poder predictivo, de manera de detectar poblaciones susceptibles de desarrollar problemas con el psicotrópico. El conocimiento derivado de este abordaje podría ser de utilidad para diseñar políticas de acción específicamente dirigidas hacia estas poblaciones en riesgo.

Objetivos

En base a lo descrito en la introducción, el presente proyecto buscaba detectar, mediante el empleo de modelos animales, variables que predijeran consumo de alcohol en la adolescencia. La susceptibilidad a adquirir aprendizaje motivacional mediado por los efectos de alcohol, por ejemplo, podría representar uno de estos factores de vulnerabilidad. De hecho, como hemos mencionado previamente, la sensibilidad a los efectos agudos de la droga es un factor de máxima importancia en la regulación de los procesos de búsqueda e ingesta de alcohol (Cunningham et al., 2000, Pautassi et al., 2009). Cuando el alcohol ejerce efectos apetitivos, las conductas de búsqueda y contacto de la sustancia, o con estímulos apareados a la misma, aumentan significativamente; en tanto que las conductas de evitación son evidentes cuando la droga induce efectos aversivos. Analizar el equilibrio entre los diferentes efectos motivacionales -apetitivos, aversivos y ansiolíticos- podría utilizarse como una herramienta para discriminar individuos que progresarían desde un consumo inicial hacia un consumo problemático de aquellos conservarían un consumo controlado a pesar estar expuestos repetidamente a la droga. Más específicamente, el proyecto reconocía como **objetivo general** desarrollar un modelo predictivo de consumo durante la adolescencia, mediante la evaluación de la reactividad hedónica al alcohol; el objetivo o problema al que se apuntaba era discriminar poblaciones de sujetos adolescentes que exhibieran susceptibilidad diferencial al consumo de alcohol y que estuvieran a riesgo de consumo problemático.

Como **objetivos específicos** nos planteamos, siempre en sujetos adolescentes:

a) Estudiar la expresión de aprendizaje motivacional (apetitivo y aversivo) mediado por el etanol, **b)** estudiar la expresión de rasgos o marcadores comportamentales (e.g., actividad locomotora espontánea o inducida por la droga) que pudieran predecir la vulnerabilidad a los efectos incondicionales del etanol en el plano motivacional y **c)** indagar la relación entre aquella sensibilidad motivacional y el consumo de la droga.

Asimismo, con el propósito de brindar una continuación orgánica al objetivo general del proyecto doctoral indagamos numerosas facetas de la estimulación motora inducida por el alcohol en las ratas adolescentes. A saber, si la estimulación motora representaba un fenómeno exclusivo del período adolescente y también si en su expresión estaba involucrada una interacción entre la novedad del ambiente y los efectos farmacológicos de la droga. Este último punto cobra importancia si se considera que en nuestros protocolos los animales no eran previamente familiarizados/habitados al contexto de evaluación. Asimismo hasta ese momento habíamos considerado e interpretado la estimulación motora como una medida, aunque indirecta, de la expresión de las propiedades apetitivas de etanol (Wise y Bozarth, 1987). Una interpretación teórica alternativa podía ser que este

incremento en la locomoción estuviera indicando un efecto ansiolítico del alcohol que facilitara la exploración; o bien una combinación entre ambos efectos, -apetitivos y ansiolíticos-.

Para resolver estos interrogantes en relación a la estimulación motora inducida por el alcohol en ratas adolescentes planteamos los siguientes **objetivos específicos** que fueron respondidos específicamente en la *Sección II*:

- a) Analizar y comparar los efectos estimulantes motores del alcohol en adolescentes y adultos.
- b) Evaluar el rol facilitador de la novedad en la expresión de activación locomotora inducida por etanol en la rata adolescente
- c) Evaluar la hipótesis alternativa que plantea que el incremento en la actividad motora inducida por el alcohol indica o se interpreta como un efecto ansiolítico de la droga, o bien por una combinación entre los efectos ansiolíticos y los efectos reforzantes apetitivos de la droga.

Uno de los objetivos más ambiciosos del proyecto doctoral era identificar marcadores comportamentales para la detección de subpoblaciones a riesgo de exhibir consumo problemático de alcohol. En un comienzo, tomamos como marcador la magnitud de activación motora inducida por la droga. En la *Sección III*, en cambio, indagamos la incidencia o rol que podía ejercer el nivel de respuesta de ansiedad basal de un sujeto –como otro marcador de vulnerabilidad– sobre el patrón de consumo de la droga a lo largo de la adolescencia. Tomamos en consideración los aportes de trabajos que han indagado esta relación apoyándose sobre el supuesto de “reducción de tensión” (Müller et al., 2001; Spanagel et al., 1995). Esta clásica hipótesis (Conger, 1951) postula que el consumo de alcohol mitiga el miedo o ansiedad y que este efecto fortalece, por mecanismos de reforzamiento negativo, la ingesta del alcohol en el futuro. De modo que los individuos que sufren de ansiedad o estrés, en estado de sobriedad, tendrían mayor sensibilidad hacia los efectos ansiolíticos del etanol y por ende mayor vulnerabilidad hacia la droga. Las aproximaciones experimentales en ratas, en un intento de validar esta hipótesis, han resultado contradictorias. Por ello, en la *Sección III* buscamos evaluar más directamente la hipótesis de consumo de etanol por reforzamiento negativo en animales caracterizados en función de niveles basales de ansiedad. Planteamos entonces como **objetivo específico**: analizar la capacidad predictiva del nivel de respuesta de ansiedad basal sobre el consumo de alcohol; e indagar en qué medida dicho perfil podía alterarse por la exposición a un estresor. En otras palabras, el propósito fue aprovechar la variabilidad natural en los niveles de respuesta de ansiedad basal de las ratas adolescentes para discriminar sub-poblaciones de alta y baja

Objetivos

ansiedad, e indagar si estas sub-poblaciones exhiben predisposición diferencial al consumo de alcohol; y si son diferencialmente sensibles a la exposición a un estresor.

SECCIÓN I. *Relación entre medidas de sensibilidad motivacional hacia el etanol en ratas adolescentes y la relación de éstas con el consumo posterior de la droga.*

Experimento 1: evaluamos la capacidad del etanol para inducir activación motora en ratas adolescentes durante la fase temprana (5-11 min) y tardía (30-36 min) de la curva de intoxicación. En el *Experimento 2* ratas adolescentes fueron evaluadas en activación motora inducida por etanol al DP28. Posteriormente, los animales fueron entrenados en un procedimiento de aversión adquirida al sabor (AAS) inducido por el etanol. Seguidamente, fue sujeta a un protocolo de ingesta de 16 días de duración. Los niveles de etanol en sangre (NES) al DP28 fueron analizados en el *Experimento 2a*. Se evaluaron las relaciones entre diferentes medidas motivacionales del etanol; esto fue, entre la actividad motora espontánea e inducida por la droga con el grado de rechazo al EC en un condicionamiento de aversión al sabor (*Experimento 3*); y entre la primera con el grado de preferencia por el EC+ en un condicionamiento de preferencia al lugar inducido por el etanol (*Experimento 4*). El *Experimento 5* replicó el condicionamiento de preferencia al lugar utilizando un control de mayor rigurosidad (no apareado).

Consideraciones Generales

Todos los animales nacieron y fueron criados en el Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC-CONICET-UNC, Córdoba, Cba, Argentina). El día de su nacimiento se consideró el día postnatal 0 (DP0). Las crías permanecieron con sus madres alojadas en cajas de maternidad estándar (45 x 30 x 20 cm) hasta el día del destete (DP21). Posteriormente, los animales eran alojadas 4 por caja con acceso libre a comida balanceada (GEPESA feeds, Córdoba, Argentina) y agua hasta el comienzo de cada experimento según correspondiera.

La colonia de animales se mantuvo en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad (0800) a una temperatura ambiental de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y con humedad mantenida de 45%, aproximadamente.

El manejo y tratamiento de los animales se abordó siguiendo los lineamientos éticos y pautas de cuidado animal establecido por la Guía para Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH, Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, 1996).

Materiales y Procedimientos Específicos

Sujetos

Los Experimentos que componen la sección I emplearon un total de 305 ratas Wistar, derivadas de 71 camadas (*Experimento 1*: 79 animales, 14 camadas; *Experimento 2*: 59 animales; 12 camadas; *Experimento 2a*: 28 animales; 13 camadas; *Experimento 3*: 71 animales; 13 camadas; *Experimento 4*: 48 animales; 7 camadas; *Experimento 5*: 20 animales; 12 camadas).

Durante los DPs 25-27 los animales fueron manipulados (“handled”) dos veces en el día durante 2 minutos. El objetivo era aminorar efectos de la manipulación que, por si mismos o en interacción con la administración de la droga, pudieran inducir estimulación motora. No más de un animal por camada fue asignado a una misma condición experimental con el fin de evitar confusión en las interpretaciones sobre los efectos observados a partir de los tratamientos (Holson y Pearce, 1992).

Preparación de las drogas y procedimientos de administración

Las administraciones de alcohol se realizaron vía intragástrica (i.g.) mediante una cánula de polietileno esterilizada de 12 cm de largo aproximadamente (de 0,58 mm de diámetro interno, PE-50

Clay Adams, Parsippany, New Jersey, USA), adosada a una jeringa descartable de 3 ml mediante una aguja hipodérmica de 0,60 mm x 25 mm – 23Gx1 (BectonDickinson, Rutheford, NJ).

Las dosis de etanol (3,0; 2,5; 1,0 o 0,5 g/kg) resultaron de la administración de un volumen equivalente a 0,015 ml por kilogramos de peso corporal de soluciones de etanol de 25,2%, 21% 8,4% o 4,2% v/v, respectivamente (Porta Hnos., Córdoba, Argentina). Un volumen similar de agua corriente de pico se utilizó como vehículo. Cada animal fue cuidadosamente entubado en 5 segundos aproximadamente y la administración de las soluciones demoraba unos 3 a 4 segundos más.

Condiciones de alojamiento durante los entrenamientos y evaluaciones

Los animales fueron alojados de a pares, con un compañero del mismo sexo y edad según el tiempo que requería cada protocolo experimental. Con ello se buscaba minimizar el impacto provocado por el aislamiento. Únicamente, durante los días experimentales en los cuales se requería registrar medidas individuales los animales permanecieron individualmente alojados. Expresamente, esto sucedió durante el protocolo de condicionamiento de aversión al sabor (DPs 29-34, AAS) – *Experimentos 2 y 3*- y durante la fase de acceso forzada del protocolo de ingesta (DPs 41-44) – *Experimento 2*-.

Análisis de Datos

La *actividad locomotora horizontal y vertical* inducida por el etanol (expresada en segundos) fue analizada separadamente a través de ANOVAs mixtos de tres vías (*Experimentos 2, 3 y 4*) y cuatro vías (*Experimento 1*). Los factor entre-grupos fueron sexo (machos o hembras), dosis de etanol al DP28 (*Experimento 1*: 0,0; 0,5 o 2,5 g/kg; *Experimentos 2 y 4*: 0,0 o 2,5 g/kg; *Experimento 3*: NT, 0,0 o 3,0 g/kg) e tiempo post-administración en el *Experimento 1* (temprano o tardío, 5-11 min o 30-36 min). Los minutos post-administración de la droga (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7) constituyeron el factor de medidas repetidas.

En el *Experimento 2*, los animales tratados con etanol al DP28 fueron divididos en grupos de alta (AR) y baja (BR) respuesta locomotora empleando como criterio de separación la mediana general de actividad locomotora total (acumulada en los 7 min de evaluación) para la población de referencia. La actividad locomotora entre las ratas AR, BR y las tratadas con agua se analizó mediante ANOVA mixto de dos vías (factor entre-grupo: sexo, categorización [AR-BR]; factor intra-grupo: minutos de la evaluación)

En los *Experimentos 2 y 3* la expresión de aversión adquirida al sabor inducida por etanol fue evaluada en función de la experiencia previa con etanol al DP28. En ambos experimentos la ingesta de sacarina (ml/100 g) durante el condicionamiento (DP31) y la evaluación (DP33; *Experimento 2*) o evaluaciones (DP33-34; *Experimento 3*) fue analizada separadamente utilizando ANOVAs 2 x 2 x 2 (tratamiento de etanol DP28: 0,0 o 2,5 g/kg; sexo: macho o hembra; tratamiento de etanol DP31: 0,0 o 2,5 g/kg; en el *Experimento 2*) y ANOVAs de 3 x 2 x 2 (tratamiento de etanol DP28: NT, 0,0 o 3,0g/kg; sexo: macho o hembra; tratamiento de etanol DP31: 0,0 o 2,5 g/kg; en el *Experimento 3*). El hallazgo de un consumo significativamente menor de sacarina en los animales tratados con etanol, en comparación a los tratados con agua, fue considerado como indicador de aversión al sabor mediada por alcohol. Las sesiones de condicionamiento y evaluación difirieron en la duración (30 y 60 min, respectivamente). La razón de ello fue evitar posibles efectos de inhibición latente durante el condicionamiento.

El condicionamiento apetitivo mediado por etanol se evaluó mediante Condicionamiento de Preferencia al Lugar (CPL). Este procedimiento registra la preferencia por una textura asociada a los efectos del etanol, en relación a una textura no asociada a la droga. En el *Experimento 4* el CPL se evaluó en función de la experiencia previa con el etanol al DP28. Específicamente, se empleó un ANOVA mixto de 4 vías que consideró como factores entre-grupos a sexo (macho o hembra), dosis de etanol al DP28 (0,0 o 2,5 g/kg) y dosis de etanol durante sesiones de condicionamiento (0,0 o 1,0 g/kg.). El *Experimento 5* empleó un ANOVA mixto de dos vías en donde se tomó como factor entre-grupo la condición temporal en que se realizaron los apareamientos entre alcohol y el estímulo táctil (apareado y no apareado). En ambos experimentos se consideró el tiempo pasado sobre cada textura (papel de lija vs. goma EVA) como factor intra-sujeto.

Se utilizó un ANOVA mixto de tres vías para examinar los registros de consumo de agua (ml/100 g) durante los días en que los animales tenían acceso a agua y a soluciones variadas de etanol (concentraciones: 3, 4, 5 y 6% de las Fases 1 y 4 del protocolo de ingesta) [véase en detalle *Experimento 2*]. Como factores entre-grupos se consideraron sexo (macho o hembra), tratamiento al DP28 (0,0 o 2,5 g/kg) y tratamiento al DP31 (0,0 o 2,5 g/kg); y como medidas repetidas se consideraron los días de evaluación (sesiones 1, 2, 3, 4); y Fases (1 y 4).

La ingesta de etanol involucró el mismo procedimiento en ambas Fases 1 y 4 (3% v/v de etanol el primer día con un incremento diario de 1% v/v durante 4 días). La ingesta y porcentaje de preferencia de etanol durante ambas fases se hizo a partir de ANOVAs mixtos, donde sexo (macho-hembra), tratamiento de etanol al DP28 (0,0 o 2,5 g/kg) y tratamiento de etanol al DP31 (0,0 o 2,5 g/kg) se consideraron como factores entre-grupos. Las Fases 1 y 4, y los días de evaluación

(sesiones: 1, 2, 3 y 4) se consideraron como medidas repetidas. El total de gramos por kilogramos de etanol consumidos durante cada sesión diaria de la Fase 2 (acceso continuo y forzado a 3 concentraciones de etanol durante 4 días) fue analizado a través de un ANOVA mixto (sexo x tratamiento de etanol al DP28 x tratamiento de etanol al DP31 x sesión). La relación entre la actividad inducida por etanol al DP28 y la AAS o ingesta de etanol se analizó mediante ANOVAs similares a los explicitados anteriormente, con la diferencia que el factor de tratamiento de etanol al DP28 fue reemplazado por un factor entre-grupos con tres niveles de “caracterización o de subpoblaciones” [alta respuesta (AR), baja respuesta (BR) y controles tratados con vehículo]. Las correlaciones de Pearson (dos colas) se utilizaron además para determinar la relación entre la actividad al DP28, consumo de sacarina, y registro de la ingesta de etanol, excepto en aquellos que casos en donde la exploración de la distribución indicara la presencia de valores extremos. Para este caso se empleó un coeficiente de correlación de rangos de Spearman. Los niveles de etanol en sangre -NES- (*Experimento 2a*) se analizó a partir de un ANOVA de dos vías. El sexo y caracterización (AR, BR, controles tratados con agua) se consideraron como factores entre-grupo.

Para conocer la dirección de los efectos principales o interacciones encontradas mediante los ANOVAs se realizaron pruebas de post hoc de Fisher o comparaciones planeadas. Expresamente, se utilizó Fisher siempre que los análisis de efectos principales simples o en la interacciones comprendieran factores “entre”. Se utilizaron comparaciones planeadas ortogonales, en tanto, para conocer la dirección de los efectos principales o interacciones significativas que involucraran medidas repetidas. La razón para esta diferencia es que no existe un post-hoc que sea aceptado y que maneje adecuadamente el error tipo I en interacciones entre factores entre y dentro (Winer et al., 1991). En este contexto, las comparaciones planeadas ofrecen un compromiso adecuado entre potencia y confiabilidad. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados como estadísticamente significativos, excepto en el *Experimento 11* en que se realizaron múltiples correlaciones entre variables comportamentales. En ese experimento se redujo el valor alfa mediante una variante del procedimiento de Bonferroni. Esto es, el valor de alfa nominal (i.e., 0.05) fue dividido por la cantidad de correlaciones realizadas en el set de datos. Las diferencias estadísticamente significativas encontradas en las pruebas post hoc o las comparaciones planeadas fueron indicadas en las figuras por medio signos y/o letras griegas (*, #, &, α , β o δ) y se reportaron los valores de $P (< 0,05; <0,01$ o $<0,001)$ provenientes de los efectos principales o interacciones encontradas mediante los ANOVAs respectivos

Experimento 1: Activación Locomotora Inducida por el Etanol en Ratas Adolescentes

Introducción

Como fuera mencionado previamente en la introducción general, se ha sugerido que tanto la activación motora como los efectos reforzantes positivos de las drogas serían homólogos, puesto que compartirían un mecanismo cerebral común –la vía dopaminérgica mesocorticolímbica- (Wise y Bozarth, 1987). Se considera que estas drogas serían capaces de provocar la liberación de DA por una vía directa entre el ATV y NACC (Bunney et al., 2000; Imperato y Di Chiara, 1986; Morzorati et al., 2010); y paralelamente por una vía indirecta, activando receptores opioides μ e inhibiendo el control que las interneuronas GABAérgicas ejercen sobre ATV, permitiendo así la excitación de neuronas dopaminérgicas (Xiao et al., 2007)

Al respecto, se ha observado que el etanol genera activación motora en las ratas infantiles (Arias et al., 2008) y en los ratones, aunque no en las ratas adultas heterogéneas (Chuck et al., 2006). En infantiles, la dinámica temporal de la activación locomotora inducida por la droga de abuso coincide con la expresión de sus efectos recompensantes (Molina et al., 2007); y ambos fenómenos pueden bloquearse por antagonismo opiáceo (Arias et al., 2009c; Nizhnikov et al., 2009). Se desconocía, sin embargo, la magnitud del efecto activador motor del alcohol durante la adolescencia.

Objetivo Específico

Analizar, en ratas adolescentes, los efectos estimulantes motores de dosis bajas y moderadas de etanol (0,5 o 2,5 g/kg, respectivamente) durante la parte inicial de la curva de intoxicación o en momentos tardíos de la misma.

Diseño Experimental

Se empleó un diseño 3 (tratamiento de etanol al DP28: 0,0, 0,5 o 2,5 g/kg) x 2 (tiempo post-administración: inicial o tardío) x 2 (sexo: machos o hembras). Se emplearon un mínimo de 6 y un máximo de 7 animales por cada una de las 12 condiciones experimentales.

Procedimientos Específicos y Evaluación:

Actividad Locomotora inducida por Etanol al DP28: Las ratas adolescentes eran pesadas en una balanza (Ohaus L2000; Ohaus, Pine Brook, NJ), administradas con etanol (0,0, 0,5 o 2,5g/kg) y evaluadas en sus patrones de locomoción y conductas de escalamiento o verticales en campo abierto

(una caja de madera laminada con melanina negra opaca; 30 x 30 x 30 cm). Más en detalle, luego de la administración los animales regresaban a sus cajas de alojamiento por 5 o 30 minutos hasta el inicio de la evaluación. Se filmó la actividad en los tiempos post-administración 5-11 (temprano) o 30–36 min (tardío). Las dosis de etanol y los tiempos post-administración fueron elegidos en función de estudios previos (Arias et al., 2008). Las variables dependientes registradas fueron actividad locomotora y escalamiento (“*wall climbing*”). Esta última era registrada siempre que el animal se sostenía sobre sus dos patas traseras y posaba sus patas delanteras en las paredes de la caja de evaluación. En tanto que actividad locomotora (s) era registrada siempre que el animal en movimiento avanzaba hacia delante con sus patas delanteras y traseras al mismo tiempo.

La luz de la habitación provenía de dos tubos fluorescentes posicionados en el centro del techo a 250 cm sobre las cajas de evaluación.

Resultados

La actividad motora y la conducta de escalamiento se muestran en la Figura 1 (izquierda y derecha, respectivamente). La administración de una dosis de 2,5 g/kg, pero no 0,5 g/kg de etanol indujo significativamente más locomoción que la inducida por el vehículo (0,0 g/kg), durante la fase temprana del proceso tóxico (5-11 min), pero no durante la fase tardía. El ANOVA para la actividad locomotora indicó efectos principales significativos del tratamiento de etanol al DP28 ($F_{2,67} = 6,61$;; de tiempo post-administración ($F_{1,67} = 5,18$; $p < 0,05$) y los minutos de la evaluación ($F_{6,402} = 79,70$; $p < 0,0001$) y un efecto interactivo significativo entre tratamiento de etanol y ; ($F_{12,402} = 2,32$; $p < 0,01$). Las comparaciones planeadas indicaron que durante el primer y segundo minuto de evaluación la dosis de 2,5 g/kg indujo mayor activación motora que el grupo control (0,0 g/kg) y la dosis de 0,5 g/kg de etanol durante la fase temprana del proceso tóxico (5-11 min)

El ANOVA de la conducta de escalamiento indicó efectos principales significativos de los minutos de la evaluación y de sexo ($F_{6,402} = 11,89$; $F_{1,67} = 5,59$; $p < 0,01$ respectivamente). La conducta de escalamiento fue mayor en las hembras que en los machos ($21,99 \pm 2,88$ y $13,85 \pm 1,74$, respectivamente) y en el transcurso de la evaluación a nivel general se observó una disminución progresiva de esta conducta. Las medias y errores estándar minuto a minuto (5-11) fueron las siguientes: $4,89 \pm 0,38$; $3,54 \pm 0,37$; $2,06 \pm 0,26$; $2,03 \pm 0,31$; $2,19 \pm 0,50$; $1,83 \pm 0,39$; $1,53 \pm 0,54$.

El tratamiento con etanol alteró significativamente la locomoción en tanto que no ejerció efecto alguno sobre la conducta de escalamiento. Esta disociación brinda apoyo al efecto específico de la droga para inducir activación motora sin alterar otros comportamientos.

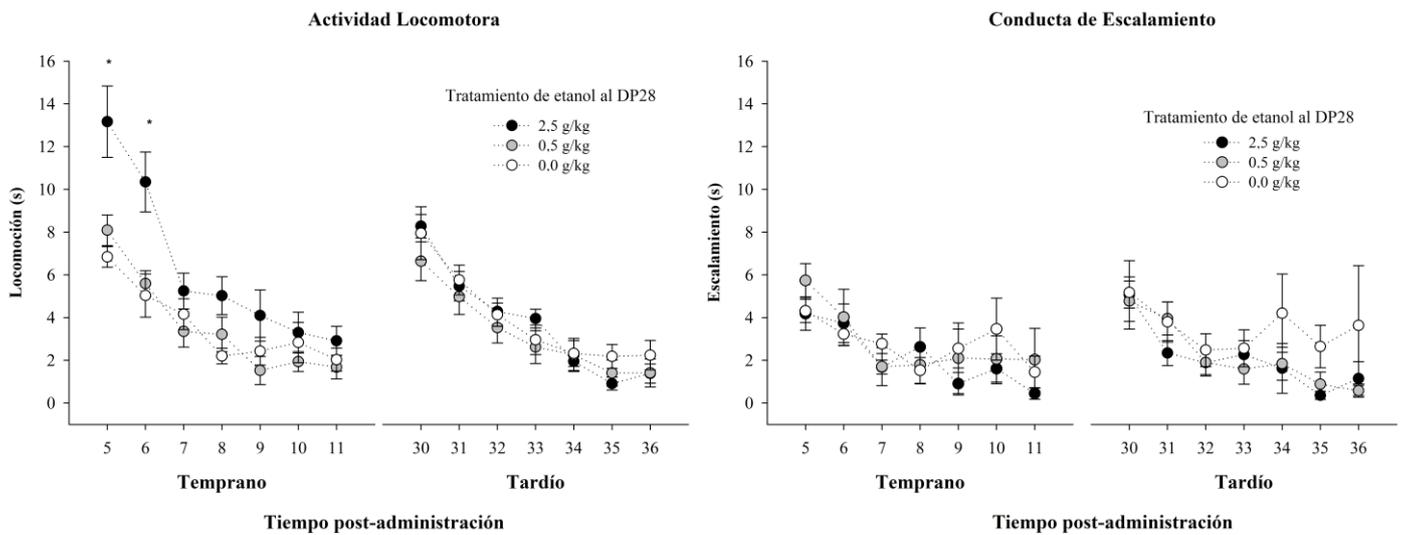


Figura 1. Actividad locomotora y conducta de escalamiento (secciones izquierda y derecha, respectivamente) al DP28 en ratas adolescentes hembras y machos en función del tratamiento con etanol (0,0 [vehículo], 0,5 o 2,5 g/kg) y el tiempo post-administración de evaluación (5–11 o 30–36 min; temprano y tardío, respectivamente). Los datos fueron colapsados por el factor de sexo. Los asteriscos (*) indican una diferencia significativa, en los minutos 5 y 6 de evaluación, entre el grupo de animales tratado con 2,5 g/kg y los grupos con 0,5 g/kg y 0,0g/kg ($p < 0,01$). Las barras verticales indican errores estándar de la media (EEM).

Experimento 2: *Una Dosis Moderada de Etanol Temprana en la Adolescencia (DP28) induce Activación Locomotora e incrementa la Ingesta Posterior mas tarde en la Adolescencia.*

Introducción

Se ha sugerido que el nivel de actividad espontánea en un ambiente nuevo predice la auto-administración de drogas en roedores (Nadal et al., 2002). Asimismo, los animales pueden ser clasificados como altos o bajo respondedores (AR y BR; respectivamente), en función de sus niveles de exploración del ambiente. Este procedimiento se ha empleado ampliamente en los animales adultos (Klebaur y Bardo, 1999; Nadal et al., 2005) y en menor medida en los infantes (Arias et al., 2009b). Estas subpoblaciones pueden diferir en la sensibilidad a los efectos motivacionales aversivos (Arias et al., 2009b) y apetitivos (Nocjar et al., 1999) del etanol y el consumo de etanol (Cools y Gingras, 1998; Nadal et al., 2002).

Como sugerimos previamente, la activación motora inducida por etanol también podría mantener relaciones con los efectos motivacionales apetitivos del alcohol (Pautassi et al., 2009). Estos efectos estimulantes son observados rutinariamente en los ratones (Chuck et al., 2006), aunque no tanto así en las ratas (Cunningham et al., 1993). No obstante, Arias et al. (2008; 2009b) observaron activación motora en las ratas infantes no destetadas luego de una dosis alta (2,5 g/kg) aunque no luego de una dosis baja (0,5 g/kg) de etanol. Aún no se había reportado, más allá de los resultados indicados en *Experimento 1*, evidencia respecto de este efecto en ratas adolescentes, si bien los ratones adolescentes parecen más sensibles que sus pares adultos a estos efectos (Hefner y Holmes, 2007; Quoilin et al., 2010; 2012; 2014; Stevenson et al., 2008)

Quizás más importante, la naturaleza exacta de la relación entre la sensibilidad motivacional a los efectos del etanol, la búsqueda y el consumo de alcohol menos conocida (Green y Grahame, 2008; Schramm-Sapyta et al., 2010).

En función de esto mismo en el *Experimento 2* examinamos la relación entre respuesta motivacional al etanol y el consumo de esta droga en ratas adolescentes genéticamente heterogéneas. Específicamente, los animales fueron examinados en la estimulación inducida por etanol y en la sensibilidad a los efectos aversivos de etanol mediante un procedimiento de aversión condicionada al sabor (AAS). Posteriormente, fueron evaluados en un protocolo de ingesta de 16 días de duración. Esta modalidad responde a un diseño intra-sujeto, en el cual los animales son evaluados en forma secuencial en un conjunto de medidas que reflejen sensibilidad hedónica al etanol y consumo de la droga. El diseño involucra grupos experimentales y controles (tratados con etanol y vehículo;

respectivamente) en cada una de las fases, lo que permite arribar a las pruebas de ingesta de alcohol con animales expuestos una, dos o ninguna vez a la droga. Esto, a su vez, permite evaluar la relación entre exposición (i.e., “inicio”) temprana al alcohol y la facilitación del consumo posterior (deWit et al., 2000)

La hipótesis era que la iniciación en el alcohol durante la adolescencia temprana aumentaría el consumo posterior de etanol, que los adolescentes exhibirían activación motora inducida por etanol (como observáramos previamente en el *Experimento 1*), y que aquellos animales más sensibles a los efectos estimulantes motores mostrarían una mayor proclividad al consumo voluntario de la droga.

Objetivo Específico

Evaluar la asociación entre diferentes mediadas de sensibilidad motivacional hacia el etanol, así como analizar la relación entre estas variables y el consumo de alcohol durante la adolescencia.

Diseño Experimental

Se empleó un diseño factorial 2 (sexo: macho o hembra) x 2 (tratamiento con etanol al DP28: 0,0 o 2,5 g/kg) x 2 (tratamiento con etanol al DP31: 0,0 o 2,5 g/kg). Cada uno de los 8 grupos finales tenía un mínimo de 6 y un máximo de 9 animales. Al DP28 los animales fueron evaluados en su locomoción 5 a 11 min después que recibieran una dosis de etanol o vehículo. La dosis y el tiempo post-administración de evaluación empleadas son aquellos que indujeron activación motora en el *Experimento 1*. El DP31 los animales experimentaron la asociación entre los efectos del etanol (2,5 g/kg) y la ingesta voluntaria de una solución de sacarina (0,1%). Finalmente, los animales fueron evaluados en consumo del etanol en un protocolo de ingesta durante 16 días (véase más adelante en procedimientos específicos).

Procedimientos Específicos de Entrenamiento y Evaluación

Actividad motora inducida por Etanol al DP28. Similar a como se describiera en el *Experimento 1*, las ratas adolescentes eran administradas con etanol (0,0 o 2,5 g/kg), durante el tiempo post-administración 5-11 min, y evaluadas en locomoción y conductas vertical (escalamiento) en un campo abierto.

AAS inducida por Etanol. Se siguió un procedimiento de 5 cinco días de duración, descrito por Anderson et al. (2008) y Varlinskaya y Spear (2008). En el Día 1 (DP29) los animales eran alojados individualmente en cajas (30 x 20 x 22,5 cm) y tenían libre acceso a comida y agua en tubos

de vidrio graduados (25 ml). Veinticuatro horas más tarde (DP30) se reemplazaba el tubo de agua por uno que contuviera el 50% del líquido consumido el día anterior y se les proveía comida ad-libitum. En el Día 3 (DP31, condicionamiento) los animales tenían acceso a una solución de sacarina (0,1% p/v; Parker Davis, Buenos Aires, Argentina) durante 30 min, inmediatamente después recibían una administración de etanol (0,0 o 2,5 g/kg). Durante el resto de ese día tenían nuevamente acceso ad-libitum de agua y comida. En el Día 4 (DP32) se reemplazaba nuevamente el tubo de agua por uno que contuviera el 50% del líquido consumido el día anterior y se les proveía comida ad-libitum. En la evaluación (Día 5, DP33) se retiraba el tubo de vidrio y se reemplazaba por uno que contuviera una solución de sacarina 0.1% durante 60 minutos. Las evaluaciones se realizaron siempre con los sujetos libres de droga (i.e., sobrios). En cada día experimental los animales eran pesados antes de comenzar con las actividades. Asimismo se registró el consumo de la solución de sacarina los DPs 31 y 33, para ello se consideraron los mililitros por 100 gramos de peso corporal (ml/100 g)

Protocolo de Ingesta de Etanol. Todos los animales fueron luego evaluados en ingesta de etanol mediante por 16 días (DPs 35-50). La prueba constaba de cuatro fases. *Fase 1:* involucraba pruebas de dos vías (etanol vs. agua) de 120 minutos. *Fase 2:* implicaba acceso a soluciones de etanol como única opción durante 24 hs, por cuatro días consecutivos. *Fase 3:* se quitaba el acceso al etanol y los animales tenían acceso ad-libitum a agua. En la *Fase 4* se repetía los procedimientos de la Fase 1. El protocolo fue diseñado para registrar la ingesta de etanol bajo diferentes condiciones experimentales, tanto en pruebas de doble acceso con disponibilidad de agua como bajo condiciones de acceso forzado (i.e., sin opción de consumo de otro fluido) y, quizás más importante, luego de un período de privación de acceso al etanol. La Fase 1 y 4 del protocolo se diseñó en base a estudios previos de pruebas de dos vías conducidos en nuestro laboratorio (Pepino et al., 2004; Ponce et al., 2004; 2008), los cuales resultaron útiles para detectar efectos de exposición temprana a los efectos del etanol. A su vez, el protocolo incorporó elementos del modelo de “efecto de privación de alcohol” (conocido como ADE por sus siglas en inglés). El ADE es un modelo de auto-administración de alcohol con fases repetidas de acceso y privación de alcohol. Por ejemplo, en Spanagel y Höltter (1999) el procedimiento involucró 8 semanas de acceso continuo a soluciones variables de etanol (5, 10, 20%; v/v), seguido por un período de privación y re-acceso al psicotrópico. Este procedimiento derivó en un aumento, temporal pero pronunciado, del consumo y preferencia por la droga. A su vez, los animales comenzaron a preferir las concentraciones más altas y a consumir en la fase diurna del ciclo luz-oscuridad, cuando normalmente los animales están mayormente inactivos (Spanagel, 2000). Generalmente, el ADE requiere de períodos extensos de tiempo, de seis a más meses. Sin embargo, Bell et al. (2008) después de emplear una versión

abreviada del modelo observaron ADE en ratas seleccionadas por su alto consumo de alcohol (HAD). En el presente experimento se combinaron ambos elementos, es decir, la prueba de dos vías y una versión reducida de ADE. Una diferencia entre el ADE y nuestro estudio fueron las concentraciones de etanol utilizadas. Cuando en el trabajo de Bell et al. (2008) se utilizaron concentraciones de 10 a 30% v/v aquí, en cambio, los animales tuvieron acceso a un abanico de concentraciones que oscilaron entre 3 y 6% v/v de etanol. El motivo del cambio subyacía en que la cepa de ratas Wistar, en términos generales, consumen menos etanol y prefieren concentraciones de la droga más bajas en relación a otras cepas o a animales genéticamente seleccionados. Para cada fase las variables dependientes bajo análisis fueron la ingesta de etanol (g/kg) y el porcentaje de preferencia [(consumo de etanol/ingesta total de líquidos) x 100].

Más en detenimiento el protocolo implicaba:

Fase 1 DPs 35-38: Prueba de dos vías de 120 minutos (agua vs. concentraciones crecientes de etanol) Los animales tenían acceso diario a dos tubos graduado de 25 ml; uno contenía agua y otro una solución determinada de etanol (3% v/v el primer día con un incremento de 1% v/v diario hasta alcanzar 6%) durante 120 minutos. Cada sesión era precedida por un período de 22 hs de privación de líquido. La presentación de los tubos se contrabalanceaban cada día para evitar preferencias por lugar y previo inicio de cada sesión los animales eran pesados. Una vez finalizada la evaluación los animales regresaban con su par en las cajas de alojamiento hasta el día siguiente.

Fase 2 DPs 39-42: Acceso continuo y forzado a concentraciones múltiples de etanol. Inmediatamente posterior a la prueba en el último día de la Fase 1, los animales eran pesados y alojados individualmente en cajas de alojamiento con acceso continuo (durante las 24 hs) y concurrente a concentraciones múltiples de etanol (3, 4 y 5% v/v) y a comida ad libitum durante los siguientes cuatro días. Todos días los animales eran pesados y se registraba el volumen consumido total de cada tubo. Luego, se agregaba comida y se reemplazaban los tubos por otros llenos. Esta modalidad de presentación de varias concentraciones, en animales adultos, promueve usualmente mayor ingesta de etanol y favorece el incremento de la ingesta de la droga, que se encuentra generalmente luego de un período de privación de la misma (Rodd-Henricks et al., 2002).

Fase 3 DPs 43-46: Privación de Etanol. Los adolescentes se re-alojaban junto a sus pares en cajas de alojamiento estándar con acceso ad-libitum a agua y comida. Durante cuatro días permanecían en esas condiciones. Esta fase se consideró como una fase de privación de

etanol y fue incorporada para evaluar si tal condición facilitaría un consumo mayor de etanol en la fase siguiente.

Fase 4 DPs 47-50: se repitieron los procedimientos empleados para la Fase 1.

Resultados

Peso Corporal. El ANOVA correspondiente indicó que, como se esperaba, los pesos fueron incrementándose con el transcurso de los días; y que los machos tuvieron pesos significativamente mayores a las hembras (efectos principales de sexo y días de evaluación; $F_{1,51} = 77,28$, $F_{12,612} = 813,55$, respectivamente; $p < 0,001$). El tratamiento con etanol al DP28 y DP31 no alteraron los patrones de los resultados. El peso corporal no fue significativamente diferente entre los adolescentes clasificados como AR o BR en términos de la actividad motora inducida por etanol (Tabla 1).

Tabla 1: Peso Corporal de las ratas adolescentes durante *Experimento 2*.

	DP28	DP 30	DP 37	DP 38	DP 39	DP 40	DP 41
Hembras	69,7 ± 0,9	69,3 ± 1,2	84,0 ± 1,4	80,8 ± 1,4	79,3 ± 1,2	78,5 ± 1,2	96,6 ± 2,0
Machos	77,2 ± 1,2	77,4 ± 1,4	93,3 ± 1,4	89,6 ± 1,4	88,2 ± 1,3	87,5 ± 1,3	107,0 ± 1,8
	DP 42	DP 43	DP 44	DP 49	DP 50	DP 51	DP 52
Hembras	98,8 ± 2,0	105,9 ± 2,1	107,3 ± 1,8	112,4 ± 1,8	109,5 ± 1,7	104,7 ± 4,5	108,5 ± 1,9
Machos	111,2 ± 1,8	117,5 ± 1,8	120,7 ± 2,0	132,4 ± 2,7	129,9 ± 2,7	127,3 ± 3,3	128,9 ± 2,7

Peso corporal (g) de las ratas adolescentes machos y hembras durante el *Experimento 2*. Los animales eran evaluados en locomoción inducida por etanol (DP28), entrenados en aversión adquirida al sabor AAS (DP31-33), y sujetos a una prueba de ingesta de 16 días (DP37-52). Los valores están expresados en media ± EEM.

Actividad motora inducida por Etanol al DP28. La locomoción y conducta vertical (escalamiento) se muestran en la Figura 2 “a y b” respectivamente. La administración de etanol indujo significativamente más locomoción que la observada en aquellos animales tratados con vehículo. La conducta vertical mostró una disminución progresiva en el transcurso de la evaluación. El ANOVA para la locomoción indicó efectos principales significativos del tratamiento de etanol y el tiempo post-administración (min) considerados, y un efecto interactivo significativo entre ambos factores ($F_{1,51} = 38,88$, $F_{6,330} = 43,13$, $F_{6,330} = 9,01$, respectivamente; $p < 0,001$). Las comparaciones planeadas indicaron diferencias significativas entre los grupos de animales tratados con etanol y los tratados con agua durante el tiempo post-administración (5, 6, 7 y 8 min). El ANOVA de la conducta vertical sólo indicó un efecto principal significativo de los minutos de la evaluación ($F_{6,330} = 8,54$; $p < 0,001$). En ningún caso la locomoción o la conducta vertical se vieron afectadas en función del

sexo. Como se describiera anteriormente el grupo de animales tratados con etanol fue dividido en dos grupos AR y BR tomando como criterio de separación la mediana general de actividad motora total (acumulada en los 7 minutos de evaluación) para la población de referencia (tratados con etanol). El ANOVA de una vía indicó una diferencia significativa entre los grupos ($F_{2,55} = 77,18, p < 0,0001$) y un efecto interactivo entre grupos y los minutos de evaluación ($F_{12,330} = 5,37, p < 0,0001$). El perfil de la locomoción durante los minutos de la evaluación de los animales tratados con etanol AR y BR vs los tratados con agua se representan en la Figura 2, “c”.

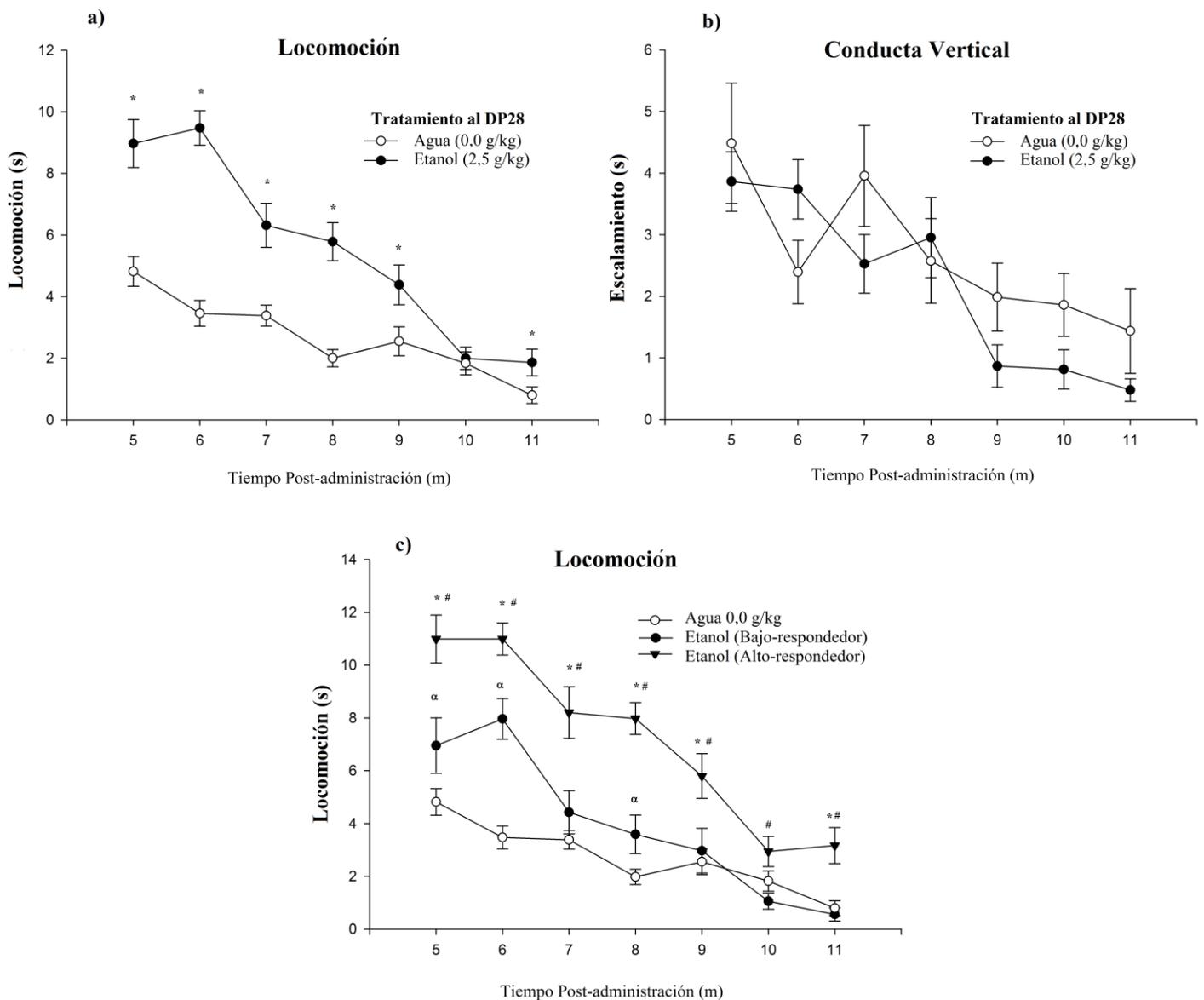


Figura 2. Panel Superior: [(a) locomoción y (b) conducta vertical, secciones izquierda y derecha, respectivamente] en ratas adolescentes hembras y machos en función del tratamiento con etanol al DP28 (0,0 o 2,5 g/kg) durante el tiempo post-administración 5–11 min. Panel Inferior (c): Las ratas tratadas con etanol fueron divididas en altos y bajos respondedores (AR y BR, respectivamente) empleando como criterio de separación la mediana general de actividad locomotora total (acumulada en los 7 minutos de evaluación) para la población de referencia. Los datos fueron colapsados por sexo (macho o hembra). El factor sexo no ejerció efecto significativo principal ni interactivo con las variables restantes. Los asteriscos (*) indican una diferencia estadísticamente significativa en los minutos 5, 6, 7, 8, 9 y 11 de evaluación entre el grupo tratado con 0,0 g/kg y 2,5 g/kg (panel a; $p < 0,001$); y entre el grupo tratado con agua y el grupo alto-respondedor (panel c; $p < 0,001$). La letra alfa (α) indica una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo tratado con agua y el grupo bajo-respondedor en los minutos 5, 6 y 8 de la evaluación ($p < 0,001$). Los numerales (#) indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) entre los grupos tratados con etanol (alto- y los bajo-respondedores [AR y BR]) en todos los minutos de evaluación. Las barras verticales indican el error estándar de la media (EEM).

AAS mediada por el Etanol al DP33. El ANOVA para la ingesta de sacarina durante la sesión de condicionamiento indicó ausencia de diferencias basales en el consumo de la solución en función del sexo o la experiencia previa con etanol al DP28. La ingesta de sacarina fue significativamente menor en los animales que recibieron el apareamiento entre etanol y sacarina; que en los animales tratados con vehículo ($F_{1,51} = 11,29; p < 0,001$). Esto indica que el etanol indujo AAS. El ANOVA no indicó un efecto principal significativo de sexo o del tratamiento con etanol al DP28 ni tampoco estos factores participaron de interacciones significativas. Es decir, la respuesta condicionada no mostró diferencias significativas entre los machos y las hembras, y entre los animales con o sin iniciación con etanol al DP28. Más aun, el ANOVA indicó que los sujetos AR y BR exhibieron patrones similares del consumo de sacarina en el entrenamiento y en la prueba. La Figura 3 representa la ingesta de sacarina en el entrenamiento y en la prueba en función de tratamiento con etanol al DP28 y DP31. Los índices de correlación de Pearson conducidos en la muestra general de animales, así como para cada sub-grupo de AR y BR mostró ausencia de asociación entre la actividad locomotora al DP28 y el consumo de sacarina al DP33.

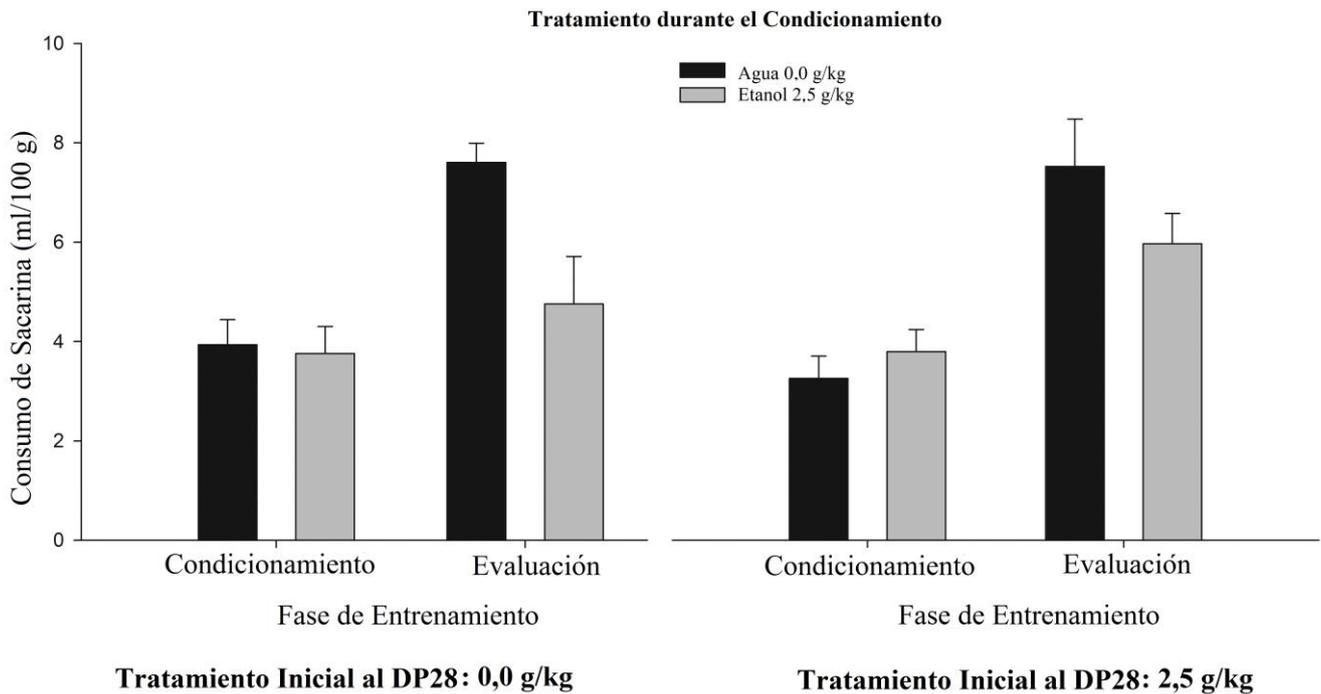


Figura 3. Consumo de Sacarina (ml/100g) durante la sesión de condicionamiento (30 min) y la evaluación (60 min) en ratas adolescentes hembras y machos en función del tratamiento con etanol durante la iniciación al DP28 y durante el condicionamiento (DP31). Al DP28 la ratas eran tratadas con etanol (2,5 g/kg) o vehículo (0,0 g/kg). Durante el condicionamiento, el consumo de sacarina era asociado a una administración de etanol i.g. (2,5 g/kg) o vehículo (0,0 g/kg). El tiempo de la sesión de condicionamiento y la evaluación fue de 30 y 60 minutos, respectivamente. Los datos fueron colapsados por sexo (macho o hembra). El sexo no ejerció efecto significativo ni interactivo con las variables restantes. El consumo de sacarina fue significativamente menor en el grupo tratado con etanol que en el grupo tratado con vehículo durante el AAS independientemente del tratamiento inicial al DP28 ($p < 0,001$). Las barras verticales indican el error estándar de la media (EEM).

Protocolo de Ingesta desde DP35 a DP50.

Consumo de Agua. El consumo de agua durante las Fases 1 y 4 del protocolo no se vio afectado por los tratamientos con etanol. El ANOVA reveló que las hembras consumieron significativamente más agua que los machos, aunque sólo durante la primera fase (un efecto principal significativo sexo y una interacción significativa del sexo y la fase ($F_{1,51} = 4,23$, $F_{1,51} = 4,65$, respectivamente; $p < 0,05$). El consumo general de agua fue mayor en el último día de ingesta (sesión 4) de cada Fase [1 y 4] ($F_{3,153} = 25,75$; $p < 0,001$). Asimismo, el consumo de agua fue mayor en la Fase 4 que en la Fase 1 ($F_{1,51} = 24,57$; $p < 0,001$), y este incremento fue mayor particularmente en las sesiones 2 y 4 (una interacción significativa de fase y día; $F_{3,153} = 6,19$, $p < 0,001$). La Tabla 2 presenta la información sobre la ingesta de agua de los machos y hembras en el transcurso de las sesiones de ingesta de las Fases 1 y 4

Tabla 2. Consumo de agua (ml/100 g) en ratas adolescentes machos y hembras durante las Fases 1 y 4 del protocolo de ingesta (*Experimento 2*).

Consumo de agua (ml/100 g) de las hembras y los machos durante las Fases 1 y 4 del protocolo de ingesta. Cada sesión de ingesta duraba 2h. Los animales tenían acceso a agua de pico y solución de etanol. Los valores se expresan en media \pm EEM.

	FASE 1				FASE 4			
	Sesión 1 (DP37)	Sesión 2 (DP38)	Sesión 3 (DP39)	Sesión 4 (DP40)	Sesión 1 (DP49)	Sesión 2 (DP50)	Sesión 3 (DP51)	Sesión 4 (DP52)
Hembras	5,95 \pm 0,51	7,32 \pm 0,50	7,13 \pm 0,41	8,42 \pm 0,15	5,15 \pm 0,33	5,53 \pm 0,30	6,45 \pm 0,29	6,10 \pm 0,30
Machos	4,85 \pm 0,41	6,32 \pm 0,45	6,54 \pm 0,31	7,52 \pm 0,27	5,18 \pm 0,30	5,75 \pm 0,15	5,70 \pm 0,18	6,16 \pm 0,30

Ingesta de Etanol durante las Fases 1 y 4 (DPs 35-38 y DPs 47-50, respectivamente). La Figura 4 representa la ingesta de etanol (g/kg y porcentaje de preferencia) durante las Fases 1 y 4. Durante la Fase 1, los animales mostraron una disminución progresiva en la ingesta de etanol a lo largo de los días de evaluación. Este efecto no se observó durante la Fase 4, en donde la ingesta de etanol o bien se incrementó (g/kg) o bien se mantuvo estable (porcentaje de preferencia).

El tratamiento con etanol al DP28 (i.e., “iniciación”) pareció afectar la ingesta de etanol. Si bien tanto los animales tratados con etanol como los tratados con agua consumieron el mismo monto de etanol durante la Fase 1, los animales iniciados con etanol al DP28 exhibieron mayor ingesta de etanol durante la Fase 4, específicamente, cuando tuvieron acceso a 6% de etanol. Los ANOVAs indicaron que el tratamiento con etanol al DP31 (durante la AAS) y el sexo no afectaron significativamente la ingesta de etanol. El ANOVA de gramos por kilogramos indicó que las interacciones entre los factores Fase x Día, Fase x Iniciación DP28 y Día x Iniciación DP28 fueron

significativas ($F_{3,153} = 4,40$; $F_{1,51} = 5,03$; $F_{3,153} = 2,85$, respectivamente; $p < 0,05$). El ANOVA para el porcentaje de preferencia reveló que las interacciones entre Fase x Día y Fase x Iniciación al DP28 lograron significancia ($F_{3,153} = 4,32$, $F_{1,51} = 5,48$, respectivamente; $p < 0,05$). Para ambas variables dependientes, las comparaciones de a pares indicaron a su vez que la ingesta de etanol durante la Fase 1 disminuyó significativamente desde el Día 1 (cuando se ofrecía a los animales 3% de etanol) al Día 4 (6% de etanol). Las comparaciones por pares también indicaron el incremento significativo durante la Fase 4. Pruebas Post Hoc confirmaron que la ingesta de etanol aumentó significativamente desde la Fase 1 a la Fase 4 en los animales que fueron iniciados al DP28 con etanol, pero no en los que recibieron vehículo. Además, revelaron que el promedio de consumo de etanol al 6% fue mayor en los animales iniciados que en los tratados con vehículo al DP28.

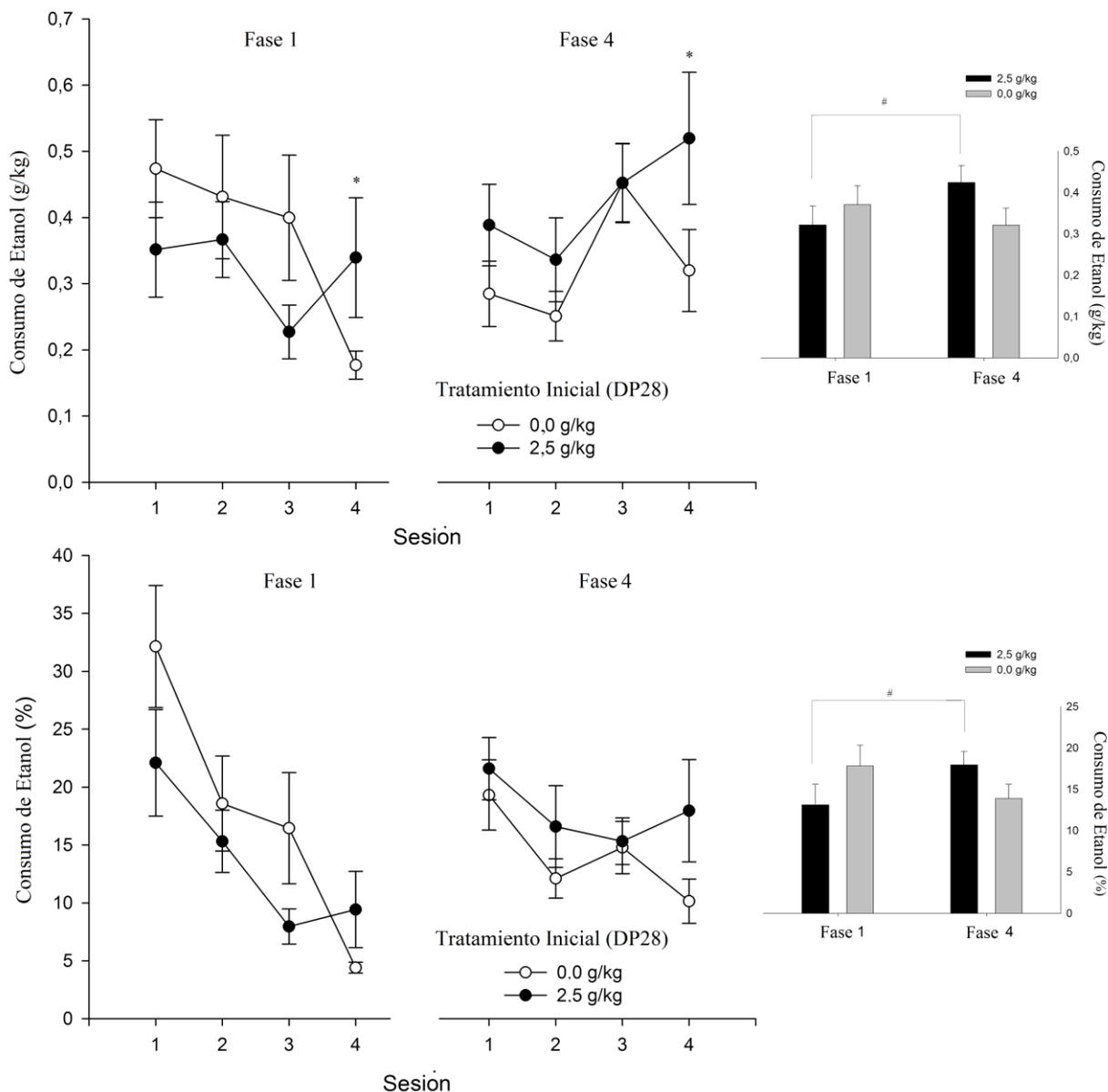


Figura 4. Ingesta de etanol (g/kg y porcentaje de preferencia, paneles izquierdos superior e inferior, respectivamente) en ratas adolescentes hembras y machos durante las Fases 1 y 4 del protocolo de ingesta, en función del tratamiento recibido durante la iniciación al DP28. Cada fase estuvo compuesta por cuatro sesiones diarias de ingesta de 120 minutos. En cada sesión los animales tenían acceso a agua y a una solución determinada de etanol (3% v/v la primera sesión, con un incremento de 1% v/v en cada sesión hasta alcanzar 6%). La iniciación ocurría el DP28 y consistía en una administración i.g. de etanol (2,5 g/kg) o vehículo (0,0 g/kg). Luego, durante los DPs 35-50, los animales eran expuestos a un procedimiento de evaluación de ingesta de alcohol de cuatro fases. El gráfico representa la ingesta de etanol durante la Fase 1 y la Fase 4. La figura de barras a la derecha superior representa el promedio de consumo absoluto de etanol durante ambas fases (1 y 4). La figura de barras a la derecha inferior representa el promedio de preferencia de etanol en ratas adolescentes durante las Fases 1 y 4 del protocolo de ingesta en función de la sensibilidad hacia el tratamiento de etanol en la iniciación al DP28. Los datos fueron colapsados por el factor sexo (macho o hembra) y por el factor tratamiento con etanol al DP31 (2,5 o 0,0 g/kg). Los asteriscos (*) indican que el promedio de consumo de etanol al 6% (sesión 4) fue significativamente mayor en los animales iniciados con 2,5 g/kg que en los tratados con vehículo al DP28 ($p < 0,05$). Los numerales (#) indican un aumento estadísticamente significativo en el consumo y preferencia de etanol de la Fase 1 a la Fase 4, en los animales que fueran iniciados con etanol al DP28 ($p_s < 0,05$). Los efectos significativos restantes se encuentran detallados en el apartado de resultados. Las barras verticales indican el error estándar de la media (EEM).

Ingesta de Etanol durante la Fase 2 (acceso forzado al etanol 24hs, DP39-42). El ANOVA indicó efectos principales significativos de sexo ($F_{1,51} = 3,86, p < 0,05$) y días ($F_{3,153} = 23,52, p < 0,001$), y también una interacción significativa entre días y tratamiento con etanol al DP28 ($F_{3,153} = 3,90, p < 0,05$). El tratamiento con etanol al DP31 (sesión de condicionamiento de AAS) no afectó significativamente los valores registrados de la ingesta. La Figura 5 representa los valores de la ingesta en los machos y hembra adolescentes iniciados o no con etanol al DP28. La iniciación implica el tratamiento con etanol al DP28. De acuerdo con las comparaciones planeadas, la ingesta de etanol durante el último ciclo de 24 hs fue significativamente menor que la ingesta en cualquier otro día. Las comparaciones de a pares indicaron que las hembras consumieron significativamente más etanol que los machos y, quizás aún más importante, el consumo inicial del etanol fue significativamente mayor en los adolescentes iniciados que en los animales que recibieran vehículo. Específicamente, el tratamiento producto de la administración de etanol al DP28 aumentó significativamente el total de gramos por kilogramos de etanol consumidos durante las primeras 24 hs del ciclo de la Fase 2. Aunque este efecto parecía ser mayor en las hembras respecto de los machos, la triple interacción entre sexo x sesiones de ingesta x iniciación al etanol al DP28 no alcanzó significación estadística.

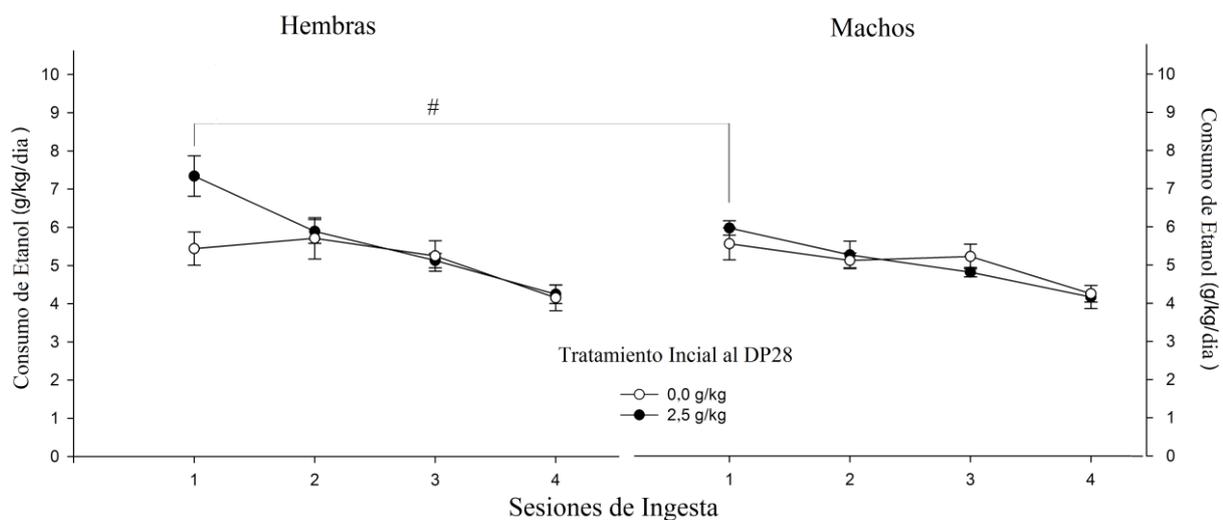


Figura 5. Ingesta de Etanol (g/kg) en ratas adolescentes hembras y machos durante la Fase 2 del protocolo de ingesta en función de las sesiones de ingesta (1, 2, 3 y 4) y el tratamiento con etanol durante la iniciación al DP28 (izquierda y derecha, respectivamente). La iniciación al DP28 consistía en una administración de etanol (2,5 g/kg) o vehículo (0,0 g/kg). Durante los DPs 35-50, los animales eran expuestos a un procedimiento de cuatro fases en la que se registraba la ingesta de etanol. La figura representa la ingesta de etanol durante la Fase 2 donde los animales tenían acceso continuo y simultáneo concentraciones variadas de etanol (3, 4 y 5%) durante 4 días como único fluido disponible durante las 24 hs. Los datos fueron colapsados por el factor de tratamiento con etanol al DP31. El numeral (#) indica una diferencia significativa entre el grupo de animales iniciados y los tratados con vehículo, específicamente en las primeras 24 hs (sesión 1) de la prueba de ingesta ($p < 0,05$). Las barras verticales indican el error estándar de la media (EEM).

Ingesta de Etanol en función de la alta o baja sensibilidad hacia la activación motora inducida por el etanol durante la iniciación al DP28. Los ANOVAs para la ingesta de etanol y porcentaje de preferencia durante la Fase 1 y Fase 4 del protocolo de ingesta indicaron que los AR consumieron más de la solución al 6% de etanol (i.e., g/kg el Día 4 de cada fase) que los BR o que los animales no iniciados ($F_{2,55} = 5,01$; $F_{2,55} = 3,58$; respectivamente; $p < 0,05$). La media de la ingesta de 6% de etanol (g/kg) a través de las Fase 1 y 4 en los AR, BR y en los tratados con vehículo al DP28 (no iniciados) se presentan en la Figura 6a. El ANOVA de gramos por kilogramos consumidos durante la Fase 2 [factores entre-grupos: sexo, tratamiento con etanol al DP31 (AAS), y la asignación a subgrupos AR y BR; factores intra-grupos: ingesta de etanol en los DPs 39-42] arrojó una interacción significativa entre asignación a subgrupos x días ($F_{6,141} = 3,52$, $p < 0,05$), así como una interacción cuádruple entre asignación a subgrupos x días de registro de ingesta y el tratamiento con etanol al DP31 y sexo ($F_{6,141} = 2,98$, $p < 0,01$). Para un mejor análisis e interpretación de la interacción, se realizaron ANOVAs individuales (factores entre-grupos: asignación a subgrupos y tratamiento con etanol al DP31; factores intra-grupos: ingesta de etanol al DPs 39-42) para cada sexo. En los machos, únicamente se observó un efecto principal de sesiones de ingesta ($F_{3,87} = 11,32$, $p < 0,001$). Los machos, iniciados y no iniciados, consumieron gradualmente menos etanol a medida que la fase avanzaba. En las hembras, el ANOVA indicó efectos principales significativos del factor intra-grupo (sesiones de ingesta) y del factor “asignación a subgrupos” ($F_{3,54} = 5,65$, $F_{2,54} = 4,44$, respectivamente; $p < 0,05$). La interacción entre estos dos factores también alcanzó significancia estadística ($F_{6,54} = 2,88$, $p < 0,05$). Las comparaciones por pares subsiguientes indicaron que durante las primeras 24 hs del ciclo de esta fase, las hembras AR consumieron significativamente más etanol que cualquier otro grupo. Estos resultados se presentan en la Figura 6. Los adolescentes BR y los controles tratados con vehículo no mostraron diferencias entre sí. El índice de correlación de Pearson no mostró asociación significativa entre el consumo de sacarina durante la evaluación de AAS y los valores de ingesta de etanol. Estas correlaciones se realizaron tanto para la muestra total de sujetos como para cada grupo definido por la combinación de tratamientos al DP28 y DP31.

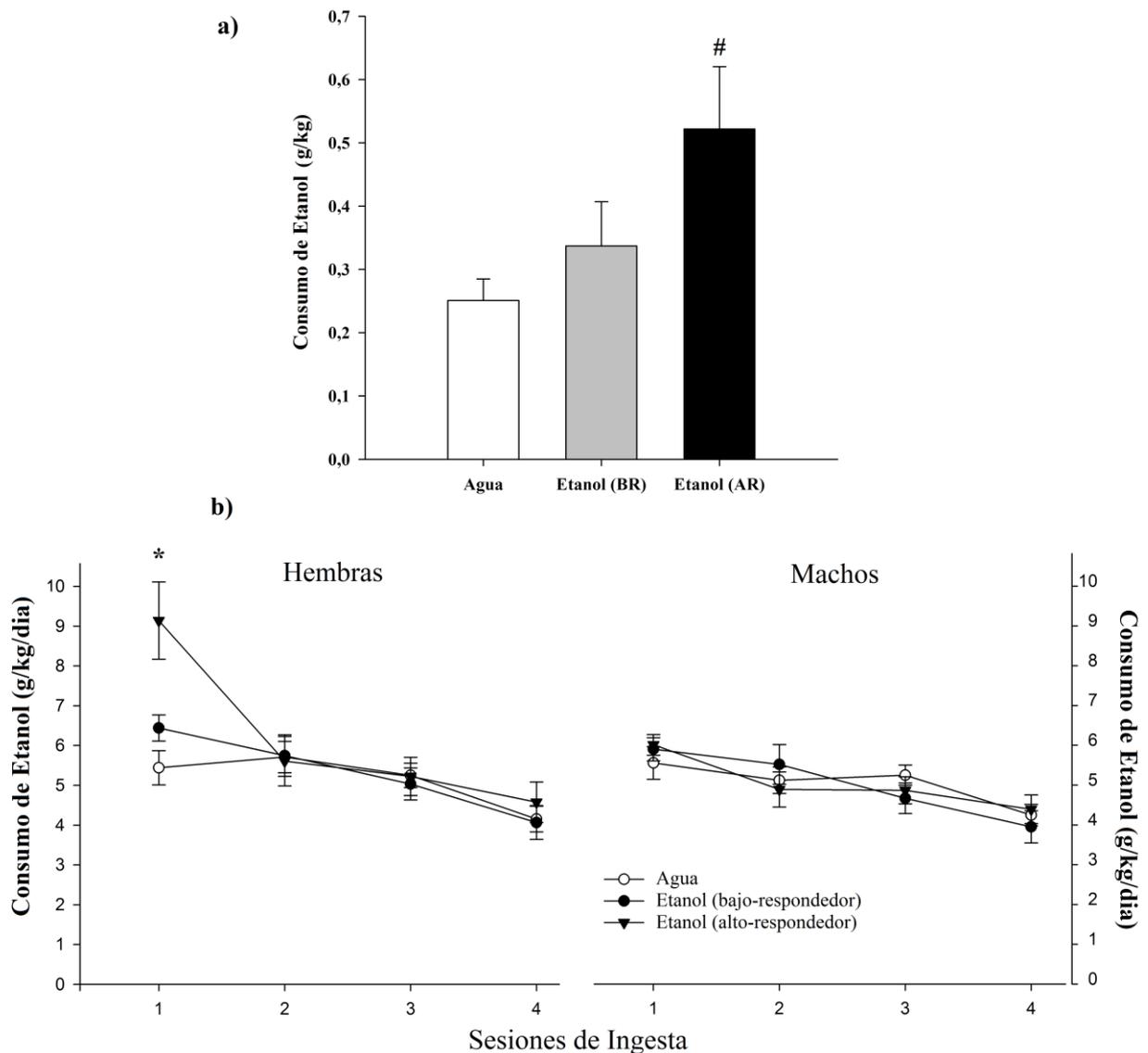


Figura 6. Panel (a): representa el promedio de consumo de la concentración de etanol al 6% de las fases 1 y 4 en los grupos de animales AR, BR y en el tratado con agua al DP28. Al DP28 los animales recibían una administración de etanol (2,5 g/kg) o vehículo (0,0 g/kg). Los adolescentes tratados con etanol luego eran divididos en dos grupos como altos- y bajos-respondedores (AR y BR) empleando como criterio de separación la mediana general de actividad locomotora total (acumulada en los 7 min de evaluación). En las fases 1 y 4 los animales tenían acceso a agua y a una solución determinada de etanol (3% v/v la primera sesión, con un incremento de 1% v/v en cada sesión hasta alcanzar 6%) durante 120 minutos. Panel (b): representa la ingesta de etanol (g/kg) en ratas adolescentes hembras y machos durante la Fase 2 del protocolo de ingesta en función de las sesiones de ingesta (1, 2, 3 y 4) y la sensibilidad a los efectos estimulantes motores del etanol durante la iniciación a la droga al DP28 (AR, BR o grupo tratado con agua). Los animales tenían acceso continuo y simultáneo concentraciones variadas de etanol (3, 4 y 5%) durante 4 días como único fluido disponible durante las 24 hs. Los datos fueron colapsados por el factor de tratamiento con etanol al DP31. El asterisco (*) indica una diferencia significativa entre las hembras AR que consumieron más etanol durante las primeras 24 hs (sesión 1), y las hembras BR y el grupo de hembras tratado con agua ($p < 0,05$). El numeral (#) indica una diferencia significativa entre el grupo AR y el grupo BR y el tratado con agua ($p < 0,05$). Las barras verticales representan los EEM.

Experimento 2a: Niveles de Etanol en Sangre (NES) en Ratas Adolescentes al DP28.

Introducción

Las diferencias observadas en la actividad locomotora de los animales AR y BR podrían deberse a diferencias en el metabolismo del etanol (Walker y Ehlers, 2009). El propósito del experimento fue analizar los NES en ratas adolescentes machos y hembras como AR o BR en términos de actividad locomotora inducida por etanol.

Diseño Experimental

Se utilizó un diseño factorial 2 (sexo: machos o hembras) x 2 (subgrupos: AR o BR). Se utilizaron 4 grupos finales. Se emplearon 6 animales por cada condición experimental. Al DP28 los animales fueron evaluados en su locomoción luego que recibieran una dosis de etanol 2,5 g/kg (i.g.) en el tiempo de post-administración 5–11 min. Al minuto 13 post-administración se tomaron muestras de sangre de los mismos.

Procedimientos Específicos de Condicionamiento y Evaluación

Los animales eran manipulados dos veces en el día por un período de 2 minutos (DPs 25–27). Al DP28, recibían una administración (i.g.) de una dosis de etanol de 2,5 g/kg y eran evaluados en campo abierto en términos de locomoción inducida por etanol, (i.e., como en el *Experimento 2*). Las muestras de sangre se obtuvieron del tronco, al minuto 13 post-administración, mediante tubos de polipropileno (Eppendorf). Los mismos se guardaban a -70° C y las mediciones se llevaron a cabo por medio de un cromatógrafo de fase gaseosa (Hewlett Packard 5892 Series II - Gas Chromatograph). Los NES se expresaron como miligramos por decilitro de fluido corporal (mg/dl = mg%).

Resultados

Los animales fueron dividido y asignados a dos grupos: AR y BR, como se describiera en el experimento previo. El etanol indujo significativamente mayor locomoción en los AR que en los BR ($F_{1,24} = 53,65, p < .0001$). Las medias y errores estándar de los AR y BR fueron $42,22 \pm 2,52$ y $16,11 \pm 2,52$, respectivamente. Similar al *Experimento 2*, los AR y BR no mostraron diferencias en la conducta vertical. El factor sexo tampoco mostró efecto principal o interacción significativa con el factor sub-poblaciones. El ANOVA de dos vías entre-grupo para NES indicó ausencia de efectos principales o interacciones significativas. Las medias y errores estándar para los AR y BR fueron las

siguientes: $144,20 \pm 14,91$ mg% y $135,20 \pm 14,97$ mg%; y $122,05 \pm 12,39$ mg% y $108,16 \pm 16,18$ mg%; para machos y hembras, respectivamente. Bajo estas condiciones, los NES en el tiempo de post-administración considerado parece ser similar en ambos grupos (AR y BR).

Experimento 3: *Relación entre Aversión Adquirida al Sabor y Actividad Locomotora espontánea o inducida por una Dosis elevada de Etanol en Ratas Adolescentes:*

Introducción

En este experimento se replica y se amplía información sobre lo realizado en el *Experimento 2*. Específicamente, el presente experimento incorporó un grupo experimental adicional para los procedimientos de caracterización de actividad motora, el cual no sufre manipulación experimental previamente a la evaluación motora. Diversos estudios (e.g., Arias et al., 2009b; Nadal et al., 2005) indican que la actividad espontánea, medida en campo abierto, puede ser un predictor de la futura reactividad motivacional al alcohol o de su ingesta. A su vez, con el fin de analizar más en detalle el espectro de dosis de etanol que indujeran activación motora, se incorporó una dosis (3,0 g/kg) medio gramo mayor a la dosis que empleamos anteriormente (2,5 g/kg). Por otro lado, el estudio previo (*Experimento 2*) observamos una tendencia leve, no significativa, de una interacción entre el tratamiento con etanol al DP28 y el tratamiento durante el condicionamiento al DP31 ($p = .60$), en el sentido que la pre-exposición a la droga (durante la iniciación al DP28) atenuaba la expresión del aprendizaje aversivo el DP31. En otras palabras la exposición a la droga previa en ese día (DP28) bloqueaba los atributos aversivos del etanol durante el condicionamiento de aversión (DP31). La hipótesis de este experimento era que el supuesto efecto de pre-exposición cobraría mayor fortaleza si incrementábamos la dosis de alcohol administrada el DP28.

Diseño Experimental

Se empleó un diseño factorial 2 (sexo: macho o hembra) x 3 (tratamiento con etanol al DP28: 3,0; 0,0 g/kg o grupo no tratado “NT”) x 2 (tratamiento con etanol al DP31: 2,5 o 0,0 g/kg). Los 12 grupos finales emplearon un mínimo de 5 y un máximo de 7 animales. Al DP28 los animales fueron evaluados en actividad motora espontánea en campo abierto, o en actividad motora inducida por etanol o vehículo, durante los minutos post-administración 5 a 11. Posteriormente, estos animales experimentaron el apareamiento entre los efectos del etanol (2,5 g/kg) y la ingesta voluntaria de sacarina (0,1% v/v), usando el paradigma descrito en el *Experimento 2*.

Procedimientos Específicos de Condicionamiento y Evaluación

Actividad motora inducida por etanol al DP28. Las ratas adolescentes machos y hembras eran administradas con etanol (0,0 o 3,0 g/kg) y evaluadas en campo abierto en términos de

locomoción y conductas verticales en el período post-administración 5-11 min. Los animales del grupo no tratado (NT) eran evaluados de la misma manera que el resto de los grupos sin sufrir la manipulación experimental (administración intragástrica). Posterior a cada evaluación todos los animales eran regresados a sus cajas de alojamiento con sus pares del mismo sexo.

AAS inducida por Etanol. Se siguió el mismo procedimiento descrito en el *Experimento 2*, aunque con una variante. Con el objetivo de evaluar patrones de extinción del aprendizaje aversivo, la ingesta de la solución de sacarina fue evaluada en dos oportunidades, posterior al condicionamiento. Como se describiera previamente el Día 5 (DP33) se retiraba el tubo de vidrio y se reemplazaba por uno que contuviera una solución de sacarina 0,1 % durante 60 minutos. Al incorporar otro día de evaluación, una vez que finalizaba el tiempo de evaluación del Día 5, se reemplazaba el tubo de sacarina por uno con agua que contuviera el 80% del líquido normal que ingerían y se les proveía comida ad-libitum. Finalmente, el Día 6 (DP34) se repetían los procedimientos del día anterior.

Resultados

Actividad motora inducida por etanol al DP28. Las conductas horizontales se muestran en la Figura 7. La dosis 3,0 g/kg de etanol indujo mayor activación motora que en los grupos controles (0,0 g/kg y NT). El ANOVA para las conductas horizontales indicó efectos principales significativos de tratamiento de etanol al DP28 y minutos de evaluación; y la interacción entre ambos factores fue también significativa ($F_{2,65} = 34,04$; $F_{6,390} = 131,53$; $F_{12,390} = 7,80$, respectivamente; $p < 0,001$). Las comparaciones planeadas indicaron diferencias significativas entre el grupo de animales tratado con etanol y el tratado con agua o el no tratado (NT) durante los minutos 1, 2, 3, 4 y 5 post-administración. Los efectos fueron independientes del factor sexo.

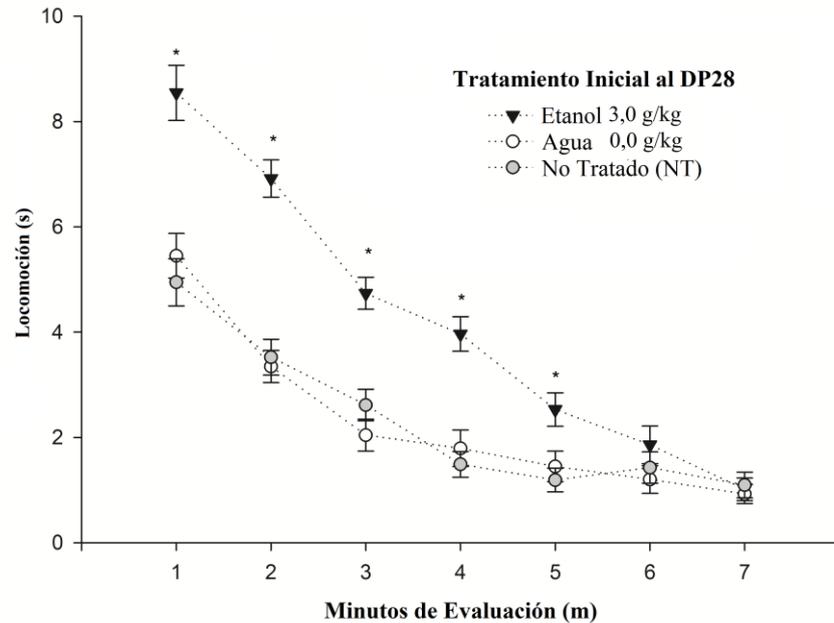


Figura 7. Actividad motora (locomoción) en ratas adolescentes hembras y machos en función del tratamiento con etanol al DP28 (3,0 g/kg) o vehículo (0,0 g/kg) y el tiempo post-administración 5–11 min. Un tercer grupo de animales fue evaluado sin recibir administración (grupo no tratado, NT). Los datos fueron colapsados por el factor de sexo. El asterisco (*) indica una diferencia significativa entre el grupo tratado con etanol (3,0 g/kg) y los dos grupos controles (0,0 g/kg y NT) en los primeros cinco minutos de evaluación [$p < 0,001$]. Las barras verticales indican errores estándar de la media (EEM).

AAS mediada por etanol al DP33-34. El ANOVA para la ingesta de sacarina durante la sesión de condicionamiento indicó ausencia de diferencias basales en el consumo en función del sexo o la experiencia previa con etanol al DP28. El ANOVA para la ingesta de sacarina en la prueba arrojó efecto principal de condicionamiento. La ingesta de sacarina durante las pruebas fue significativamente menor en aquellos animales que fueron expuestos al apareamiento entre etanol y sacarina el DP31; en relación a los animales tratados con vehículo ($F_{1,60} = 14,92$; $p < 0,001$). El ANOVA y subsiguientes post-hoc indicaron que este resultado, indicativo de AAS mediada por etanol, no se observó en los animales tratados con etanol durante la iniciación al DP28 (i.e., interacción significativa tratamiento de iniciación al DP28 x tratamiento durante el condicionamiento al DP31, $F_{2,60} = 4,83$; $p < 0,05$). Asimismo, se observó un efecto principal de prueba de evaluación ($F_{1,60} = 8,54$; $p < 0,01$), siendo el consumo de sacarina significativamente mayor en la primera que en la segunda prueba. Los efectos no se alteraron significativamente en función del sexo y la interacción prueba x tratamiento con etanol tampoco fue significativa.

La Figura 8 representa el consumo promedio de sacarina durante los días de evaluación en función de los tratamientos con etanol al DP28 y durante el condicionamiento al DP31.

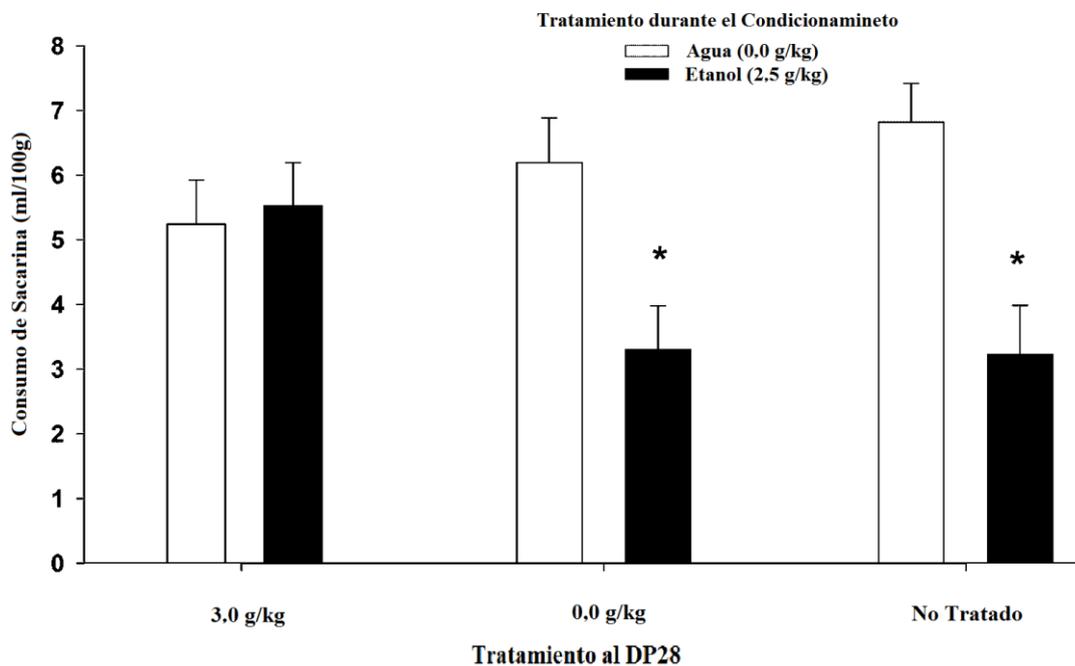


Figura 8. Consumo de Sacarina (ml/100g) en ratas adolescentes hembras y machos en función del tratamiento con etanol durante la iniciación al DP28 y del tratamiento con etanol durante el condicionamiento aversivo (DP31). Al DP28, los animales recibían una administración i.g. de etanol (3,0 g/kg), vehículo (0,0 g/kg) o no recibían administración (NT). Durante el condicionamiento el consumo de sacarina era seguido de una administración i.g. de etanol (2,5 g/kg) o vehículo (0,0 g/kg). Se realizaron dos evaluaciones de 60 minutos cada una en los DPs 33 y 34. La figura representa el promedio de las media de consumo de sacarina durante ambas evaluaciones. El análisis indicó que los animales que consumieron sacarina apareada a la administración de la droga durante el condicionamiento consumieron significativamente menos sacarina que los animales que recibieron vehículo, pero sólo si no fueron iniciados con la droga el DP28. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre un grupo tratado con etanol y su control específico durante el condicionamiento al DP31 ($p < 0,05$). La información fue colapsada por el factor sexo, que no ejerció ningún efecto principal o interactuó con los restantes factores. Las barras verticales indican el error estándar de la media (EEM).

Los índices de correlación de Pearson para los grupos AR y BR que fueron condicionados para evitar alcohol (AAS) no mostraron una asociación significativa entre la actividad motora al DP28 en el campo abierto y el consumo de sacarina a los DPs 33-34. Lo interesante fue que en el grupo de animales no tratados (NT) y que fueron condicionados para evitar alcohol (AAS) observamos una asociación positiva entre la actividad motora *per se* (actividad espontánea) y el consumo de sacarina, tanto en la primera como en la segunda sesión de extinción ($r = 0,64$ [Figura 9])

y $r = 0,59$ respectivamente; $p < 0,05$); esto es, cuanto mayor fue exploración basal espontánea tanto menor fue la expresión del AAS.

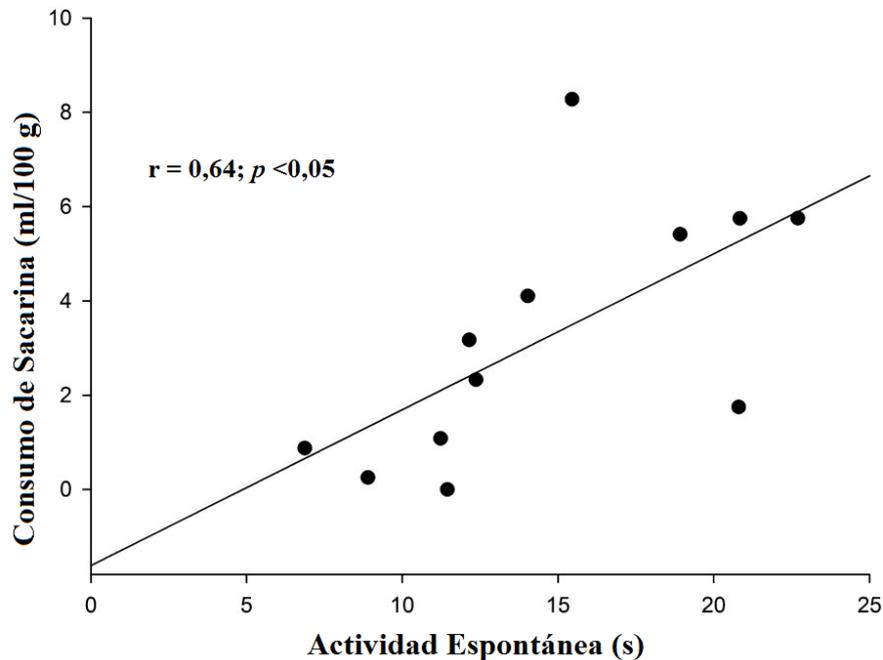


Figura 9. Asociación entre la actividad espontánea en campo abierto y la expresión de aversión adquirida al sabor (AAS). Consumo de sacarina (ml/100g de peso corporal) durante la prueba de extinción 1 (DP33) en función de la actividad espontánea (s) en campo abierto al DP28 en ratas adolescentes que no recibieron tratamiento con etanol (i.e., NT) y que recibieron el apareamiento de sacarina con etanol (2,5 g/kg) al DP31. El coeficiente de Pearson ($r = 0,64$, $p < 0,05$) indicó que una mayor exploración espontánea en el campo abierto predecía un mayor consumo de la sacarina asociada a los efectos de la droga; y por tanto, una menor expresión de aversión adquirida al sabor. Similar asociación se encontró en la prueba de extinción 2 ($r = 0,59$, $p < 0,05$; datos no representados en el gráfico).

Experimento 4: *Relación entre Condicionamiento de Preferencia al Lugar inducido por Etanol y Actividad Locomotora inducida por esta Droga en Ratas Adolescentes*

Introducción

Pocos trabajos reportaron condicionamiento de preferencia al lugar inducido por etanol en ratas adolescentes o adultas. No obstante, algunos trabajos han sugerido que –a diferencia de sus pares adultos- los adolescentes podrían ser sensibles a los efectos motivacionales positivos del etanol (Pautassi et al., 2008b; Philpot, et al., 2003). El estudio de estas diferencias ontogenéticas en respuesta a la droga cobra importancia al considerar que aquellos adolescentes que perciban la droga como más reforzantes podrían estar a mayor riesgo de desarrollar consumo problemático de alcohol (Schramm-Sapyta et al., 2006). Así entonces, indagamos la capacidad de la rata adolescente para percibir los atributos apetitivos del etanol mediante CPL y analizamos si la expresión de CPL estaba relacionada con la actividad motora espontánea o la inducida por alcohol, medida en un ambiente nuevo y de manera previa al entrenamiento de CPL.

Diseño Experimental

Se empleó un diseño factorial 2 (sexo: macho o hembra) x 2 (tratamiento al DP28: 2,5 o 0,0 g/kg) x 2 (tratamiento durante el condicionamiento: 1,0 o 0,0 g/kg). Los 8 grupos emplearon 6 animales cada uno. Al DP28 los animales fueron evaluados en su locomoción luego que recibieran la administración de una dosis de etanol o vehículo (i.g.) en los minutos 5 a 11 post-administración. Estos animales fueron luego entrenados en un procedimiento de condicionamiento de preferencia al lugar (CPL) donde experimentaban los efectos de dosis de etanol (1,0 g/kg) apareados o no a una superficie rugosa (papel de lija).

Procedimientos Específicos de Condicionamiento y Evaluación

Actividad motora Inducida por Etanol al DP28. Se siguió el mismo procedimiento descrito en el *Experimento 2*.

Aparatos y Condiciones de CPL. Para las sesiones de condicionamiento y el día de la evaluación se empleó una caja opaca rectangular de Plexiglas (20 x 24 x 70 cm). Durante las sesiones cada caja se dividía por medio de un panel del mismo material que seccionaba la misma en dos compartimentos individuales (20 x 24 x 35 cm). La superficie de cada compartimento podía ser de papel de lija (grosor 60, Norton, Brasil) o bien de etileno acetato de vinilo (goma “EVA”). En la

evaluación de preferencia táctil, la caja se dividía en tres secciones: zona central neutra del mismo material de la caja (12 x 20 cm) y dos áreas en los extremos de la caja (29 x 20 cm) con las dos claves táctiles mencionadas. Cada evaluación comenzaba con el animal en la zona central. La habitación de trabajo estaba iluminada con una lámpara roja de 40-W, localizada a 50 cm sobre cada caja.

Procedimientos Generales de CPL. Los animales eran entrenados durante cuatro días consecutivos (DP30-33); y eran evaluados 24 hs después del último día de condicionamiento (DP34). Cada sesión de condicionamiento tuvo una duración de 15 minutos, a partir del minuto 5 posterior a cada administración intragástrica hasta el minuto 20. Por las mañanas todos los animales eran introducidos individualmente en el compartimento con superficie de goma EVA, cinco minutos después de recibir vehículo. Cinco horas más tarde recibían vehículo o 1,0 g/kg de etanol (grupos control y experimental, respectivamente) y eran confinados en los compartimentos tapizados con lija. Es decir, la lija y la goma EVA predecían la presencia y ausencia, respectivamente, de los efectos farmacológicos del alcohol. Al día siguiente, posterior a la última sesión de condicionamiento, todos los animales eran evaluados en una prueba de preferencia de dos vías. Los animales permanecían 12 minutos en una caja con dos texturas: papel de lija (estímulo condicionado, EC+) vs goma EVA (estímulo no apareado). Se registraba el tiempo (segundos) de permanencia en cada compartimento, el cual era considerado siempre que el animal se posicionaba con sus patas delanteras en una de las dos superficies. La Tabla 3 representa el esquema completo del CPL.

Tabla 3. Esquema de Condicionamiento Preferencia a la Textura

			Condicionamiento (administraciones i.g.)				Prueba
			Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Condición Experimental	Experimental	Mañana (goma EVA)	Agua (0,0 g/kg)	Agua (0,0 g/kg)	Agua (0,0 g/kg)	Agua (0,0 g/kg)	LIJA vs goma EVA
		Tarde (Lija)	Etanol (1,0 g/kg)	Etanol (1,0 g/kg)	Etanol (1,0 g/kg)	Etanol (1,0 g/kg)	
	Control	Mañana (goma EVA)	Agua (0,0 g/kg)	Agua (0,0 g/kg)	Agua (0,0 g/kg)	Agua (0,0 g/kg)	
		Tarde (Lija)	Agua (0,0 g/kg)	Agua (0,0 g/kg)	Agua (0,0 g/kg)	Agua (0,0 g/kg)	

Resultados

El ANOVA para la locomoción al DP28 arrojó efectos principales significativos de tratamiento con etanol ($F_{1,45} = 21,54$; $p < 0,001$), minutos de evaluación ($F_{6,270} = 53,17$; $p < 0,001$), y una interacción significativa entre ambos factores ($F_{6,270} = 5,60$; $p < 0,001$). Pruebas Post Hoc indicaron que el tratamiento con la dosis de etanol 2,5 g/kg indujo activación motora, principalmente, durante los primeros 4 minutos de la evaluación. El ANOVA de conducta vertical solo indicó un efecto principal significativo de los minutos de la evaluación ($F_{6,330} = 8,54$; $p < 0,001$). Ni la locomoción ni la conducta vertical se vieron afectadas por el factor sexo.

Las variables analizadas en la prueba de CPL fueron el tiempo (s) pasado sobre cada una de las texturas (papel de lija, EC+, y goma EVA, EC-). Se realizó un ANOVA mixto que consideró al tiempo de permanencia sobre cada una de las texturas como factor “dentro” o de medidas repetidas, y el tratamiento durante el condicionamiento (etanol o vehículo) como factor entre o de comparación entre grupos. El ANOVA indicó un efecto interactivo significativo entre ambos factores ($F_{1,41} = 4.74$, $p < 0,05$). Los post-hoc indicaron que los sujetos controles tratados con vehículo exhibieron igual preferencia por el EC+ que por el EC-. Este no fue el caso en los sujetos experimentales, los cuales pasaron significativamente más tiempo sobre la lija EC+ que sobre la goma EVA EC- (Figura 10). La Figura 11 ilustra el perfil de preferencia por ambas texturas en cada uno de los grupos, a lo largo de los 12 minutos de evaluación. La preferencia por la textura asociada al alcohol no fue afectada por la pre-exposición a la droga el DP28, ni por el sexo de los animales.

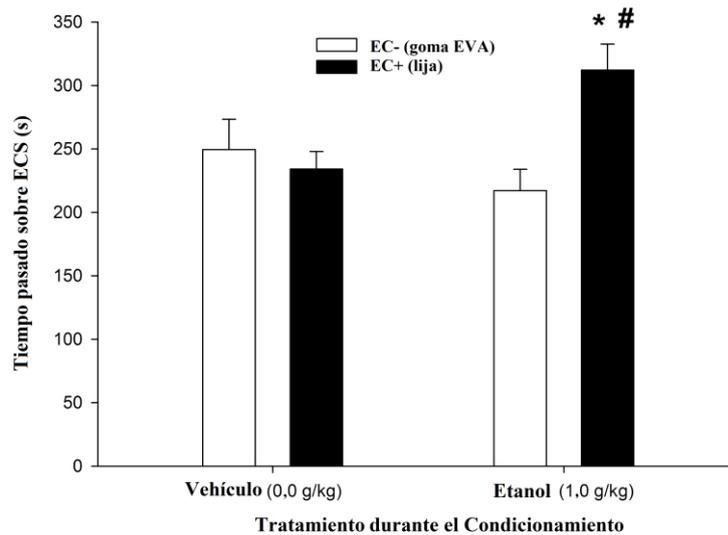


Figura 10. El etanol indujo preferencia condicionada a la lija en ratas adolescentes. La Figura representa el total de tiempo (s) permanecido sobre la lija (EC+) y sobre la goma EVA (EC-) durante 12 minutos de evaluación en función del tratamiento en los DPs30-33 (etanol-1,0 g/kg o vehículo-0,0 g/kg). El grupo de animales que fue condicionado con etanol permaneció mayor tiempo sobre la textura asociada a los efectos de la droga (papel de lija) respecto de la goma EVA durante la evaluación y además exhibió mayor preferencia por la lija que el grupo de animales que recibieron vehículo. Estas diferencias significativas se indican con los signos de asterisco (*) y numeral (#), respectivamente ($p < 0,05$). Los datos fueron colapsados por el factor sexo. Las barras verticales indican el error estándar de la media (EEM).

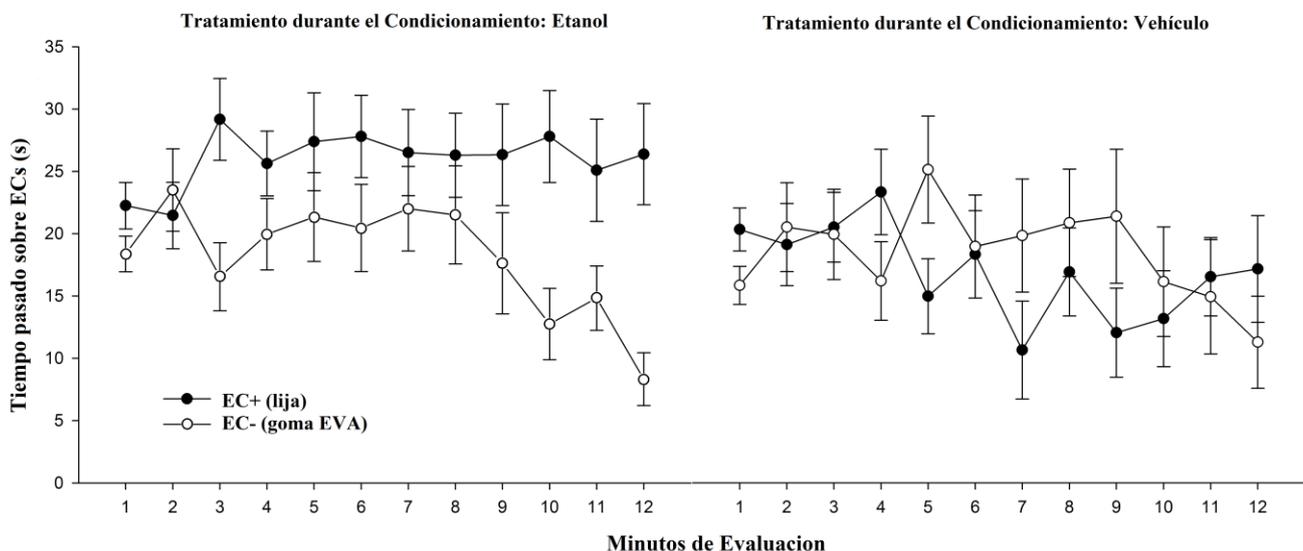


Figura 11. Tiempo de permanencia (s) sobre las texturas de papel de lija y goma EVA en función del tratamiento durante el condicionamiento en los DPs 30-33 (etanol-1,0 g/kg o vehículo-0,0 g/kg) y los minutos de evaluación. Durante el condicionamiento, el papel de lija (EC+) – pero no la goma EVA – había sido apareado a los efectos del alcohol. Los datos fueron colapsados por el factor sexo. Las barras verticales indican el error estándar de la media (EEM).

En esta oportunidad también dividimos entre altos y bajos respondedores en función del nivel de activación inducida por alcohol el DP28. Sin embargo, ambos grupos no difirieron en términos de CPL ni se encontró una asociación significativa entre los puntajes individuales de activación inducida por alcohol y los de CPL. En cambio, se observó una relación positiva entre la actividad de los animales controles administrados con vehículo (0,0g/kg) durante la prueba de actividad motora el DP28 y el monto de preferencia por el estímulo condicionado (EC+, lija) ($r_s = 0,47$; $p < 0,05$). Es decir, cuanto mayor fuera la actividad basal al DP28, tanto mejor la expresión del aprendizaje apetitivo inducido por los efectos del etanol. Esta correlación, obviamente, tomó solo en cuenta aquellos sujetos que recibieron apareamientos entre etanol y la lija.

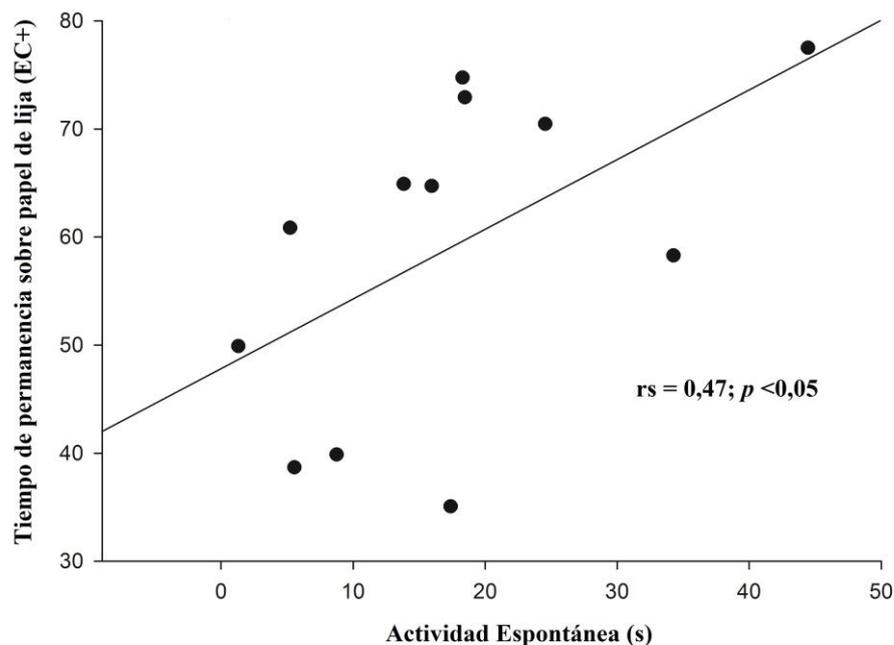


Figura 12. Asociación entre la actividad espontánea en campo abierto en animales que recibieron vehículo y el tiempo de permanencia sobre el papel de lija (EC+). El tiempo de permanencia (s) sobre la lija durante la evaluación de CPL en función de la actividad motora (s) en campo abierto al DP28 en ratas que recibieron vehículo y que fueron entrenada durante cuatro días (DPs 30-33) para preferir la textura apareada a los efectos de etanol (1,0 g/kg). El coeficiente de Spearman ($r_s = 0,47$; $p < 0,05$) indicó que una mayor exploración espontánea en el campo abierto predecía un mayor tiempo de permanencia sobre la textura asociada a los efectos de la droga (papel de lija).

Experimento 5: *Replicación del Condicionamiento de Preferencia al Lugar Inducido por Etanol en Ratas Adolescentes utilizando un control de mayor rigurosidad.*

Introducción

El hallazgo de CPL inducido por alcohol (*Experimento 4*) es muy relevante dada la escasez de evidencias de condicionamiento apetitivo mediado por esta droga en ratas y en adolescentes en particular. El presente experimento tuvo por objetivo replicar el hallazgo e incorporar un control de condicionamiento más confiable, un grupo no apareado, el cual estuvo expuesto a los efectos la droga y a los estímulos táctiles pero de manera no relacionada. Asimismo se redujo la cantidad de sesiones a dos y, dada la ausencia de efectos de sexo en el experimento anterior, sólo se emplearon machos.

Diseño Experimental

Se empleó un diseño de 2 grupos. Se emplearon 20 ratas machos adolescentes: 9 en el grupo apareado y 11 en el grupo no apareado. Estos animales fueron entrenados dos días en un condicionamiento de preferencia al lugar (CPL) donde experimentaban los efectos de dosis de etanol (1,0 g/kg) apareados a una superficie rugosa o separados temporalmente (no apareados).

Procedimientos Específicos de Condicionamiento y Evaluación

Los aparatos y condiciones empleados para CPL fueron los mismos que se describieran en el *Experimento 4* apartado de “aparatos y condiciones de CPL”. En esta ocasión las sesiones de entrenamiento fueron dos (DPs 30 y 31), y la evaluación tuvo lugar el DP32. Al igual que en el *Experimento 4* cada sesión de condicionamiento tuvo una duración de 15 minutos, a partir del minuto 5 posterior a cada administración hasta el minuto 20. La elección de este intervalo de condicionamiento radica en que en ese momento los niveles de alcohol en sangre están subiendo y, hipotéticamente, los efectos apetitivos del alcohol serían máximos (Niznikov et al., 2009). Por las mañanas todos los animales eran introducidos en los compartimentos con superficie de goma EVA, luego que recibieran una administración de vehículo (i.e., agua). Por las tardes, 5 horas posteriores al entrenamiento de las mañanas, los animales eran introducidos en el compartimento con superficie de papel de lija, pero solo la mitad de ellos lo hacía bajo los efectos tóxicos de la dosis de etanol (1,0 g/kg, grupo apareado). La otra mitad de animales (grupo no apareado) recibía la administración de etanol 90 minutos después de las sesiones de condicionamiento, es decir, estos últimos animales

experimentaban los efectos de la droga pero separados temporalmente de la superficie a la que los demás animales eran apareados. La evaluación de preferencia condicionada al lugar y el análisis de datos se realizaron siguiendo los mismos criterios que se describieron en el experimento anterior.

Resultados

Las variables analizadas en la prueba de CPL fueron el tiempo (s) pasado sobre cada una de las texturas (papel de lija, EC+, y goma EVA, EC-). Se realizó un ANOVA mixto que consideró al tiempo de permanencia sobre cada una de las texturas como factor “dentro” o de medidas repetidas, y el tratamiento durante el condicionamiento (apareado o no apareado) como factor entre o de comparación entre grupos. El ANOVA indicó una interacción significativa de tratamiento durante el condicionamiento (apareado o no apareado) y las texturas, $F_{1,18} = 4,69$; $p < 0,05$. Como se observa en la Figura 13 (panel superior), las ratas adolescentes que recibieron apareamientos entre la droga y el papel de lija mostraron mayor preferencia por la textura lija (EC+) que por la goma EVA (EC-) y también exhibieron mayor preferencia por el EC+ que el grupo de animales no apareado. La Figura 13 (panel inferior) ilustra el perfil de preferencia por ambas texturas en cada uno de los grupos, a lo largo de los 12 minutos de evaluación

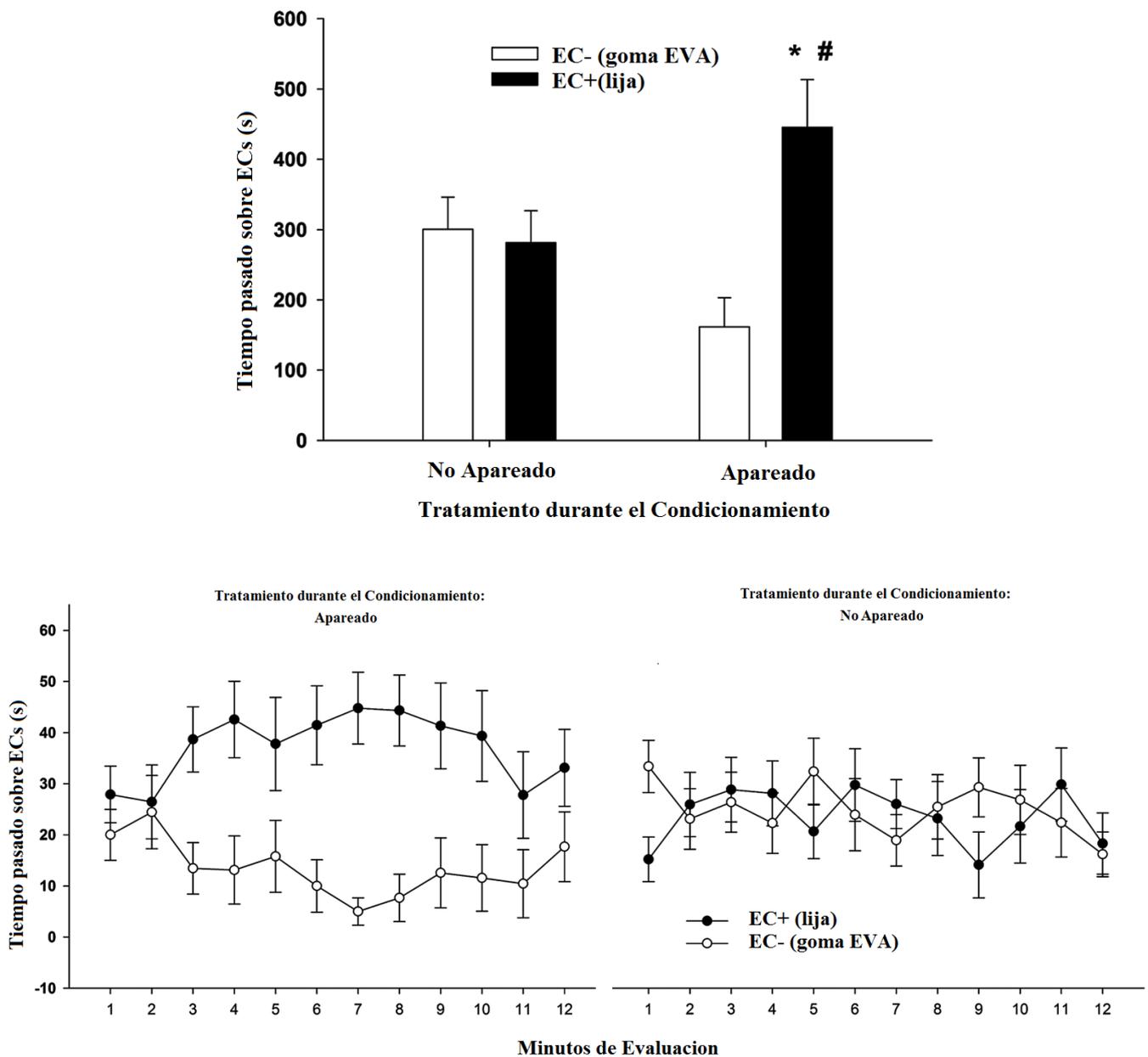


Figura 13. El *panel superior* representa el tiempo de permanencia sobre la lija (EC+) y sobre la goma EVA durante 12 minutos de evaluación en función del tratamiento durante el condicionamiento (grupos: apareado o no apareado). Durante los días de condicionamiento DPs 30-31 el grupo apareado era expuesto al EC+ bajo los efectos tóxicos de la droga, en tanto que el grupo no apareado era expuesto al papel de lija 90 minutos antes de recibir el etanol (EC-EI, 90 min de intervalo entre estímulos). El grupo apareado permaneció mayor tiempo sobre el EC+ (papel de lija) respecto de la goma EVA durante la evaluación y además exhibió mayor preferencia por la lija que el grupo de animales no apareados. Estas diferencias significativas se indican con los signos de asterisco (*) y numeral (#), respectivamente ($p < 0,05$). El *panel inferior* representa el tiempo de permanencia (s) sobre las texturas de papel de lija y goma EVA en función del tratamiento durante el condicionamiento (grupos: apareados o no apareados) y los minutos de evaluación (1-12). Las barras verticales indican el error estándar de la media (EEM).

Conclusión de la Sección I

En esta sección hemos observado que la administración de dosis altas y moderadas (3,0 y 2,5 g/kg) de alcohol– pero no bajas (0,5 g/kg) – inducen activación motora; y que dicha activación predice el consumo posterior de la droga en ratas adolescentes; aunque no la expresión de aprendizajes motivacionales. No se observaron diferencias en activación motora entre los grupos tratados con vehículo (0,0 g/kg) y aquellos que no recibían administración (sin manipulación, NT). Este resultado indica que el efecto activador del alcohol, en términos motores, no se debe a los efectos de activación propios de la manipulación experimental. En todas las experiencias experimentales la actividad inducida por alcohol fue similar en ambos sexos.

Sobre la variabilidad de los grupos trabajados, específicamente sobre las poblaciones que experimentaron los desafíos farmacológicos fue posible caracterizar sub-poblaciones de ratas adolescentes en función de su alta o baja reactividad inicial a los efectos del alcohol (altos y bajos respondedores, (AR-BR, respectivamente). Las diferencias en la sensibilidad a los efectos estimulantes del etanol entre estas dos poblaciones no se explicaron por diferencias en la metabolización de la droga. Cuando indagamos el consumo de la droga en estas poblaciones observamos que los AR consumieron más etanol al 6% que los BR y que los animales no iniciados; efecto que se observó específicamente durante las últimas sesiones de las pruebas de doble vía en las fases 1 y 4. Asimismo, los AR exhibieron un consumo de alcohol significativamente más elevado que los BR y que sus pares tratados con vehículo (no iniciados al DP28) durante las primeras 24 horas de la fase de acceso continuo y concurrente (fase 2). Este efecto en términos de gramos absoluto de etanol consumido fue más pronunciado en hembras que en machos.

En conjunto, estos resultados sugieren que la exposición temprana al alcohol en la adolescencia aumentaría el consumo posterior de la droga. Cabe remarcar que aquellos con mayor sensibilidad al efecto estimulante motor del alcohol serían aún más sensibles a los efectos facilitadores de la exposición temprana al etanol sobre el consumo posterior.

Los experimentos subsiguientes incluyeron animales iniciados previamente al alcohol droga (DP28), administrados con vehículo o sin manipulación (NT). Estos grupos fueron luego evaluados en la expresión de aprendizajes inducidos por los atributos aversivos (AAS) y apetitivos (CPL) del alcohol. Ambos paradigmas resultaron exitosos, y se buscó además observar si la expresión de dichos aprendizajes mantenía relación con la locomoción inducida o no por el etanol en un ambiente nuevo.

En el caso del AAS, utilizamos el procedimiento descrito por Anderson et al. (2008) y observamos una respuesta condicionada aversiva. Básicamente, se observó el rechazo de una sustancia gustativa (sacarina, estímulo condicionado, EC) que había sido apareada a los efectos del etanol. Este resultado, indicativo de aversión condicionada mediada por la droga, fue independiente del sexo y del monto de activación motora inicial inducida por etanol al DP28. El AAS se bloqueó si los animales previamente habían recibido una dosis alta de alcohol (3,0 g/kg), aunque esto no ocurrió si la dosis de etanol administrada era un poco menor (2,5 g/kg). Estos resultados indican un efecto de pre-exposición al estímulo incondicionado. En otras palabras, la exposición al alcohol hace a los sujetos insensibles a los efectos aversivos del etanol e impide la adquisición de condicionamiento aversivo mediado por el alcohol, aparentemente de una manera dosis-dependiente. La hipótesis de asociación entre la estimulación motora provocada por la droga y AAS no fue corroborada, tanto en la población general como en poblaciones agrupadas por su reactividad motora inicial inducida por la droga; esto es, los AR y BR respondedores. No obstante, encontramos una relación negativa entre los niveles de actividad espontánea y el consumo de sacarina, en el grupo de animales que no recibieron manipulación (NT) y que fueron entrenados en un procedimiento AAS a la sacarina. Esto es, aquellos animales que mostraron mayor ambulación espontánea consumieron más del EC sacarina, aun cuando este sabor predecía los efectos aversivos del alcohol; lo cual implicaba que fueron más resistentes para expresar AAS. Las interpretaciones respecto de este efecto lo abordaremos en detalle en la discusión general.

En un experimento subsiguiente observamos, mediante CPL, condicionamiento apetitivo inducido por etanol. Este resultado fue novedoso dada la relativa escasez de evidencias de efectos reforzantes del alcohol en la rata adolescente. También analizamos si dicho aprendizaje estaba asociado con la actividad locomotora espontánea o inducida por alcohol, medida en campo abierto y de manera previa al entrenamiento en el paradigma de CPL. Encontramos una relación positiva entre el nivel de actividad de los animales de grupo control que recibieron administración de vehículo (0,0 g/kg) y el monto de preferencia por el estímulo condicionado (EC+, papel de lija). Esto es, cuanto mayor la actividad basal al DP28 tanto mayor el aprendizaje apetitivo inducido por la droga. Esta asociación fue congruente con la dirección que observamos para la asociación en AAS. Una mayor ambulación predice una mayor sensibilidad por los atributos apetitivos y una menor sensibilidad por los atributos aversivos de la droga. Por otro lado, como observamos también en el experimento de AAS, la hipótesis de una asociación entre el efecto estimulante motor del alcohol y los efectos apetitivos en CPL no fue corroborada.

En conclusión, los animales adolescentes expresaron aprendizaje apetitivo inducido por alcohol y fueron sensibles a los efectos activadores de la droga. La hipótesis de que estos

aprendizajes tuvieran relación con el monto de actividad inducida por la droga no fue corroborada. Se encontró, sin embargo, una asociación positiva entre CPL por el etanol y nivel de actividad espontánea en un campo abierto. Este resultado sugiere que la actividad en un ambiente nuevo e inescapable puede, de la misma manera que la búsqueda de novedad observada en humanos vincularse con la probabilidad de uso y abuso de drogas. Cabe destacar que los efectos encontrados son factores de máxima importancia en la regulación de los procesos de búsqueda e ingesta de la droga (Cunningham, 2000). Asimismo, pudimos observar que la mera exposición a la droga temprano en la adolescencia fue capaz de alterar el perfil de consumo posterior de la misma más tarde en la adolescencia. Este perfil también fue diferente en la población de sujetos que experimentan los efectos de la droga. Los individuos que se mostraron más sensibles a los efectos estimulantes motores inducidos por la droga (AR) en el campo abierto consumieron más de la droga durante la prueba de ingesta que los BR y que los animales no iniciados (0,0 g/kg), particularmente, el día que tenían acceso a la concentración más alta de la solución de etanol (6% v/v). Asimismo, fueron las hembras AR las que consumieron significativamente más etanol que cualquier otro grupo.

SECCIÓN II. *Caracterización del efecto estimulante motor agudo del etanol*

En la Sección I caracterizamos numerosos aspectos del fenómeno de activación motora inducida por alcohol en ratas adolescentes. En la Sección II buscamos llegar a una interpretación más acabada de lo que representa esta variable. Partimos de una consideración teórica de la estimulación motora como un indicador de reforzamiento apetitivo; la droga durante la curva ascendente del proceso tóxico -directa o indirectamente- activa la vía dopaminérgica mesocorticolímbica-; en la que las fibras se proyectan al área prefrontal desde el mesencéfalo hacia las regiones límbicas y corticales, que además sería responsable de la conducta de acercamiento y el reforzamiento asociado a otros reforzadores (e.g., comida, agua; Wise y Bozarth, 1987).

Una alternativa, sin embargo, era que el alcohol estuviera ejerciendo efectos ansiolíticos en el contexto de evaluación –nuevo- que estábamos empleando. La prueba de campo abierto también ha sido empleada para evaluar los efectos ansiolíticos de drogas de abuso (Choleris et al., 2001; Fraser et al., 2010; Prut et al., 2003; Ramos, 2008; Ramos y Mormede, 1998). Era posible, también, que la activación motora medida en nuestros experimentos estuviera reflejando una combinación de ambos efectos; esto es apetitivo y ansiolítico. El peso específico de cada uno de estos efectos podría, a su vez, variar según el período ontogénico bajo consideración. Los estudios han demostrado que las ratas infantiles y adolescentes muestran activación motora inducida por la exposición aguda al etanol (Acevedo et al., 2010; 2013, Arias et al., 2008; 2009b). En ratones, los estudios sugieren que a medida que el organismo crece, el efecto estimulante motor agudo de etanol disminuye (Little et al., 1996; Quoilin et al., 2012). Asimismo el efecto de supresión motora inducido por etanol en ratones, medido mediante la pérdida de reflejo de enderezamiento, es mayor en los adultos que en adolescentes (Quoilin et al., 2010).

Otro componente importante era que en esta tesis se analizó locomoción en un campo abierto que era nuevo para las ratas. Esto dejaba abierta la posibilidad que la activación motora observada fuera producto de una interacción entre la droga y efectos estimulantes inespecíficos ligados a la novedad de contexto de evaluación. Originalmente la prueba de campo abierto fue desarrollada para el estudio de la “emocionalidad” en ratas por Hall en el año 1934. El procedimiento consistía en exponer al animal a un entorno desconocido, en el cual el escape estaba impedido por las paredes que colindaban. Generalmente, los animales expuestos a estímulos extraños o nocivos muestran una reacción de congelamiento, es decir el animal queda inmóvil (Ennaceur et al., 2006). La exposición a ambientes nuevos induce respuestas de ansiedad y reacciones de congelamiento en una variedad de paradigmas de comportamiento (Crawley, 1985; Ennaceur et al., 2006). Diversos autores consideran

(para revisión y referencias; véase Ramos y Mormède, 1998) que una baja ambulación de un espacio nuevo es un indicador de ansiedad.

Con el tiempo el empleo de esta herramienta se ha extendido a un gran número de especies, incluyendo los terneros, cerdos, corderos, conejos, gallinas, primates, abejas, etc. Más importante aún, no solo se ha utilizado para medir indicadores de ansiedad, sino también sedación o actividad (Prut y Belzung, 2003). Consideramos importante indagar sobre el rol de la novedad en la mediación de los efectos estimulantes del alcohol en ratas adolescentes. Se intentaba desestimar la posibilidad que los efectos estimulantes del alcohol estuviesen reflejando efectos ansiolíticos de la droga, que facilitarían la exploración del contexto de evaluación. También realizamos comparaciones entre adolescentes y adultos en la expresión de estos efectos del alcohol.

Para responder a estos interrogantes se condujeron los siguientes experimentos:

En el *Experimento 6* evaluamos el rol de la novedad sobre la respuesta locomotora inducida por etanol en ratas adolescentes. En el *Experimento 7 y 7b* evaluamos adolescentes y adultos en relación a activación motora inducida por etanol y los niveles de etanol en sangre alcanzados en dichas pruebas.

En el *Experimento 8* continuamos el análisis ontogénico de la respuesta estimulante hacia el etanol, su modulación por exposición a estímulos aversivos, y ampliamos la generalidad de nuestros resultados mediante el empleo de otra cepa de rata. Específicamente, evaluamos la respuesta estimulante motora inducida por alcohol luego de la exposición a estrés social o inducido por inmovilización, así como también niveles de etanol en sangre y cerebro, corticosterona y progesterona (*Experimento 8b*) en ratas machos Sprague-Dawley adultas y adolescentes. Sobre la base de los resultados anteriores profundizamos más sobre el efecto estresante de la privación social; para ello, en el *Experimento 9* evaluamos la sensibilidad hacia magnitudes diferentes de privación social sobre la locomoción inducida por etanol en ratas machos Sprague-Dawley adultas y adolescentes. En el *Experimento 10* incorporamos otra modalidad para inducir estrés, más específicamente, ejercimos estrés farmacológico mediante la inyección de un agonista opiáceo kappa y analizamos, en ratas adolescentes Sprague-Dawley, su efecto sobre la activación motora inducida por etanol.

Finalmente, en el *Experimento 11*, buscamos comprender el significado funcional del efecto estimulante que inducía la administración de etanol. Hasta el momento la respuesta había sido considerada una medida apetitiva reforzante; no obstante, una explicación alternativa podía ser que el etanol estuviera disminuyendo la ansiedad provocada por el ambiente nuevo; y por tanto, facilitara la

exploración al mismo. En este sentido evaluamos el efecto agudo de la administración de la droga en tres pruebas de comportamiento diferentes conocidas por su capacidad para registrar actividad y ansiedad. Asimismo, analizamos cómo la experiencia con la droga se traducía posteriormente en un consumo voluntario de la misma.

Consideraciones Generales de los Experimentos de la Sección II

Materiales y Procedimientos Específicos

Sujetos

Un total de 1135 ratas, derivadas de 252 camadas fueron utilizadas. 538 eran ratas Sprague-Dawley (*Experimento 8*: 288 animales, 64 camadas; *Experimento 8b*: 22 animales, 24 camadas; *Experimento 9*: 138 animales; 29 camadas; *Experimento 10*: 80 animales; 12 camadas) y 597 eran ratas Wistar-King Aptekman Hokkaido (WKAH/Hok), cepa exocriada (*Experimento 11*: 246 animales; 46 camadas; *Experimento 6*: 91 animales, 27 camadas; *Experimento 7*: 144 animales, 30 camadas; *Experimento 7b*: 73 animales: 24 camadas). El empleo de cepas diferentes obedeció a que la doctorando realizó parte del proyecto en el Departamento de Psicología de la Universidad Estatal de Binghamton, NY, EE.UU, en carácter de pasantía. Esta última se correspondió con los *Experimentos 8, 8b, 9 y 10*.

Las ratas Sprague-Dawley nacieron y fueron criadas en el Center for Development and Behavioral Neuroscience (Binghamton University, NY, USA), mientras que las ratas Wistar lo hicieron en el Instituto de Investigación Médica M y M Ferreyra (INIMEC-CONICET-UNC, Córdoba, Cba, Argentina). El día de su nacimiento se consideró el día postnatal 0 (DP0). Las crías permanecieron alojadas con sus madres en cajas de maternidad estándar hasta el día del destete (DP21). Posteriormente, los animales eran alojados 4 por caja con libre acceso a comida balanceada (Purina Rat Chow, Lowell, MA o GEPSA feeds, Córdoba, Argentina; respectivamente) y agua hasta el comienzo de cada experimento.

Preparación de las drogas y procedimientos de administración

Las administraciones de etanol se realizaron vía intragástrica (i.g.) mediante una cánula de polietileno esterilizada de 12 cm de largo aproximadamente (de 0,58 mm de diámetro interno, PE-50 Clay Adams, Parsippany, New Jersey, USA), adosada a una jeringa descartable de 3 ml mediante una aguja hipodérmica de 0,60 mm x 25 mm – 23Gx1 (Becton Dickinson, Rutheford, NJ). Las dosis de etanol utilizadas (3,5; 3,25; 2,5; 1,25 o 0,5 g/kg) resultaron de la administración de un volumen equivalente a 0,015 ml por kilogramos de peso corporal de soluciones de etanol de 29,4%, 27,3%, 21%, 10,5% o 4,2% v/v, respectivamente (190 proof ethanol, Pharmaco, Brookfield, CT o Porta Hnos., Córdoba, Argentina; respectivamente). Un volumen similar de agua corriente de pico se

utilizó como vehículo. Cada animal fue cuidadosamente entubado en 5 segundos aproximadamente y la administración de las soluciones demoraba unos 3 a 4 segundos más.

Las administraciones de espiradolina (U62, 066E; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) se realizaron vía intraperitoneal (i.p.). Las dosis utilizadas (1,0 o 5,0 mg/kg) se derivaron de una solución de 0,1 y 0,5 mg/ml, respectivamente. Cada inyección no demoraba más de 10 segundos entre animales. El volumen administrado para las dosis se obtuvo a 0,01 ml/g, y como vehículo se utilizó salina (CINa 0,9%, v/v).

Condiciones de alojamiento durante los entrenamientos y evaluaciones

Los animales fueron alojados en algunos casos de a pares, de a cuatro y hasta 5 animales por caja, con compañeros del mismo sexo y edad según el tiempo que requiriese cada protocolo experimental. El objetivo de esto era minimizar cualquier condición potencialmente estresante y que pudiera modificar o interactuar con las medidas en estudio. Sólo, en los momentos en que cada protocolo experimental así lo demandase (véase, específicamente cada experimento) los animales permanecieron alojados individualmente por algunas minutos u horas de un mismo día.

Análisis de Datos

La actividad locomotora en segundos recorridos fue analizada separadamente a través de ANOVAs de tres vías (*Experimento 6, 7, y 11*). Los factores entre-grupo fueron el sexo (machos o hembras, *Experimento 6, 7 y 11*), dosis de etanol (*Experimento 6*: 0,0, 2,5 o 3,25 g/kg; *Experimento 7*: 0,0; 0,5; 2,5 o 3,25 g/kg; *Experimento 11*: 0,5; 1,25; 2,5 o 3,25 g/kg), orden de presentación de pruebas (LEC-CA o CA-LEC, *Experimento 11*), edad (adultos o adolescentes; *Experimentos 7*) y habituación al contexto (habitua-do- no habitua-do, *Experimento 6*).

Los niveles de etanol en sangre –NES [mg/dl]- (*Experimento 7b*) se analizaron a partir de un ANOVA mixto de tres vías. La edad (adolescentes o adultos), el sexo (machos o hembras) y dosis de etanol (0,5; 2,5 o 3,25 g/kg) se consideraron como factores entre-grupo; y como medidas repetidas se consideraron los tiempos post-administración de extracción de muestras (15, 30, 60 o 120 min)

En el *Experimento 8* los ANOVAs indicaron diferencias significativas entre los adultos y adolescentes en referencia a la actividad espontánea y la locomoción inducida por el etanol. En base a estos resultados, como así también, a partir de la estrategia seguida por Pautassi et al. (2008b) y Varlinskaya y Spear (2012), los análisis subsiguientes se llevaron a cabo separadamente por edad en los *Experimentos 8 y 9*. Véase en detalle apartado de resultados del *Experimento 8*.

La actividad motora inducida por etanol, (distancia recorrida expresada en centímetros por minutos) fue analizada separadamente a través de ANOVAs mixtos de tres (*Experimento 8 y 9*) o cuatro vías (*Experimento 10*). En el *Experimento 8* los factores entre-grupo fueron estrés (sin manipulación, restricción de movimiento o privación social durante 90 min cada condición), y dosis de etanol (0,0; 1,25; 2,5 o 3,5 g/kg). En el *Experimento 9* los factores entre-grupo fueron estrés (sin manipulación, privación social durante 90 o 180 min) y dosis de etanol (0,0 o 3,5 g/kg). En el *Experimento 10* fueron sexo (hembras o machos, todos adolescentes), dosis de agonista kappa U62, 066E (0,0; 1,0 o 5,0 mg/kg) y dosis de etanol (0,0 o 2,5 g/kg). En todos los experimentos los minutos de evaluación (5–19 post-administración) se consideraron como medidas repetidas.

En el *Experimento 8b* los NES, NEC, CORT y PROG fueron analizados separadamente mediante ANOVAs de una vía. Los grupos que se compararon fueron ratas machos adolescentes y adultas expuestas a 90 min de privación social y un grupo control de adolescentes sin manipulación. En el *Experimento 10* se analizaron, además, los NES mediante un ANOVA de dos vías (dosis de agonista kappa U62, 066E: 1,0 o 5,0 mg/kg x sexo: machos o hembras).

Para conocer la dirección de los efectos principales o interacciones encontradas mediante los ANOVAs se realizaron pruebas de post hoc Fisher o comparaciones planeadas. Expresamente, se empleó Fisher siempre que los análisis de efectos principales simples o en la interacciones comprendieran factores “entre”. Se utilizaron comparaciones planeadas ortogonales, en tanto, para conocer la dirección de los efectos principales o interacciones significativas que involucraran medidas repetidas. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

Experimento 6: Rol de la novedad del contexto sobre la Actividad Locomotora inducida por Etanol en Ratas Adolescentes

Introducción

La evaluación de la activación inducida por etanol en los experimentos que anteceden fueron realizados en contexto nuevos, es decir que animales no habían sido previamente familiarizados con el ambiente de evaluación. En algunas ocasiones las drogas de abuso ejercen efectos diferenciales en función del contexto donde son administradas. Se ha observado, por ejemplo, que el efecto motor agudo y la sensibilización inducida por anfetamina son significativamente más marcados cuando el contexto de evaluación es novedoso (Badiani et al., 2000). Era posible entonces que los efectos estimulantes del etanol observados en los experimentos previos dependieran o fueran modulados por la novedad del ambiente de evaluación. El **objetivo específico** de este experimento fue evaluar el rol de la novedad en la expresión de activación locomotora inducida por etanol en la rata adolescente. Para ello, los animales adolescentes fueron sometidos o no a una sesión de familiarización al contexto. Buscábamos conocer si la magnitud de la activación motora inducida por la droga en el grupo de animales que había sido familiarizado con el contexto era significativamente menor que la que se observaría en el grupo que recibía etanol pero que no había sido expuesto previamente al contexto. Si ese resultaba el caso podíamos interpretar que la novedad posee un efecto modulador sobre la expresión de la activación motora inducida por alcohol.

Diseño Experimental

Se empleó un diseño factorial 2 (sexo: macho o hembra) x 2 (tratamiento al DP28: habituados, o no, al ambiente) x 3 (tratamiento con etanol al DP32: 0,0; 2,5 o 3,25 g/kg). Cada uno de los 12 grupos tenía un mínimo de 6 y un máximo de 8 animales.

Procedimientos Específicos

El DP32 los animales eran evaluados en un ambiente al cual, cuatro días antes (i.e., al DP28) habían sido o no expuestos durante 7 minutos. Se emplearon las mismas cajas de evaluación que en el *Experimento 1* (véase aparatado de procedimientos). Todos los animales recibían una administración i.g. de etanol (0,0; 2,5 o 3,25 g/kg) y cinco minutos después se evaluaba la actividad locomotora en el ambiente durante 7 minutos.

Resultados

El ANOVA para la actividad locomotora arrojó efectos principales significativos de la habituación previa al contexto ($F_{1,73} = 34,92$; $p < 0,01$), y de tratamiento con etanol al DP32 ($F_{2,73} = 3,31$; $p < 0,05$). No se observó una interacción significativa entre los factores. Las pruebas post hoc indicaron que la actividad locomotora en el campo abierto era significativamente mayor cuando el contexto era nuevo para el animal (Figura 14, panel a). A su vez, se observó que el grupo administrado con 2,5 g/kg etanol -pero no el que recibió 3,25 g/kg- exhibió significativamente mayor activación locomotora que el grupo control administrado con vehículo (0,0 g/kg) (Figura 14, panel b). Estos resultados indican, que bajo las condiciones de este Experimento, la actividad motora general disminuye cuando el ambiente deja de ser nuevo para el animal. Este efecto, sin embargo, parece no impedir la expresión del efecto estimulante del etanol. En conjunto, estos resultados sugieren que los efectos estimulantes de la droga no dependen solamente de una facilitación de la exploración inducida por la novedad del ambiente.

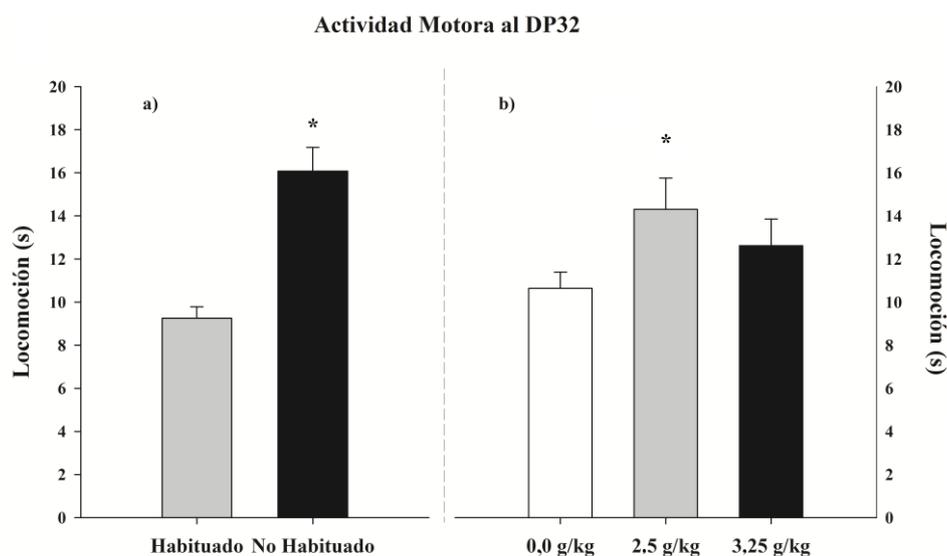


Figura 14. Total de actividad motora en campo abierto (locomoción, segundos) en ratas adolescentes que recibieron una administración de etanol (2,5 o 3,25 g/kg) o vehículo (0,0 g/kg) y que habían sido, o no, expuestas al ambiente de evaluación en el DP28 durante 7 minutos. El *panel (a)* grafica el efecto principal de habituación, en el que se observa significativamente mayor locomoción en el grupo de animales que no fueran familiarizados (habitados) previamente al contexto de evaluación. El *panel (b)* refleja el efecto principal de tratamiento con etanol, el cual indicó que la dosis de 2,5 g/kg indujo activación motora, y que esta fue estadísticamente similar en sujetos expuestos y no expuestos a la sesión de habituación. Los datos fueron colapsados por el factor de sexo. Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de animales habituado y el grupo de animales no habituado al contexto de evaluación (panel a; $p < 0,01$); y entre los grupos de animales que recibieron las dosis de 2,5 g/kg y 0,0 g/kg (panel b; $p < 0,05$). Las barras verticales indican el error estándar de la media (EEM).

Experimento 7: *Estudio de los efectos estimulantes motores y ansiolíticos inducidos por dosis variadas de etanol en ratas Wistar exocriadas adolescentes y adultas.*

Introducción

Se ha observado que las ratas adolescentes son menos sensibles que los adultos a numerosos efectos del alcohol, por ejemplo, a la narcosis (Silveri y Spear, 1998) y a las alteraciones motoras (Little et al., 1996) inducidas por esta droga. Estas diferencias pueden deberse en parte a que los adolescentes, pero no adultos, muestran una tolerancia aguda al etanol (Silveri y Spear, 2004). Del mismo modo, la administración de dosis bajas o moderadas de etanol induce facilitación social y supresión social, en adolescentes y adultos, respectivamente (Varlinskaya y Spear, 2002). Esta sensibilidad diferencial hacia el etanol de los adolescentes podría ponerlos a riesgo para el desarrollo de problemas asociados al psicotrópico.

Se ha sugerido que la búsqueda e ingesta de etanol se encuentran principalmente moduladas por el equilibrio entre los efectos apetitivos, aversivos y/o ansiolíticos de la droga (Roma et al., 2008). Al respecto, se ha observado que los adolescentes muestran, respecto de sus pares adultos, una sensibilidad disminuida hacia los efectos aversivos de etanol (Anderson et al., 2010; Schramm-Sapyta et al., 2010; Vetter-O'Hagen et al., 2009). Más específicamente, las ratas adultas evitan un sabor asociado a los efectos de dosis de etanol $\geq 1,0$ g/kg, mientras que dicha evitación se observa en los adolescentes sólo después de dosis de etanol $\geq 2,0$ g/kg (Anderson et al., 2010). Recientemente, Varlinskaya y Spear (2010; 2012) observaron que la administración de dosis (0,25; 0,5; 0,75 y 1,0 g/kg) de etanol revertía el estrés generado por la restricción del movimiento en ratas adolescentes, pero no en adultas. Poco se conoce, sin embargo, sobre la sensibilidad hacia los efectos apetitivos del etanol en las diferentes edades. Algunos estudios han encontrado preferencia al lugar asociados a los efectos del etanol en los adolescentes, aunque no en adultos (Pautassi et al. 2008b; Philpot et al., 2003).

En ratones, la exposición aguda del etanol induce activación motora mientras la exposición crónica genera un aumento progresivo de la actividad motora, fenómeno conocido como sensibilización motora (Faria et al., 2008). La sensibilización motora inducida por etanol ha sido un fenómeno difícil de observar en ratas (Masur et al., 1980). Los estudios que analizan dicha sensibilidad en ratas se han concentrado primordialmente en animales adultos; observando efectos depresores (Chuck et al., 2006; Cunningham et al., 1993). No obstante, otros estudios han demostrado que las ratas infantiles y adolescentes muestran activación motora inducida por la exposición aguda al

etanol (Acevedo et al., 2010; 2013; Arias et al., 2008; 2009b) y que esta activación es inhibida por tratamientos que afectan la sensibilización motora inducida por etanol en los ratones, entre ellos el antagonismo de los receptores dopaminérgico D1 y opioides mu y delta. Por otra parte, el curso temporal de los efectos agudos motores del etanol (Arias et al., 2008) y los efectos motivacionales (Molina et al., 2006; 2007, Nizhnikov et al., 2009) es similar. En conjunto, estos estudios sugieren que los efectos agudos motores de actividad inducidos por el etanol pueden servir como medida de reforzamiento positivo (Pautassi et al., 2009). Los estudios con ratones sugieren que, a medida que el organismo se desarrolla, el efecto estimulante motor agudo de etanol disminuye (Little et al., 1996; Quoilin et al., 2012) y el efecto de supresión motora (por ejemplo, medido mediante la pérdida de reflejo de enderezamiento) aumenta (Quoilin et al., 2010). De manera similar, Arias et al. (2009b) encontraron una disminución de la sensibilidad motora inducida por el efecto agudo del etanol entre la segunda y tercera semana de vida de la rata. Consideramos necesario analizar la sensibilidad a los efectos estimulantes motores del etanol en ratas adolescentes, y compararla con la exhibida por sujetos adultos.

Con el fin de maximizar la posibilidad de expresión de nuestra hipótesis (i.e., efectos diferenciales del etanol en función de la edad), el presente experimento empleó un abanico de dosis de etanol. A este diseño dosis-respuesta se le sumó el uso de ambos sexos y una medición más detallada de la actividad locomotora. En adición a la medición general de duración de locomoción se analizó el tiempo pasado en el centro y periferia del campo abierto. El tiempo pasado en la parte central de este aparato, así como de la relación centro/ total de locomoción; la disminución de la latencia para entrar en la parte central, o bien su inversa, el grado observado de tigmotaxis (ambulación en contacto con las paredes) (véase, Carola et al., 2002; Choleris et al., 2001; Kliethermes, 2005; Prut et al., 2003; Ramos et al., 1997; 1998; 2008) pueden tomarse como indicadores de “emocionalidad” (ansiedad). Este abordaje fue la primera aproximación que empleamos para mejorar la comprensión del significado biológico de la estimulación motora inducida por el alcohol.

Diseño Experimental

Se utilizó un diseño factorial 2 (sexo: machos o hembras) x 2 (edad: adolescentes o adultos; DPs 28 o 74, respectivamente) x 4 (Tratamiento con Etanol: 0,0; 0,5; 2,5 o 3,25 g/kg). Se utilizaron 16 grupos finales. Se emplearon 8 animales por cada condición experimental. Al DP 28 o 74, los animales fueron evaluados en campo abierto luego que recibieran una administración intragástrica (i.g.) de etanol.

Procedimientos Específicos

Al día post-natal 28 o 74 (adolescentes y adultos, respectivamente), ratas Wistar machos y hembras recibieron una administración intragástrica de etanol (0,0; 0,5; 2,5 o 3,25 g/kg) y luego fueron evaluados en un campo abierto (30 x 30 x 30 cm, o 50 x 50 x 50 cm; para adolescentes y adultos, respectivamente) durante 7 minutos (tiempo post-administración: 5-11 min). Se midieron la duración total de locomoción y el tiempo de permanencia en la zona central del campo abierto. La locomoción se consideró como una medida de activación inducida por etanol, mientras que tiempo en el centro de la caja se consideró como un indicador de nivel de ansiedad. También se midieron conductas verticales: escalamiento –“wall-climbing”- y erguimiento –“rearing”-. El escalamiento se registraba cuando los animales se paraban sobre sus patas traseras con las patas delanteras apoyadas sobre las paredes de la caja, en tanto que si no apoyaban sus patas delanteras la conducta era clasificada como erguimiento

Resultados

El ANOVA para locomoción indicó efectos principales de edad, sexo y tratamiento con etanol ($F_{1,111} = 21,11$; $F_{1,111} = 10,47$; y $F_{3,111} = 7,24$; $p_s < 0,001$, respectivamente), así como una interacción significativa entre sexo y edad, $F_{1,111} = 7,56$; $p < 0,01$. La locomoción general fue significativamente mayor en las hembras adultas que en el resto de las combinaciones de sexo y edad. Un resultado importante fue que el alcohol indujo activación motora y que este efecto estimulante fue similar en ambas edades (véase Figura 15). Pruebas post-hoc indicaron que los animales administrados con la dosis de 3,25 g/kg exhibieron mayor locomoción que los controles, en tanto que la comparación entre el grupo control (0,0 g/kg) y el administrado con la dosis 2,5 g/kg arrojó una significancia fronteriza ($p = 0,06$).

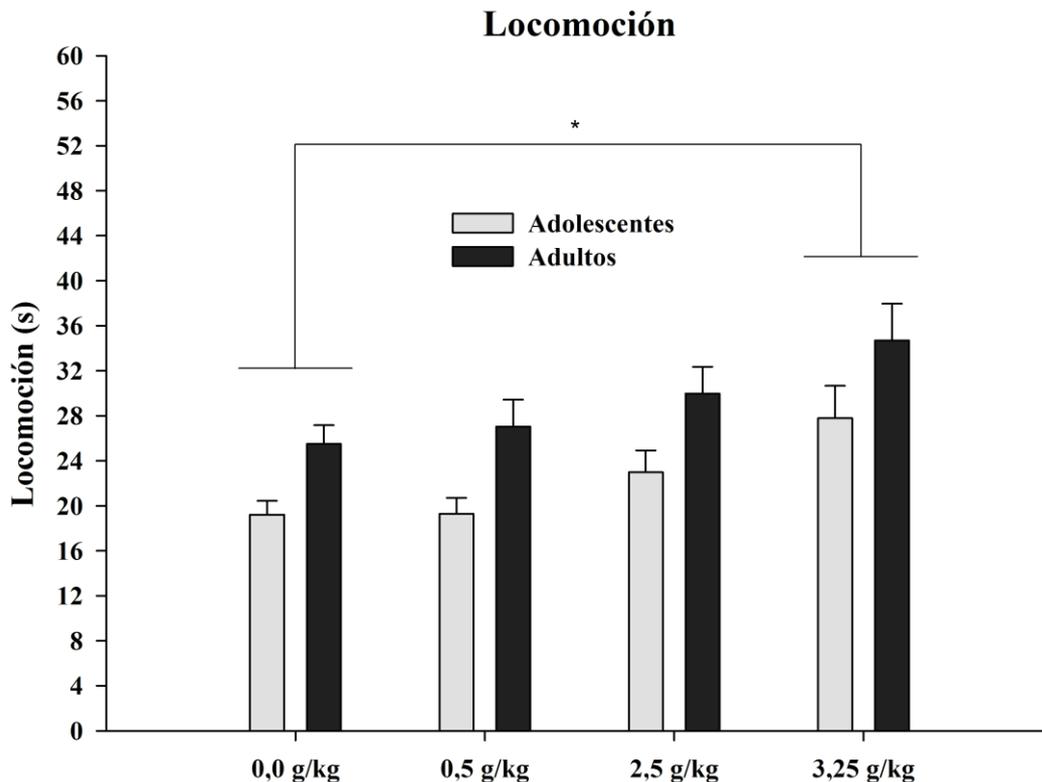


Figura 15. Total de actividad motora (s) en campo abierto en ratas adolescentes y adultas que recibieran dosis de etanol (0,0; 0,5; 2,5 o 3,25 g/kg). Los datos fueron colapsados por el factor sexo. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de animales que recibió la dosis de 3,25 g/kg y el grupo que recibió 0,0 g/kg ($p < 0,001$). Las barras verticales indican el error estándar de la media (EEM).

Estos resultados confirman que, a pesar de ampliar el abanico de dosis bajo análisis, los adolescentes y adultos no exhibieron diferencias en actividad inducida por el etanol, al menos bajo las condiciones experimentales del presente experimento.

El tiempo pasado en la zona central en el campo abierto fue similar para los adolescentes y los adultos que fueron tratados con vehículo, lo que sugiere que ambas edades expresaban similares niveles de ansiedad basal. Sin embargo, los adultos –pero no los adolescentes– que recibieron las dosis 2,5 y 3,25 g/kg de etanol, permanecieron significativamente menos tiempo en el centro, en comparación con controles de la misma edad tratado con vehículo ($F_{3,111} = 3,98$; $p < 0,01$; véase, Figura 16). Este resultado sugiere que estas dosis de etanol incrementaron la ansiedad en las ratas adultas, pero no en las adolescentes. El resultado es consistente con estudios previos (Varlinskaya y Spear, 2002), donde los adolescentes fueron resistentes al efecto no ansiolítico del alcohol, medido en una prueba de ansiedad social.

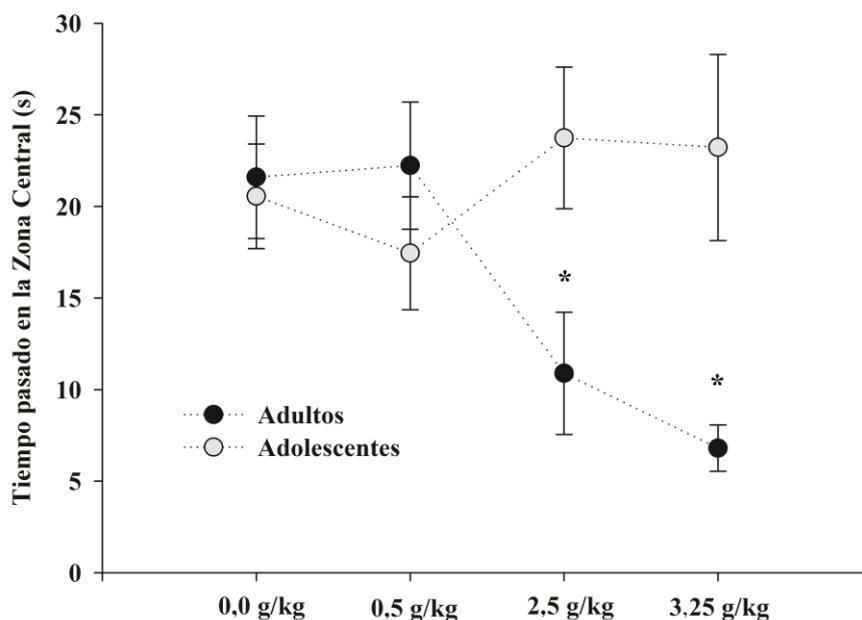


Figura 16. Tiempo pasado (segundos) en la zona central de un campo abierto en ratas adultas y adolescentes administradas con etanol (0,0; 0,5; 2,5 o 3,25 g/kg). La información está colapsada por el factor de sexo. Los asteriscos (*) indican una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de adultos tratados con las dosis 2,5 y 3,25 g/kg y los dos grupos de adultos restantes ($p < 0,01$). Las barras verticales representan los EEM.

En otros resultados, la Figura 17 indica que los animales que recibieron las dosis de 2,5 y 3,25 g/kg, pero no la dosis de 0,5 g/kg de etanol, exhibieron una disminución significativa en las conductas verticales: escalamiento y erguimiento ($F_{3,111} = 4,60$; $p < 0,01$; $F_{3,111} = 8,67$; $p < 0,05$; respectivamente), en comparación con animales controles tratados con vehículo. Nuevamente, no se observaron diferencias significativas entre las dos edades en este aparente efecto depresor motor inducido por el etanol.

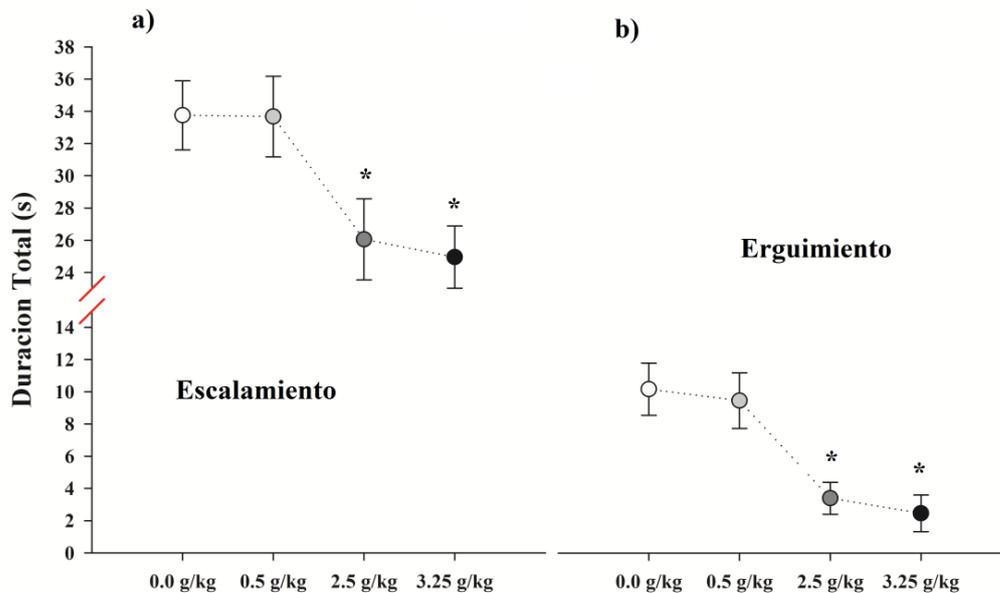


Figura 17. Duración Total (s) de conductas verticales en campo abierto. Panel (a) el gráfico indica conducta de escalamiento, mientras que panel (b) representa la conducta de erguimiento. Ambos comportamientos provienen de ratas que recibieron administraciones de etanol (0,0; 0,5; 2,5 o 3,25 g/kg). La información está colapsada por el factor de sexo y edad. Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con las dosis 2,5 y 3,25 g/kg y los dos grupos restantes en escalamiento ($p < 0,01$) y erguimiento ($p < 0,05$). Las barras verticales representan los EEM.

En conclusión, este experimento mostró que tanto adolescentes como adultos exhibieron similar activación locomotora inducida por etanol. Esta activación motora se expresó contundentemente en la dosis de 3,25 g/kg y en menor medida en la dosis de 2,5 g/kg. Posiblemente, el hecho que esta última dosis no haya sido tan efectiva como en experimentos anteriores obedezca a diferencias en el tipo de crianza de los animales utilizadas (endocriadas en los anteriores experimentos, exocriadas en el presente experimento). En general, los animales endocriados expresan una menor variabilidad en la respuesta y son, por lo tanto recomendadas para estudios en que se buscan diferencias sutiles dosis-respuesta (Festing, 2010).

Si bien nuestra expectativa era encontrar mayor sensibilidad a los efectos estimulantes del alcohol en adolescentes, la ausencia de esta diferencia ontogenética no es completamente inconsistente con la literatura. Estudios previos a menudo han observado diferencias en sensibilidad hacia los efectos motivacionales del alcohol (e.g., Anderson et al., 2010; Pautassi et al., 2008b); pero algunos han observado similar sensibilidad en ambas edades. Por ejemplo Redolat et al. (2009) y Rezvani y Levin (2004) midieron efecto estimulante motor en adolescentes y adultos, y observaron resultados similares a los aquí reportados.

En general, la rata es una especie donde los efectos depresores del alcohol son más fácilmente observables que los efectos estimulante motores (Chuck et al., 2006, Rezvani y Levin., 2004). Algunas diferencias metodológicas entre estos estudios y el presente podrían explicar la relativa facilidad con la que hemos detectado el efecto estimulante. En la mayoría de los estudios previos se ha utilizado la vía intraperitoneal, la cual usualmente favorece una tasa de absorción más rápida y niveles de alcohol en sangre mayores en la misma unidad de tiempo que la vía intragástrica (Walker y Ehlers, 2009). Por lo tanto, es posible que la vía i.p. favorezca la emergencia de efectos depresores y aversivos. Por ejemplo, se ha observado que ratas Marchigian Sardinian exhiben AAS inducido por alcohol cuando la droga es administrada i.p pero no cuando es dada vía i.g. (Cicocioppo et al., 1999). Por otro lado, las dimensiones del campo de evaluación utilizadas en el presente experimento, son mayores a la utilizadas en Chuck et al. (2006), o en Rezvani y Levin (2004).

Experimento 7b: *Niveles de Etanol en Sangre (NES) en Ratas Wistar exocriadas adolescentes y adultas (DPs 28 o 74, respectivamente) en función de dosis variadas de etanol y en diferentes momento de la curva de etanol en sangre.*

Introducción

El propósito del experimento fue analizar los NES en ratas adolescentes y adultas, tanto en machos como en hembras, luego de la administración de diferentes dosis de etanol y a diferentes tiempos post-administración, a fin de establecer el perfil metabólico de la curva de etanol en sangre. El objetivo era conocer el nivel de alcoholemia asociado a los efectos observados en los experimentos previos e indagar posibles diferencias farmacocinéticas entre adultos y adolescentes.

Diseño Experimental

Se utilizó un diseño factorial 2 (sexo: machos o hembras) x 2 (edad: adolescentes o adultos; DPs 28 o 74, respectivamente) x 3 (tratamiento con etanol: 0,5; 2,5 o 3,25g/kg). Se utilizaron 12 grupos finales. Se emplearon 6-7 animales por cada condición experimental. Al DP 28 o 74 recibieron una administración i.g con alguna de las 3 dosis de etanol y se tomaron 4 muestras de sangre de cada individuo, a los 15, 30, 60 y 120 min post-administración.

Procedimientos Específicos

Los animales adolescentes o adultos fueron sujetos una intervención quirúrgica que permitía recoger muestras seriadas de sangre de la aurícula derecha a través de un catéter (cánula) implantado en la vena yugular externa derecha de las ratas. Para ello se usó una cánula de 13 cm aproximadamente (de polietileno, PE-50) y una aguja calibre 21 G que se utilizaba para insertar el catéter y que además se adosaba a una jeringa descartable de 3 ml que contenía solución salina fisiológica 0,9%. La punta de la aguja se cortaba y se limaba hasta que la superficie quedara suave, de modo de evitar se doblara durante el proceso obstruyendo el catéter. Para una mayor descripción, véase Thrivikraman et al. (2002)

Un día después de la cirugía, para verificar la permeabilidad de la cánula se infundía una porción de solución fisiológica heparinizada y se esperaba 30 minutos hasta realizar la primera extracción de sangre. Quince minutos después de aplicar el anticoagulante los animales recibían una administración i.g. de etanol (0,5; 2,5 o 3,25 g/kg). Por cada animal se obtenían cuatro muestras de sangre, correspondiente a los minutos 15, 30, 60 y 120 post-administración. En cada ocasión se

recolectaban 0,1 ml (100 ul) de sangre e inmediatamente después se reponía el mismo volumen con solución salina fisiológica. El procedimiento en su totalidad no implicaba la extracción de más de 1% de volumen sanguíneo. Las muestra se almacenaban en viales color jarabe y se conservaban a -70°C hasta el momento en que se analizaban, por medio de un cromatógrafo de fase gaseosa (Hewlett Packard 5892 Series II - Gas Chromatograph). Los NES se expresaron como miligramos por decilitro de fluido corporal ($\text{mg/dl} = \text{mg}\%$).

Resultados

Se realizó un ANOVA mixto de 4 vías. Como factores entre-grupos se consideraron el sexo (machos o hembras), edad (adolescentes o adultos) y tratamiento con etanol (0,5; 2,5 o 3,25 g/kg); y como medidas repetidas los tiempos post-administración en que se realizaban las muestras (15, 30, 60 y 120 min). Los análisis indicaron efecto principal significativo de tratamiento con etanol ($F_{2,59} = 65,82$; $p < 0,001$), una doble interacción significativa entre tratamiento con etanol y tiempo post-administración ($F_{6,177} = 6,77$; $p < 0,001$); y una triple interacción significativa entre sexo, tratamiento con etanol y edad ($F_{2,59} = 4,50$; $p < 0,05$). Pruebas *post hoc* confirmaron que, como podría esperarse, los NES derivados de las dosis de etanol más altas (2,5 y 3,25 g/kg) fueron, durante los dos primeros tiempos de post-administración (15 y 30 min), significativamente mayores que los derivados de la dosis más baja (0,5 g/kg). Los NES inducidos por las dosis altas disminuyeron significativamente a partir de la primera y segunda hora, en tanto que aquellos derivados de la dosis 0,5 g/kg se mantuvieron constantes a lo largo de los tiempos de post-administración siendo siempre menores a los valores alcanzados por las dosis mayores (Figura 18). En general adultos y adolescentes exhibieron similares NES, si bien los machos adultos administrados con 2,5 g/kg y las hembras adultas que recibieron 3,25 g/kg exhibieron un sutil, si bien significativo, incremento en NES en relación a los grupos adolescentes respectivos. En general, los resultados observados parecen indicar que la ausencia de diferencias en actividad inducida por alcohol entre adolescentes y adultos (i.e., *Experimento 7*) no obedece a diferencias en la farmacocinética del alcohol entre ambas edades.

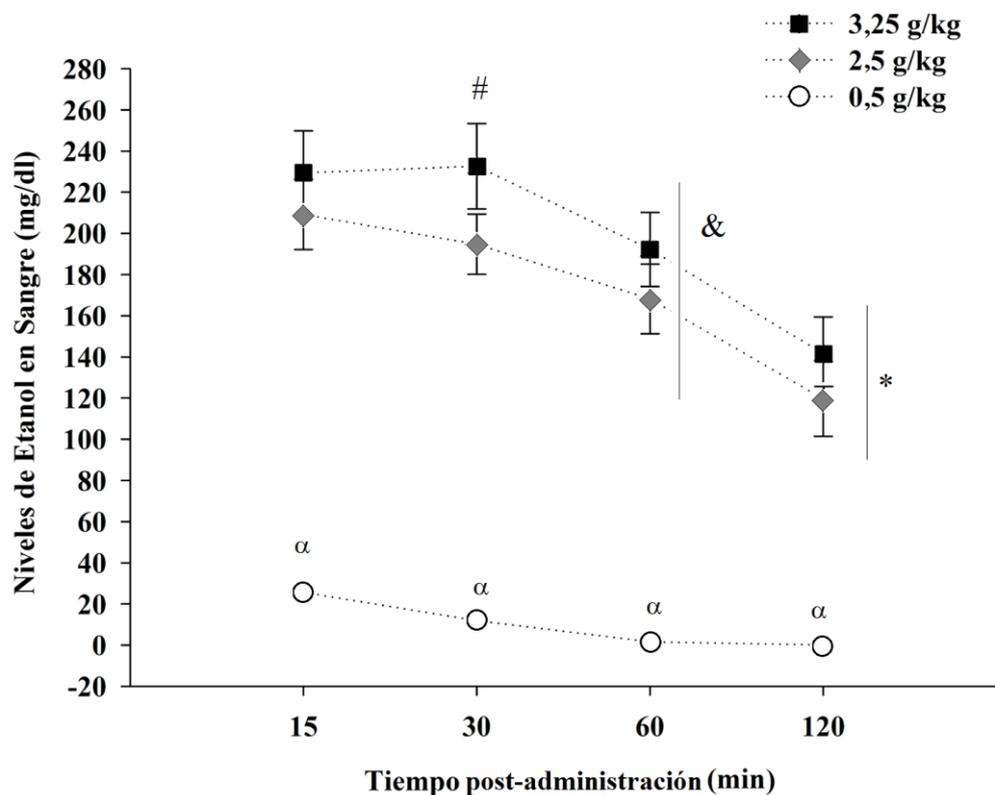


Figura 18. Niveles de etanol en sangre (mg/dl) en ratas que recibieron una administración i.g. de etanol (0,5; 2,5 o 3,25 g/kg), registrados a los 15, 30, 60 o 120 minutos posteriores a la intubación de la droga. La información está colapsada por el factor de edad y sexo. El asterisco (*) indica una diferencia significativa de los NES cuando se emplearon las dosis 2,5 y 3,25 g/kg al tiempo post-administración 120 respecto de los tres otros tiempos (15, 30 y 60). El signo *et* (&) indica una diferencia significativa de los NES cuando se emplearon las dosis 2,5 y 3,25 g/kg al tiempo post-administración 60 respecto de los tiempos post-administración (15 y 120). El numeral (#) indica una diferencia significativa de los NES al tiempo post-administración 30 entre las dosis 2,5 y 3,25 g/kg. La letras alfa (α) indican una diferencia significativa de los NES entre las dosis 0,5 g/kg y las dosis 2,5 y 3,25 g/kg en cada uno de los tiempos post-administración (15, 30, 60 y 120). En todas las diferencias $p < 0,001$. Las barras verticales indican el error estándar de la media (EEM).

Experimento 8: *Efectos de la exposición aguda al estrés sobre la activación motora inducida por etanol, en ratas machos Sprague-Dawley adultas y adolescentes.*

Introducción

La exposición al estrés está implicada en el consumo de drogas, el abuso y la recaída; y algunos estudios indican diferencias en la sensibilidad al estrés relacionadas con la edad. Por ejemplo, la privación social aumenta radicalmente las conductas relacionadas al juego en los adolescentes, pero en los adultos sólo las altera ligeramente (Doremus-Fitzwater et al., 2009; Varlinskaya y Spear, 2006). Asimismo, el estrés asociado con la mera inyección de drogas reduce de forma significativa la investigación social en los adolescentes, pero no en los adultos (Varlinskaya y Spear, 2010). Doremus-Fitzwater et al. (2009) observaron que los adolescentes eran más sensibles que los adultos a un número de respuestas fisiológicas inducida por la inmovilización o restricción del movimiento, entre ellas alteraciones en el peso corporal y aumento de los niveles de corticosterona inducidas por dicho estresor. La administración de etanol y el estrés provocado por la inmovilización inducen por sí mismos liberación de corticosterona (McCormick, 2010) -hormona que se ha observado induce propiedades reforzantes- (Piazza et al., 1991), y la modulación de la auto-administración de etanol (Fahlke y Hansen, 1999). En conjunto, estos estudios sugieren que -bajo ciertas circunstancias- los adolescentes serían más vulnerables que los adultos al estrés, y que la exposición a condiciones estresantes podría exacerbar el efecto estimulante motor provocado por la droga (Phillips et al., 1997)

Durante la adolescencia la interacción con congéneres se incrementa, tanto en frecuencia como en calidad, presumiblemente facilitando la independencia y la transición hacia la vida adulta (Spear, 2000). Se conoce, por ejemplo, que la exposición crónica a la restricción del movimiento –tratamiento también conocido como “restraint”- produce una disminución significativa en la investigación social tanto en adolescentes como en adultos, mientras que otras conductas -- como las relacionadas al juego -- no se ven afectada por este estresor (Doremus-Fitzwater et al., 2009), posiblemente porque los mecanismos neuronales que comparten no son comunes, y por ello ejercerían diferentes efectos en función de las edades (Vanderschuren et al., 1997). A su vez, la inhibición social provocada por la exposición crónica o aguda al estresor que se observa en los adolescentes y los adultos, logra revertirse en los más jóvenes tras la administración de dosis bajas-moderadas de etanol, un resultado probablemente causado por los efectos ansiolíticos de la droga (Varlinskaya y Spear, 2010; 2012). Generalmente, los adolescentes, pero no los adultos, son

sensibles a los efectos activadores del etanol sobre las conductas sociales (Varlinskaya y Spear, 2002).

Este experimento fue realizado en ratas macho Sprague-Dawley (SD), una cepa que habitualmente exhibe mayor consumo de alcohol que la cepa Wistar (Doremus et al., 2005) y en donde se han documentado gran parte de las diferencias ontogenéticas en relación a efectos hipnóticos y atáxicos del etanol. En este experimento analizamos el impacto de dos estresores (restricción de movimiento o privación social -90 min-) sobre la actividad locomotora inducida por etanol (0,0; 1,25; 2,5 o 3,5 g/kg) en ratas machos adolescentes y adultas (día postnatal 28 o 70, respectivamente). Las hipótesis eran que, a diferencia de lo observado en cepa Wistar, el tratamiento con etanol induciría mayor estimulación (y posiblemente menor depresión) motora en los adolescentes que en los adultos de la cepa Wistar; y que la exposición al estrés exacerbaría la activación motora inducida por el etanol, particularmente en los adolescentes.

Por otro lado, evaluamos la respuesta hormonal y farmacocinética hacia el estrés y el etanol con el fin de analizar posibles diferencias relacionadas a la edad. Específicamente, en el *Experimento 8b* medimos los niveles de sangre y en cerebro de etanol (NES y NEC, respectivamente), asimismo los niveles de corticosterona (CORT) y progesterona (PROG).

En el *Experimento 10* buscamos analizar el impacto del estrés farmacológico disparado por la estimulación endógena de receptores opiáceos kappa. Al respecto, la inyección de un agonista kappa reduce la locomoción en campo abierto en ratas adultas (Ukai y Kameyama, 1985), mientras que induce un incremento en esta conducta en ratas infantiles (Duke et al., 1997; Pautassi et al., 2012a). Se desconocía aún, que efectos provocaría la inyección del agonista kappa sobre actividad espontánea y/o la inducida por etanol en los adolescentes.

En definitiva en esta serie de experimentos buscábamos conocer el efecto del estrés sobre el efecto estimulante motor del etanol; y posibles diferencias entre edades en este efecto. Solamente se emplearon machos ya que los mismos ha sido usualmente el foco de los trabajos previos que, en esta cepa, analizaron diferencias ontogenéticas en relación al etanol (e.g., Broadwater y Spear, 2014).

Diseño Experimental

Se empleó un diseño 2 (edad DPs 28 o 70: adolescentes o adultos, respectivamente) x 3 (exposición a estrés: sin manipulación –control-, 90 minutos: restricción de movimiento –“restraint”- o privación social) x 4 (tratamiento con etanol: 0,0; 1,25; 2,5 o 3,5 g/kg). Se emplearon 12 animales por cada una de las 24 condiciones experimentales.

Procedimientos Específicos y Evaluación

Exposición al Estrés: en los días postnatales DPs 28 o 70 los animales se retiraban de sus cajas estándar de alojamiento durante 90 minutos y eran aleatoriamente distribuidos en las siguientes condiciones: a) restringidos de movimiento: estos animales eran confinados a un tubo de acrílico (Braintree Scientific, Braintree, MA) de tamaño y medidas acorde a las edades ($4,7 \times 15,24$ cm y $8,57 \times 21,51$ cm (diámetro x largo -adolescentes y adultos-; respectivamente), b) privados socialmente: alojados individualmente en cajas estándar; y c) grupo sin manipulación: alojados con un par de la misma camada y edad. Una vez transcurridos 90 minutos todos los animales recibían una dosis de etanol (0,0; 1,25; 2,5 o 3,5 g/kg).

Actividad Locomotora inducida por etanol posterior al Estrés: La evaluación de locomoción se realizaba, a partir del minuto 5 post-administración. Los animales eran apoyados en el centro de la caja de actividad ($42 \times 42 \times 31$) y se registraba la distancia total recorrida (cm) minuto a minuto durante 15 minutos (5-19 min post-administración) por medio de un sistema de monitoreo automatizado (Versamax; Accuscan Instruments, Columbus, OH).

Resultados

Los ANOVAs indicaron diferencias significativas entre los adultos y adolescentes en referencia a la actividad espontánea y la inducida por el etanol. Específicamente, a través de un ANOVA mixto de cuatro vías (edad x tratamiento con etanol x exposición a estrés x minutos de evaluación) se observó un efecto principal de edad ($F_{1, 264} = 11,09, p < 0,001$), una doble interacción entre edad x tratamiento con etanol ($F_{3, 264} = 17,40; p < 0,001$) y una triple interacción entre tiempo de evaluación, edad y tratamiento con etanol ($F_{42, 3696} = 3,48; p < 0,001$). Las pruebas post-hocs indicaron que los adultos mostraron significativamente mayor locomoción general que los adolescentes. A su vez, las ratas adolescentes pero no las adultas exhibieron activación motora inducida por etanol en comparación con sus pares de la misma edad tratados con vehículo, efecto que resultó significativamente más pronunciado durante los primeros 5 minutos de evaluación.

Las diferencias relacionadas con la edad sobre la locomoción inducida por las diferentes dosis de etanol durante los primeros 5 minutos de evaluación -cuando los efectos activadores eran máximos- fueron también analizadas a través puntuaciones z, con transformaciones llevada a cabo por separado para cada edad empleando los respectivos grupos controles (0,0 g/kg) como referencia. El ANOVA factorial (edad x tratamiento con etanol) sobre los valores estandarizados reveló un

efecto principal significativo de la edad, y una interacción significativa edad x tratamiento con etanol ($F_{1,210} = 81,16$; $p < 0,001$, $F_{2,210} = 4,56$; $p < 0,05$; respectivamente). Los adolescentes fueron significativamente más sensibles a la activación motora inducida por el etanol que los adultos, y este efecto se incrementaba con las dosis de etanol. Las medias y errores estándar de los puntajes de actividad estandarizados en adolescentes y adultos fueron: $1,83 \pm 0,28$; $2,76 \pm 0,32$; $3,03 \pm 0,73$ y $0,04 \pm 0,20$; $0,05 \pm 0,27$; $-1,10 \pm 0,26$; para los animales que recibieron las dosis 1,25; 2,5 y 3,5 g/kg de etanol, respectivamente. En base a estos resultados los análisis estadísticos en este y en el próximo Experimento se llevaron a cabo separadamente para cada edad.

Adolescentes: como se muestra en la Figura 19a, los adolescentes exhibieron mayormente efectos estimulantes del alcohol, siendo los efectos dependientes de las dosis y fueron más marcados durante la parte inicial de la evaluación (primeros minutos). El análisis estadístico arrojó efectos significativos principales de tratamiento con etanol y de minutos de evaluación ($F_{3,132} = 3,19$; $p < 0,01$; $F_{14,1848} = 451,72$; respectivamente, $p < 0,001$) y una interacción significativa entre estos factores ($F_{42, 1848} = 9,11$; $p < 0,001$). Las comparaciones planeadas indicaron que aquellos animales que recibieron las dosis 3,5 o 2,5 g/kg de etanol, exhibieron significativamente mayor actividad motora que los animales del grupo control que recibieron agua durante los primeros cinco minutos de evaluación, mientras que aquellos que recibieron la dosis 1,25 g/kg de etanol exhibieron significativamente mayor actividad motora que los animales del grupo control durante los minutos de evaluación 5 al 7. Los animales que recibieron la dosis mayor (3,25 g/kg) mostraron una actividad motora significativamente mayor que aquellos animales que recibieron la dosis de 1,25 g/kg durante los minutos 5 y 6 post-administración y significativamente mayor actividad que aquellos que recibieron la dosis 2,5 g/kg durante el minuto 5 de evaluación. El estrés provocado por la restricción de movimiento o por la privación social no ejerció incidencia significativa sobre la actividad de los adolescentes ni se vio implicado en interacciones significativas. La actividad en función del estrés se muestra en la Figura 19b

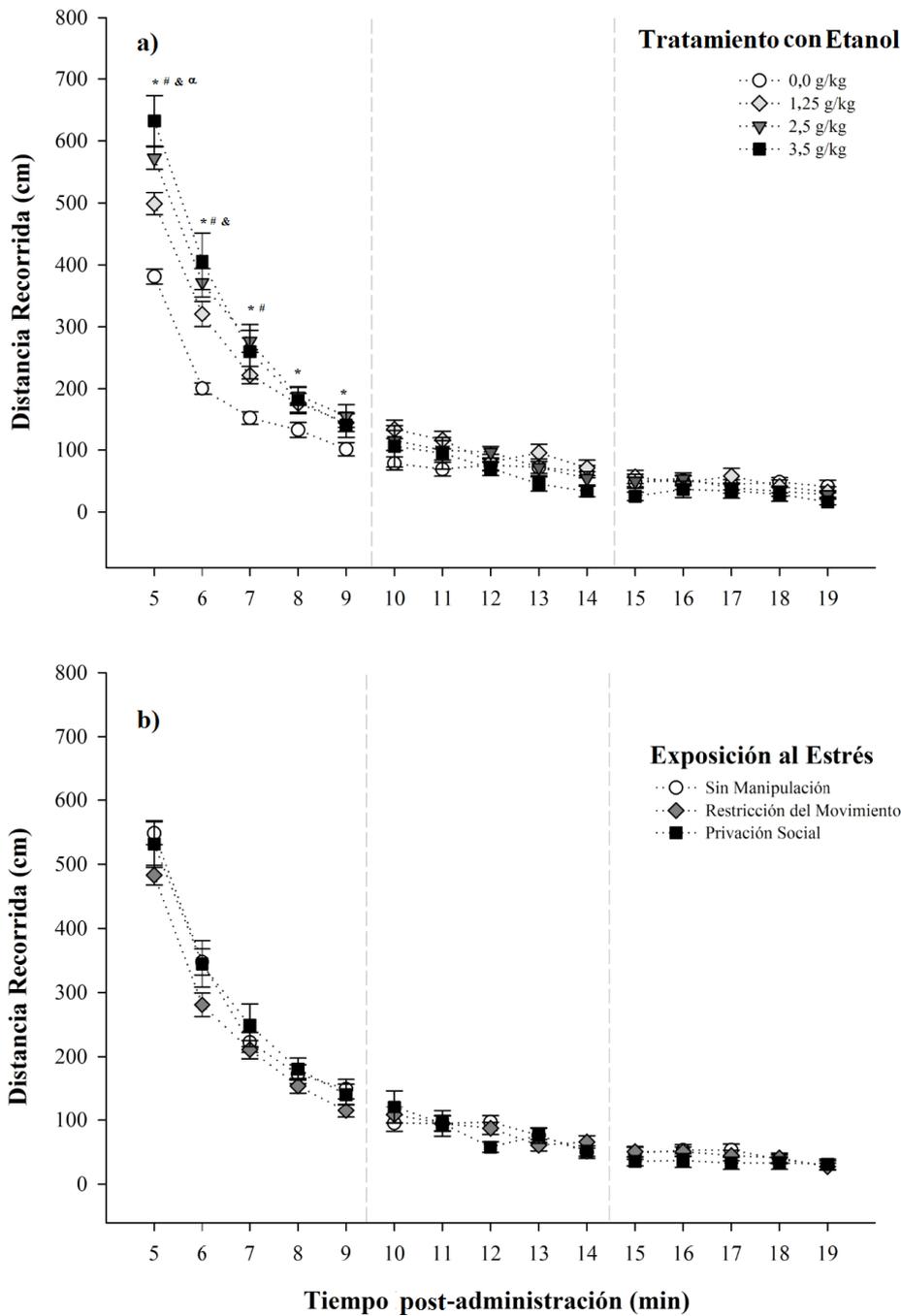


Figura 19. Efecto del tratamiento con etanol (0,0; 1,25; 2,5 o 3,5 g/kg; ig) y de la exposición a estrés (sin manipulación, restricción del movimiento o privación social; 90 min) sobre la actividad motora en ratas adolescentes machos. La figura representa la distancia recorrida (cm) en función del tratamiento de etanol (panel a) y la exposición a estrés (panel b) a partir de minuto 5 al 19 post-administración. El asterisco (*) indica una diferencia significativa en los minutos 5, 6, 7, 8 y 9 de la evaluación, entre el grupo que recibió vehículo (0,0 g/kg) y las dosis mayores 2,5 y 3,5 g/kg de etanol. El numeral (#) indica una diferencia significativa en los minutos 5, 6 y 7 de la evaluación, entre los grupos que recibieron 0,0 y 1,25 g/kg. El signo *et* (&) indica una diferencia significativa en los minutos 7 y 8 de la evaluación entre los grupos que recibieron las dosis de etanol 3,5 y 1,25 g/kg. La letra alfa (α) indica una diferencia significativa entre las dosis de etanol mayores (3,5 y 2,5 g/kg). En todas las diferencias $ps < 0,001$. Las barras verticales indican los errores estándar de la media (EEM).

Adultos: Los efectos observados en los adultos fueron marcadamente diferentes a los observados en los adolescentes. La Figura 20a muestra un aumento rápido aunque transitorio en la locomoción seguido de un efecto supresor motor a lo largo de la evaluación en los animales que recibieron las dosis 2,5 y 3,5 g/kg de etanol. El ANOVA arrojó efectos significativos principales de exposición a estrés ($F_{3, 132} = 23,67$; $p < 0,01$); tratamiento con etanol y minutos de evaluación ($F_{2,132} = 6,99$; $F_{14,1848} = 377,01$; respectivamente, $ps < 0,001$). Asimismo, se observaron interacciones significativas del tratamiento con etanol x minutos de evaluación, y de exposición a estrés x minutos de evaluación ($F_{42,1848} = 6,59$; $F_{42,1848} = 3,98$; respectivamente, $p < 0,001$). Las comparaciones planeadas indicaron que aquellos animales que recibieron la dosis 2,5 g/kg de etanol mostraron significativamente mayor activación motora que los sujetos del grupo control, aunque sólo durante el primer minuto de evaluación. Este efecto de activación moderada inducida por el etanol cambió de manera rápida a una drástica supresión de la actividad. Las comparaciones planeadas indicaron que aquellos animales que recibieron la dosis 3,5 g/kg de etanol mostraron significativamente menor actividad que los sujetos tratados con vehículo (0,0 g/kg) desde el minuto 6 post-administración hasta el final de la evaluación. De modo similar, los animales que recibieron la dosis 2,5 g/kg de etanol mostraron menor locomoción que sus pares del grupo control durante los minutos 8 al 14 post-administración.

Los análisis post-hoc respecto a la interacción entre la exposición a estrés y los minutos de evaluación mostraron que las ratas adultas expuestas a la privación social, aunque no a la restricción del movimiento, exhibieron un aumento general de la locomoción respecto del grupo de animales sin manipulación durante los minutos 5 al 10 post-administración. El efecto de privación social sobre la actividad motora se puede ver ilustrado en la Figura 20b, el cual fue similar a través de los sujetos que recibieron las dosis de etanol o vehículo.

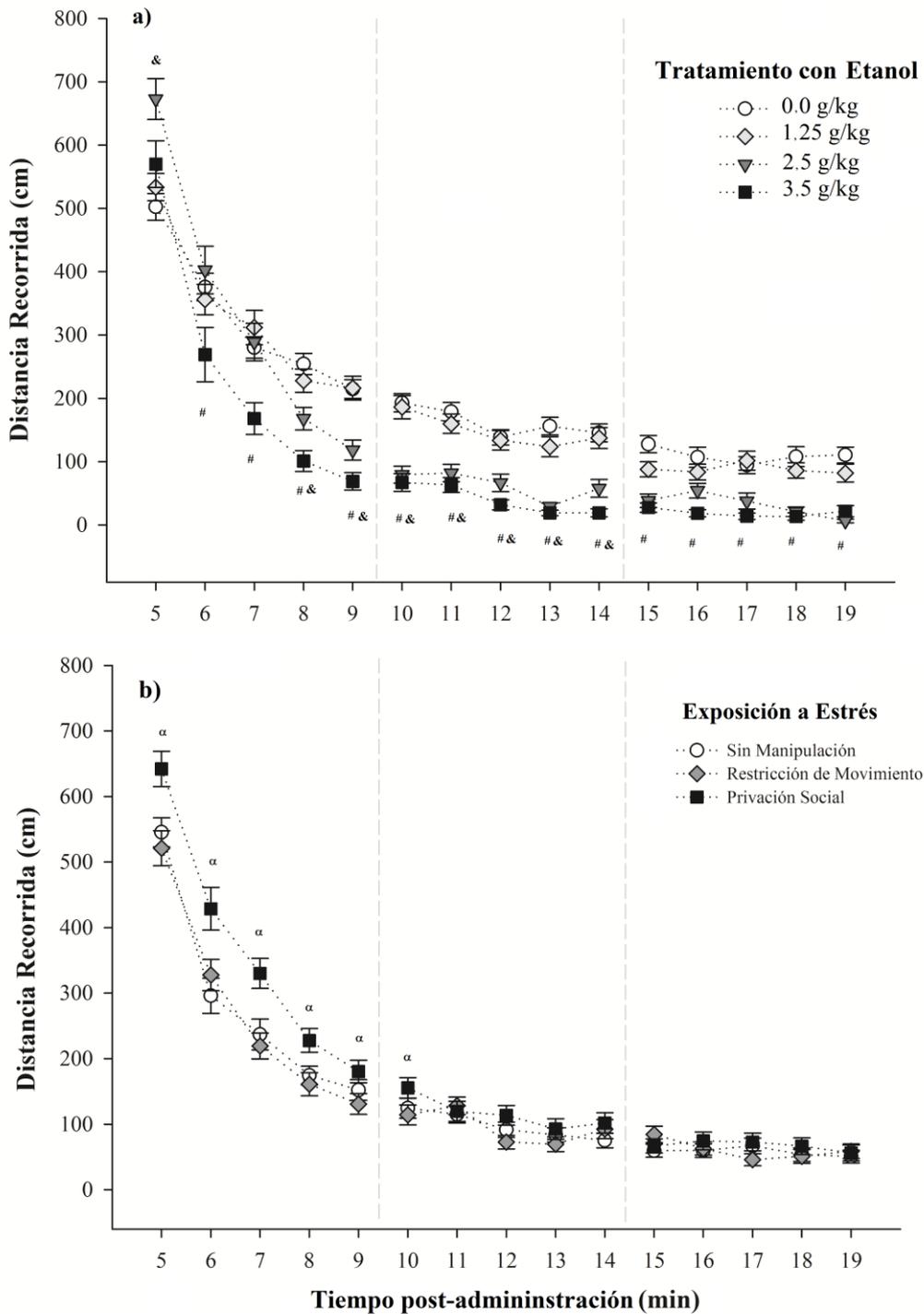


Figura 20. Efecto del tratamiento con etanol (0,0; 1,25; 2,5 o 3,5 g/kg; i.g.) y de la exposición a estrés (sin manipulación, restricción del movimiento o privación social; 90 min) sobre la actividad motora en ratas adultas machos. La figura representa la distancia recorrida (cm) en función del tratamiento con etanol (panel a) y la exposición a estrés (panel b) a partir de minuto 5 al 19 post-administración. El numeral (#) indica una diferencia significativa en los minutos 6 al 19 de evaluación entre los grupos que recibieron 0,0 y 3,5 g/kg. El signo *et* (&) indica una diferencia significativa entre los grupos que recibieron 0,0 y 2,5 g/kg, en los minutos 1, 8 al 14 de evaluación. La letra alfa (α) indica una diferencia significativa entre el grupo de animales que sufrió privación social y el grupo de animales sin manipulación, en los minutos 5 al 10 de evaluación. En todas las diferencias $ps < 0,001$. Las barras verticales indican los errores estándar de la media (EEM).

Experimento 8b: *Niveles de Etanol en Sangre y Cerebro, Corticosterona y Progesterona en ratas machos Sprague-Dawley adultas y adolescentes privadas socialmente.*

Introducción

Para analizar correlatos fisiológicos de la activación inducida por etanol y posibles diferencias metabólicas del alcohol entre adultos y adolescentes se midieron los NES, NEC, CORT y PROG (niveles etanol en sangre, en cerebros, corticosterona y progesterona; respectivamente) en ratas machos adolescentes y adultas que fueron privadas socialmente durante 90 minutos y en un tercer grupo de ratas adolescentes que permanecía alojado con un par del mismo sexo y edad sin manipulación. Todos los animales recibieron una dosis 3,5 g/kg de etanol previo a que se recolectaran muestras de sangre. Se utilizó la dosis más alta porque resultó la más efectiva para indicar diferencias entre las edades; esto es en los adolescentes provocó un incremento en la locomoción durante los primeros minutos y una disminución drástica de la actividad en los adultos respecto de sus respectivos controles. Se empleó la privación social como único estrés, puesto que a diferencia de la restricción del movimiento, este tipo de estrés alteró significativamente la locomoción en el *Experimento 8*. Se emplearon entre 7-8 animales por cada condición.

Resultados

Los NES fueron ligera, aunque significativamente, mayor en los adolescentes que en los adultos expuestos a 90 min de privación social, $F_{2,19} = 3,73$; $p < 0,05$. Las pruebas post-hoc indicaron que tanto los adolescentes que no fueron privados socialmente (adolescente n-privados) como aquellos adolescentes que sufrieron 90 minutos de privación social (adolescente 90-privados) mostraron niveles similares de etanol en sangre. Asimismo, los dos grupos anteriores presentaron mayores NES de los adultos que sufrieron 90 minutos de privación social (adulto 90-privados). Por otra parte, el ANOVA para los NEC indicó ausencia de diferencias entre los grupos. Las medias y errores estándar para los NEC y NES fueron los siguientes $138,89 \pm 18,50$ mg% y $160,94 \pm 17,68$ mg%; $138,17 \pm 16,57$ mg% y $147,67 \pm 16,81$ mg%; y $129,74 \pm 14,95$ mg% y $104,21 \pm 8,09$ mg%, en los grupos adolescente n-privados; adolescente 90-privados y adulto 90-privados, respectivamente.

Los niveles de CORT y PROG fueron significativamente mayor en los adolescentes expuestos, o no, a 90 minutos de privación social que en los adultos ($F_{2,19} = 6,45$; $p < 0,01$, $F_{2,19} = 9,06$; $p < 0,01$, respectivamente). Las medias y errores estándar de los niveles de CORT y PROG fueron los siguientes como sigue: $309,71 \pm 48,07$ y $20,07 \pm 2,94$ ng/mL (adolescente n-privado);

320,62 ± 16,18 y 22,50 ± 2,07 ng/mL (adolescente 90-privado) y 186,28 ± 12,32 y 9,14 ± 1,98 ng/mL (adulto 90-privado).

Experimento 9: *Efectos de la exposición a diferentes magnitudes de privación social sobre la actividad inducida por etanol en ratas Sprague-Dawley machos adultos y adolescentes*

Introducción

Se evaluaron los efectos del estrés, inducido por diferentes magnitudes de privación social, sobre la actividad motora inducida por una dosis alta de etanol (3,5 g/kg), en ratas machos adultos y adolescentes. Para ello se empleó un diseño 2 (edad: adolescentes o adultos) x 3 (exposición a estrés: sin manipulación –grupo control-, 90 o 180 minutos de privación social) x 2 (tratamiento con etanol: 0,0 o 3,5 g/kg). Se emplearon entre 10 a 11 animales por cada condición experimental.

En este experimento se buscó estudiar en mayor profundidad los efectos de privación social (90 o 180 minutos, inmediatamente previos a la evaluación de actividad) en ratas adolescentes y adultas, y las interacciones potenciales entre los efectos motores inducidos por etanol y este estrés. En el *Experimento 8* dicho estresor fue capaz de alterar la actividad motora general en los adultos, aunque no en los adolescentes. Asimismo empleamos la dosis de etanol que, en el *Experimento 8*, indujo máxima activación y supresión motora en adolescentes y adultos, respectivamente (3,5 g/kg). La hipótesis era que el hecho de aumentar la magnitud de privación social permitiría observar una posible potenciación de la activación motora inducida por etanol en los adolescentes.

Procedimientos Específicos y Evaluación:

Exposición al Estrés: en los días postnatales DPs 28 o 70 los animales eran retirados de sus cajas de alojamiento y eran aleatoriamente distribuidos en las siguientes condiciones: a) privados socialmente durante 180 minutos, esto era, alojados individualmente en cajas estándar; b) privados socialmente durante 90 minutos c) y un grupo sin manipulación (alojados con un par de la misma camada y edad).

Actividad Locomotora inducida por etanol posterior al Estrés: Inmediatamente luego de la exposición (o no) a estrés los animales eran intubados con etanol (0,0 o 3,5 g/kg) y regresados a sus cajas por 5 minutos hasta que comenzaba la evaluación de locomoción. Para la evaluación de la actividad se siguieron los mismos procedimientos que los descritos en el apartado de procedimientos del *Experimento 8*.

Resultados

Adolescentes: El ANOVA indicó un efecto principal de minutos de evaluación y una interacción significativa entre este factor y el tratamiento con etanol ($F_{14,924} = 312,05$; $F_{14,924} = 23,55$, ambas $p < 0,001$). Las comparaciones planeadas indicaron efectos de estimulación motora inducida por etanol durante los minutos iniciales de evaluación. Los animales tratados con etanol exhibieron una supresión motora significativa desde el minuto 13 post-administración hasta el final de la evaluación, respecto de los animales tratados con vehículo (Figura 21a). La exposición a estrés no ejerció efecto principal significativo ni interactivo (Figura 21b).

ADOLESCENTES

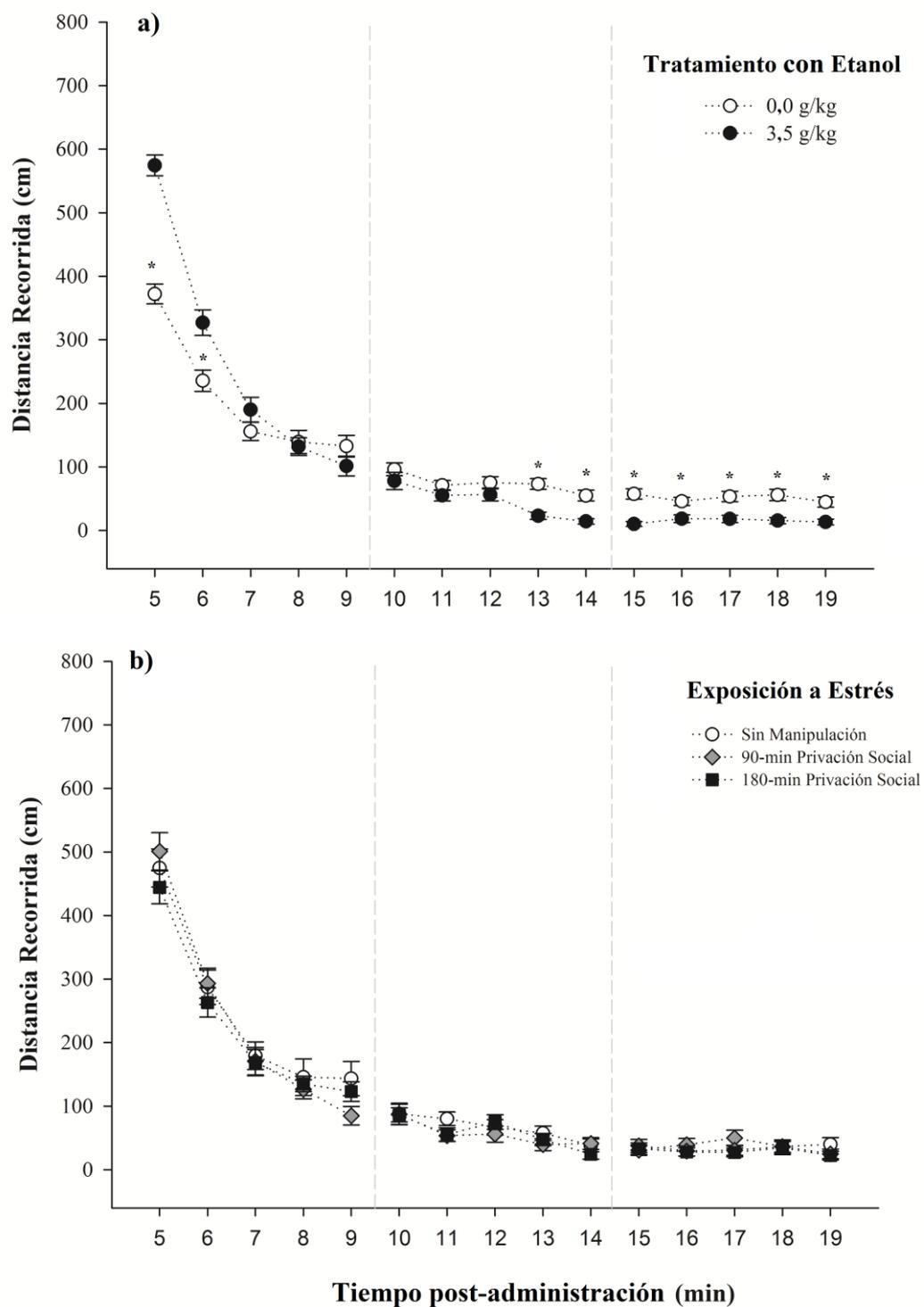


Figura 21. Efecto del tratamiento con etanol (0,0 o 3,5 g/kg; ig) y de la exposición a estrés (sin manipulación, privación social; 90 o 180 min) sobre la actividad motora en ratas adolescentes machos. La figura representa la distancia recorrida (cm) en función del tratamiento con etanol (panel a) y la exposición a estrés (panel b) a partir de minuto 5 al 19 post-administración. El asterisco (*) indica una diferencia significativa entre el grupo que recibió vehículo (0,0 g/kg) y el que recibió la dosis 3,5 g/kg de etanol, en los minutos 5, 6 y del 13 al 19 de la evaluación ($p < 0,001$). Las barras verticales indican los errores estándar de la media (EEM).

Adultos: el ANOVA indicó efectos principales significativos de exposición a estrés ($F_{1,60} = 54,27$; $p < 0,05$), tratamiento con etanol y minutos de evaluación ($F_{2,60} = 4,56$; $F_{14,840} = 189,73$; respectivamente, $p < 0,001$) e interacciones significativas de tratamiento con etanol y minutos de evaluación ($F_{14,840} = 16,34$; $p < 0,001$), y entre este último factor con la exposición a estrés ($F_{28,840} = 1,86$; $p < 0,01$). Las comparaciones planeadas indicaron que los animales tratados con etanol exhibieron significativamente más activación motora que sus pares controles, pero sólo durante el primer minuto de evaluación. Los animales tratados con etanol exhibieron significativamente menor actividad motora que los animales tratados con vehículo desde el minuto 7 post-administración hasta el final de la evaluación. Como se puede observar en la Figura 22a, la magnitud de la supresión motora fue considerable, puesto que los adultos tratados con etanol mostraron una actividad casi nula en el último tramo de evaluación. Por otro lado, los adultos que sufrieron 180 minutos privación social mostraron significativamente mayor actividad general que el grupo de animales sin manipulación en los minutos 5, 6, 8, 9 y 10 post-administración. Los efectos del etanol sobre la actividad motora fueron similares entre los animales estresados y aquellos que no tuvieron manipulación. Los efectos del estrés inducidos por la privación social se muestran en la Figura 22b.

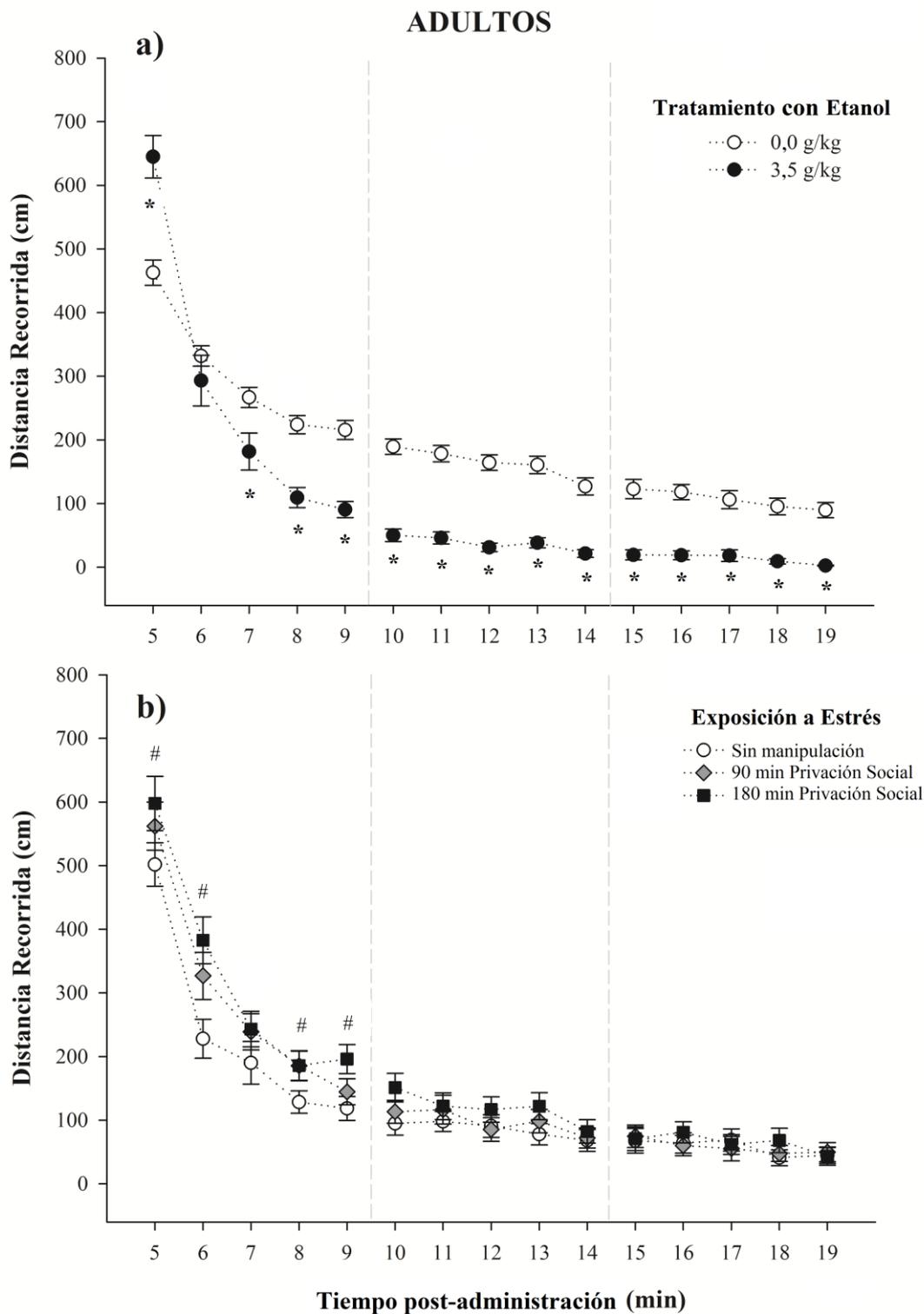


Figura 22. Efecto del tratamiento con etanol (0,0 o 3,5 g/kg; ig) y la exposición a estrés (sin manipulación, privación social; 90 o 180 min) sobre la actividad motora en ratas adultas machos. La figura representa la distancia recorrida (cm) en función del tratamiento de etanol (panel a) y la exposición a estrés (panel b) a partir de minuto 5 al 19 post-administración. El asterisco (*) indica una diferencia significativa entre el grupo que recibió vehículo (0,0 g/kg) y el que recibió la dosis 3,5 g/kg de etanol, en los minutos 5, y del 7 al 19 de la evaluación ($p < 0,001$). El numeral (#) indica una diferencia significativa entre el grupo sin manipulación y el grupo 180 minutos privado socialmente, en los minutos 5, 6, 8 y 9 de la evaluación ($p < 0,01$). Las barras verticales indican los errores estándar de la media (EEM).

Experimento 10: *Actividad Locomotora inducida por Etanol después de la Exposición a un Estrés Farmacológico (agonista kappa U62,066E) en ratas adolescentes Sprague-Dawley.*

Introducción

Un resultado llamativo de los experimentos anteriores era la relativa falta de sensibilidad de los adolescentes al estrés social o psicológico (privación social y/o restricción del movimiento). En este experimento se evaluaron los efectos de una fuente alternativa de estrés sobre la actividad espontánea e inducida por etanol en los adolescentes. Más específicamente, se analizó el efecto de la exposición a un estrés farmacológico, inducido por la administración de un agonista kappa U62,066E, sobre la actividad subsiguiente inducida por etanol en ratas adolescentes machos y hembras.

Diseño Experimental

Se empleó un diseño 2 (sexo: machos o hembras) x 3 (dosis de U62,066E: 0,0; 1,0 o 5,0 mg/kg) x 2 (Tratamiento con etanol: 0,0 o 2,5 g/kg). Se utilizaron entre 9 a 10 animales por condición experimental. Asimismo, los animales tratados con etanol fueron sacrificados al finalizar la evaluación y se tomaron muestras de sangre para determinar las concentraciones de etanol.

Procedimientos Específicos

El estrés farmacológico se indujo por medio de la administración del agonista opiáceo kappa U62, 066E quince minutos antes de la intubación de una dosis 2,5 g/kg de etanol. La actividad motora inducida por etanol se evaluó a partir de los 5-19 min post-administración. Al finalizar la evaluación los animales eran sacrificados por decapitación y se tomaban muestras de sangre para estimar los NES. La dosis de etanol y tiempos de post-administración fueron seleccionados sobre la base de los resultados del *Experimento 8*. Asimismo, se exploraron posibles diferencias de sexo hacia la reactividad inducida por el etanol -que no se habían medido en los experimentos anteriores- y respuesta a la activación del receptor kappa.

Resultados

El ANOVA para la actividad inducida por etanol indicó efectos principales de tratamiento con etanol ($F_{1,105} = 11,07$; $p < 0,01$), dosis de U62, 066E y minutos de evaluación ($F_{2,105} = 57,94$; $p < 0,01$; $F_{14,1470} = 456,32$; $p < 0,001$; respectivamente). La doble interacción entre dosis de U62, 066E x minutos de evaluación ($F_{28, 1470} = 18,46$; $p < 0,001$) y tratamiento con etanol x minutos de

evaluación ($F_{14,1470} = 13,96$; $p < 0,001$) alcanzaron significación estadística, así como la triple interacción entre dosis de U62, 066E, tratamiento con etanol, y minutos de evaluación ($F_{28, 1470} = 2,24$; $p < 0,001$). El sexo no ejerció efecto principal significativo alguno ni estuvo implicado en otras interacciones significativas. Como se observa en la Figuras 23a y 23b y como indicaron las comparaciones planeadas, los animales tratadas con etanol mostraron significativamente mayor activación motora que aquellos animales que recibieron sólo vehículo (0,0 g/kg), y que la inyección del agonista kappa U62, 066E disminuyó drásticamente las puntuaciones globales de locomoción.

Para comprender mejor la triple interacción entre los factores mencionados, se realizaron ANOVAs de medidas repetidas para *a*) cada dosis del agonista kappa U62, 066E (factor entre-grupo: tratamiento con etanol) y *b*) para cada una de las dos dosis de etanol (0,0 o 2,5 g/kg) (factor entre-grupo: dosis U62, 066E).

En ausencia del agonista kappa U62, 066E (0,0 mg/kg), el tratamiento con etanol indujo un efecto activador durante los minutos 5 al 9 post-administración ($F_{14,240} = 13,48$; $p < 0,001$). Dicho efecto se vio significativamente inhibido en aquellos animales que recibieron las dosis 1,0 o 5,0 mg/kg de U62, 066E ($F_{14, 532} = 2,25$; $p < 0,01$; $F_{14, 532} = 2,73$; $p < 0,001$; respectivamente).

Los ANOVAs para los animales tratados con etanol (efecto de agonismo kappa, $F_{28, 784} = 11,75$; $p < 0,001$) y los animales tratados con vehículo (efecto de agonismo kappa, $F_{28, 770} = 8,96$; $p < 0,001$), junto a las comparaciones planeadas subsiguientes indicaron que el efecto supresor motor de U62, 066E en la actividad motora espontánea (minutos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 y 17) o la inducida por etanol (minutos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 19) fue significativamente mayor en los animales que recibieron la dosis de 5,0 mg/kg respecto al grupo que recibió vehículo (0,0 mg/kg U62, 066E). Las comparaciones planeadas indicaron también un efecto supresor provocado por la dosis de 1,0 mg/kg U62, 066E sobre la actividad motora espontánea (minutos 9, 10, 11 y 13) o la inducida por etanol (minutos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 18 y 19) respecto de grupo que recibió vehículo (0,0 mg/kg U62, 066E).

El ANOVA de dos vías indicó que el tratamiento de U62, 066E que era inyectado 15 minutos previos a la administración del etanol no alteró los NES. Las medias y errores estándar para los NES de aquellos animales que recibieron 0,0; 1,0 y 5,0 mg/kg U62, 066E fueron los siguientes: $175,06 \pm 9,49$ mg%, $146,23 \pm 13,47$ mg% y $142,13 \pm 11,74$ mg%, respectivamente.

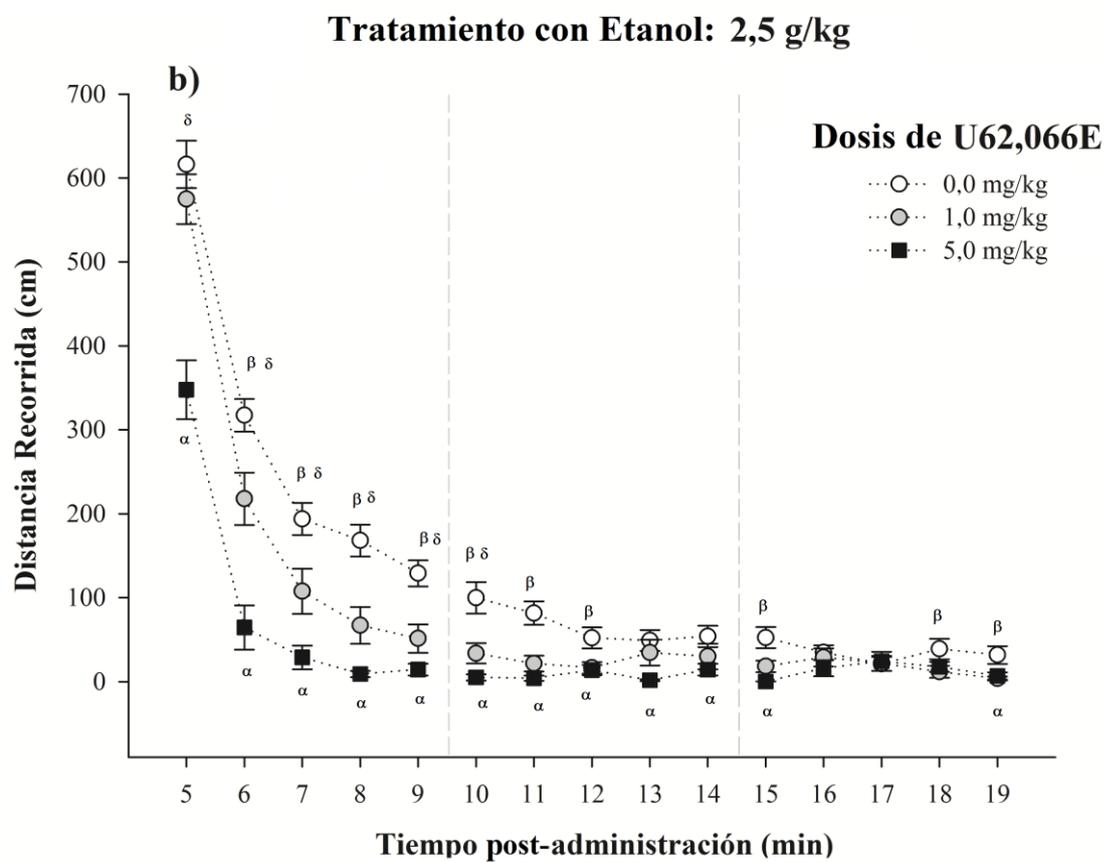
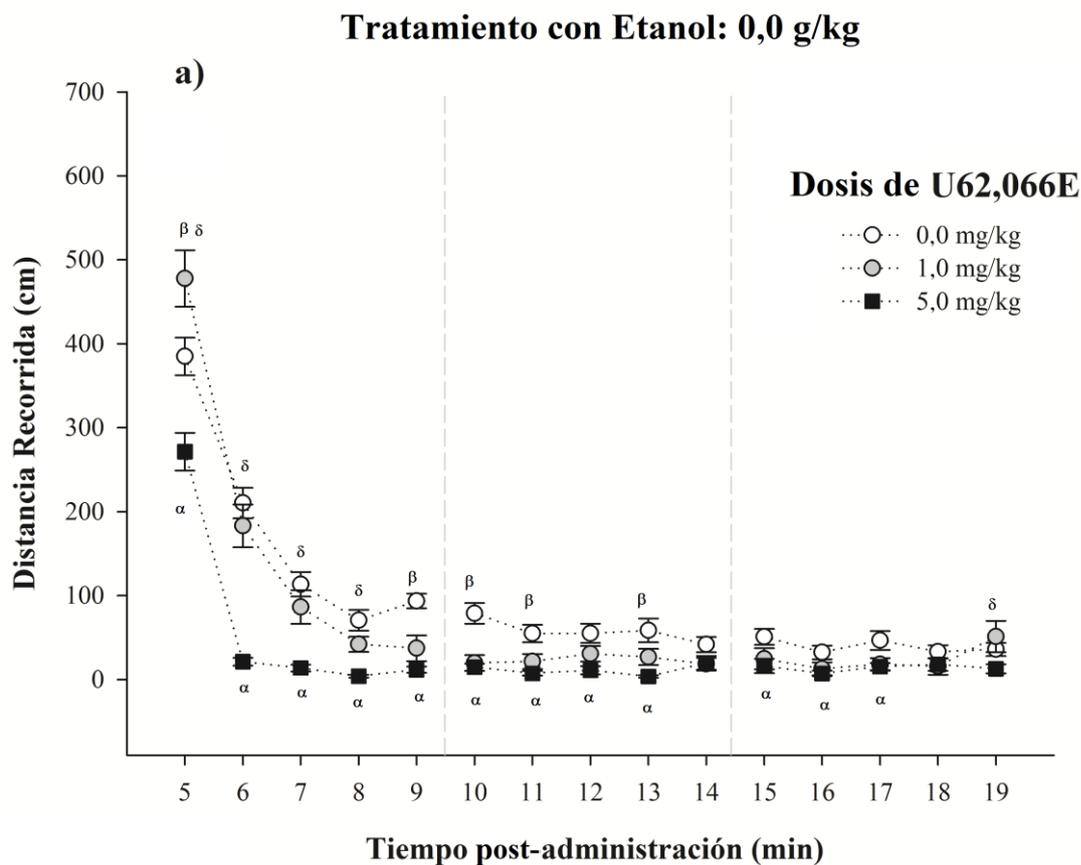


Figura 23. Efecto del tratamiento de etanol (0,0 o 2,5 g/kg; ig) y de la dosis de U62, 066E (0,0; 1,0 o 5,0 mg/kg, i.p.) sobre la actividad motora en ratas adolescentes. La figura representa la distancia recorrida (cm) en función de la dosis de U62, 066E en animales tratados con vehículo (panel a) y etanol (panel b) a partir del minuto 5 al 19 post-administración. La información se encuentra colapsada por el factor sexo. La letra alfa (α) indica una diferencia significativa entre el grupo que recibió 5,0 mg/kg y el grupo que recibió 0,0 mg/kg de U62, 066E; los cuales recibieron posteriormente una dosis de 0,0 g/kg (panel a; minutos 5-13, 15-17 de la evaluación) o una dosis 2,5 g/kg de etanol (panel b; en los minutos 5-15 y 19 de la evaluación). La letra beta (β) indica una diferencia significativa, entre el grupo que recibió 1,0 mg/kg y el grupo que recibió 0,0 mg/kg de U62, 066E; los cuales recibieron posteriormente una dosis de 0,0 g/kg (panel a; minutos 5, 9, 10, 13 de la evaluación) o una dosis 2,5 g/kg de etanol (panel b; minutos 6-12, 15, 18 y 19 de la evaluación). La letra delta (δ) indica una diferencia significativa entre el grupo que recibió 1,0 mg/kg y el grupo que recibió 5,0 mg/kg de U62, 066E; los cuales recibieron posteriormente una dosis de 0,0 g/kg (panel a; minutos 5-8, y 19 de la evaluación) o una dosis 2,5 g/kg de etanol (panel b; minutos 5-10 de la evaluación). En todas las diferencias $ps < 0,001$. Las barras verticales indican los errores estándar de la media (EEM).

La hipótesis que los adolescentes mostrarían mayor sensibilidad a la locomoción inducida por etanol y al estrés que los adultos; y que el estrés podría exacerbar el efecto estimulante motor del etanol fue parcialmente corroborada en la serie de experimentos precedentes (*Experimento 8 y 9*). Observamos que los adultos, aunque no los adolescentes, fueron afectados por 90 o 180 minutos de privación social. El efecto inducido por la restricción aguda del movimiento fue sorprendentemente ineficaz en alterar la locomoción espontánea o la inducida por etanol en ambas edades. La diferencia quizá más consistente fue que los adolescentes, en comparación con los adultos, resultaron más sensibles a la estimulación motora inducida por el etanol y más resistentes a los efectos sedativos de la droga. La sedación motora observada en los adultos se produjo poco después de la administración de la droga y se mantuvo durante toda la evaluación, asimismo fue más pronunciada que en los adolescentes. Estos resultados son comparables a los observados por Varlinskaya et al. (2010), en la que los adolescentes fueron más sensibles que los adultos a la facilitación social inducida por dosis bajas de etanol, aunque más resistentes a la inhibición social inducidos por dosis altas de etanol.

Los adolescentes fueron sensibles al estrés farmacológico inducido por la inyección del agonista kappa U62, 066E (*Experimento 10*). Este perfil de locomoción no parece ser el mismo a lo largo de la ontogenia. Mientras que la inyección del agonista kappa incrementa la locomoción en los infantes (Duke et al., 1997; Pautassi et al., 2012a), en adultos (Ukai y Kameyama, 1985) y en adolescentes -como hemos observado en el *Experimento 10*- provoca una disminución drástica de la locomoción general y la inducida por el etanol tras la inyección del agonista kappa

A diferencia de otros estudios en donde los adolescentes fueron más sensibles que los adultos a la interacción entre el estrés y el etanol, aquí el estrés no alteró significativamente el efecto estimulante motor inducido por el etanol. Esto pudo derivarse de diferencias en los procedimientos entre los estudios. Los estudios que han encontrado mayor sensibilidad al etanol en los adolescentes luego de exposición a estrés han empleado pruebas con un fuerte componente social; por ejemplo,

mostrando que el etanol reduce en los adolescentes, pero no en los adultos, la ansiedad social provocada por estrés agudo (Varlinskaya y Spear, 2012). Posiblemente, las variables que consideramos para ejercer estrés (restricción motriz y privación social) tengan un componente social más fuerte asociado a los efectos de la droga en términos de facilitación o inhibición social que la variable de locomoción que tomamos en consideración. De modo que pudieron verse opacados, en parte, los efectos entre el estrés y la locomoción inducida por el etanol entre las edades.

Experimento 11. *Relación entre el efecto estimulante y ansiolítico inducido por el etanol en un campo abierto, un laberinto elevado en cruz y una caja de luz-oscuridad. Consumo de la droga tras una administración aguda de la misma en ratas adolescentes.*

Introducción

El objetivo del *Experimento 11* era refinar y entender el significado o rol funcional del efecto estimulante motor inducido por la administración aguda de etanol en ratas adolescentes. Buscábamos conocer si el incremento en la locomoción tras la administración aguda de etanol era un indicador de reforzamiento apetitivo (hipótesis A); o si bien dicho incremento era indicativo de una propiedad ansiolítica del etanol (hipótesis B). De hecho, podía ser que el etanol estuviese aminorando la ansiedad o temor de los animales al campo abierto y que, por lo tanto, facilitara la exploración debido a su propiedad ansiolítica. Era posible también que el incremento fuera un reflejo de ambos efectos (hipótesis C).

Para analizar este interrogante los animales fueron administrados con alcohol y luego evaluados secuencialmente (esto es, durante el mismo proceso de intoxicación) en tres pruebas (campo abierto -CA-, laberinto elevado en cruz -LEC-, y caja de luz-oscuridad LO), todas ellas durante la parte ascendente de la curva de intoxicación de alcohol en sangre. Se realizaron análisis de correlaciones entre las principales variables obtenidas en cada prueba, a saber: locomoción general en CA y % de entradas en brazos cerrados (brc) en laberinto elevado en cruz entre otras (serán descritas en el apartado de análisis de datos). Dicha estrategia sirvió para responder provisoriamente a las principales preguntas bajo análisis. Por ejemplo, si la locomoción inducida por alcohol en CA estaba asociada a los efectos ansiolíticos del etanol medidos en LEC esto apoyaría a la hipótesis A; en tanto que si se asociaba a la actividad inducida por la droga en LEC la hipótesis B sería la favorecida. En otras palabras, la presencia de correlaciones significativas entre los puntajes de activación motora inducida por alcohol en campo abierto y los puntajes de baja ansiedad en laberinto en cruz serviría como evidencia que los efectos estimulantes de esta droga en campo abierto reflejaban, al menos en parte, sensibilidad a efectos ansiolíticos. Asimismo, se utilizaron los puntajes del LEC para dividir entre sujetos con alta- media- y baja- sensibilidad a los efectos ansiolíticos del alcohol e indagar si estas subpoblaciones de sujetos exhibían un perfil diferencial de consumo de alcohol. Finalmente, los puntajes obtenidos en CA, LEC y LO de los sujetos control (i.e., sin exposición previa al alcohol), se utilizaron como variables predictoras sobre el consumo de la droga, en un modelo de regresión múltiple. Con estos análisis buscábamos encontrar predictores de ingesta de alcohol en adolescentes y discriminar entre grupos con probabilidad exacerbada al consumo de esta sustancia.

Diseño Experimental

Se empleó un diseño factorial 2 (sexo: macho o hembra) x 6 (tratamiento con etanol al DP28: 0,0; 0,5, 1,25, 2,5, 3,25 g/kg o sin manipulación [NT]) x 2 (orden de presentación de pruebas: CA-LEC + LO o LEC-CA + LO). Se emplearon un mínimo de 12 y un máximo de 13 animales por cada una de las 24 condiciones experimentales. El grupo de animales NT eran removidos de sus ambiente de alojamiento y directamente evaluados en el LEC, CA y LO sin recibir administración alguna.

Aparatos Pruebas de Comportamiento al DP 28

Laberinto en Cruz Elevado (LEC): la superficie (cuatro brazos y un plataforma central) y las paredes para dos de los cuatro brazos estaban hechas de material de alto impacto negro (espesor: 0,03 cm). Los brazos se disponían en forma de cruz y cada brazo medía 45 cm de largo y 5 cm de ancho. Un par de brazos opuestos estaban cerrados con paredes (45 x 5 x 45 cm; largo, ancho y altura; respectivamente). La plataforma central interconectaba los cuatro brazos (5 x 5 cm). El aparato se encontraba elevado a 50 cm del suelo. A su vez, cada brazo se encontraba subdividido en tres sectores de menor a mayor longitud comenzando desde la plataforma central hacia los extremos. El primer sector constaba de 10 cm, el segundo sector 15 cm y el tercer sector 20 cm de longitud. Brazos cerrados: sector 1: [1-CA], sector 2 [2-CA] y sector 3 [3-CA]. Brazos abiertos: sector 1: [1-OA], sector 2 [2-OA] y sector 3 [3-OA]: Las medidas registradas fueron el número de entradas y tiempo transcurrido en los brazos abiertos (bra) y en los cerrados (brc), que resultaban de la sumatoria de valores obtenidos en cada sector. A su vez se calculó el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (índice de ansiedad). Las conductas que se registraron se describen en la Tabla 4:

- Tiempo (segundos) y número (frecuencias) de entradas a los brazos abiertos (bra) y cerrados (brc): esto implica siempre que el animal entra en cada brazo con sus cuatro patas.
- Cantidad de transiciones entre los sectores abiertos y cerrados y/o plataforma central (0-PC). La sumatoria de entradas en los sectores es considerado como índice de actividad general.

Campo Abierto (CA): Consistía en un cubo de madera (30 x 30 x 30 cm) forrado con fórmica negra. El piso estaba dividido por líneas blancas en 25 cuadrados de 6 x 6 cm cada uno, que dividía a la superficie en dos áreas: a) periférica -implicaban los cuadrantes adyacentes a las paredes de la caja (cantidad: 16); y b) central -implicaba el cuadrante del centro (cantidad: 1) que es rodeado por el resto de los cuadrantes de la caja, que no pertenecían o representaban el área periférica (cantidad: 8). [Véase Gráfico 1]. Las conductas que fueron registradas (véase Tabla 4) fueron:

- Tiempo Total (s) de locomoción en ambas zonas (centro y periferia) del campo
- Cantidad (f) en la zona central del campo
- Cantidad (f) en la zona periférica del campo.

Caja Luz-Oscuridad (LO): caja (43 x 25 x 30 cm; largo, ancho, altura) de material de alto impacto negro y blanco (espesor: 0,03 cm). La caja estaba dividida en dos compartimentos por medio de un panel que tenía un corredor o pasillo (6,5 x 6,5 cm) que permitía al animal pasar de compartimento a otro. Un compartimento blanco (25 x 25 x 30 cm, representaba el 60% de la caja) iluminado con un tubo fluorescente 100-W y un compartimento negro (18 x 25 x 30 cm, representaba el 40% de la caja) iluminado con una lámpara roja de 40-W. [Véase Gráfico 1]. Las conductas que fueron registradas (véase Tabla 4) fueron:

- Número de entradas a cada compartimento: transiciones de un compartimento al otro cuando el animal ha cruzado con sus cuatro patas. Las sumatoria de las transiciones fue considerada indicador de actividad general en la prueba.

- Latencia (s) para salir del compartimento blanco (tiempo que tarda el animal en realizar el primer cruce con sus cuatro patas hacia la compartimento negro)

- Tiempo de permanencia (s) en cada compartimento de la prueba (blanco o negro)

Tabla 4. Variables de comportamiento registradas en LEC, CA y LO en el *Experimento 11*

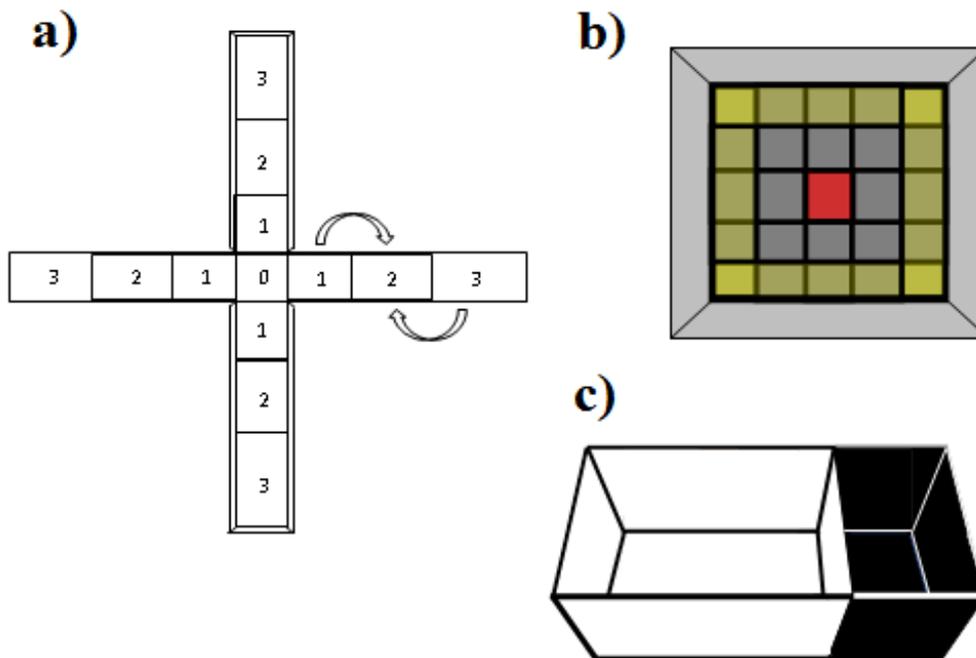
Variables	LEC			CA		LO	
	Brazos Abiertos	Brazos Cerrados	Plataforma Central	Área Central	Área Periférica	Zona Blanca	Zona Oscura
Convencionales							
Locomocion (f)*	+	+	-	+	+	+	+
Locomocion (d)**	+	+	-	+	+	+	+
Sector 1 (f)	+	+	-	-	-	-	-
Sector 2 (f)	+	+	-	-	-	-	-
Sector 3 (f)	+	+	-	-	-	-	-
Sector 0 (f)	-	-	+	-	-	-	-
Latencia (d)	-	-	-	-	-	+	-
Etológicas							
Escalamiento (f)	-	+	-	-	+	+	+
Erguimiento (f)	-	-	-	+	+	+	+
Acicalamiento (f)	+	+	+	+	+	+	+

* Frecuencia (f), ** Duración (d)

Procedimientos Específicos

Día post-natal 28 (pruebas de comportamiento): los animales eran pesados y recibían administraciones de etanol (0,0; 0,5; 1,25; 2,5 o 3,25 g/kg), o permanecían sin manipulación experimental (NT). Cinco minutos después eran evaluados secuencialmente –durante el mismo proceso de intoxicación- en campo abierto “CA” (minutos 5-9 post-intubación), en laberinto elevado en cruz “LEC” (minutos 10-14 post-intubación) y finalmente en una caja de luz-oscuridad “LO” (minutos 15-19 post-intubación). En cada prueba los animales eran colocados sobre la zona central de cada aparato, es decir, en la plataforma central del LEC en dirección a los brazos abiertos, en el centro del CA, y en el centro del compartimento blanco de LO en dirección al corredor. Las dos primeras pruebas fueron contrabalanceadas para controlar posibles efectos interactivos entre ellas. La prueba de LO se presentaba siempre al final y se incorporó al estudio ante la potencialidad que el LEC no fuera suficientemente sensible para la detección de efectos ansiolíticos. Estos procedimientos se resumen en el Gráfico 1. Nuestra expectativa era que, si las mediciones de actividad en el CA reflejaban efectos ansiolíticos del etanol, encontraríamos correlación entre los puntajes de la distancia recorrida en esta prueba y los puntajes que expresaban efectos ansiolíticos (i.e., tiempo pasado en los brazos abiertos del LEC, tiempo pasado en el compartimento de LO) en las pruebas restantes; y que encontrásemos similitud entre dosis que ejercían efectos ansiolíticos en ambas pruebas. De no encontrarse estas asociaciones podíamos conservar la hipótesis de que la actividad locomotora inducida por alcohol en CA reflejan efectos estimulantes, posiblemente apetitivos.

Gráfico 1. Pruebas de comportamiento: LEC, CA y LO



a) Laberinto elevado en cruz, b) Campo abierto: área periférica, área central y c) Caja de luz-oscuridad.

Prueba de Ingesta (DPs29-30): al día siguiente de la sesión de pruebas de comportamiento los animales eran alojados individualmente y expuestos a una prueba de ingesta de etanol de 24 horas. La prueba comenzaba a las 9:00 AM del DP29. Se registraron los mililitros consumidos cada 60 minutos durante las 6 primeras horas y los mililitros ingeridos totales. La prueba constaba de acceso simultáneo a tres tubos de 25 ml de capacidad, cargados con agua de pico, o una solución de sacarosa a 1% v/v, o bien solución de etanol al 5% con vehículo de sacarosa al 1% v/v. La noche previa a la prueba de ingesta los animales fueron privados en un 25% del total del agua que consumían habitualmente. Las medidas dependientes analizadas fueron el consumo de alcohol (g/kg y porcentaje de preferencia); consumo de agua y de sacarosa (ml/100 g de peso corporal), así como también el consumo total de fluidos (ml/100 g de peso corporal).

Análisis de Datos

Análisis Univariados de las respuestas comportamentales en las pruebas CA, LEC y LO, y los valores de consumo durante la prueba de ingesta

Las variables registradas en el CA y LEC fueron analizadas independientemente mediante un ANOVA de tres vías, considerando el sexo (macho o hembra), tratamiento con etanol al DP28 (0,0; 0,5; 1,25; 2,5; 3,25 g/kg o UT), orden de presentación de pruebas (CA-LEC + LO o LEC-CA + LO) como factores entre-grupo. ANOVAs similares fueron empleados para analizar el consumo de etanol, de sacarosa y de fluidos totales durante la prueba de tres vías.

Análisis de Correlaciones

Se realizaron correlaciones (producto-momento de Pearson) en la muestra total de sujetos y para cada una de los grupos definidos por los tratamientos con etanol (i.e., 0,0; 0,5; 1,25; 2,5; 3,25 g/kg y el grupo NT), entre las siguientes variables: actividad motora [s] en el CA, % de tiempo sobre área central de CA, número de entradas a los brazos abiertos en LEC, números de entradas a los brazos cerrados en LEC, actividad motora en LEC (número de entradas a los brazos abiertos y cerrados), respuesta de ansiedad en LEC (% de entradas a los brazos abiertos), actividad motora en LO (número de transiciones entre compartimentos), respuesta de ansiedad en LO (tiempo pasado sobre el compartimento blanco). Dado el gran número de correlaciones realizadas, el nivel alfa se ajustó dentro de cada conjunto de datos para el número de variables en estudio (i.e., 0,05/8). De esta manera solo aquellas asociaciones con un $p \leq 0,00625$ fueron consideradas estadísticamente significativas. El objetivo de estos análisis era estudiar las correlaciones a nivel global entre los comportamientos obtenidos en el CA, LEC y LO más allá del tratamiento con etanol, y determinar, en los grupos que habían recibido etanol, si una mayor actividad motora inducida por el etanol en el CA se correlacionaba positivamente con un mayor porcentaje de entradas a los brazos abiertos del LEC. Este resultado apoyaría la hipótesis alternativa que sugiere que la estimulación motora en CA podría reflejar, al menos parcialmente, efectos ansiolíticos de la droga.

Análisis Univariados y Multivariados de los valores para la ingesta en sujetos controles: vehículo (0,0 g/kg) y sin experiencia previa (NT) con la droga.

Los análisis preliminares indicaron que los animales sin manipulación (NT) o que recibieron vehículo (0,0 g/kg) al DP28 mostraron un perfil de respuestas comportamentales similar en el CA,

LEC y LO. No se observaron diferencias entre ambas condiciones en relación a la actividad motora en CA, LEC y LO ($t = -0,4; -1,86$ y $-0,89$, respectivamente; $ps < 0,05$) o en % de tiempo pasado sobre los brazos abiertos del LEC, o tiempo pasado sobre el compartimento blanco de LO ($t_{78} = -0,03$ y $-0,60$, respectivamente; $ps < 0,05$). A los fines de los análisis de ingesta de fluidos, estas condiciones NT y 0,0 g/kg se combinaron en una única condición control, compuesta por 80 sujetos. Los valores de ingesta de estos grupo controles de animales fueron posteriormente analizados mediante estrategias uni- y multivariadas

Los análisis de regresión múltiple se utilizaron para estudiar, en el grupo de 80 sujetos originalmente asignados a las condiciones NT y 0,0 g/kg, la relación entre los comportamientos desplegados en CA, LEC y LO sobre el consumo de etanol durante las 24 horas de la prueba de ingesta. Más específicamente, las variables predictivas incluidas para este análisis fueron la exploración y respuesta de ansiedad en CA (i.e., actividad motora total [s] y % de tiempo pasado en el área central del aparato –considerada como medida de ansiedad basal [Da Silva et al., 2005]– respectivamente), en LEC (número total de entradas a los brazos abiertos y cerrados y % de entradas a los brazos abiertos; respectivamente) y en LO (número de transiciones entre compartimentos y tiempo pasado en el compartimento blanco; respectivamente). La conducta de erguimiento –“rearing”– en CA también fue incluida como variable predictiva. La conducta de escalamiento –“wall-climbing”– en CA fue desestimada porque la inspección de las correlaciones parciales entre las variables indicó un coeficiente de 0,95 de asociación con el erguimiento. La frecuencia de acicalamiento –“grooming”– y escalamiento en LEC y LO arrojó una distribución fuertemente sesgada porque la mayoría de las ratas no exhibieron estos comportamientos. Tampoco observamos erguimiento en las pruebas de LEC y LO. Como variable dependiente fueron considerados los g/kg de alcohol consumido en las 24 horas de duración de la prueba de ingesta. Utilizamos un análisis de regresión múltiple estándar (i.e., método “enter”) que incorporaba simultáneamente todas las variables independientes en el modelo. Se calcularon coeficientes de correlación múltiple regular y ajustada (R^2 y R^{2a}). Estos índices indican el porcentaje de varianza explicada, y la versión ajustada disminuye con el número de variables predictivas incluidas en la ecuación. El coeficiente de regresión estandarizado (β) se calculó también para generar una estimación de las relaciones individuales entre cada variable predictiva y el consumo de etanol.

Para evaluar el nivel de especificidad del modelo de regresión múltiple se condujo otro análisis de regresión múltiple con las mismas variables predictivas pero en este caso considerando el consumo de sacarosa (ml/100 g en 24 h) como variable dependiente.

Asimismo, utilizamos los valores de ingesta de etanol que provenían de los 80 sujetos controles y llevamos a cabo ANOVAs en función del nivel de respuesta de ansiedad basal (alta-,

media- o baja-respuesta) desplegados en las pruebas LEC y CA. Esto último tuvo por finalidad poner en prueba la hipótesis de reducción de tensión, es decir, corroborar si el consumo de la droga estaba determinado por el nivel basal de ansiedad de los organismos; particularmente en aquellos más ansiosos como una respuesta para mitigar dicho estado. Específicamente, los animales fueron clasificados como alto-, medio- bajo-ansiosos en función del % de entradas a los brazos abiertos en el LEC. Los animales que caían en el cuartil superior (i.e., 20 animales que exhibieron la mayor cantidad de entradas en los brazos abiertos) eran clasificados como bajo-ansiosos (BA). Los animales que caían en el cuartil inferior eran clasificados como alto-ansiosos (AA). Los animales que caían entre los percentiles 38^{avo} y 62^{do} eran clasificados como medio-ansiosos (MA). De modo similar los animales fueron clasificados como alto-, medio- y bajo-ansiosos (AA₁, MA₁ y BA₁, respectivamente) en función del porcentaje de tiempo pasado en el área central de CA. La ingesta de etanol (g/kg y % de preferencia), de sacarosa (ml/100g) y de fluidos totales (ml/100g) fueron analizadas empleando ANOVAs de un vía (factor comparado entre los grupos: nivel de respuesta de ansiedad basal en LEC o nivel de respuesta de ansiedad basal en CA) para cada criterio de clasificación.

ResultadosVariables de actividad y ansiedad registradas en las pruebas de comportamiento: CA, LEC y LOCampo Abierto

El ANOVA para la locomoción en CA arrojó efectos principales de tratamiento con etanol y orden de presentación de las pruebas ($F_{5, 222} = 5,28$; $F_{1, 222} = 16,98$; $ps < 0,001$; respectivamente). Las pruebas Post-hocs indicaron un efecto estimulante motor significativo dosis-respuesta del etanol (Figura 24). Más específicamente, los animales que recibieron las dosis de 3,25; 2,5 y 1,25 g/kg, las cuales ejercieron similar efecto activador entre sí, mostraron mayor locomoción respecto de aquellos que recibieron vehículo (0,0 g/kg) o que no recibieron manipulación (NT). Los dos últimos grupos mostraron similar locomoción. La dosis 0,5 g/kg no ejerció efecto de activación motora. Asimismo, independientemente del orden de presentación de las pruebas se observó que el efecto estimulante motor se presentaba primordialmente durante los primeros minutos pos-administración (i.e., 5-9 min).

Nótese que en los análisis que se continuaron se repitió el efecto principal del orden de presentación de las pruebas, en donde más allá de la secuencia y las variables bajo análisis, los efectos se concentraban en los primeros cinco minutos de evaluación. En los análisis subsiguientes este efecto se dejó de reportar. No se observaron efectos principales o interactivos que involucraran el factor sexo.

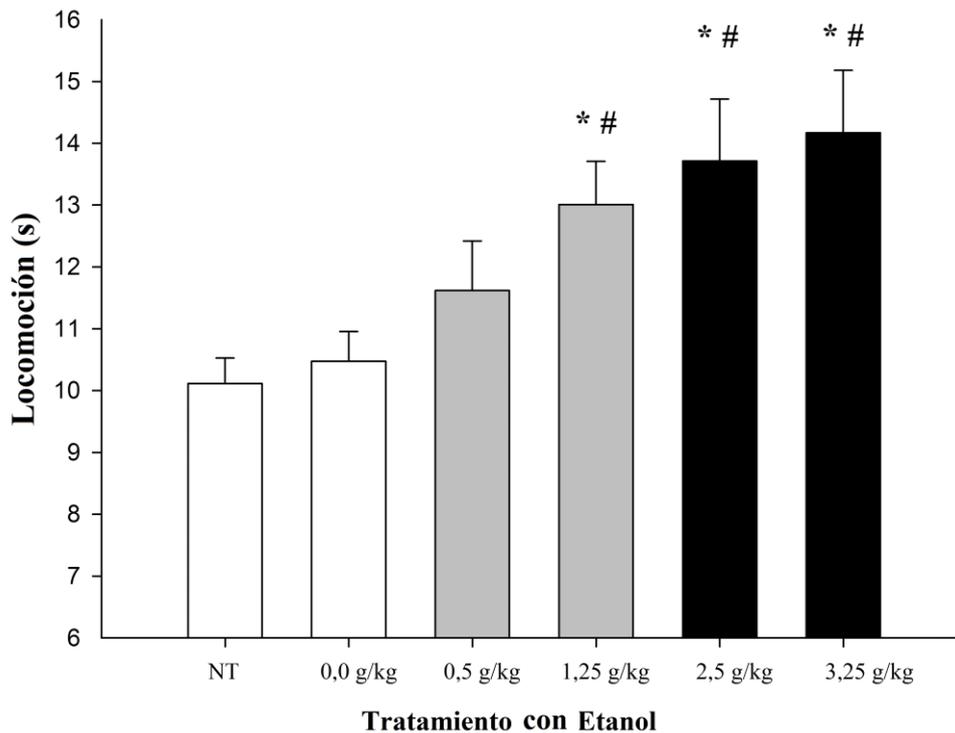


Figura 24. Locomoción (s) en CA en función del tratamiento con etanol (0,0, 0,5, 1,25, 2,5 y 3,25 g/kg; o sin manipulación [NT]) en ratas adolescentes al DP28. Los animales eran evaluados en los minutos 5-9 o 10-14 post-administración. La información fue colapsada por sexo (machos y hembras) y el orden de presentación de las pruebas. Los ANOVAs indicaron que, independientemente del tratamiento con etanol y del sexo, los valores de locomoción fueron mayores cuando el CA era presentado anterior al LEC durante los minutos (5-9). Los asteriscos (*) indican una diferencia estadísticamente significativa entre las dosis de etanol (1,25; 2,5 y 3,25 g/kg) y el grupo que recibió vehículo (0,0 g/kg). Los numerales (#) indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos que recibieron etanol (1,25, 2,5 y 3,25 g/kg) y el grupo sin manipulación (NT). En todas las diferencias (* y #) $ps < 0,001$. Las barras verticales indican los errores estándar de la media (EEM).

Laberinto Elevado en Cruz

El ANOVA para % de entradas a los brazos abiertos reveló efectos principales de tratamiento con etanol y orden de presentación de las pruebas ($F_{5,222} = 7,11$ y $F_{1,222} = 6,78$, respectivamente; $ps < 0,001$). Las pruebas post-hocs indicaron que los animales que recibieron las dosis 2,5, 1,25, y 0,5 g/kg de etanol exhibieron un incremento significativo en el % de entradas a los brazos abiertos en LEC respecto de los grupos tratados con vehículo y los NT. El incremento significativo en el porcentaje de entradas en los brazos abiertos, presumiblemente indicativo de un efecto ansiolítico del etanol, fue similar para los machos y hembras, y no fue significativamente afectado por el orden de presentación de las pruebas. Los animales que recibieron la dosis 3,5 g/kg de etanol exhibieron similar % de entradas en los brazos abiertos que los grupos controles (0,0 g/kg y NT). Estos

resultados están representados en la Figura 25. Las pruebas post-hoc indicaron también que el porcentaje de entradas en los brazos abiertos era mayor cuando los animales eran evaluados en LEC primero antes que en CA ($17,87 \pm 1,35$), que cuando eran evaluados en LEC al intervalo 10-14 min ($12,98 \pm 1,33$).

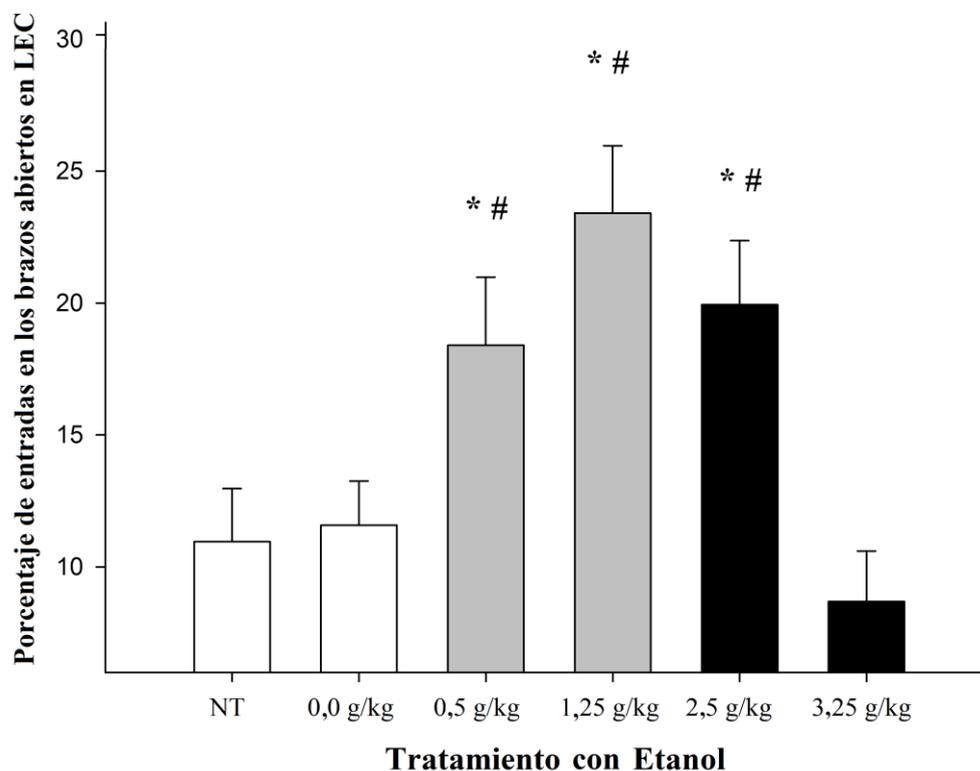


Figura 25. Porcentaje de entradas en los brazos abiertos (%) en el laberinto elevado en cruz (LEC) en función del tratamiento con etanol (0,0; 0,5; 1,25; 2,5 y 3,25 g/kg; o sin manipulación [NT]) en ratas adolescentes al DP28. Los animales eran evaluados en los minutos 5-9 o 10-14 post-administración. La información fue colapsada por sexo (machos y hembras) y el orden de presentación de las pruebas. Los ANOVAs indicaron que, independientemente del tratamiento con etanol y del sexo, los valores del porcentaje de entradas fueron mayores cuando el LEC era presentado anterior al CA durante los minutos (5-9). Los asteriscos (*) indican una diferencia estadísticamente significativa entre las dosis de etanol (0,5; 1,25 y 2,5 g/kg) y el grupo que recibió vehículo (0,0 g/kg). Los numerales (#) indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos que recibieron etanol (0,5; 1,25 y 2,5 g/kg) y el grupo sin manipulación (NT). En todas las diferencias (* y #) $ps < 0,001$. Las barras verticales indican los errores estándar de la media (EEM).

La Figura 26a muestra la locomoción alcanzada en LEC (número de entradas totales a los brazos abiertos) en función del tratamiento con etanol al DP28. El ANOVA indicó efectos principales de tratamiento con etanol ($F_{5,222} = 10,45$; $p < 0,001$) y orden de presentación de las pruebas ($F_{1,222} = 15,24$; $p < 0,001$). Las pruebas post-hoc indicaron efecto estimulante motor inducido por el etanol. Más específicamente, las dosis de 3,25, 2,5 y 1,25 g/kg ejercieron mayor estimulación motora

respecto de los grupos controles vehículo (0,0 g/kg) y sin manipulación (NT), los cuales entre ellos mostraron similar locomoción. Los animales que recibieron la dosis 0,5 g/kg etanol exhibieron mayor locomoción que el grupo NT, aunque mostraron similar locomoción al grupo vehículo (0,0 g/kg). La dosis de 2,5 g/kg ejerció significativamente mayor actividad motora que las demás dosis y que los grupos controles, a excepción de la dosis 1,25 g/kg, con la cual mostró similar locomoción. Las pruebas post-hocs también mostraron que el número de entradas totales a ambos brazos eran mayor durante los primeros minutos post-administración (i.e., 5-9 min) [$76,72 \pm 2,15$] que cuando la prueba ocurría entre los minutos 10-14, siguiendo la prueba de CA [$66,21 \pm 1,99$]. El orden de presentación de las pruebas, sin embargo, no afectó la curva dosis-respuesta (i.e., el orden de presentación de las pruebas no interactuó significativamente con el tratamiento de etanol al DP28). El factor de sexo no arrojó efecto principal o interactivos significativos con los demás factores.

El número de entradas totales a ambos brazos ha sido considerado como una medida de actividad motora en LEC, aunque combina la actividad motora en los brazos abiertos (presumiblemente ansiógena) con la actividad motora en los brazos cerrados (a veces considerada como única variable de locomoción) en LEC. Para una mejor comprensión de las diferencias potenciales entre efectos ansiolíticos y activadores del etanol respecto de estas variables en LEC, subdividimos el total de entradas y analizamos separadamente la actividad motora en cada uno de los brazos. Ambos ANOVAs arrojaron efectos principales de tratamiento de etanol ($F_{5,222} = 6,30$ y $F_{5,222} = 9,10$, respectivamente; $p < 0,001$) y el orden de presentación de las pruebas ($F_{1,222} = 10,30$ y $F_{1,222} = 4,79$, respectivamente; $p < 0,05$). Como fuera también confirmado por pruebas post-hocs, el incremento en la locomoción inducido por el etanol se expresó diferencialmente a través de los dos brazos (abiertos y cerrados) en función de las dosis consideradas (Figura 26 b y c). Por ejemplo, los animales que recibieron las dosis de 0,5 y 1,25 g/kg exhibieron mayor número de entradas a los brazos abiertos, aunque no en los brazos cerrados, respecto de los grupos NT y el tratado con vehículo (0,0 g/kg). Inversamente, los animales tratados con la dosis de 3,5 g/kg de etanol mostraron mayor número de entradas a los brazos cerrados aunque no en los brazos abiertos, respecto de grupo tratado con vehículo. En el caso de los animales que recibieron la dosis de 2,5 g/kg, el número de entradas entre ambos brazos (abiertos y cerrados) fue parejo; exhibieron significativamente mayor número de entradas respecto a los grupos controles. El número de entradas en los brazos abiertos y cerrados se representa en la Figura 25b y c, respectivamente. Las pruebas post-hocs indicaron que la locomoción en LEC era mayor en cada brazo cuando la evaluación ocurría previa a la prueba de CA (bra: $12,54 \pm 1,08$; brc: $51,59 \pm 1,39$) comparado con los valores de locomoción observados en el LEC cuando la prueba ocurría en el intervalo 10-14 minutos post-administración, justo después que

finalizaba la prueba de CA (bra: $8,07 \pm 0,97$; brc: $47,68 \pm 1,37$). El orden de presentación de las pruebas no interactuó significativamente con el tratamiento de etanol. No se observaron efectos principales ni interactivos del factor de sexo.

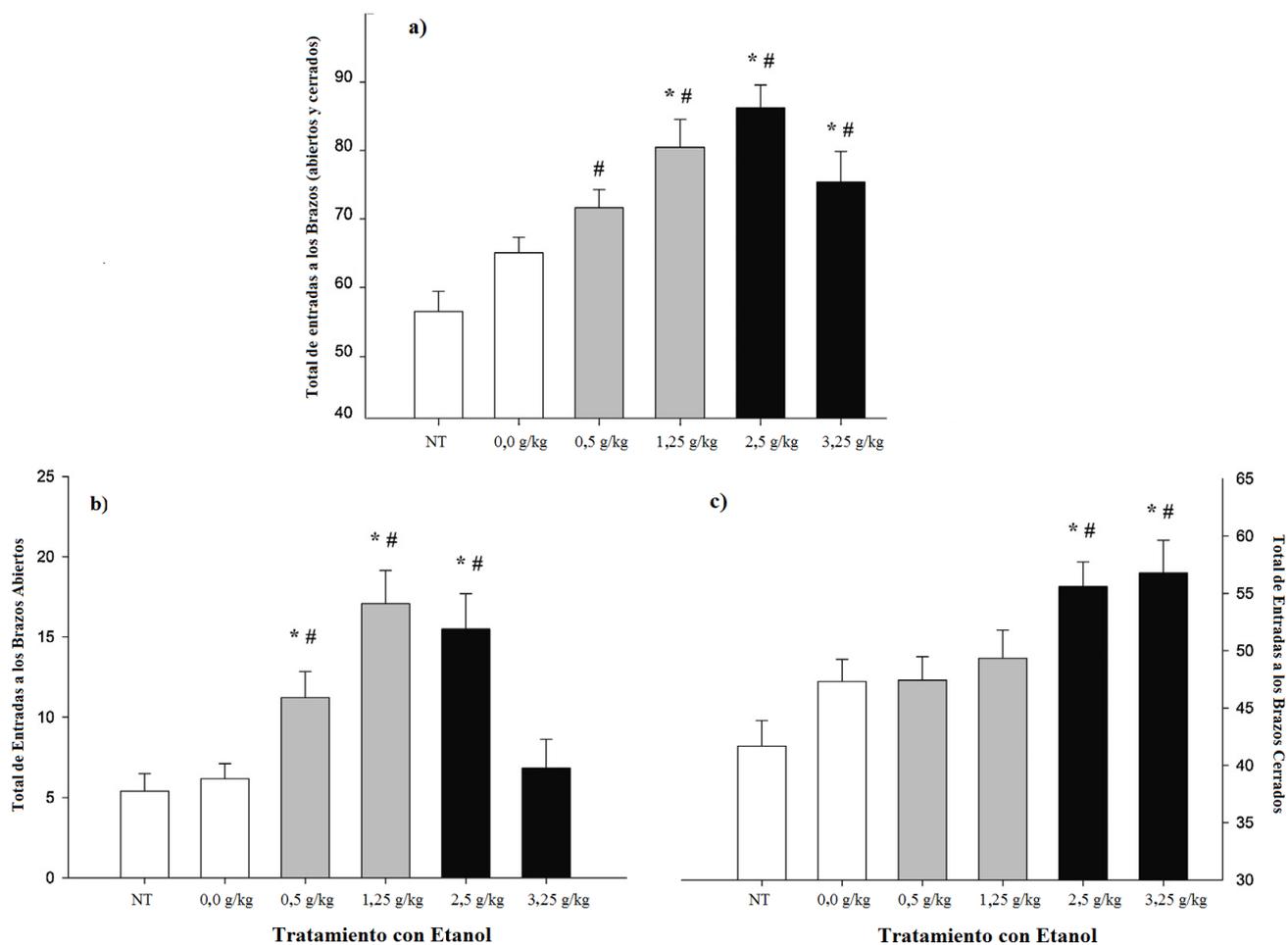


Figura 26. Panel (a): Total de entradas en los brazos cerrados y abiertos; panel (b): total de entradas en los brazos abiertos; panel (c): total de entradas en los brazos cerrados en el laberinto elevado en cruz (LEC) en función del tratamiento con etanol (0,0; 0,5; 1,25; 2,5 y 3,25 g/kg; o sin manipulación [NT]) en ratas machos y hembras adolescentes al DP28. Los animales eran evaluados en los minutos 5-9 o 10-14 post-administración. La información fue colapsada por sexo (machos y hembras) y el orden de presentación de las pruebas. Los ANOVAs indicaron que, independientemente del tratamiento de etanol y del sexo, el total de entradas a ambos brazos (panel a), el total de entradas en los brazos abiertos (panel b) y el total de entradas en los brazos cerrados (panel c) fueron mayores cuando el LEC era presentado anterior al CA durante los minutos (5-9). Los asteriscos (*) indican una diferencia estadísticamente significativa entre las dosis de etanol y el grupo que recibió vehículo (0,0 g/kg). Los numerales (#) indican una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos que recibieron etanol y el grupo sin manipulación (NT). En todas las diferencias (* y #) $p < 0,001$. Las barras verticales indican los errores estándar de la media (EEM).

Caja de Luz-Oscuridad

La Figura 27 muestra los valores de actividad motora en LO (i.e. número total de transiciones entre los compartimentos blanco y negro) en función de tratamiento con etanol. El ANOVA arrojó un efecto principal de tratamiento con etanol ($F_{5,222} = 2,63; p < 0,05$). Los animales que recibieron las dosis de 1,25 g/kg exhibieron significativamente mayor locomoción que los animales NT. Los animales que recibieron 3,5 g/kg mostraron, comparados con los animales tratados con vehículo, significativamente menor actividad motora. Los animales que recibieron las dosis 2,5 y 0,5 g/kg exhibieron similar locomoción a los grupos controles (0,0 g/kg y NT)

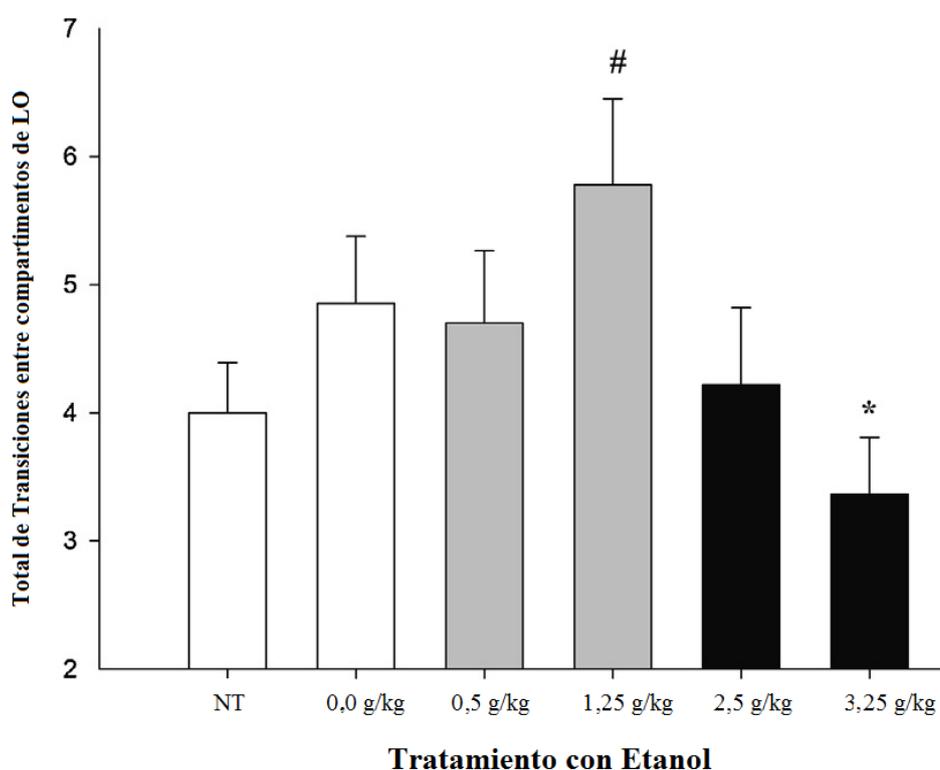


Figura 27. Total de transiciones entre compartimentos de la caja de luz-oscuridad (LO) en función del tratamiento de etanol (0,0; 0,5; 1,25; 2,5 y 3,25 g/kg; o sin manipulación [NT]) en ratas adolescentes al DP28. La información fue colapsada por sexo (macho o hembra) y el orden de presentación de las pruebas. A lo largo de los tratamientos, el número total de transiciones entre los compartimentos de LO fue mayor cuando los animales fueron evaluados en CA antes que en LEC. El factor sexo no ejerció un efecto significativo principal ni interactuó significativamente con los demás factores. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo que recibió la dosis 3,25 g/kg y el grupo que recibió vehículo (0,0 g/kg). El numeral (#) indica diferencia estadísticamente significativa entre el grupo que recibió la dosis de 1,25 g/kg y el grupo sin manipulación (NT). En ambas diferencias (* y #) $p < 0,05$. Las barras verticales indican los errores estándar de la media (EEM).

El ANOVA del tiempo pasado sobre el compartimento blanco de LO (s) reveló efectos principales de tratamiento ($F_{5,222} = 2,45$; $p < 0,05$) y orden de presentación de las pruebas ($F_{1,222} = 16,44$; $p < 0,001$). A través de los tratamientos, el tiempo pasado en este compartimento fue mayor cuando los animales eran evaluados primero en CA que cuando eran evaluados primero en LEC ($21,80 \pm 2,47$ vs. $9,95 \pm 1,41$). El orden de presentación de las pruebas no interactuó significativamente con el tratamiento de etanol. Quizá más importante, las pruebas post-hocs indicaron que el grupo NT y los animales que recibieron las dosis 0,0; 0,5 o 1,25 g/kg de etanol pasaron similar porcentaje de tiempo sobre el compartimento blanco. Los animales que recibieron las dosis 2,5 g/kg pasaron similar tiempo sobre el compartimento blanco que el grupo tratado con vehículo, aunque pasaron significativamente menos tiempo sobre este compartimento respecto del grupo NT. Más aún, los adolescentes tratados con la dosis 3,25 g/kg de etanol pasaron significativamente menor tiempo en el compartimento blanco que los grupos controles (0,0 g/kg y NT), y que los animales que recibieron la dosis 1,25 g/kg de etanol (Figura 28). Estos resultados sugieren que la dosis 3,25 g/kg de etanol puede haber ejercido un efecto ansiógeno en LO y aporta más información para indicar que el efecto estimulante motor en CA (como el ejercido por la dosis de 3,25 g/kg) no parece estar derivado de un efecto ansiolítico. No se observó efecto significativo principal ni interacciones significativas que involucraran el factor sexo.

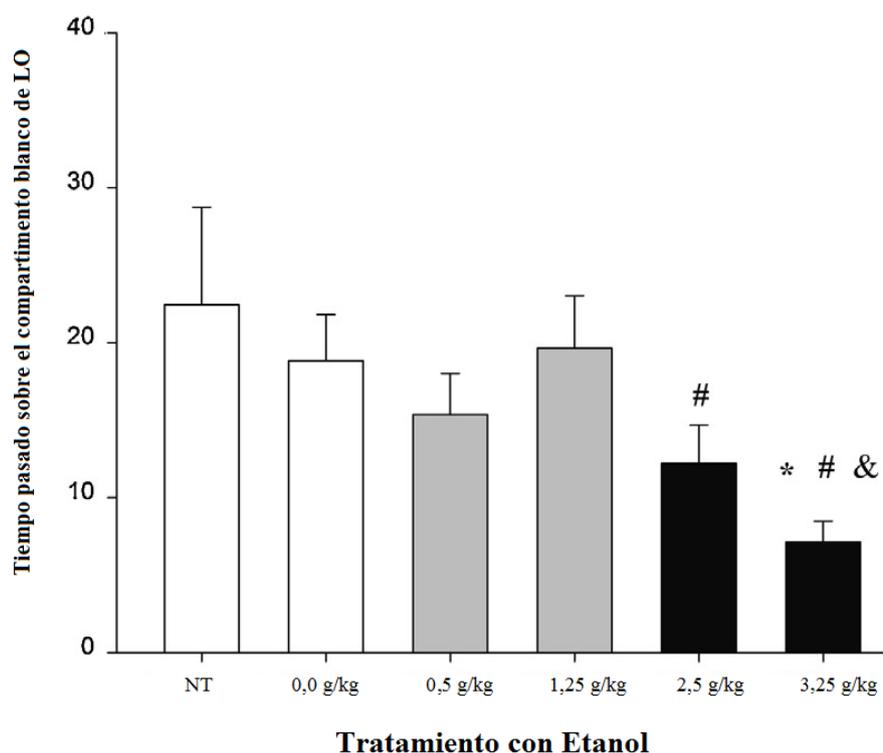


Figura 28. Tiempo pasado sobre el compartimento blanco de la caja de luz-oscuridad (LO) en función del tratamiento de etanol (0,0; 0,5; 1,25; 2,5 y 3,25 g/kg; o sin manipulación [NT]) en ratas adolescentes al DP28. La información fue colapsada por sexo (macho o hembra) y el orden de presentación de las pruebas. A lo largo de los tratamientos, el tiempo pasado sobre el compartimento blanco de LO fue mayor cuando los animales fueron evaluados en CA primero que en LEC. El factor sexo no ejerció efecto principal ni interactuó con los demás factores. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo que recibió la dosis 3,25 g/kg y el grupo que recibió vehículo (0,0 g/kg). Los numerales (#) indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos que recibieron las dosis 2,5 y 3,25 g/kg respecto al grupo sin manipulación (NT). El signo *et* (&) indica una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de animales tratados con la dosis 3,25 g/kg de etanol y los que recibieron la dosis de 1,25 g/kg de etanol. En todas las diferencias (*, # y &) $p < 0,05$. Las barras verticales indican los errores estándar de la media (EEM).

Correlaciones entre las medidas de actividad y de ansiedad de las pruebas de CA, LEC y LO

La Tabla 5 muestra las correlaciones de Pearson entre las medidas de CA, LEC y LO. Los análisis para el total de la muestra indicaron que la duración total de actividad motora (s) en CA y el número total de entradas en ambos brazos del LEC se encontraban, si bien de manera moderada significativa y positivamente asociadas ($r = 0,27$). Esto implicaba que una mayor ambulación en una de las pruebas estaba asociada a una mayor actividad en la otra prueba. Más aún, la actividad motora en CA estaba significativamente asociada con el número de entradas en los brazos cerrados ($r = 0,30$), pero no en los brazos abiertos ($r = 0,07$) en LEC. Estos resultados parecían indicar que los brazos cerrados serían un mejor indicador de actividad para LEC que la suma de entradas en ambos brazos de la prueba, aunque comúnmente en estudios previos la medida más utilizada para evaluar actividad ha sido esta última (File, 2001). Las entradas en los brazos cerrados parece verse menos afectada por la ansiedad asociada con la exploración de los brazos abiertos. El porcentaje de entradas en los brazos abiertos en LEC se mostró negativamente asociada al número de entradas en los brazos cerrados ($r = -0,24$) de la prueba.

Uno de los objetivos que perseguía la estrategia correlacional era determinar si una mayor locomoción en CA, particularmente después de la administración de etanol, estaba asociada con una menor respuesta de ansiedad en LEC o LO. La asociación entre la actividad motora (s) en CA y el % de entradas en los brazos abiertos en LEC resultó casi nula ($r = -0,02$) para el total de la muestra de sujetos y no significativa ($r \leq 0,25$) para los grupos tratados con etanol o el grupo NT. De modo similar, la actividad motora en CA no estuvo asociada significativamente con el tiempo pasado sobre el compartimento blanco en LO o con el número de entradas en los brazos abiertos de LEC en ninguno de los grupos experimentales. En el total de la muestra de sujetos, como así también para cada una de los grupos de dosis empleadas, el tiempo pasado sobre el área central en CA (%) no estuvo asociado significativamente con las medidas registradas en LEC o LO, ni tampoco estuvo asociado con la actividad motora en CA. En conjunto, los resultados sugirieron que la actividad motora inducida por etanol en CA no resulta de la disminución de ansiedad inducida por la droga; al menos no bajo las condiciones experimentales planteadas en este experimento.

En el total de la muestra general de sujetos, la locomoción en LO estuvo asociada significativamente con el número total de entradas en los brazos abiertos, % de entradas en los brazos abiertos, y al número de entradas en los brazos abiertos de LEC ($r = 0,31$; $0,32$, y $0,35$, respectivamente) y con el tiempo pasado sobre el compartimento blanco de LO ($r = 0,64$). Como se podía esperar, la actividad motora (i.e., número total de entradas en ambos los brazos) en LEC estuvo

significativamente asociada con el porcentaje de entradas a los brazos abiertos ($r = 0,40$) de la prueba.

El número total de entradas (abiertos y cerrados) y el % de entradas a los brazos abiertos de LEC estuvieron significativamente asociados en todas las condiciones experimentales ($r = 0,93-0,96$). El número total de entradas a los brazos cerrados estuvo significativamente asociado con la locomoción en LEC desplegada en la muestra total de sujetos ($r = 0,77$) y en cada condición experimental ($r = 0,60-0,86$). El número total de entradas a los brazos abiertos estuvo significativamente asociado con la locomoción en LEC desplegada en el total de la muestra de sujetos ($r = 0,61$) y en los grupos tratados con las dosis 1,25; 2,5 y 3,25 g/kg de etanol ($r = 0,60$; 0,68 y 0,64; respectivamente).

El tiempo pasado sobre el compartimento blanco en LO estuvo significativamente asociado a la locomoción en LO en todos los grupos experimentales ($r = 0,64-0,96$), a excepción del grupo NT. En el grupo tratado con la dosis de 1,25 g/kg el tiempo pasado sobre el compartimento blanco de LO estuvo significativamente asociado con el porcentaje de entradas a los brazos abiertos ($r = 0,45$) y con el número de entradas a los brazos abiertos en LEC ($r = 0,44$). El tiempo pasado sobre el compartimento blanco de LO estuvo también significativamente asociado a la locomoción en LEC en el grupo tratado con la dosis de 2,5 g/kg de etanol ($r = 0,44$).

La locomoción en LO también estuvo significativamente asociada a la locomoción en LEC en el total de la muestra general de sujetos ($r = 0,31$), y en los grupos tratados con las dosis 1,25 y 2,5 g/kg de etanol (ambos $r = 0,53$). Estuvo también asociado significativamente con el número de entradas en los brazos cerrados en LEC en aquellos animales que recibieron la dosis 1,25 g/kg de etanol ($r = 0,54$), para el total de la muestra general de sujetos ($r = 0,36$) y el porcentaje de entradas en los brazos abiertos en LEC en el grupo de animales que recibieron la dosis 1,25 g/kg de etanol ($r = 0,52$).

Tabla 5. Correlaciones entre las medidas de actividad y ansiedad en las pruebas de comportamiento CA, LEC y LO

		1. Entradas en BRa	2. Entradas en BRc	3. % entradas en BRa	4. Locomoción en LEC	5. Locomoción en CA	6. Locomoción en LO	7. Tiempo pasado en el compartimento blanco de LO
General	1.	1,00						
	2.	-0,02	1,00					
	3.	0,93*	-0,24*	1,00				
	4.	0,61*	0,77*	0,40*	1,00			
	5.	0,07	0,30*	-0,02	0,27*	1,00		
	6.	0,35*	0,10	0,32*	0,31*	-0,14	1,00	
	7.	0,17	0,02	0,17	0,12	-0,16	0,64*	1,00
NT	1.	1,00						
	2.	-0,13	1,00					
	3.	0,93*	-0,32	1,00				
	4.	0,39	0,86*	0,18	1,00			
	5.	-0,17	0,13	-0,15	0,03	1,00		
	6.	0,00	0,27	-0,01	0,23	-0,21	1,00	
	7.	-0,03	0,19	-0,04	0,15	0,01	0,30	1,00
0,0 g/kg	1.	1,00						
	2.	-0,29	1,00					
	3.	0,95*	-0,48*	1,00				
	4.	0,25	0,85*	0,03	1,00			
	5.	0,03	0,16	-0,03	0,16	1,00		
	6.	0,41	0,10	0,31	0,35	-0,02	1,00	
	7.	0,29	0,06	0,21	0,24	-0,12	0,89*	1,00
0,5 g/kg	1.	1,00						
	2.	-0,39	1,00					
	3.	0,96*	-0,54*	1,00				
	4.	0,42	0,66*	0,24	1,00			
	5.	-0,13	0,23	-0,11	0,10	1,00		
	6.	0,30	-0,06	0,28	0,17	-0,28	1,00	
	7.	0,29	-0,01	0,26	0,21	-0,24	0,96*	1,00
1,25 g/kg	1.	1,00						
	2.	0,03	1,00					
	3.	0,94*	-0,18	1,00				
	4.	0,66*	0,76*	0,47*	1,00			
	5.	-0,03	0,36	-0,13	0,23	1,00		
	6.	0,54*	0,25	0,52*	0,53*	-0,06	1,00	
	7.	0,44*	0,15	0,45*	0,39	-0,15	0,88*	1,00
2,5 g/kg	1.	1,00						
	2.	-0,16	1,00					
	3.	0,94*	-0,33	1,00				
	4.	0,68*	0,61*	0,51*	1,00			
	5.	-0,13	0,11	-0,18	-0,03	1,00		
	6.	0,37	0,28	0,27	0,53*	-0,15	1,00	
	7.	0,35	0,18	0,28	0,44*	-0,23	0,93*	1,00
3,25 g/kg	1.	1,00						
	2.	0,16	1,00					
	3.	0,94*	0,00	1,00				
	4.	0,64*	0,86*	0,48*	1,00			
	5.	0,34	0,32	0,25	0,42*	1,00		
	6.	0,14	-0,02	0,12	0,05	-0,15	1,00	
	7.	0,10	-0,10	0,11	-0,03	-0,23	0,94*	1,00

Nota 1: BRa = brazos abiertos, BRc = brazos cerrados, CA = campo abierto, LEC = laberinto elevado en cruz, LO = caja de luz-oscuridad. Nota 2: las correlaciones significativas ($p < .007$) están expresadas en negrita y llevan un asterisco (*). Nota 3: Locomoción en LEC refiere al número total de entradas en los brazos abiertos y cerrados de la prueba. La locomoción en CA refiere al tiempo (s) en movimiento dentro de la prueba. La locomoción en LO refiere al número de transferencias entre compartimentos (blanco y negro).

Ingesta de Etanol, Sacarosa y Fluidos totales en función del tratamiento con etanol al DP28

La Figura 29 muestra la ingesta total (g/kg, panel izquierdo) y porcentaje de preferencia (% , panel derecho) de etanol al DP30; en función del tratamiento de etanol al DP28. El ANOVA mostró que la experiencia previa con etanol modifica el consumo posterior de alcohol. Más precisamente, los sujetos administrados con 3,25 g/kg exhibieron un incremento significativo en el porcentaje de preferencia de etanol ($F_{5,263} = 3,29$; $p < 0,01$). Este grupo de animales también exhibieron un mayor consumo en término de g/kg, si bien estadísticamente el efecto no alcanzó significancia estadística ($p > 0,15$). No se observaron efectos principales atribuibles al sexo u orden de presentación de las pruebas o interacciones significativas que involucraran estos factores.

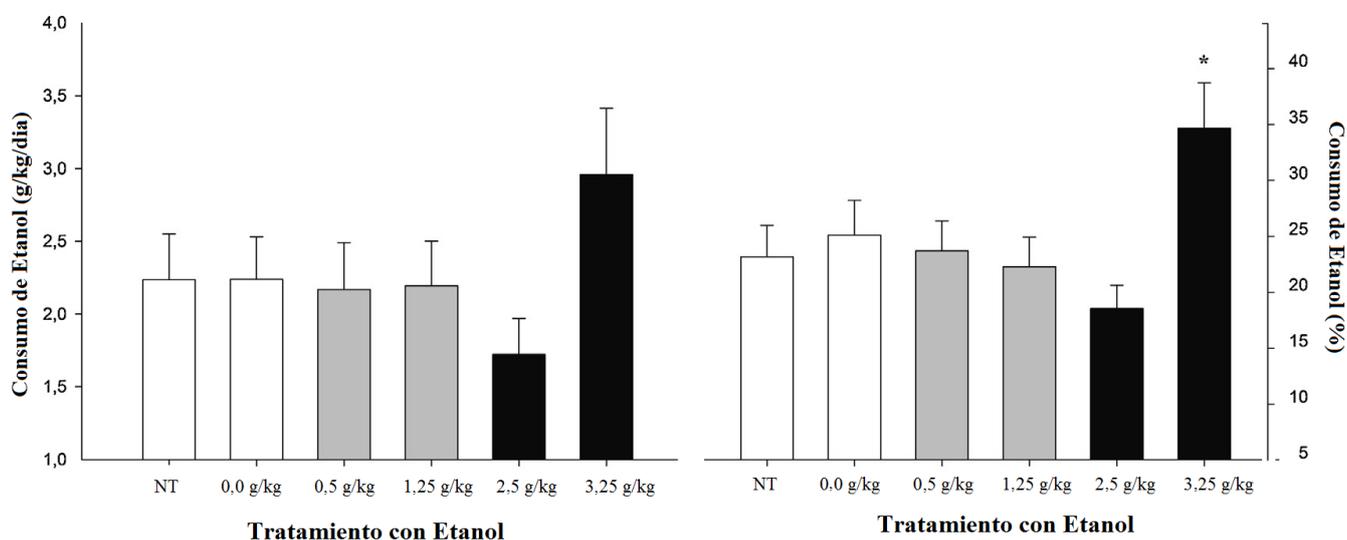


Figura 29. Consumo de etanol g/kg/día [Panel izquierdo] y porcentaje de preferencia de alcohol [Panel derecho] en función del tratamiento con etanol (0,0; 0,5; 1,25; 2,5 y 3,25 g/kg; o sin manipulación [NT]) en ratas machos y hembras adolescentes al DP29. Al día siguiente en que los animales fueran expuestos a las pruebas de comportamiento, eran evaluados durante 24 h en un prueba de ingesta de tres vías donde tenían acceso a tubos graduados de 25 ml que contenían: una solución de sacarosa al 1% v/v, una solución de etanol a una concentración al 5% vehiculizado en sacarosa al 1% v/v, y una solución de agua de pico. La información se encuentra colapsada por el factor de sexo. Éste último no ejerció efecto principal ni interactuó con los demás factores. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) entre el grupo que recibió la dosis 3,25 g/kg de etanol y el grupo que recibió vehículo (0,0 g/kg). Las barras verticales indican los errores estándar de la media (EEM).

En contraste con el efecto facilitador observado sobre el consumo de etanol, el tratamiento con la dosis 3,25 g/kg disminuyó significativamente la ingesta de sacarosa. Los ANOVAs indicaron un efecto principal de tratamiento con etanol al DP28 en términos de consumo absoluto (i.e., ml/100g de peso corporal) y % de preferencia ($F_{5,263} = 3,09$ y $F_{5,263} = 3,68$; respectivamente, $ps < 0,01$). Las pruebas post hoc indicaron que los animales que recibieron la dosis 3,25 g/kg de etanol exhibieron menor ingesta de sacarosa que los animales de los demás grupos. Los valores medios (ml/100g y % de preferencia) y los errores estándar para cada grupo fueron los siguientes: NT ($20,65 \pm 1,14$ ml/100g y $64,34 \pm 3,00\%$), 0,0 g/kg ($18,93 \pm 1,18$ ml/100g y $62,72 \pm 3,49\%$), 0,5 g/kg ($17,94 \pm 1,20$ ml/100g y $61,04 \pm 3,64\%$), 1,25 g/kg ($20,81 \pm 1,06$ ml/100g y $66,60 \pm 2,96\%$), 2,5 g/kg ($20,52 \pm 1,18$ ml/100 y $66,51 \pm 3,10\%$), y 3,25 g/kg ($15,12 \pm 1,60$ ml/100 g, $49,07 \pm 3,81\%$).

El ANOVA indicó que el tratamiento con alcohol al DP28 no alteró el consumo total de fluidos (ml/100g). Los valores de la media y errores estándar para las dosis fueron los siguientes: NT ($31,70 \pm 0,94$), 0,0 g/kg ($29,67 \pm 1,05$), 0,5 g/kg ($28,87 \pm 1,04$), 1,25 g/kg ($31,38 \pm 1,14$), 2,5 g/kg ($30,58 \pm 1,01$), y 3,25 g/kg ($27,39 \pm 2,36$). Este resultado sugirió que el efecto facilitador que la dosis más alta ejerce sobre el consumo de etanol no obedeció a un incremento general en la ingesta de fluidos. Ni el sexo ni el orden de presentación de las pruebas ejercieron efecto principal o interactivo con las variables restantes en ninguna de las variables medidas durante la ingesta.

Análisis univariados y multivariados de los patrones de ingesta en los animales controles (NT o tratados con vehículo 0,0 g/kg)

Regresión Múltiple

Se desarrolló un modelo de regresión múltiple para predecir el consumo de alcohol (g/kg) en las ratas sin experiencia previa con la droga. Se introdujeron simultáneamente variables registradas en las tres pruebas; esto fue, en LEC (entradas en los brazos abiertos y cerrados [locomoción] y porcentaje de entradas en los brazos abiertos), en CA (frecuencia de erguimiento, porcentaje de tiempo pasado sobre el área central y locomoción) y en LO (números de transiciones entre compartimentos [locomoción] y tiempo pasado sobre el compartimento blanco). El análisis indicó que el consumo de etanol (g/kg) en la prueba de ingesta podía explicarse significativamente por el conjunto de variables consideradas. Específicamente, el modelo explicó un 22% de la variabilidad de los valores de ingesta de etanol ($R^2 = 0,22$; $R^{2a} = 0,14$; $ps < 0,05$). La inspección de los valores de correlación individual indicaron que el % de entradas a los brazos abiertos en LEC, el % de tiempo pasado sobre el área central del CA, y la frecuencia de erguimiento en CA predijeron significativamente los valores de ingesta ($\beta = 0,23$; $-0,26$, y $0,25$, respectivamente). En otras

palabras, consumen más de la droga aquellos animales que presentan mayor porcentajes de salidas a los brazos abiertos de LEC, que además presentan mayor números de conductas de erguimiento en CA y que permanecen un menor porcentaje de tiempo sobre el área central del CA. Las estimaciones restantes de las relaciones parciales e individuales entre las variables predictivas restantes consideradas y la ingesta de etanol no alcanzaron significación estadística. La descripción del modelo de regresión múltiple se presenta en la Tabla 6.

Cuando analizamos el consumo de sacarosa (ml/100g) durante las 24 h de la prueba de ingesta en función del mismo conjunto de variables empleadas para predecir el consumo de alcohol, el análisis no arrojó valores estadísticamente significativos ($R^2 = 0,07$, $R^{2a} = 0,02$; $ps < 0,05$). La inspección de los valores β para cada variable predictiva indicaron falta de asociación significativa entre las variables individuales e ingesta de sacarosa ($ps > 0,05$). Esto último indicó la especificidad del modelo de predicción para la solución de etanol.

Tabla 6. Valores obtenidos en los análisis de regresión múltiple (RM), sobre la ingesta de etanol (g/kg) y de sacarosa (ml/100 g). Las variables fueron incorporadas simultáneamente al modelo. El coeficiente de correlación R^2 y R^{2a} ajustada indicaron el porcentaje de varianza explicada; y la R^{2a} ajustada disminuye con el número de variables predictivas incluidas en la ecuación. Los efectos significativos ($p < 0,05$) en los niveles individual y multivariado figuran en negrita.

Variable Dependiente: Ingesta de Etanol (g/kg) $R^2 = 0,22$, R^2 Ajustada = 0,14; $p < 0,01$			
Variables cargadas	Beta	t	Valor p
Frecuencia de erguimiento en CA	0,25	2,31	0,02
Locomoción en CA	-0,07	-0,64	0,52
Porcentaje de tiempo sobre el área central en CA (%)	-0,26	-2,49	0,02
Locomoción en LEC	-0,01	-0,08	0,94
Porcentaje de entradas en los Bra en LEC (%)	0,23	2,14	0,03
Locomoción en LO	-0,19	-1,58	0,12
Tiempo pasado sobre el compartimento blanco en LO	0,18	1,60	0,11

Variable Dependiente: Ingesta de sacarosa (ml/100 g) $R^2 = 0,07$, R^2 Ajustada = -0,02; $p > 0,50$			
Variables cargadas	Beta	t	P level
Frecuencia de erguimiento en CA	-0,21	-1,82	0,07
Locomoción en CA	0,05	0,39	0,70
Porcentaje de tiempo sobre el área central en CA (%)	-0,02	-0,20	0,84
Locomoción en LEC	0,09	0,72	0,47
Porcentaje de entradas en los Bra en LEC (%)	0,05	0,38	0,71
Locomoción en LO	0,13	1,08	0,28
Tiempo pasado sobre el compartimento blanco en LO	0,05	0,44	0,66

Ingesta de Etanol en sujetos agrupados en función de su respuesta a la ansiedad en: Alto-, Medio- y Bajo-ansiosos

Mediante otro procedimiento utilizamos la población de animales controles - NT y 0,0 g/kg (n=80) - y la ordenamos en tres grupos (bajo-, medio- y alto-ansiosos [*ba*, *ma*, y *aa*; respectivamente]) en función de la respuesta a la ansiedad que mostraron en el LEC. La variable que consideramos fue el porcentaje de entradas en los brazos abiertos en LEC. El procedimiento que empleamos para seleccionar las subpoblaciones implicó una división por percentiles y está detallado en el apartado de análisis de datos del *Experimento 11* (“Análisis Univariados y Multivariados de los valores para la ingesta en sujetos controles: vehículo (0,0g/kg) y sin experiencia previa (NT) con la droga”).

Los ANOVAs para la ingesta de etanol y % de preferencia de etanol entre los grupos de animales arrojaron efectos principales en función de este criterio de selección ($F_{2,57} = 6,02$; $p < 0,01$, y $F_{2,57} = 4,61$; $p < 0,05$, respectivamente). Las pruebas post-hocs indicaron que los *alto-ansiosos* prefirieron y consumieron significativamente menos (g/kg) etanol, respecto de los grupos de animales *medio-* y *bajo-ansiosos*. Los últimos dos grupos exhibieron similar preferencia y consumo de la droga. El consumo (g/kg) y preferencia de etanol entre los tres grupos se presenta en la Figura 30 y en la Tabla 7

Los ANOVAs indicaron que las diferencias observadas en función de la respuesta de ansiedad basal fueron específicas al consumo y preferencia de la droga. Ni el consumo absoluto, ni la preferencia por sacarosa o el consumo de fluido totales fueron significativamente diferentes entre los grupos *ba-*, *ma-* o *aa-* (Tabla 7).

El grupo de animales controles (n = 80) fueron también clasificados como bajo-, medio- y alto-ansiosos [*ba1*, *ma1*, y *aa1*; respectivamente]) en función del % de tiempo pasado sobre el área central de CA. Los ANOVAs indicaron similares niveles de consumo absoluto de etanol y % de preferencia entre los grupos *ba1*, *ma1*, y *aa1* ($F_{2,57} = 2,51$; $p > 0,05$ y $F_{2,57} = 2,11$; $p > 0,10$, respectivamente). Los ANOVAs también indicaron que estos sujetos exhibieron similares niveles de ingesta de sacarosa (ml/100 g y el % de preferencia) y no difirieron en términos de consumo de fluidos totales ($ps > 0,05$). Véase Tabla 7 para la ingesta de etanol, sacarosa y fluidos totales en *alto-*, *medio-* y *bajo-ansiosos* clasificados en función de los patrones de exploración en el área central del CA

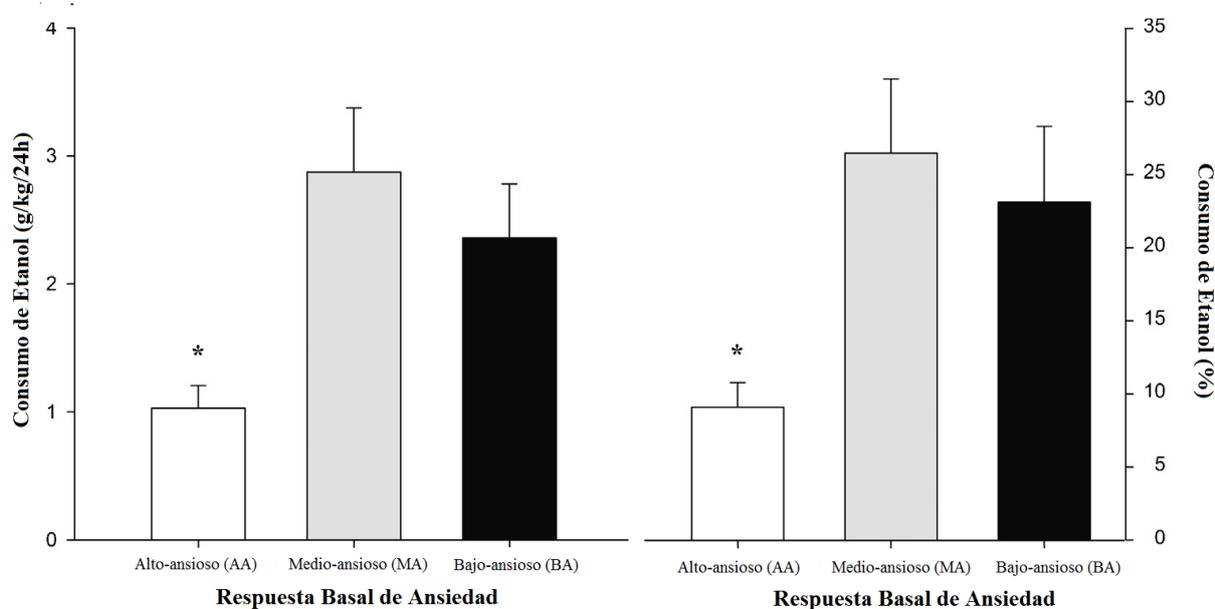


Figura 30. Consumo de etanol g/kg/día [*Panel izquierdo*] y porcentaje de preferencia de alcohol [*Panel derecho*] en animales controles ($n = 80$; recibieron vehículo $-0,0$ g/kg- o permanecieron sin manipulación -NT-) agrupados en función de la respuesta de ansiedad en laberinto elevado en cruz (LEC). Los animales fueron categorizados como alto-, medio- y bajo-ansiosos (AA, MA, BA; respectivamente). El criterio de selección resultó de un procedimiento de división por cuartiles de la población general en función del porcentaje de entradas en los brazos abiertos de LEC. La información se encuentra colapsada por el factor sexo. Éste último no ejerció efecto principal ni interactuó con los demás factores. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre los animales alto-ansiosos y los otros dos grupos (bajo- y medio-ansiosos) en el consumo (panel izquierdo; $p < 0,01$) y en el % de preferencia (panel derecho; $p < 0,05$). Las barras verticales indican los errores estándar de la media (EEM).

Tabla 7. Consumo de Fluidos Totales (ml/100 g), consumo y preferencia de sacarosa (ml/100 g), consumo y preferencia de etanol durante 24h en una prueba de ingesta de tres vías en ratas adolescentes sub-agrupadas como alto-, medio-, y bajo-ansioso en función del porcentaje de entradas en los brazos abiertos del LEC (sección izquierda); o en función del porcentaje de tiempo pasado en el área central de CA (sección derecha).

Variables Dependientes	Porcentaje de entradas en los brazos abiertos de LEC			Porcentaje de tiempo pasado sobre el compartimento blanco de CA		
	Alto-ansioso	Medio-ansioso	Bajo-ansioso	Alto-ansioso	Medio-ansioso	Bajo-ansioso
Consumo de Fluidos Totales (ml/100g)	29,70 ± 1,25	30,18 ± 1,53	29,51 ± 1,63	29,45 ± 1,52	30,84 ± 1,43	29,46 ± 1,49
Consumo de Sacarosa (ml/100g)	21,00 ± 1,56	18,30 ± 2,04	19,67 ± 1,68	18,65 ± 1,92	22,23 ± 1,47	21,12 ± 1,69
Preferencia de Sacarosa (%)	70,46 ± 4,15	58,19 ± 5,85	65,64 ± 4,59	61,75 ± 5,37	71,99 ± 3,47	70,32 ± 4,88
Consumo de Etanol (g/kg/24h)	1,03 ± 0,17	2,91 ± 0,50	2,24 ± 0,42	2,52 ± 0,48	1,86 ± 0,39	1,26 ± 0,30
Preferencia de Etanol (%)	9,09 ± 1,59	26,58 ± 5,06	22,01 ± 5,04	24,56 ± 5,44	14,76 ± 2,83	13,46 ± 3,82

Conclusión de la Sección II

En la sección II indagamos el efecto agudo del etanol sobre la estimulación motora; analizamos en qué medida este efecto dependía o estaba modulado por la novedad del contexto de evaluación; cuan específico era al período ontogenético de la adolescencia y si se alteraba por la exposición a diferentes fuentes de estrés. También indagamos sobre el significado funcional de esta activación motora inducida por etanol y evaluamos la posibilidad que reflejara un efecto ansiolítico de la droga o una interacción entre efectos ansiolíticos y estimulantes. Finalmente, utilizamos la información derivada de pruebas de comportamientos (CA, LEC y LO) para tratar de analizar uno de los objetivos centrales de la tesis doctoral; esto es, predecir consumo de alcohol en adolescencia y discriminar entre los individuos aquellos a riesgo de incurrir en consumo exacerbado de esta sustancia.

Respecto del rol de la novedad del contexto de evaluación, en el *Experimento 6* pudimos observar que una vez que el contexto se convierte en un espacio familiar, el efecto estimulante motor del alcohol disminuye, pero no desaparece. Esto es, la familiaridad del contexto modula pero no impide la expresión del efecto activador de la droga. En este sentido, el efecto de la droga sobre la ambulación no dependería solamente de una facilitación de la misma por el carácter novedoso del contexto.

Posteriormente, indagamos diferencias ontogenéticas en la sensibilidad a los efectos estimulantes motores del etanol. Los adultos y adolescentes (*Experimento 7*) de la cepa de ratas Wistar exocriadas exhibieron similar sensibilidad a los efectos estimulantes motores de la droga. Esta ausencia de efecto no obedeció a diferencias farmacocinéticas entre las edades (*Experimento 7b*).

En experimentos siguientes (*Experimentos 8, 9, 10*) replicamos las condiciones de evaluación e indagamos el efecto del estrés sobre esta sensibilidad motora en otra cepa de ratas (Sprague Dawley). Nuestra hipótesis basada, por ejemplo, en el trabajo de Pautassi et al. (2008b), era que los adolescentes de esta cepa expresarían mayor activación motora y mayor sensibilidad al estrés, respecto de sus pares adultos. Los estudios que han encontrado mayor sensibilidad en adolescentes que en adultos hacia el etanol, tras ser expuestos a estrés, generalmente han analizado su efecto sobre comportamiento social, por ejemplo, mostrando que el etanol reduce la ansiedad inducida por el estrés (Varlinskaya y Spear, 2012). En este sentido, supusimos que los animales serían sensibles al efecto estimulante y al estrés, y que este último exacerbaría el efecto activador inducido por la droga en los adolescentes aunque no en los adultos. Esta hipótesis se corroboró solo parcialmente. El etanol ejerció un efecto estimulante en los adolescentes y un efecto sedativo en los adultos Sprague Dawley, particularmente, en las dosis más altas. Por otro lado, observamos que los adultos, aunque

no los adolescentes, fueron sensibles al estrés, particularmente a la privación social. El estrés inducido por la restricción aguda del movimiento fue sorprendentemente ineficaz en alterar la locomoción espontánea o la inducida por etanol en ambas edades. Una forma alternativa de analizar este efecto, es que no es posible escindir en la modalidad de estrés por restricción del movimiento el aislamiento social que se experimenta simultáneamente al estresor. En este sentido, puede pensarse que el estrés inducido por la restricción del movimiento este aminorando el efecto estimulante de la privación social. Parte de estos resultados también son comparables a los observados por Varlinskaya et al. (2010), en donde los adolescentes fueron más sensibles que los adultos a la facilitación social inducida por dosis bajas de etanol, aunque más resistentes a la inhibición social inducidos por dosis altas de etanol.

Los adolescentes no fueron, sin embargo, insensibles a todas las fuentes de estrés. La administración de un agonista opiáceo kappa (U62, 066E) provocó una drástica disminución de la locomoción general en los adolescentes, similar a la previamente reportada en adultos (Ukai y Kameyama, 1985). El agonista también redujo (y en ciertos casos inhibió totalmente) la locomoción inducida por el etanol, efecto que es opuesto a lo que se ha visto sucede en ratas infantiles (Duke et al., 1997; Pautassi et al., 2012a).

En esta aproximación también analizamos los efectos ansiolíticos de la droga y cómo la mera exposición pasiva a la misma alteraba el consumo posterior de etanol. En relación a lo primero, evaluamos la relación entre medidas de actividad motora y de ansiedad inducida por el etanol en tres pruebas de comportamiento (CA, LEC y LO). En conjunto, los resultados sugirieron que el aumento en la exploración en CA después de recibir la administración de dosis altas (2,5 y 3,25 g/kg) reflejaba un efecto estimulante que en principio parecía relativamente independiente de consecuencias ansiolíticas. Específicamente, la dosis 2,5 g/kg aumentó la locomoción en los brazos abiertos en LEC, pero este aumento estuvo derivado por un aumento general de la actividad más que por una reducción específica del miedo a los espacios abiertos. Asimismo, la dosis mayor (3,25 g/kg) ejerció un efecto significativo estimulante en CA pero que no se acompañó de un efecto ansiolítico en LEC. De hecho, este último grupo permaneció menor tiempo sobre el compartimento blanco de LO. Esto sugería un posible efecto ansiógeno del etanol; no obstante, este mismo grupo mostró también una supresión de la actividad general en esta prueba (i.e., número de transiciones entre los compartimentos). Esto planteaba la posibilidad que el menor tiempo pasado sobre el compartimento blanco simplemente podía indicar un efecto depresor/sedativo tardío provocado por esta dosis, más precisamente porque dicha prueba era presentada entre los minutos 14-19 post-administración.

La dosis de 1,25 g/kg ejerció efectos estimulantes motores en CA y en LEC (locomoción y entradas en ambos brazos, respectivamente) y ansiolíticos en LEC, y los mismos fueron

relativamente independientes. En LEC, la dosis 1,25 g/kg de etanol aumentó el número de entradas únicamente en los brazos abiertos del aparato. La dosis 0,5 g/kg de etanol, en cambio, ejerció efecto ansiolítico en LEC y no ejerció efecto estimulante en CA. Más aun, cuando realizamos comparaciones con los grupos controles, ninguna de las tres dosis más bajas de etanol (i.e., 0,5, 1,25 y 2,5 g/kg) fue efectiva para aumentar el tiempo pasado en el área central del CA.

Observamos correlaciones positivas entre los puntajes de actividad de las tres pruebas. Esto significaba que el incremento en la locomoción en una prueba se asociaba al incremento de la actividad en las demás. Asimismo, no observamos correlación entre las puntuaciones de actividad en CA posterior a la administración de la droga y una menor respuesta de ansiedad en LEC o en LO, lo que sugiere que el incremento en la actividad en CA reflejaba más un efecto estimulante que ansiolítico. En otras palabras, los resultados en su conjunto indican una relativa disociación entre los efectos estimulantes motores y ansiolíticos del etanol durante la adolescencia.

¿Cómo alteró la exposición pasiva a la droga el consumo voluntario de alcohol? La exposición previa a la dosis más alta (3,25 g/kg) de etanol indujo mayor preferencia por el alcohol, pero no por la sacarosa, el día posterior a las pruebas comportamentales. Cabe recordar que la solución de etanol era preparada en una solución vehículo de sacarosa al 1% v/v.

El *Experimento 11* nos permitió, a su vez, estudiar parte de la población de sujetos experimentales siguiendo otra estrategia de análisis. Para ello seleccionamos de la totalidad animales en el estudio aquellos que no habían tenido exposición pasiva a la droga (NT y 0,0g/kg), e intentamos identificar sub-poblaciones a riesgo de exhibir consumo exacerbado de alcohol.

Para ello seguimos dos estrategias. En la primera elaboramos un modelo de regresión múltiple para predecir consumo de la droga en función de variables registradas en LEC, CA y LO. El modelo explicó significativamente en un 22% la variabilidad de los valores de ingesta de etanol. Más específicamente, aquellos sujetos sin exposición previa a la droga que mostraron mayor frecuencia de erguimiento -“rearing”- en campo abierto, mayor porcentaje de entradas en los brazos abiertos en laberinto elevado en cruz, y menor propensión a permanecer sobre el área central en CA fueron los que exhibieron mayor consumo de etanol. Una virtud de este modelo fue que el conjunto de comportamientos seleccionaron fue eficaz para explicar significativamente el consumo de etanol, pero no el de sacarosa. Las interpretaciones respecto de los resultados obtenidos a partir del modelos serán analizados en mayor profundidad en el apartado de discusión general.

La segunda estrategia consideró, de manera independiente, el porcentaje de entradas en los brazos abiertos en LEC y el porcentaje de tiempo pasado sobre el área central de CA. En función de estos índices ordenamos a los sujetos en tres grupos: alto-, medio-, bajo-ansiosos. Un puntaje alto en

LEC o en CA era indicador de baja ansiedad y, lo opuesto, un puntaje bajo un indicador de alta respuesta de ansiedad.

Nuestra expectativa, previa al experimento, era que los sujetos que mostrasen menor tiempo pasado en el área central de CA consumirían significativamente más etanol que pares que exhibían más tiempo sobre dicha área central. Asimismo, aquellos que mostraran menor porcentaje de entradas en los brazos abiertos en LEC consumirían significativamente más etanol. La hipótesis subyacente a estas expectativas se basa sobre el efecto ansiolítico del etanol. Se ha sugerido que el mismo sería uno de los componentes que median el consumo inicial de la droga, a partir de aminorar estados no placenteros de ansiedad, miedo y/o estrés (Koob et al., 1998; Spanagel et al., 1995). Ese efecto, sin embargo, no fue observado. No se encontraron diferencias en el consumo de etanol entre los diferentes grupos discriminados según el tiempo que pasaron sobre el área central de CA. En referencia al porcentaje de entradas en los brazos abiertos en LEC, similar a lo que observamos en el modelo de regresión múltiple en función de esta variable, las ratas con una alta respuesta de ansiedad (i.e., que exhibieron un número relativamente menor de entradas en los brazos abiertos) consumieron significativamente menos etanol que las ratas categorizadas como bajo- y medio-responderas a la ansiedad en este aparato.

La información obtenida en el *Experimento 11* se suma a la evidencia que indica que la relación entre estados de ansiedad y consumo del etanol arroja resultados contradictorios. Si bien se ha sugerido una asociación positiva entre estado de ansiedad y abuso de etanol en estudios humanos (Kushner et al., 1990) y en animales (Bahi, 2013; Möller et al., 1997; Spanagel et al., 1995), existen estudios preclínicos que ha reportado una relación opuesta (McMillen et al., 1998; Schuckit y Hesselbrock, 1994).

Una limitación del *Experimento 11* fue que empleamos una prueba de ingesta de una sesión de 24 h de duración. Posiblemente, la sensibilidad a la droga en el grupo de alta respuesta de ansiedad podría diferir si los animales tienen acceso a más oportunidades-sesiones con la droga; es decir, un acceso prolongado al etanol.

En conjunto, los resultados en el *Experimento 11* proporcionaron nueva información sobre el efecto de la administración aguda de etanol sobre la sensibilidad motora y ansiolítica a la droga y el consumo de la misma en ratas adolescentes. El etanol indujo efectos estimulantes y ansiolíticos y, en función de estos efectos, los resultados dieron sustento a la hipótesis estarían mediados por diferentes mecanismos; al menos en la cepa, pruebas y condiciones aquí empleadas. La administración de la dosis 3,25 g/kg de etanol indujo un efecto estimulante e incremento el consumo y la preferencia por la droga. El efecto estimulante motor detectado en el CA aparentemente no estuvo relacionado con los posibles efectos ansiolíticos. Aportamos nueva información al describir que una parte

significativa del consumo de alcohol en la rata adolescente puede explicarse en función de variables comportamentales relacionados con exploración y ansiedad en campo abierto y en el laberinto elevado en cruz. Partes de estos resultados serán analizados con mayor profundidad en la discusión general.

SECCIÓN III: Rol predictivo de los niveles de Ansiedad sobre el Patrón de Consumo de Etanol durante la Adolescencia.

En el *Experimento 11* de la sección II intentamos entre otras cosas analizar los efectos ansiolíticos del etanol. Estos han sido sindicados como mediadores del consumo inicial de la droga, ya que supone que esta disminuye estados no placenteros como la ansiedad, miedo y/o estrés (Koob et al., 1998; Spanagel et al., 1995). En dicho *Experimento 11* discriminamos a las ratas adolescentes, en función de su respuesta basal de ansiedad, en tres grupos: alto-, medio- y bajo-ansiosos. Bajo las condiciones de ese experimento, en el que los animales tenían acceso a la droga en una sola sesión de 24 horas, no fue posible corroborar la hipótesis que el consumo de la droga estaba asociado a un alto nivel de ansiedad. Por ello, en la sección III intentamos profundizar sobre esta relación, extendiendo la duración de las pruebas de ingesta. Nuestra expectativa era que la exposición prolongada y repetida al etanol permitiría observar más claramente diferencias en los perfiles de consumo en función de los niveles de ansiedad. En este sentido Samson et al. (1988) sugieren que es probable que el consumo de alcohol por reforzamiento negativo requiera varios episodios de ingesta, para que los sujetos puedan aprender la contingencia entre el acceso a la droga y los efectos de reducción de ansiedad provocados por la misma. A las consideraciones de Samson y colaboradores subyace la “hipótesis de reducción de tensión” (Conger, 1951; Greeley y Oei, 1999), la cual considera que el consumo de etanol reduce miedo o tensión, y que este efecto aumenta las probabilidades de consumo posterior.

En función de estas consideraciones, evaluamos si ratas adolescentes con mayor respuesta de ansiedad estarían mayor riesgo de mantener o escalar el consumo de alcohol, respecto de pares con menor respuesta de ansiedad.

En humanos, se ha reportado que mujeres con síntomas de estrés post-traumático causados por episodios de violencia doméstica están asociadas tanto a mayores expectativas de que el alcohol y otras drogas permiten afrontar las secuelas físicas y psicológicas del maltrato como a mayores problemas con el alcohol (Peters et al., 2012). Si bien los resultados en la literatura relativos a la relación estrés y alcohol han sido confusos (Read et al., 2003), algunos trabajos han logrado vincular el consumo problemático como consecuencia de reducir estados negativos (Carey y Correia, 1997; Carpenter y Hasin, 1998a; 1998b) provocados por la exposición a tareas estresantes (Greeley y Oei, 1999; Levenson et al., 1980). Asimismo, las creencias relativas a la capacidad del alcohol para aminorar estados no placenteros (es decir, las expectativas sobre la reducción de la tensión [RT]) han

sido implicados en el consumo problemático en estudiantes universitarios (Brown, 1985; Kassel et al., 2000).

En roedores las aproximaciones experimentales que han intentado validar esta hipótesis, es decir, observar la relación positiva entre los diferentes factores de estrés o ansiedad y el consumo de etanol, han resultado contradictorios. Por ejemplo, se ha visto una relación positiva entre ansiedad y consumo de alcohol en ratas genéticamente modificadas para preferir alcohol -P vs NP- (Stewart et al., 1993), como así también en ratones (Bahi, 2013) y en ratas seleccionadas por su respuesta de ansiedad en laberinto elevado en cruz (Spanagel et al., 1995). Estos resultados son consistentes con los observados al inducir lesiones bilaterales en la amígdala central. La lesión en esta área reduce tanto la ansiedad como el consumo voluntario de etanol (Möller et al., 1997). Otros estudios, sin embargo, que emplearon ratas seleccionadas genéticamente por exhibir alta o baja respuesta de ansiedad (“HAB y LAB”, respectivamente), observaron un incremento en el consumo del alcohol en las LAB (Henniger et al., 2002).

En la sección III realizamos dos aproximaciones experimentales que intentaron evaluar la relación posible entre ambos factores (respuesta de ansiedad y consumo de alcohol). La primera aproximación implicó una *experiencia preliminar o experimento piloto*. Con ella, buscábamos precisar parámetros y fijar criterios como: cuales serían los indicadores a considerar para definir respuesta de ansiedad, cuáles serían las características y qué modalidad o modalidades consideraríamos para la prueba de consumo de alcohol (longitud, naturaleza, etc.); evaluar si la relación propuesta podía establecerse diferencialmente en machos o hembras, teniendo presente que generalmente en las hembras consumen más gramos absolutos de etanol que los machos en diferentes cepas de roedores (Loi et al., 2014; Piano et al., 2005; Sarviharju et al., 2001). En función de los resultados de esta experiencia piloto, pusimos en marcha el *Experimento 12*, en el cual analizamos explícitamente la relación ansiedad y consumo de la droga; y como la interacción entre estos factores podía alterarse por la introducción de una fuente de estrés.

Experiencia Piloto: *Primera aproximación sobre cómo el patrón de consumo de alcohol puede alterarse en función de los niveles de respuesta de ansiedad en ratas adolescentes.*

Introducción

Empleamos dos de las pruebas de comportamiento para registrar ansiedad que habíamos utilizado en el *Experimento 11*. Más específicamente, el laberinto elevado en cruz y la caja de luz-oscuridad (LEC y LO; respectivamente); las cuales han servido tradicionalmente para medir ansiedad. La razón de utilizar dos, en vez de una de las pruebas reside en que buscábamos alcanzar una comprensión de carácter multivariada sobre la respuesta de ansiedad. En este sentido, cada prueba arrojaría un puntaje de ansiedad y la combinación de las mismas permitiría desarrollar una medida compuesta de ansiedad.

Esta medida compuesta de ansiedad resultó del promedio de los puntajes z de una variable -indicativa de ansiedad- por cada prueba. En el caso del LEC obteníamos el puntaje z a partir del porcentaje (%) de entradas en los brazos abiertos; mientras que en LO obteníamos el puntaje z a partir del porcentaje (%) tiempo pasado sobre el compartimento blanco de LO. En otras palabras, obteníamos un valor compuesto que resultaba del promedio de la suma lineal de los puntajes estandarizados (puntajes z) de las pruebas LEC y LO. Este valor era indicativo del nivel de respuesta de ansiedad. Un puntaje alto (por ejemplo, exhibida por un sujeto que pasó mucho más tiempo que sus pares tanto en los brazos abiertos del LEC, como en la zona blanca del LO) era considerado como una respuesta de ansiedad baja, y lo opuesto era considerado una respuesta de ansiedad alta. Un puntaje intermedio era considerado como una respuesta promedio o estándar de ansiedad. En función de estos valores los animales eran asignados, dentro de cada una de sus camadas y en función del sexo, a tres condiciones que reflejaban el nivel de respuesta de ansiedad: alto-, medio-, y bajo-ansioso (AA, MA, BA; puntaje bajo, intermedio, alto; respectivamente). De un total de 160 animales representativos de 16 camadas (10 animales por camada; 5 machos y 5 hembras) se seleccionaron 96 animales (48 animales por sexo) en función del criterio de separación mencionado previamente (AA, MA, BA). Los animales eran evaluados en los días postnatales 28 y 29 por cinco minutos en cada prueba. Eran expuestos un día a cada prueba. El orden de presentación de las pruebas se contrabalanceó. Más en detalle, obteníamos los puntajes de una camada y, para dividir a los sujetos en altos o bajos ansiosos, considerábamos los valores de ansiedad estandarizados en cada sexo. Por ejemplo, de los cinco valores observados en las 5 hembras de una camada considerábamos los dos puntajes extremos (máximo y mínimo) y el puntaje intermedio. El animal que obtenía el valor máximo de su grupo de referencia –por camada y por sexo– era categorizado como un animal de

baja respuesta de ansiedad –BA-, si obtenía el valor mínimo de su grupo de referencia era categorizado como un animal de alta respuesta de ansiedad –AA-, y si obtenía el valor intermedio era categorizado como un animal con una respuesta estándar de ansiedad –MA-. Esto se repitió para cada una de las camadas y en función de cada sexo. Una vez que asignamos cada animal a un grupo según el nivel de respuesta de ansiedad quedaron conformados los grupos AA, MA, BA; n=16 por condición

Empleamos, por lo tanto un diseño factorial de 3 (respuesta de ansiedad: AA, MA o BA) x 2 (sexo: machos o hembras) x (orden de presentación de las pruebas: LEC/LO o LO/LEC). Diez animales por camada (5 hembras y 5 machos) en los DPs 28 y 29 fueron evaluados en laberinto elevado en cruz (LEC) y una prueba de luz-oscuridad (LO) -un día en cada prueba; duración: 5 min-.

Desde el DP32, es decir, tres días posteriores a la evaluación comportamental, los animales eran sujetos a un protocolo de ingesta con el propósito de evaluar diferencias en el consumo en función de los niveles de respuesta de ansiedad. El protocolo de ingesta constaba de 21 días, es decir, tres semanas (DPs32-51). Solo tres días de cada semana (lunes, miércoles y viernes) se ofrecía a los animales acceso a doble vía de fluidos. Cada sesión de ingesta tenía una duración de 18 h; esto era, día de por medio (intermitente) tenían acceso limitado “overnight” desde las 15:00 a las 9:00 h del día siguiente. Las sesiones tuvieron lugar los DPs32, 34 y 36 (primera semana de ingesta; sesiones 1-3), DPs39, 41 y 43 (segunda semana de ingesta; sesiones 4-6), y DPs46, 48 y 50 (tercera semana de ingesta; sesiones 7-9). Al inicio de cada sesión los animales eran pesados y alojados individualmente en cajas estándar con viruta de pino. Cada jaula era equipada con dos botellas de vidrio de 100 ml, con tapones de goma que tenían un pico de acero inoxidable con punta redonda tipo bolígrafo (“ball point”). Una botella se llenaba con agua de pico y la otra con una concentración de etanol al 5% v/v. El etanol y el vehículo se mezclaban con sacarosa al 1% v/v (primera semana), con sacarosa al 0,5% v/v (segunda semana) o agua de pico (tercera semana). En otras palabras, los animales comenzaban a responder por soluciones de etanol ligeramente endulzadas y en las sesiones siguientes la sacarosa se iba retirando, hasta que en las sesiones 7-9 consumían de las soluciones (etanol o agua) sin endulzar. Durante los días en que no tenían las sesiones de ingesta los animales era alojados de a tres con pares del mismo sexo y que tuvieran la misma respuesta de ansiedad (i.e., alto-ansiosos con alto-ansiosos) en cajas estándar donde tenían acceso ad-libitum de comida y agua de pico. El protocolo de ingesta se detalla en la Tabla 8

Tabla 8. Protocolo de Ingesta (DPs28-51)

	<i>DP/Día/Hora</i>	<i>Procedimiento</i>
Pruebas de Comportamiento	28/1/08:30 am	LEC o LO. Duración 5 minutos
	29/2/08:30 am	LO o LEC. Duración 5 minutos
Descanso	30/3/--	Agua y comida ad-libitum
	31/4/--	Alojados por camadas y sexo
Semana 1 (sesiones 1-3)	32/5/15:00 pm	Pesaje y alojamiento individual. Medición de cada botella de ingesta (gr.) Acceso doble vía: 5% EtOH + 1% v/v sacarosa y sacarosa 1%v/v. Comida ad-libitum
	33/6/09:00 am	Medición de cada botella de ingesta (gr.) Pesaje y alojamiento con pares de la misma categoría. Tres animales por caja Agua y comida ad-libitum
	34/7/15:00 pm	Pesaje y alojamiento individual. Medición de cada botella de ingesta (gr.) Acceso doble vía: 5% EtOH+ 1% v/v sacarosa y sacarosa 1%v/v. Comida ad-libitum
	35/8/09:00 am	Medición de cada botella de ingesta (gr.) Pesaje y alojamiento con pares de la misma categoría. Tres animales por caja Agua y comida ad-libitum
	36/9/15:00 pm	Pesaje y alojamiento individual. Medición de cada botella de ingesta (gr.) Acceso doble vía: 5% EtOH+ 1% v/v sacarosa y sacarosa 1%v/v. Comida ad-libitum
Descanso	37/10/09:00 am	Medición de cada botella de ingesta (gr.) Pesaje y alojamiento con pares de la misma categoría. Tres animales por caja Agua y comida ad-libitum
	38/11/--	Agua y comida ad-libitum
Semana 2 (sesiones 4-6)	39/12/15:00 pm	Pesaje y alojamiento individual. Medición de cada botella de ingesta (gr.) Acceso doble vía: 5% EtOH+ 0,5% v/v sacarosa y sacarosa 0,5%v/v. Comida ad-libitum
	40/13/09:00 am	Medición de cada botella de ingesta (gr.) Pesaje y alojamiento con pares de la misma categoría. Tres animales por caja Agua y comida ad-libitum
	41/14/15:00 pm	Pesaje y alojamiento individual. Medición de cada botella de ingesta (gr.) Acceso doble vía: 5% EtOH+ 0,5% v/v sacarosa y sacarosa 0,5% v/v. Comida ad-libitum
	42/15/09:00 am	Medición de cada botella de ingesta (gr.) Pesaje y alojamiento con pares de la misma categoría. Tres animales por caja Agua y comida ad-libitum
	43/16/15:00 pm	Pesaje y alojamiento individual. Medición de cada botella de ingesta (gr.) Acceso doble vía: 5% EtOH+ 0,5% v/v sacarosa y sacarosa 0,5%v/v. Comida ad-libitum
Descanso	44/17/9:00 am	Medición de cada botella de ingesta (gr.) Pesaje y alojamiento con pares de la misma categoría. Tres animales por caja Agua y comida ad-libitum
	45/18/--	Agua y comida ad-libitum
Semana 3 (sesiones 7-9)	46/19/15:00 pm	Pesaje y alojamiento individual. Medición de cada botella de ingesta (gr.) Acceso doble vía: 5% EtOH+ agua y agua. Comida ad-libitum
	47/20/09:00 am	Medición de cada botella de ingesta (gr.) Pesaje y alojamiento con pares de la misma categoría. Tres animales por caja Agua y comida ad-libitum
	48/21/15:00 pm	Pesaje y alojamiento individual. Medición de cada botella de ingesta (gr.) Acceso doble vía: 5% EtOH+ agua y agua Comida ad-libitum

	49/22/09:00 am	Medición de cada botella de ingesta (gr.) Pesaje y alojamiento con pares de la misma categoría. Tres animales por caja Agua y comida ad-libitum
	50/23/15:00 pm	Pesaje y alojamiento individual. Medición de cada botella de ingesta (gr.) Acceso doble vía: 5% EtOH + agua y agua Comida ad-libitum
Finaliza	51/24/09:00 am	Medición de cada botella de ingesta (gr.) Pesaje y alojamiento con pares de la misma categoría. Tres animales por caja Agua y comida ad-libitum

Resultados

Realizamos un ANOVA mixto de cuatro vías (factores entre-grupo: respuesta de ansiedad [AA, MA y BA], orden de presentación de las pruebas y sexo; factor intra-grupo: sesiones de ingesta [1-9]). El ANOVA arrojó efectos principales de sexo y sesiones de ingesta ($F_{1, 84} = 10,37$; $p < 0,01$; $F_{8, 672} = 13,47$; $p < 0,001$; respectivamente) y un efecto interactivo entre ambos factores ($F_{8, 672} = 5,83$; $p < 0,001$) Similar perfil se observó para el porcentaje de preferencia ($F_{8, 672} = 2,97$; $p < 0,01$). Las pruebas post hoc indicaron que las hembras, pero no los machos, aumentaban el consumo de la droga a lo largo de los días, un efecto más claramente observado a partir de la quinta sesión y séptima sesión de ingesta (para las variables de g/kg y % de preferencia; respectivamente). Los machos exhibieron un consumo bajo y estable a lo largo de la evaluación. Contrario a nuestras expectativas el perfil de consumo no se vio alterado ni por el orden de presentación de las pruebas ni por el nivel de respuesta de ansiedad.

En función de los resultados aquí observados tomamos algunos parámetros para llevar a cabo el *Experimento 12*. Por ejemplo, decidimos trabajar solamente con las hembras, ya que las mismas mostraron una escalada en la ingesta de alcohol a lo largo de los ensayos. Para facilitar aun más el incremento del consumo de alcohol, y que quizás permitiría observar diferencias de consumo en función de niveles de ansiedad, decidimos incorporar una semana (i.e., tres sesiones) al protocolo de ingesta, replicando las condiciones de la semana 3 (i.e., 5% de etanol no endulzado vs. agua).

Una limitación del experimento piloto fue que la presentación de las pruebas de evaluación de ansiedad se efectuaba en dos días –una por día-. Para evitar la intromisión de factores históricos aleatorios y hacer la medida de ansiedad más consistente y estable, decidimos presentar ambas en un mismo día. La locomoción en campo abierto, por ejemplo como otros comportamientos, representa una reacción compleja que involucra neofobia, excitabilidad y exploración. El equilibrio de estos aspectos es modulado directamente por el estado emocional con que ingresa un animal y las respuestas fisiológicas de éste asociadas a la situación (i.e., frecuencia cardíaca, micción y/o defecación). Esto sugiere que cuando la actividad aumenta (por ejemplo, como respuesta de huida) o

cuando disminuye (por ejemplo, como respuesta congelamiento) ambas reacciones podrían estar indicando un estado emocional común de temor o ansiedad (Archer, 1973). Por ejemplo, Blanchard et al. (1988) han sugerido que la valoración de riesgo que hace un animal ante un contexto está sujeta a una relación temporal que el animal experimenta desde una posición inicial (i.e., en cuclillas) a otra que implica movimiento como el desplazamiento de comportamientos que dejan de ser defensivos. Bajo este concepto, el aumento o disminución de conductas que evalúan el riesgo como respuesta a situaciones relacionadas con la ansiedad, no sólo podrían verse alteradas por la expresión de un nivel de respuesta de ansiedad que analizamos, sino que también podrían depender del estado emocional con que inicia un animal en cada prueba. Por ello consideremos conveniente presentar ambas pruebas en contigüidad temporal, de manera que las diferencias de excitabilidad ante las pruebas se redujeran, posibilitando de este modo la evaluación del animal bajo un estado emocional constante y que permitiera valorar más claramente la consistencia de los aparatos. Consideramos mejor trabajar con una mayor variabilidad de puntajes de ansiedad que provinieran de la muestra total de sujetos de diferentes camadas; ya no preseleccionando animales por cada camada.

Experimento 12. *Niveles de respuesta de ansiedad y estrés inducido por inmovilización afectan diferencialmente el consumo de alcohol en ratas hembras adolescentes****Introducción***

Como ya indicáramos, los individuos con altos niveles de ansiedad pueden ser más sensibles a los efectos de reforzamiento negativo del alcohol y, por lo tanto, pueden estar en situación de riesgo para el desarrollo de AUDs (Cappell y Herman, 1972; Kushner et al., 1994). Algunos estudios brindan apoyo a la hipótesis de reducción de tensión (Izidio y Ramos, 2007; Manzo et al., 2014; Ramos, 2007; Stewart et al., 1993), pero otros no han encontrado evidencia de dicha relación (Da Silva et al., 2004), o bien, encontraron una relación inversa entre la ansiedad y el consumo de alcohol (Henniger et al., 2002).

Una forma de analizar experimentalmente si altos niveles de respuesta de ansiedad predicen la predisposición al consumo de alcohol es clasificar a los sujetos en función de la respuesta de ansiedad como altos- o bajos-ansiosos, por medio del empleo de pruebas de ansiedad validadas (por ejemplo, LEC o LO; [Lister, 1990]) y después evaluar consumo de alcohol a través de pruebas de dos o tres vías/botellas. Esta estrategia ha permitido encontrar una asociación positiva entre la ansiedad innata o de “rasgo” y una mayor ingesta de etanol, en ratones y ratas adultas (Bahí, 2013; Spanagel et al., 1995; respectivamente)

Por otro lado, los individuos con altos niveles de respuesta de ansiedad pueden ser más sensibles a la estimulación estresante y aversiva (Muigg et al., 2008), y se ha sugerido que los adolescentes serían más sensibles al estrés, y a las interacciones estrés-etanol, que los adultos. Por ejemplo, se ha encontrado que la exposición a inmovilización durante 90 o 120 minutos diarios por cinco días incrementa significativamente la respuesta de ansiedad y provoca la disminución de peso corporal en adolescentes, pero no en adultos (Stone y Quartermain, 1997). La restricción del movimiento o inmovilización (conocida como “restraint” en la literatura anglosajona) es considerada un factor de estrés psicológico, mayormente desprovisto de estimulación nociceptiva periférica (Herman y Cullinan, 1997; Weinberg et al., 2008). Asimismo, una exposición a 90 minutos de restricción del movimiento reduce la investigación social tanto en ratas adultas como en ratas adolescentes. Curiosamente, este efecto es revertido por la administración de dosis de etanol (0,25-1,0 g/kg) en las ratas adolescentes, pero no en las adultas (Varlinskaya y Spear, 2012).

A su vez, otra interacción relevante entre la adolescencia, el estrés y el etanol es que ratas machos (Siegmund, et al., 2005) o hembras (Füllgrabe et al., 2007) que comenzaron a consumir alcohol durante la adolescencia, pero no aquellas que se iniciaron durante la adultez, fueron sensibles

a la facilitación en el consumo de alcohol inducida por estimulación nociceptiva periférica (i.e., shock). Este resultado, consistente con otros que se observaron en humanos (Dawson et al., 2007; Lee et al., 2012), es importante porque señala un mecanismo por el cual la iniciación adolescente o “debut temprano” en el consumo de alcohol puede facilitar la transición a patrones de uso y abuso de esta sustancia.

Estos resultados, asimismo, resaltan la importancia de evaluar el consumo de etanol inducido por el estrés tempranamente en el desarrollo. El estrés durante la adolescencia puede facilitar la aparición y la escalada en el consumo de alcohol, probablemente en mayor medida que durante la adultez; y subpoblaciones caracterizadas por altos niveles de ansiedad basal pueden ser particularmente vulnerables a estos fenómenos.

Para obtener más conocimientos sobre la modulación del consumo de etanol en función del nivel de respuesta de ansiedad y por la exposición a estrés durante la adolescencia, en el presente experimento evaluamos el consumo y preferencia de etanol a lo largo de todo el transcurso de la adolescencia, desde el DP32 y hasta el DP57, en ratas hembras clasificados como alta-, media-, y baja-ansiosas en función de la respuesta basal de ansiedad (AA, MA, BA; respectivamente). La clasificación resultó del mismo índice multivariado de la respuesta de ansiedad derivada de las pruebas, LEC y LO (que se describiera en la experiencia piloto). Estos animales fueron también expuestos (o no) a restricción del movimiento, de modo similar a como se ha visto previamente afecta a los efectos inducidos por etanol en ratas adolescentes, aunque no en adultas (Varlinskaya y Spear, 2010).

En otras palabras, evaluamos consumo de etanol en animales agrupados por su nivel de respuesta de ansiedad y que fueron expuestos a una fuente de estrés. La hipótesis era que el consumo de la droga ejercería efectos reforzantes negativos, es decir actuaría como un reductor de miedo o tensión, y que estos efectos facilitarían el consumo posterior. De este modo, aquellos individuos que sufrieran ansiedad basal elevada (AA) serían más sensibles a los efectos ansiolíticos del etanol y a los efectos del estrés; y, por ende, constituirían una población de individuos vulnerables al consumo de la droga. Si bien en el Experimento piloto previo no habíamos observado esta relación, nuestra expectativa era que los cambios realizados en relación al *Experimento piloto* [i.e., la extensión de la prueba de ingesta, la caracterización por ansiedad en un solo día y la mayor variabilidad en puntajes de ansiedad derivada de trabajar con toda la muestra de sujetos (y ya no por camadas)] serían cambios que favorecerían la expresión de diferencias en ingesta de alcohol en función de los niveles de ansiedad.

Diseño Experimental

Se empleó un diseño factorial 3 (Respuesta de ansiedad: alta, media o baja: AA, MA y BA, respectivamente) x 2 (Exposición al Estrés: restricción de movimiento o control; RES o CTRL, respectivamente). El número de animales por cada condición fue la siguiente: AA-RES = 12, AA-CTRL = 14; MA-RES = 9, MA-CTRL = 18; BA-RES = 9, BA-CTRL = 17. El número desigual de sujetos por cada condición se debió a que la asignación de grupos en función de la respuesta de ansiedad se produjo, debido a las características propias del diseño experimento, después de la finalización de los procedimientos experimentales.

Procedimientos Generales

Sujetos

Se emplearon un total de 132 ratas Wistar hembras adolescentes, derivadas de 25 camadas nacidas y criadas en el bioterio del Instituto de Investigaciones Médicas M. y M. Ferreyra (INIMEC-CONICET, Argentina). Se emplearon hembras debido a que la experiencia piloto anterior indicó que las hembras, aunque no los machos, exhibieron un patrón progresivo de consumo que derivó en niveles farmacológicamente relevantes de la droga. Este resultado es congruente con otros estudios que indicaron que las ratas hembras consumen más etanol que sus pares machos (Doremus et al., 2005), en una gran variedad de condiciones que incluyen procedimientos de ingesta prologados (Lancaster et al., 1996), de acceso limitado (Chester et al., 2006) y de auto-administración operante (Blanchard et al., 1993). Las demás condiciones de crianza fueron iguales a las descriptas en los apartados iniciales.

Condiciones Experimentales y Pruebas de Comportamiento

Al DP26 los animales eran retirados de sus cajas de alojamiento y eran trasladadas a una habitación adyacente equipada con una caja de luz-oscuridad (LO) y un laberinto en cruz elevado (LEC). Una cámara de video fijada a un riel de metal colgaba del techo y permitía registrar el comportamiento del animal en cada uno de los aparatos. El procesamiento de los videos se realizó mediante el programa EthoLog (Ottoni, 2000).

Los animales se colocaban suavemente en la plataforma central del LEC durante 5 minutos e inmediatamente después eran trasladados y posicionados en el centro del compartimento blanco de LO durante otros 5 minutos. Es decir, a diferencia de la experiencia piloto, en este experimento la evaluación de niveles de ansiedad se realizaba en un mismo día, con el objeto de aumentar la

confiabilidad del proceso de clasificación y disminuir la interferencia de factores de confusión históricos y madurativos. Las dimensiones de cada uno de los dos aparatos fueron descritas en detalle en el apartado “*aparatos pruebas de comportamiento*” del *Experimento 11*.

Procedimientos de Ingesta de Etanol

El procedimiento fue similar al descrito en la *Experiencia Piloto*. Más en detalle, la ingesta de etanol se evaluó durante cuatro semanas a partir del DP32 al 58. Solo tres días de cada semana (lunes, miércoles y viernes) se ofrecía a los animales acceso a doble vía de fluidos. Cada sesión de ingesta tenía una duración de 18 h; esto era, día de por medio (intermitente) tenían acceso limitado “overnight” desde las 15:00 a 9:00 h. Cada sesión de ingesta involucraba la presentación de dos botellas. Más en detalle, las sesiones tuvieron lugar los DPs32, 34 y 36 (primera semana de ingesta; sesiones 1-3), DPs39, 41 y 43 (segunda semana de ingesta; sesiones 4-6), DPs46, 48 y 50 (tercera semana de ingesta; sesiones 7-9) y los DPs53, 55 y 57 (cuarta semana de ingesta; sesiones 10-12). Al comienzo de cada sesión de ingesta los animales eran pesados y alojados individualmente en cajas estándar con viruta de pino a las cuales se les incorporaban dos botellas. Una se llenaba con agua de pico y la otra con una concentración de etanol al 5% v/v. El etanol y el vehículo se mezclaban con sacarosa al 1% v/v (primera semana), con sacarosa al 0,5% v/v (segunda semana) o agua de pico (tercera y cuarta semana). Esto era, los animales comenzaban a responder por soluciones levemente endulzadas y a medida que se continuaban las sesiones la sacarosa se iba retirando hasta no presentarse más (sesiones 7-12) donde los animales consumían de las soluciones (etanol o agua) sin endulzar.

A los fines del subsiguiente análisis de los datos, el consumo de etanol se dividió en dos bloques de 6 sesiones de ingesta cada uno. Durante las sesiones 1-6 (bloque 1: semanas 1° y 2°) los animales tenían acceso a soluciones endulzadas (etanol y vehículo), mientras que durante las sesiones 7-12 (bloque 2: semanas 3° y 4°) los animales tenían acceso a soluciones sin endulzar (etanol y vehículo). El agua de pico sirvió como vehículo para preparar la totalidad de las soluciones. La posición de ambas botellas se contrabalanceaba para cada sesión con el fin de evitar efectos de lateralización. Un par de botellas, una con etanol y otra con vehículo eran puestas en una caja vacía; eran utilizadas para corregir los valores en la ingesta debido a pérdidas propias a la mera manipulación (i.e., un control de derrame). Los valores de derrame eran descontados a cada botella en cada sesión de ingesta. Cuando los animales no estaban en sesión de ingesta, permanecían alojados en grupo de 3 animales por caja – junto a pares de la misma condición experimental – con acceso ad-libitum agua y comida. Es decir, los animales nunca estuvieron bajo condiciones de

restricción de acceso a fluidos o alimento.

Se registraron los g/kg y el porcentaje de preferencia de etanol [(consumo de etanol/ingesta total de fluidos) x 100] y fluidos totales consumidos ml/100g [(consumo etanol + vehículo) / (peso del animal/100)]

Estrés inducido por Inmovilización (i.e., restricción del movimiento)

Los procedimientos de estrés por restricción del movimiento fueron similares a los descritos en la Sección II (*Experimentos 8 y 9*) y en Acevedo et al. (2013) y Varlinskaya y Spear (2012). Los animales eran inmovilizados 90 minutos (RES) en tubos de cloruro de polivinilo blanco (PVC) con tapas en los extremos que tenían orificios para la respiración, los DPs 46, 48 y 50, inmediatamente antes del comienzo de las sesiones de ingesta 7, 8 y 9 (es decir, durante la tercera semana de la prueba de ingesta). Los grupos controles no estresados (CTRL) permanecían sin tratar en su caja de alojamiento. El estrés por inmovilización se realizó en los DPs 46, 48 y 50, ya que estos días se correspondían con las primeras tres sesiones en que los animales recibían alcohol sin endulzar y a partir de las cuales habíamos observado en el *Experimento Piloto* la escalada en el consumo y porcentaje de preferencia por el etanol. Esto es, considerábamos que las sesiones del bloque 1 (i.e., sesiones 1 a 6) eran aquellas en que los animales se iniciaban e iban estabilizándose en el consumo y potencialmente aprendían acerca de la relación entre consumo de alcohol y efecto de reducción de tensión. La exposición a estrés en las sesiones 7, 8 y 9 permitía que el estresor impacte sobre un patrón de consumo adquirido.

Análisis de Datos y asignación de grupos en función de la respuesta de ansiedad en LEC y LO.

Los animales fueron asignados a tres grupos en función del nivel de respuesta de ansiedad: alto-, medio- o bajo-ansioso (AA, MA y BA, respectivamente). La asignación a estos grupos era resultado de la conformación de un índice multivariado proveniente de las pruebas de LEC y LO. Similar a como fuera descrito en el *Experimento piloto*, este índice era el promedio de la suma lineal de los puntajes estandarizados (“z”) del % de entradas en los brazos abiertos del LEC y la latencia (s) para cruzar al compartimento oscuro de LO. La media y desviaciones estándar para el porcentaje de número de entradas y la latencia (s) fueron $11,12 \pm 13,43$ y $6,06 \pm 5,72$; respectivamente. Las puntuaciones correspondientes a estas variables dependientes fueron estandarizados (puntuación z, en relación con la muestra total de sujetos) y posteriormente sumadas y divididas en la mitad (en 2). De este modo, obteníamos una puntuación de respuesta de ansiedad para cada animal. El puntaje obtenido por cada animal representaba una puntuación general de la respuesta de ansiedad en el que

los valores más altos y positivos indicaban una respuesta relativamente baja de ansiedad (BA); y los valores más bajos y negativos, derivados del relativamente bajo número de entradas en los brazos abiertos del LEC y la latencia más corta para cruzar hacia el compartimento oscuro de LO, indicaban una respuesta relativamente alta de ansiedad (AA). Indicadores multivariados similares se han empleado anteriormente para indagar reacciones de rechazo condicionado en animales adultos (Parker, 1995) y no destetados (Pautassi et al., 2008a)

Los grupos AA y BA correspondían a sujetos que exhibieron las puntuaciones generales de respuesta de ansiedad del 20 % inferior y superior de la distribución del promedio de los puntajes z, respectivamente. Los MA correspondieron a los animales cuyas puntuaciones del promedio de los puntajes z cayeron entre los percentiles 40 y 60 de la distribución de las puntuaciones generales de ansiedad. La división en percentiles superiores e inferiores, según variables comportamentales, ha sido una herramienta utilizada en otros trabajos realizados en ratas adultas (Klebaur et al., 2001; Nadal et al., 2005), infantes (Arias et al., 2009) y adolescentes (Acevedo et al., 2010); y que se ha mostrado útil para discriminar subpoblaciones susceptibles al consumo o reactividad incondicional o condicional al alcohol y otras drogas.

La eficacia estadística de este criterio de selección se evaluó a través de un ANOVA de una vía (factor entre-grupo: respuesta de ansiedad [AA, MA, BA], y variable dependiente: puntuación general de ansiedad). El peso corporal al comienzo y terminación de las sesiones ingesta de etanol (DP32 y DP 58, respectivamente) se analizó por separado a través de un ANOVA factorial de dos vías (exposición al estrés x respuesta de ansiedad).

El consumo de etanol (g/kg y el porcentaje de preferencia) durante el primer y segundo bloque del protocolo de ingesta (bloque 1: sesiones 1-6; bloque 2: sesiones 7-12) se analizaron mediante ANOVAs separados. El ANOVA para los valores observados en el bloque 1 consideró la respuesta de ansiedad (AA, MA y BA) como factor entre-grupo y las sesiones de ingesta como medida repetida. El ANOVA para el bloque 2 consideró la respuesta de ansiedad (AA, MA y BA) y la exposición al estrés (RES y CTRL) como factores entre-grupos, y las sesiones de ingesta como la medida repetida. Se emplearon ANOVAs similares para analizar las puntuaciones de los fluidos totales (ml/100g de peso corporal).

El consumo de etanol (g/kg y el porcentaje de preferencia) y de fluidos totales (ml/100 g) de los animales que cayeron entre los grupos AA y MA; y entre los MA y BA (i.e., individuos sin agrupación) también fueron analizados. Estas variables de consumo fueron analizadas para el bloque 1 y 2 a través de ANOVAs mixtos de una y dos vías (factor entre-grupo: exposición a estrés en el análisis del bloque 2 y las sesiones de ingesta de etanol como medida repetida).

Un ANOVA indicó que los grupos que iban a ser asignados para recibir (RES) o no estrés

(CTRL) exhibieron valores de ingesta de alcohol y vehículo similares durante el bloque 1.

Resultados

Las puntuaciones generales (promedio de la suma lineal de los puntajes z de LEC y LO) de la respuesta de ansiedad en los grupos de animales AA, MA y BA fueron las siguientes; $-0,72 \pm 0,02$, $-0,10 \pm 0,02$ y $1,03 \pm 0,09$, respectivamente. Las puntuaciones estandarizadas de las pruebas de LEC y LO fueron los siguientes: $-0,69 \pm 0,03$ y $-0,75 \pm 0,04$; $-0,13 \pm 0,12$ y $-0,08 \pm 0,12$; y $1,14 \pm 0,26$ y $0,92 \pm 0,31$; para AA, MA y BA, respectivamente. La Figura 31 ilustra las diferencias significativas entre los grupos en función de la respuesta global de la ansiedad y que fueron confirmadas por un ANOVA de una vía ($F_{2,76} = 291,36$, $p < 0,001$). Las pruebas post-hocs indicaron que cada grupo era diferente de los otros ($ps < 0,0001$).

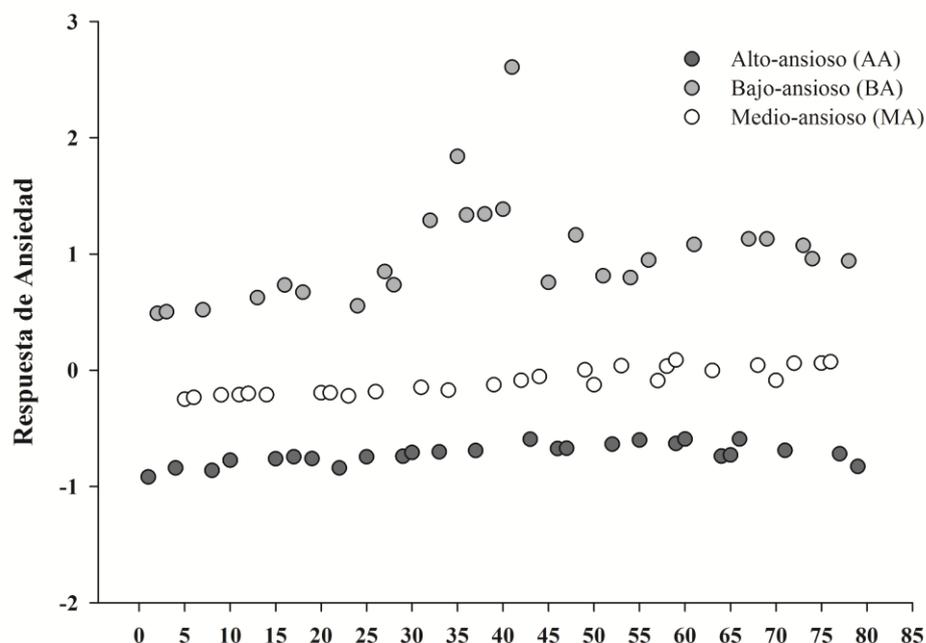


Figura 31. Gráfico de puntos que representa los puntajes multivariados de ansiedad de cada una de las ratas hembras adolescentes ($n=79$) asignadas a los tres grupos según fue su respuesta de ansiedad: grupos alto-, medio- y bajo-ansioso (AA, MA, BA; respectivamente). Los animales eran expuestos a ambas pruebas y en función de los valores obtenidos en las mismas se generó una variable multivariada que indicaba el nivel de respuesta de ansiedad. El criterio de selección y categorización de los animales resultó de un procedimiento de división por cuartiles de la población general en función del índice de ansiedad multivariado. Este resultaba del promedio de los puntajes estandarizados (“z”) del % de entradas en los brazos abiertos del LEC y la latencia (s) para cruzar al compartimento oscuro de LO. Los valores más altos y positivos indicaban una respuesta relativamente baja de ansiedad (BA); y los valores más bajos y negativos, derivados del relativamente bajo número de entradas en los brazos abiertos del LEC y la latencia más corta para cruzar hacia el compartimento oscuro de LO, indicaban una respuesta relativamente alta de ansiedad (AA).

Los pesos corporales fueron similares en todos los grupos definidos según la exposición a estrés y la respuesta de ansiedad, tanto al comienzo como en la terminación de las sesiones de ingesta de etanol. El ANOVA indicó ausencia de efectos principales o interacciones significativas. Los pesos corporales (g) a los DP32 y 57 fueron los siguientes para cada condición: $106,08 \pm 2,68$ y $215,67 \pm 5,27$ para AA-RES; $100,57 \pm 2,21$ y $214,36 \pm 4,22$ para AA-CTRL; $105,33 \pm 4,46$ y $209,89 \pm 2,99$ para MA-RES; $102,44 \pm 1,76$ y $208,94 \pm 3,51$ para MA-CTRL; $106,33 \pm 4,27$ y $221,22 \pm 5,98$ para BA-RES; $105,82 \pm 2,97$ y $207,82 \pm 3,77$ para BA-CTRL.

Como se ilustra en la Figura 32, el consumo de etanol durante las sesiones de ingesta del bloque 1 (sesiones de 1-6, en las que el alcohol era levemente endulzado con sacarosa) fue similar en los tres grupos. El ANOVA para el consumo de etanol durante las sesiones del bloque 1 reveló un efecto principal significativo de sesiones de ingesta, $F_{5,365} = 17,14$; $F_{5,365} = 10,86$; $p_s < 0,001$; para g/kg y % de preferencia, respectivamente. Las comparaciones planeadas indicaron que el consumo absoluto y la preferencia fueron mayores en la primera sesión de ingesta que durante las sesiones restantes. Asimismo indicaron que, después de la caída significativa en la sesión de ingesta 2 el consumo absoluto de etanol (g/kg) se mantuvo estable a lo largo de las sesiones, mientras que el porcentaje preferencia mostró un incremento significativo en la sesión de ingesta 4 respecto a las sesiones 2 y 3.

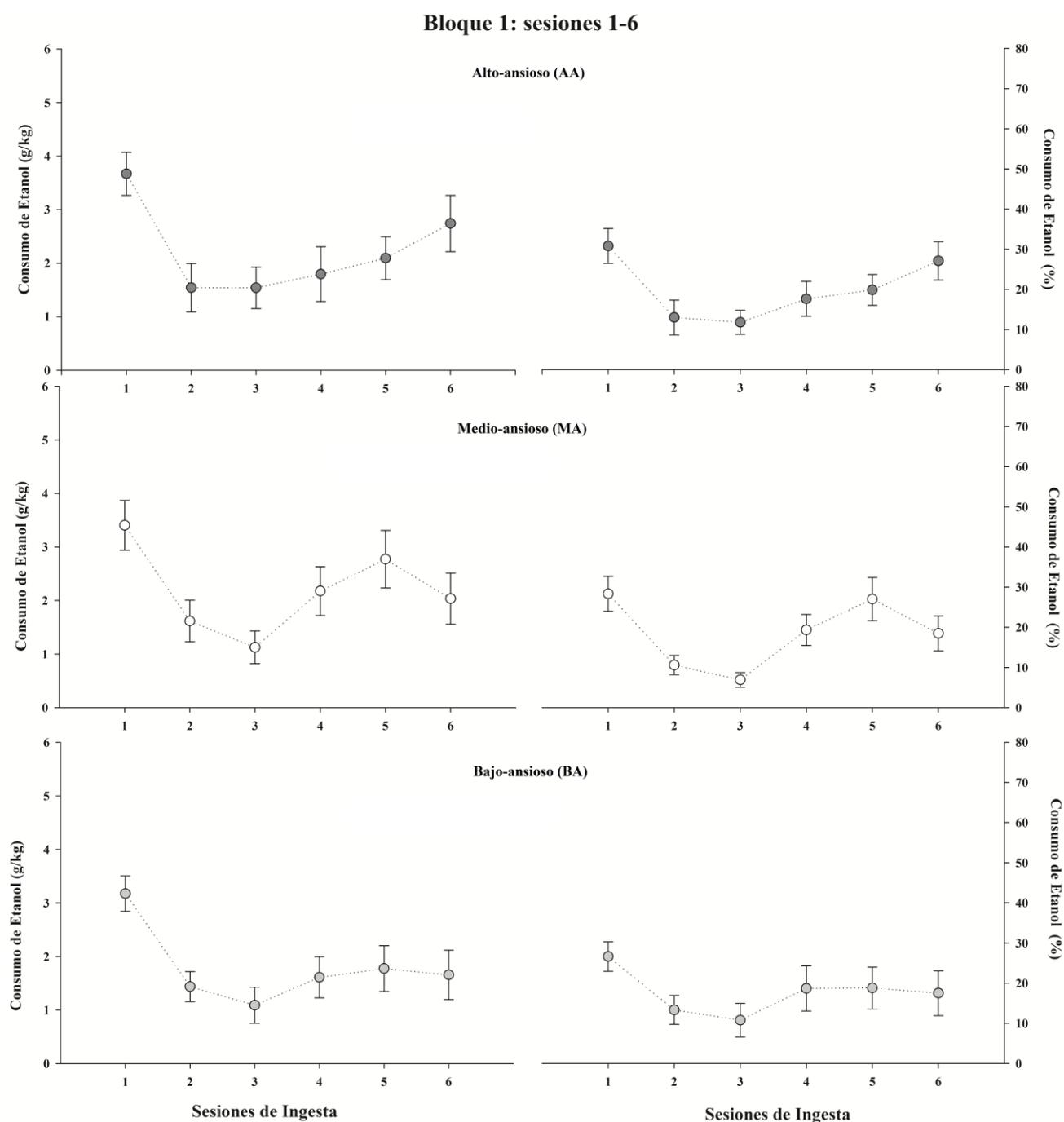


Figura 32. Consumo absoluto (g/kg, *panel izquierdo*) y porcentaje de preferencia (% , *panel derecho*) de etanol durante las sesiones de ingesta del bloque 1 (sesiones de 1-6, en las que el alcohol se presentaba levemente endulzado con sacarosa) en función de la respuesta de ansiedad (alto-, medio y bajo-ansioso) exhibida en ratas hembras adolescentes. El ANOVA reportó un efecto principal de sesiones de ingesta ($ps < 0,001$; para g/kg y % de preferencia), el cual no fue afectado por el nivel de respuesta de ansiedad observándose que el consumo absoluto y la preferencia fueron mayores en la primera sesión de ingesta que durante las sesiones restantes.

Durante el bloque 2 (sesiones 7-12, en la que los animales eran expuestos a botellas de etanol vehiculizado en agua o vehículo), observamos una variación sustancial de la ingesta de alcohol en función de la respuesta de ansiedad. Es importante recordar que antes de iniciarse las sesiones 7, 8 y 9 los animales eran expuestos a estrés durante 90 min. Como se puede observar en la Figura 33, los animales con niveles de respuesta de ansiedad alta (alto-ansioso –AA-) consumieron más etanol que aquellos cuya respuesta de ansiedad era media o baja (medio- y bajo-ansioso; MA y BA; respectivamente), pero este perfil sólo se observó en aquellos grupos que no fueron expuestos a estrés. Aparentemente el estrés indujo una reducción significativa en el consumo y preferencia de etanol en el grupo AA-RES. Estas impresiones fueron confirmadas por el ANOVA, que indicó un efecto principal de sesiones de ingesta ($F_{5,365} = 17,39$ y $F_{5,365} = 14,26$; $p_s < 0,001$; para g/kg y el porcentaje de preferencia, respectivamente). El estrés ejerció un efecto principal sobre el porcentaje de preferencia etanol ($F_{1,73} = 5,16$; $p < 0,05$) y estuvo próximo a la significación sobre los g/kg ($F_{1,73} = 3,89$, $p = 0,053$). Observamos, asimismo, una interacción significativa entre la respuesta de la ansiedad, la exposición a estrés y las sesiones de ingesta ($F_{10,365} = 1,87$ y $F_{10,365} = 2,04$ para g/kg y el porcentaje de preferencia, respectivamente, $p_s < 0,05$).

Para entender mejor la dirección de estas interacciones, se llevaron a cabo dos series de ANOVAs. La primera serie [factor entre-grupo: respuesta de ansiedad, factor intra-grupo: sesiones de ingesta] se llevó a cabo por separado para los animales estresados (RES) y para los animales no estresados (CTRL). El objetivo era evaluar el efecto de la respuesta de ansiedad en la aceptación de etanol, en cada uno de estos grupos. El ANOVA para los animales estresados indicó sólo un efecto principal de sesiones de ingesta, $F_{5,380} = 15,03$ y $F_{5,380} = 12,68$, para g/kg y % de preferencia, respectivamente, $p_s < 0,001$. Las comparaciones planeadas indicaron que el consumo de etanol en los animales estresados aumentó gradualmente desde las sesiones 7-8 a las sesiones 9-10; alcanzando su máxima expresión en las sesiones 11 y 12. La asignación de los grupos en función de la respuesta de ansiedad y la interacción entre este factor y las sesiones de ingesta no alcanzó significación estadística, para ninguna de estas variables.

Para los animales no estresados (CTRL), el ANOVA para g/kg de etanol consumidos indicó un efecto principal de sesiones de ingesta, y una interacción entre este factor y la respuesta de ansiedad ($F_{5,235} = 6,97$; $p < 0,001$ y $F_{10,235} = 2,16$; $p < 0,01$). El ANOVA para el porcentaje de preferencia etanol, a su vez, indicó efectos principales de la respuesta de ansiedad y de sesiones de ingesta ($F_{2,46} = 3,25$ y $F_{5,235} = 7,50$; $p_s < 0,05$; respectivamente), así como un efecto interactivo entre la respuesta de ansiedad y sesiones de ingesta ($F_{10,230} = 3,52$; $p < 0,05$). Las comparaciones planeadas indicaron que en las sesiones de 9, 10, 11 y 12 el porcentaje de preferencia por etanol fue significativamente mayor en los sujetos con alta respuesta de ansiedad (AA), en relación a sus pares

con media respuesta de ansiedad (MA). Del mismo modo, las comparaciones planeadas también indicaron que los g/kg de etanol consumidos fueron significativamente mayores en los animales AA, en comparación con sus pares MA, en las sesiones de 10, 11 y 12. Los animales de baja respuesta de ansiedad (BA) exhibieron un nivel intermedio de consumo y preferencia de etanol, no difiriendo en ninguna de las sesiones de ingesta respecto de los animales AA o MA.

Bloque 2: sesiones 7-12

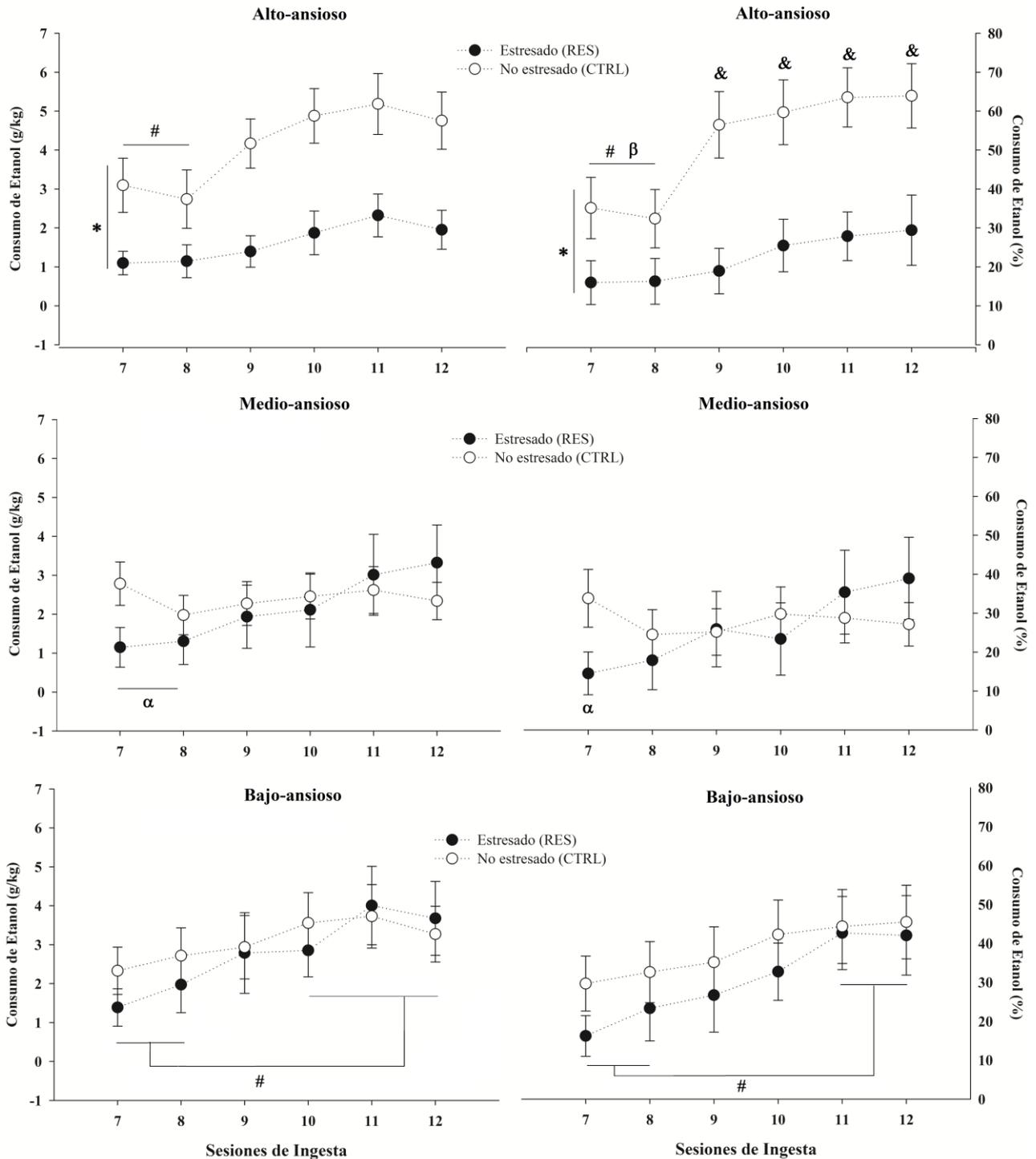


Figura 33. Consumo absoluto (g/kg, *panel de la izquierda*) y porcentaje de preferencia (% , *panel de la derecha*) de etanol durante las sesiones de ingesta del bloque 2 (sesiones de 7-12, el alcohol se presenta sin endulzar con sacarosa) en los tres grupos según fuera su respuesta de ansiedad (alto-, medio y bajo-ansioso) exhibida en ratas hembras adolescentes y que fueran expuestos o no a estrés (RES o CTRL; respectivamente) en las sesiones de ingesta 7-9 (bloque 2). El asterisco (*) indica una diferencia significativa en el grupo AA entre los que fueron estresados y los que no fueron estresados (g/kg y % preferencia; $ps < 0,01$). El numeral (#) indica una diferencia significativa entre sesiones de ingesta ($ps < 0,001$): en el grupo las sesiones 7 y 8 son diferentes de las sesiones 9, 10, 11 y 12 AA (g/kg y % preferencia); en el grupo BA las sesiones 7 y 8 son diferentes de las sesiones 10, 11 y 12 en los g/kg; y de las sesiones 11 y 12 en el % de preferencia. La letra (α) indica una diferencia significativa en el grupo MA-RES entre las sesiones de ingesta ($p < 0,05$): las sesiones 7 y 8 son diferentes de 11 y 12 en los g/kg, mientras que la sesión 7 es diferente de las sesiones 11 y 12 en el % de preferencia. La letra (β) indica una diferencia significativa en el grupo AA-CTRL en el % de preferencia entre las sesiones de ingesta 7 y 8 respecto de las demás 9, 10,11 y 12 ($p < 0,001$). El signo *et* (&) indica una diferencia significativa entre el grupo AA-RES y AA-CTRL en el % de preferencia en las sesiones 9, 10,11 y 12 ($p < 0,05$). Las barras verticales indican los errores estándar de la media (EEM).

La segunda serie de ANOVAs se llevaron a cabo por separado para animales de alta, media y baja respuesta de ansiedad (AA, MA y BA, respectivamente). El objetivo era comprender los efectos del estrés sobre la ingesta de etanol en cada uno de los grupos según fuera su respuesta de ansiedad.

El ANOVA para los sujetos de alta respuesta de ansiedad (AA) indicó un efecto principal de sesiones de ingesta y de exposición a estrés ($F_{5,120} = 9,47$; $p < 0,001$; $F_{1,24} = 10,54$; $p < 0,01$ y $F_{5,120} = 10,86$; $p < 0,001$; $F_{1,24} = 10,51$; $p < 0,01$; para los g/kg absolutos y porcentaje de preferencia de etanol, respectivamente) y una interacción significativa entre sesiones de ingesta y exposición a estrés para el porcentaje preferencia de etanol ($F_{5,120} = 2,41$; $p < 0,05$). Las comparaciones planeadas indicaron, para ambas variables, que el consumo de etanol fue similar entre sujetos estresados y no estresados (RES y CTRL; respectivamente) durante las sesiones de ingesta 7 y 8. En las sesiones de ingesta 9 a 12, en tanto, los animales AA-RES consumieron significativamente menos (% de preferencia) que sus pares AA-CTRL.

El ANOVA para los animales con una respuesta de ansiedad media (MA) indicó un efecto principal de sesiones de ingesta ($F_{5,125} = 3,33$; $p < 0,01$) para el consumo de etanol absoluto y una interacción significativa entre sesiones de ingesta y exposición a estrés ($F_{5,125} = 2,99$ y $F_{5,125} = 2,47$; $p < 0,05$; para los g/kg absolutos y porcentaje de preferencia de etanol, respectivamente). Las comparaciones planeadas revelaron que el consumo de etanol de los animales MA-RES fue significativamente mayor en las dos últimas sesiones (11 y 12) que en las dos primeras (7 y 8) o solo en la primera (g/kg y % de preferencia; respectivamente). El consumo de etanol en los animales MA-CTRL se mantuvo estable entre las sesiones.

El ANOVA para los animales con una respuesta de ansiedad baja (BA) indicó sólo un efecto principal significativo de sesiones de ingesta ($F_{5,120} = 6,66$ y $F_{5,120} = 5,20$, $p < 0,001$; para los g/kg absolutos y porcentaje de preferencia de etanol). Las comparaciones planeadas indicaron una mayor preferencia de etanol en las sesiones de ingesta 11-12 que en las sesiones de 7-8 y un mayor consumo de etanol en las tres últimas sesiones de ingesta (10, 11 y 12) respecto de las sesiones de ingesta 7 y 8.

El consumo de fluidos totales fue similar entre los grupos. El ANOVA para el consumo de fluidos totales (ml/100g) durante las sesiones de ingesta del bloque 1 (cuando los animales tenían acceso a soluciones de etanol endulzado) revelaron un efecto principal significativo de sesiones de ingesta ($F_{5,365} = 37,86$; $p < 0,001$). Las pruebas post-hocs indicaron un consumo mayor de líquidos durante las primeras 3 sesiones que durante las últimas 3 sesiones de ingesta. El ANOVA para las sesiones del bloque 2 (cuando los animales tenían acceso a soluciones de etanol no endulzado) no indicó efectos principales o interacciones significativas entre los factores analizados. Los datos descriptivos del consumo de fluidos totales (media y EEM) de cada grupo se describen en la Tabla 9.

Tabla 9. Consumo Total de Fluidos Totales (ml/100g de peso corporal) durante el bloque 1 y 2 (sesiones 1-6 y 7-12) en ratas adolescentes hembras de alto-, medio- y bajo- nivel de respuesta de ansiedad (AA, MA y BA; respectivamente).

BLOQUE 1						
Respuesta de Ansiedad	Sesión 1 (DP32)	Sesión 2 (DP34)	Sesión 3 (DP36)	Sesión 4 (DP39)	Sesión 5 (DP41)	Sesión 6 (DP43)
AA	35,38 ± 2,19	37,02 ± 2,64	34,77 ± 2,64	25,89 ± 1,59	27,69 ± 2,02	27,02 ± 2,24
MA	34,74 ± 2,64	40,68 ± 3,35	41,54 ± 2,96	29,71 ± 2,05	28,68 ± 1,89	28,44 ± 2,12
BA	34,48 ± 2,55	35,18 ± 2,62	34,53 ± 2,51	27,85 ± 1,64	27,60 ± 1,74	27,89 ± 1,72
BLOQUE 2						
Respuesta de Ansiedad	Sesión 7 (DP46)	Sesión 8 (DP48)	Sesión 9 (DP50)	Sesión 10 (DP53)	Sesión 11 (DP55)	Sesión 12 (DP57)
AA	24,37 ± 2,49	20,30 ± 1,35	20,72 ± 1,35	22,19 ± 2,00	21,12 ± 1,38	19,57 ± 1,28
MA	22,03 ± 1,55	20,27 ± 1,03	20,94 ± 1,05	21,08 ± 1,01	21,48 ± 1,13	21,52 ± 1,31
BA	21,10 ± 1,37	20,82 ± 1,38	20,79 ± 0,99	21,51 ± 1,00	21,30 ± 0,73	19,62 ± 0,87

Los valores de ingesta de etanol fueron también analizados en los animales que cayeron entre los grupos AA y MA; y entre MA y BA (i.e., sujetos que no recibieron asignación). El ANOVA para las puntuaciones durante el bloque 1 indicó un efecto significativo principal de sesiones de ingesta ($F_{5,245} = 9,69$ y $F_{5,245} = 6,52$; $p_s < 0,001$, para el consumo de g/kg absolutos y % de preferencia de etanol, respectivamente). La ingesta de etanol fue mayor en las primeras sesiones de ingesta que en las sesiones posteriores. El ANOVA para g/kg de etanol consumido durante el bloque 2 reveló efectos principales significativos de exposición a estrés ($F_{1,51} = 6,48$; $p < 0,05$) y de sesiones de ingesta ($F_{5,255} = 7,81$; $p < 0,001$). Las comparaciones planeadas indicaron un mayor consumo absoluto

y porcentaje de preferencia de etanol en las sesiones de 10, 11 y 12 respecto de la sesión 1; así como un menor consumo de etanol en la sesión 2 respecto de la última sesión. Quizá lo más importante, las comparaciones planeadas también indicaron que el promedio de ingesta absoluto de etanol fue significativamente menor en los animales estresados ($1,60 \pm 0,31$ g/kg) que en los no estresados ($3,19 \pm 0,39$ g/kg). Los animales estresados también mostraron menor % de preferencia de etanol que los controles no estresados ($24,63 \pm 5,10$ vs $39,47 \pm 4,47$ %), sin embargo, el ANOVA para esta variable estuvo próxima a la significación estadística ($F_{1,51} = 3,82, p = 0,056$).

Conclusión de la Sección III

El principal hallazgo en esta sección fue que los adolescentes hembras con alto nivel de respuesta de ansiedad exhibieron un consumo significativamente mayor al de sus pares con una respuesta de ansiedad media. Una implicancia de estos resultados es que el nivel de ansiedad basal parece tener influencia sobre el consumo de alcohol en las hembras, y que la dirección de este efecto es consistente con la noción que la población de adolescentes que manifiesta una mayor ansiedad estaría a mayor riesgo de iniciar y escalar el consumo de la droga. Las ratas AA exhibieron el doble de consumo absoluto y hasta tres veces más porcentaje de preferencia de etanol respecto de sus pares con un nivel de respuesta de ansiedad promedio (MA). Otro hallazgo importante fue que este efecto facilitador de la ansiedad sobre el consumo de etanol en animales alto-ansiosos fue inhibido por la exposición a estrés (AA-RES).

Las diferencias en el consumo y preferencia de la droga en función de los niveles de ansiedad basal se expresaron significativamente en las sesiones de ingesta en donde la presentación de la solución de etanol no estaba endulzado (bloque 2). No se encontraron diferencias entre los grupos cuando el etanol estaba ligeramente endulzado (1 o 0,5 % v/v de sacarosa, bloque 1), ni se observaron diferencias en cuanto al consumo general de fluidos en las pruebas.

En general la cepa de ratas Wistar muestra un consumo bajo de etanol, particularmente a concentraciones $\geq 5\%$, por lo que requiere de fases de adquisición del consumo de alcohol prolongadas o la privación hídrica o de alimentos para facilitar el consumo (véase, por ejemplo, Pepino et al., 2004; Ponce et al., 2008). En los experimentos de esta sección pudimos evitar, al menos parcialmente, estos inconvenientes. La evaluación se extendió durante toda la adolescencia y los animales terminaron por responder sólo por etanol. La estructura general de la prueba de doble botella utilizada, sin embargo, remeda a un paradigma de sustitución progresiva de sacarosa. La combinación entre el consumo intermitente durante la tarde-noche y el empleo de un porcentaje bajo sacarosa (1 o 0,5%) fue suficiente para inducir rápidamente la ingesta de etanol. Ya en las sesiones de ingesta 7 y 8, en particular en los animales categorizados como alto-respondedores de ansiedad, alcanzaron a consumir alrededor de 3-4 g/kg de etanol, lo que puede ser considerado como un umbral importante en términos de relevancia farmacológica y consecuencias ansiolíticas de la droga (Blatt y Takahashi, 1999; Spanagel et al., 1995). También hay que señalar que la concentración de sacarosa empleada para facilitar el consumo inicial (1 o 0,5%) fue en proporción mucho menor que la empleada en otros estudios. Por ejemplo, en Morales et al. (2013) adolescentes tenían acceso limitado (30-min) diario a una mezcla de etanol al 10%, 3% de sacarosa y 0,125% de sacarina.

El *Experimento 12* es uno de los primeros trabajos en analizar la ingesta de etanol en

función del nivel de respuesta de ansiedad innata en ratas adolescentes y es consistente con algunos, pero no todos, los estudios que analizan este fenómeno en la edad adulta. Esto último, será analizado en mayor profundidad en la discusión general de la tesis doctoral.

Consideramos que una característica interesante alcanzada en esta sección es que las variables que fueron consideradas para generar el criterio de selección “asignación” provinieron de dos pruebas diferentes, en lugar de una; y que este criterio mejoró sustancialmente cuando la presentación de las pruebas se realizaba en una sola oportunidad, evitando la introducción de factores de confusión históricos o madurativos. Por otro lado, el índice multivariado que desarrollamos ha sido una estrategia también empleada eficazmente en otros estudios como el de Parker (1995) y Pautassi et al. (2008a); y nuestro trabajo ha permitido la detección del efecto del nivel de respuesta de ansiedad innata sobre el perfil de consumo de etanol.

La estrategia de selección por medio una variable multivariada que refleja un nivel de respuesta de ansiedad estuvo en consonancia con la propuesta de Ramos et al. (2008). Los autores proponen, dado que las diferentes pruebas de ansiedad podrían reflejar diferentes aspectos de la emocionalidad, que una evaluación más fiable de la respuesta de ansiedad requiere la integración de varias medidas derivadas de más de un aparato o test. Para ellos plantearon la denominada "prueba triple", una integración física de LEC, CA y LO unidas entre sí conformando un solo aparato. La estrategia alternativa empleada en esta sección consistió en la combinación de información sobre la respuesta de ansiedad derivada de dos pruebas secuenciales (LEC y LO). Se ha observado de manera similar (Nielsen et al., 1999) que la rotación y la locomoción juntas -aunque no locomoción por sí sola- predicen el consumo voluntario de etanol en ratas Long-Evans. La actividad locomotora en un campo abierto ineludiblemente ha sido utilizada como indicador que predice el reforzamiento inducido por alcohol y la ingesta. Los animales que presentan una mayor actividad locomotora o la falta de habituación exhiben una mayor ingesta de etanol (Acevedo et al., 2010; Bisaga y Kostowski, 1993; Nadal et al., 2002).

En relación a los efectos de estrés observados, estudios previos indican que este factor puede exacerbar el consumo de etanol y que los adolescentes pueden ser más sensibles que los adultos al consumo inducido por estrés (Füllgrabe et al., 2007; Siegmund et al., 2005). Sobre la base de este conjunto de conocimientos, nuestra expectativa era que el estrés aumentaría el consumo de alcohol en los animales, y que este efecto estaría exacerbado en sujetos con una respuesta de ansiedad basal alta. Esta hipótesis no fue corroborada. En el *Experimento 12* el estrés inducido por la restricción del movimiento ejerció un drástico efecto supresor en este grupo de animales de alta-ansiedad basal. El estrés no solo provocó una disminución en el consumo en estos animales, respecto de pares alto-ansiosos que no recibieron estrés, sino que los primeros tampoco incrementaron el consumo de la

droga a lo largo de las sesiones de ingesta del bloque 2. También observamos una disminución en el consumo por efecto de la exposición al estrés en el grupo de animales que no recibieron asignación grupal (individuos sin clasificación), ya que sus puntuaciones caían entre los demás grupos. Esto no ocurrió en los animales que exhibieron una respuesta media de ansiedad (MA). Por el contrario, los animales MA expuestos a estrés, aunque no sus controles (sin estrés), exhibieron un incremento en el consumo de etanol desde la sesión 7 a la sesión 12.

Este patrón de resultados sugiere que el efecto de estrés por restricción del movimiento en la ingesta de etanol fue diferencial en función de la respuesta de ansiedad basal. La exposición a estrés provocó un efecto supresor en los animales categorizados como alto-respondedores de ansiedad (AA) y un efecto de facilitación leve, pero significativo, en sujetos con una respuesta media de ansiedad (MA). Los efectos del estrés en términos de consumo de etanol a menudo han resultado complejos y contradictorios. Retomaremos este análisis en la discusión general.

En resumen, en la presente sección los resultados sugieren que ciertos grupos de adolescentes -específicamente las hembras con altos niveles de ansiedad basal- pueden estar a riesgo de exhibir predisposición a la ingesta de alcohol. También indican que el estrés, como se ha sugerido en varias ocasiones (Pohorecky, 1981), puede ejercer efectos distintos sobre el consumo de etanol en función del nivel de respuesta de ansiedad del organismo. Asimismo, los resultados aquí presentes brindan nueva evidencia a la hipótesis de reducción de tensión. En este sentido, estos resultados proveen una herramienta para la detección de poblaciones vulnerables al consumo exacerbado del alcohol, facilitando el desarrollo de estrategias de intervención previas al desarrollo de patrones de consumo problemático con la droga.

Discusión General

Este trabajo de tesis aportó nuevos conocimientos en relación a un campo poco explorado, como es la sensibilidad hedónica hacia el alcohol durante la adolescencia. Estudios previos habían indicado que el adolescente exhibe un patrón idiosincrático de respuesta hacia numerosos efectos del alcohol que parecen funcionar como barreras para el mantenimiento y escalada en el consumo. Las ratas adolescentes exhiben, respecto de sus pares adultos, una relativa insensibilidad a los efectos sedativos y de inducción del sueño del alcohol, y también muestran una menor sensibilidad a los efectos aversivos de la droga (Anderson et al., 2010; Little et al., 1996; Spear y Varlinskaya, 2005; Vetter-O'Hagen et al., 2009; White et al., 2002). Sin embargo, era aún desconocido si los adolescentes percibían efectos positivos, apetitivos del alcohol y, más importante aún, no se había explorado la relación entre la respuesta motivacional apetitiva hacia los efectos del alcohol y el consumo de la droga (Cunningham et al., 2000; Pautassi et al., 2009). A pesar que existen antecedentes experimentales respecto a esta relación, el supuesto de una asociación significativa ha resultado difícil de corroborar (Green y Grahame, 2008; Rodd et al., 2004).

Además de analizar la sensibilidad hacia dichos efectos motivacionales durante la adolescencia, consideramos que el conocimiento de los mismos resultaría una herramienta de gran utilidad para discriminar aquellos sujetos que progresarían hacia un consumo problemático de alcohol, de aquellos que conservarían un consumo controlado a pesar de tener exposiciones repetidas a la droga.

Empleamos dos estrategias de abordaje. En las *Secciones I y III* empleamos diseños intra-sujeto, en la que los sujetos fueron evaluados repetidamente desde la adolescencia temprana hasta la tardía. La segunda estrategia implicó mediciones agudas, puntuales, en adolescentes, y a veces en adultos. Mediante esta metodología indagamos con mayor detenimiento los efectos estimulantes motores inducidos por la administración de etanol (*Sección II*).

El fin último de este proyecto doctoral fue desarrollar un modelo de predicción de ingesta durante la adolescencia, indagando variables candidatas a predecir el mantenimiento y la escalada en el consumo problemático de alcohol; y que nos permitiesen detectar aquellos individuos susceptibles de desarrollar problemas con la droga dentro de este período ontogenético.

No todos los adolescentes que se inician en el consumo de alcohol progresan hacia consumo problemático o exacerbado (Schramm-Sapyta et al., 2009). Consideramos de suma importancia determinar el peso específico de los factores involucrados en esta transición y esperábamos que el

conocimiento derivado de este trabajo pudiera, en parte, servir como disparador para la conformación de políticas de acción específicamente dirigidas hacia las poblaciones conocidas en riesgo.

Una de las variables de mayor relevancia en este trabajo fue la locomoción en campo abierto, inducida por la administración aguda de etanol. La exposición repetida o crónica a muchas drogas psicoactivas, notablemente los psicoestimulantes, induce un fenómeno conocido como sensibilización motora, que consiste en un aumento progresivo y duradero de los efectos estimulantes motores iniciales inducidos por la droga (Quoilin et al., 2012). Se ha sugerido que la sensibilización representa un paso fundamental en la transición a la adicción a sustancias (Vanderschuren y Pierce, 2010). Los efectos estimulantes motores agudos de las drogas también han recibido atención. Algunos trabajos en animales han reportado una correlación positiva entre la locomoción inducida por el alcohol y preferencia por la droga (Agabio et al., 2001; Colombo et al., 1998; Rodd et al., 2004). En humanos, se ha observado que los individuos altos consumidores de alcohol -respectos de los bajo consumidores- (King et al., 2002) y aquellos a riesgo de alcoholismo por exhibir una historia familiar positiva de la patología (Conrod et al., 1997) son más sensibles a los efectos estimulantes del etanol, sugiriendo que la sensibilidad a estos efectos podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de consumo problemático con la droga (King et al., 2011; 2014).

En ratones adultos usualmente se ha reportado efecto estimulante motor a dosis bajas de etanol, en tanto que a dosis altas la droga ejerce efecto supresor (Correa et al., 2001; Pastor et al., 2002; Quoilin 2010; 2012). En ratas adultas, en tanto, la administración sistémica de la droga provoca una drástica disminución en la locomoción (Chuck et al., 2006; Correa et al., 2003; Duncan et al., 2000; Masur et al., 1986; Sanchis-Segura et al., 2005); y sólo por medio de infusiones intracerebroventriculares (ICV) de dosis bajas de etanol (0,35-2,8 ul) se observan signos de activación motora (Arizzi et al., 2003; Correa et al., 2003)

La administración aguda de la droga en ratas pareciera ejerce un efecto depresor en los adultos (Chuck et al., 2006; Duncan et al., 2000; Masur et al., 1986; Sanchis-Segura et al., 2005), aunque un efecto estimulante en los infantes (Arias et al., 2008; 2009b; Pautassi et al., 2011). No obstante, desconocíamos los efectos de la droga en la rata adolescente.

En el transcurso de los diferentes experimentos (*Experimentos: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11*) siempre que indagamos sobre la reactividad motora ante la administración aguda de etanol observamos que las ratas adolescentes mostraban una robusta y confiable sensibilidad a los efectos estimulantes de la droga en un rango amplio de dosis de etanol (1,25; 2,5; 3,0; 3,25 y 3,5 g/kg). La mayor parte de las evaluaciones fueron concentradas en los primeros 30 minutos post-administración de la droga; período en que los niveles de alcohol en sangre están subiendo y los efectos apetitivos de

la droga asociados se presumen son máximos (Cunningham y Prather, 1992; Nizhnikov et al., 2009; Risinger y Cunningham et al., 1992). Durante esta parte inicial del proceso tóxico, los adolescentes mostraron similar reactividad motora que la que se observa en ratas infantiles (Arias et al., 2008; 2009), ratones adultos (Faria et al., 2008; Stevenson et al., 2008); y más recientemente, en ratones adolescentes (Quoilin et al., 2010). Este último antecedente es importante, porque generalmente se había reportado que los ratones adolescentes eran menos sensibles a la sensibilización motora provocada por el etanol (e.g., Faria et al., 2008; Stevenson et al., 2008). Aparentemente, esta discrepancia se debió a una diferencia en las dosis empleadas entre los estudios. Mientras que generalmente el rango de dosis empleado en estos estudios oscilaba entre 1,0-2,5 g/kg; en el trabajo de Quoilin et al. (2010) observaron que a dosis > 2,5 g/kg tanto los ratones destetados como adolescentes eran más sensibles a los efectos agudos y crónicos que sus pares adultos. No se había aún comparado, sin embargo, el efecto estimulante en ratas adolescentes y adultas, bajo un mismo esquema experimental.

Nuestra hipótesis al respecto y en función de los antecedentes, era que los adolescentes expresarían estimulación motora, en tanto que los adultos mostrarían depresión motora. En uno de los experimentos (*Experimento 7*) y contrariamente a lo esperado, tanto los adultos como los adolescentes de la cepa Wistar mostraron similar locomoción inducida por la administración de la droga. Esta discrepancia pudo deberse a diferencias en los procedimientos empleados; entre ellos la ruta de administración. Generalmente, los trabajos que observaron ausencia de efecto supresor por alcohol en ratas adultas, emplearon administraciones vía intraperitoneal (Chuck et al., 2006; Rezvani y Levin, 2004); la cual se ha visto ejerce un efecto aversivo de corta duración (Cunningham et al., 2002; 2003) e induce un perfil de absorción-distribución de los niveles de alcohol en sangre muy diferente al observado tras el uso de intubaciones (Walker y Ehlers, 2009). Asimismo, el ambiente de evaluación que empleamos (*Experimento 7*) fue relativamente mayor (30 x 30 x 30 cm, o 50 x 50 x 50 cm; adolescentes y adultos, respectivamente) que el utilizado, por ejemplo, por Chuck et al. (2006) [28 x 28 x 28cm, para adultos], lo cual podría ser un elemento que haya favorecido la expresión del efecto estimulante de la droga en los adultos. Además, a diferencia de nuestro trabajo, donde los animales eran evaluados pocos minutos después de recibir las administraciones de etanol (5 minutos post-administración; 7 minutos duración); los animales en otros trabajos eran evaluados, por ejemplo, inmediatamente posterior a la administración durante 30 minutos (Chuck et al., 2006) o 20 minutos post-administración durante 60 minutos (Rezvani y Levin, 2004).

La ausencia de diferencias en términos motores entre los adolescentes y adultos no obedeció a diferencias farmacocinéticas entre ambas edades (*Experimento 7b*). Asimismo, si bien nuestra expectativa era que las ratas adolescentes mostrarían una mayor sensibilidad a este efecto de etanol

respecto de los adultos, el resultado no era del todo incompatible con la literatura previa. Rezvani y Levin (2004) observaron magnitudes similares de actividad motora inducida por la inyección (i.p.) de una dosis 2,5 g/kg de etanol en ratas adolescentes y adultos.

Por otro lado, cuando realizamos comparaciones ontogenéticas en la cepa Sprague-Dawley - SD- (*Experimentos 8, 9 y 10*) en relación a este efecto del alcohol, los adolescentes, aunque no lo adultos, mostraron activación motora y fueron menos sensibles a los efectos depresores de la droga. Las ratas SD consumen etanol a concentraciones altas [i.e., $\geq 10\%$ v/v] (Brunell et al., 2005; Doremus et al 2005; Vetter-O'Hagen et al., 2009); en tanto que la cepa de ratas Wistar consume relativamente poco de la droga cuando se les provee acceso a concentraciones $\geq 6\%$ v/v de etanol (Pepino et al., 2004; Ponce et al., 2004; 2008). Es interesante, por lo tanto, que esta diferencia en el consumo se asoció en la presente tesis a diferencias en la sensibilidad entre edades al efecto estimulante (i.e., se observaron diferencias ontogenéticas en el efecto estimulante del alcohol en ratas SD pero no en ratas Wistar). Debe notarse, sin embargo, que hay resultados contradictorios y que este patrón puede variar dependiendo de las condiciones y modalidades en que el animal experimenta la droga. Linseman (1987) reportó lo contrario, es decir que la cepa Wistar consume más que la SD es un esquema de consumo limitado (1h diaria) donde el animal no era privado del consumo de comida y agua habitual. No obstante, cabe mencionar que también en períodos más tempranos de la ontogenia se observa un patrón de consumo disímil entre cepas. Mientras que las ratas infantiles Wistar responden a concentraciones 3-6% (Dominguez et al., 1993; Miranda-Morales et al., 2010; Ponce et al., 2008), las ratas infantiles SD responden por concentraciones 3-15% (Miranda-Morales et al., 2012) en un esquema operante.

Se podría argumentar que la estimulación motora obtenida en esta tesis en las ratas SD no fue fiable puesto que el efecto estimulante fue de poca duración y se limitó a los primeros minutos de la prueba. Los estudios previos en ratas Wistar adolescentes y adultas y en ratones adultos Swiss (Acevedo et al., 2010; 2013; Faria et al., 2008; Quoilin et al., 2010; 2012) concuerdan, sin embargo, que la expresión de la estimulación motora aguda y la sensibilización motora luego del tratamiento con etanol se encuentra regularmente durante los minutos iniciales de la prueba, cuando los niveles de etanol en sangre están subiendo.

En la tesis también se analizaron factores que pueden potencialmente modular la expresión de activación inducida por alcohol, como es la exposición a estrés. La evidencia indica que los adolescentes serían más sensibles a situaciones estresantes que los adultos. Por ejemplo, Stone y Quartermain (1997) encontraron una respuesta exacerbada de ansiedad y menor peso en ratas adolescentes, pero no en las adultas, expuestas de manera crónica a privación social y a restricción

del movimiento, respectivamente. Más recientemente, Doremus-Fitzwater et al. (2009) observaron que los adolescentes eran más sensibles que los adultos a una variedad de consecuencias fisiológicas producto de la restricción crónica de movimiento, como la alteración en el peso corporal y el aumento en los niveles de corticosterona. Curiosamente, en el *Experimento 9* aplicamos estrés agudo (por restricción de movimiento o por privación social) y observamos que los adultos, aunque no los adolescentes, fueron sensibles a la privación social aguda. Se ha visto en la literatura que el estrés agudo y crónico ejercen efectos diferenciales (véase Katz et al., 1981)

A diferencia de otros estudios donde los adolescentes han sido más sensibles que los adultos a la interacción entre estrés y alcohol; en nuestra aproximación el estrés agudo no alteró la activación motora ejercida por el etanol. Los estudios que han encontrado alteraciones de esta índole; es decir, que los adolescentes sean más sensibles a la combinatoria de estrés y alcohol respecto de los adultos emplearon pruebas con un fuerte componente social. Por ejemplo, el etanol reduce en los adolescentes, pero no en los adultos, la ansiedad social provocada por estrés agudo sugiriendo una interacción entre el estrés y el efecto ansiolítico del etanol, específica para la esfera social (Varlinskaya y Spear, 2012).

Consistente con lo observado en el presente estudio, otros trabajos reportaron ausencia de efectos del estrés en tareas que no tienen componentes sociales. Anderson et al. (2010) evaluaron en adultos y adolescentes el efecto del estrés sobre la expresión de aversión condicionada al sabor - AAS-). Observaron una menor aversión condicionada al sabor inducida por etanol en los adolescentes respecto de los adultos; no obstante similar a nuestros resultados, el estrés no ejerció un efecto sobre dicho aprendizaje en ninguna de las dos edades. Este patrón de resultados no debería resultar llamativo, ya que como hemos visto durante la adolescencia el valor atribuido a los estímulos sociales cobra mayor importancia que en la adultez. En este sentido, la probabilidad de encontrar diferencias entre adolescentes y adultos que reflejen la interacción de etanol y estrés sería mayor en situaciones que involucran componentes sociales.

En resumen, los adolescentes se mostraron insensibles a las modalidades de estrés empleadas; ni la privación social ni la restricción del movimiento alteraron la actividad motora en este grupo (*Experimentos 8 y 9*). Cabe, sin embargo, mencionar que en estos últimos experimentos el contexto en que eran evaluados era nuevo; esto es, los animales no habían sido habituados al mismo. Desconocíamos, el vínculo que podría entablar las condiciones de estrés y la novedad del contexto para estos animales. En algunos trabajos se ha visto que la novedad del ambiente modula el efecto estimulante motor del etanol en ratas infantiles (Arias et al., 2009b), ratas adultas (Cools y Gingras, 1998; Hoshaw y Lewis, 2001). Por ejemplo, Cools y Gingras (1998) indicaron que dependiendo de la reactividad espontánea hacia la novedad del contexto (alta- o baja-) observaron que la altas

respondedoras a la novedad del contexto luego de la administración de una dosis de 1,0 g/kg de etanol expresan sensibilización motora, esto mismo no ocurre en las baja-respondedoras a la novedad. No obstante, en el *Experimento 6* observamos que el etanol indujo efecto estimulante motor, aun cuando los animales habían sido previamente habituados/familiarizados al ambiente de evaluación.

Desde el comienzo del trabajo doctoral consideramos al efecto estimulante motor como indicador de reforzamiento apetitivo mediado por etanol (Meyer et al., 2009; Wise y Bozarth, 1987); por ejemplo en los *Experimentos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 y 10*. Sin embargo, ¿era este aumento en la locomoción producto del alcohol un indicador confiable de efecto estimulante; o, alternativamente, podía ser un indicador de la propiedad ansiolítica de la droga; o bien una interacción entre ambos efectos? Es importante plantear esta explicación alternativa. Bajo la misma, la administración de alcohol disminuiría la ansiedad a los espacios abiertos y por lo tanto aumentaría la exploración y distancia recorrida en los mismos.

No sería la primera ocasión en que en la literatura sobre alcohol haya encontrado dificultad para discriminar adecuadamente si una consecuencia conductual del alcohol responde a un efecto apetitivo o ansiolítico. Por ejemplo, este problema se encuentra en los estudios de condicionamiento de preferencia al lugar en los que se utiliza como estímulo condicionado un contexto que, inicialmente, fue el menos preferido de dos opciones (Zakharova et al., 2009). En estos trabajos, se realizan apareamientos entre este contexto y los efectos del alcohol, durante la fase de condicionamiento [véase Ciccocioppo et al. (1999)]. Este procedimiento deriva en un incremento significativo en el tiempo pasado durante la evaluación sobre el compartimento asociado a los efectos de la droga; el cual inicialmente, antes del condicionamiento, era el lugar menos preferido. Una limitación de este trabajo y trabajos similares es que no es claro si efectivamente una mayor preferencia por el EC después de los condicionamientos refleja una propiedad apetitiva o ansiolítica de la droga –que aminora o quita la característica aversiva inicial del lugar-. Otro ejemplo que deja visible esta ambigüedad surge al evaluar los efectos de la droga sobre la exploración en un campo abierto inescapable. Los estudios que analizan la actividad motora inducida por etanol reportan medidas comunes, aunque las interpretaciones teóricas respecto de lo que observan son diferentes y, a veces, opuestas. Puede interpretarse que los cambios en la distancia recorrida en un campo abierto indican aumento o reducción de ansiedad. Karayadian et al. (2013) consideraron que un menor número de cruces y menor cantidad de postura de erguimiento serían indicadores comportamentales de ansiedad durante la abstinencia de alcohol. Fukushiro et al. (2012) analizaron el efecto agudo y crónico del alcohol sobre la actividad en ratones e interpretaron el incremento en la locomoción tras la administración aguda de la droga como indicio de que ésta tenía la capacidad de quitar el valor

aversivo de la novedad del contexto de evaluación (i.e., efecto ansiolítico). No obstante, esto mismo también ha sido considerado, en otros trabajos pero siguiendo los postulados de la teoría estimulante psicomotora de la adicción (deWit y Phillips, 2012; Wise y Bozarth, 1987), como indicador de efectos apetitivos de la droga (i.e., Quoilin et al., 2010; 2012).

En este marco ambiguo consideramos importante analizar con mayor precisión si el aumento en la actividad en campo abierto tras la administración de etanol en ratas adolescentes reflejaba un efecto estimulante, o si el incremento estaba impulsado o modulado por las propiedades ansiolíticas de la droga. Para ello, realizamos un experimento donde no sólo focalizamos nuestra atención en comportamientos relacionados a los efectos del etanol durante la adolescencia, sino también analizamos la relación entre medidas de actividad y de ansiedad inducida por etanol en tres pruebas de comportamiento ampliamente utilizadas para evaluar esencialmente ansiedad y también actividad (i.e., CA, LEC y LO). Más específicamente, evaluamos los efectos estimulantes y ansiolíticos en un rango de dosis variadas de etanol (0,0; 0,5; 1,25; 2,5 y 3,25 g/kg) durante los minutos post-administración 5-19, en estas tres pruebas.

Los resultados (*Experimento 11*) sugirieron que el aumento de la exploración en CA tras la administración aguda de dosis 2,5 y 3,25 g/kg de etanol reflejaba un efecto estimulante, en principio, relativamente independiente del efecto ansiolítico. En tanto que la dosis 1,25 g/kg indujo tanto estimulación motora en el CA como un efecto ansiolítico en LEC; pero estos efectos resultaron relativamente independientes. La dosis 0,5 g/kg de etanol ejerció efecto ansiolítico en LEC aunque no un efecto estimulante en CA. Estos resultados fueron consistentes con otro trabajo donde una dosis de 2,0 g/kg ejerció ambos efectos (Boerngen-Lacerda y Souza-Formigoni, 2000). En conjunto los resultados brindaron apoyo a la hipótesis de que el efecto estimulante medido en CA refleja un efecto apetitivo, y que los efectos estimulantes y ansiolíticos del etanol probablemente estén mediados por distintos mecanismos. Asimismo apoyaron la concepción que la utilización de drogas que promueven el uso y abuso, como el alcohol, podrían estar dándose tanto por reforzamiento positivo como negativo. A los fines de una mayor explicación respecto de los resultados se sugiere redirigirse al apartado de resultados del *Experimento 11* o cierre de *Sesión II*.

Por otro lado, también observamos correlaciones positivas entre las puntuaciones de actividad/locomoción entre las pruebas. Esto era indicativo que cuanto mayor actividad hubiese en una prueba tanto mayor sería la actividad en las otras pruebas. Este resultado es congruente con los análisis multivariados que asocian variables como la ambulación en CA, entradas a los brazos cerrados de LEC, o entradas a ambos brazos; a un factor común denominado “actividad/locomoción” (Files, 1995; Ramos et al., 1997; Rodgers y Johnson, 1995). Otra evidencia a favor de la disociación

entre efectos estimulantes y ansiolíticos fue la ausencia de correlación entre las puntuaciones de locomoción en CA y una menor respuesta de ansiedad en LEC o en LO, posterior a la administraciones de la droga. Esto parecía indicar que el incremento en la actividad reflejaba más un efecto estimulante que ansiolítico. Asimismo, brindaba apoyo que a la noción que plantea que el CA es una prueba válida para la medición de estimulación motora inducida por etanol; lo cual es importante a la luz de las controversias asociadas a la validez de los resultados de estas pruebas (Stanford, 2007).

El alcohol ejerce efectos motivacionales apetitivos y aversivos, que son importantes para entender por qué algunos individuos progresan rápidamente del uso de alcohol al abuso y dependencia, y que pueden ser medidos mediante procedimiento de preferencia condicionada al lugar (CPL) y aversión condicionada al sabor (AAS) (Pautassi et al., 2009). La preferencia o aversión posterior por los estímulos condicionados (e.g., textura y sacarina; respectivamente) asociados a los efectos de la droga se consideran una medida del efecto motivacional inducido por el etanol. Muy poco se sabía acerca de la sensibilidad a estos efectos durante la adolescencia de la rata.

En relación a condicionamiento de preferencia al lugar en ratas adultas, generalmente a dosis $< 1,5$ g/kg no se han observado efectos significativos (Busse y Riley, 2002; Busse et al., 2004; Funk et al., 2004; Martijena et al., 2001; Sable et al., 2004), mientras que a dosis mayores (i.e., $\geq 2,0$ g/kg) si algo se ha visto es que el alcohol ejerce aversión condicionada al lugar (Becker et al., 2002). Sin embargo, cuando el etanol se co-administra con estrés (Matsuzawa et al., 1998) u otras drogas (Marglin et al., 1988) la preferencia se expresa, y también cuando se emplean ratas jóvenes-adultas (i.e., 200-250 g de peso; Kotlinska et al., 2004). Más recientemente, se ha reportado preferencia condicionada al alcohol en ratas adolescentes (Philpot et al., 2003) y en ratas infantes mediante condicionamiento de primer y también de segundo orden (Molina et al., 2007; Nizhnikov et al., 2009; Pautassi et al., 2007; 2011; 2012b). También un par de trabajos reportaron que los adolescentes eran sensibles a los efectos aversivos de la droga, aunque respecto a sus pares adultos requerían dosis más elevadas ($\geq 1,5$ g/kg) para mostrar dicho aprendizaje (Anderson et al., 2010; Vetter-O'Hagen et al., 2009)

Cuando indagamos sobre la capacidad del adolescente para aprender los efectos de la droga observamos que exhibieron aversión condicionada al etanol (*Experimentos 2 y 3*; inducido por una dosis de 2,5 g/kg de etanol en un solo ensayo de condicionamiento) y condicionamiento de preferencia al lugar inducido por etanol (*Experimentos 4 y 5*). Los adolescentes exhibieron aversión adquirida al sabor mediada por una dosis de 2,5 g/kg de etanol y también mostraron preferencia condicionada al lugar asociado a los efectos de una dosis de 1,0 g/kg de etanol. Este último efecto

fue en sí mismo relevante porque como mencionásemos anteriormente muy pocos estudios habían indicado CPL mediante condicionamiento de primer orden, por ejemplo Peana et al. (2008) en ratas adultas, y menos aún, durante la adolescencia etanol (Philpot et al., 2003)

Para evaluar la preferencia condicionada a la droga en ratas adolescentes empleamos parámetros que se derivaron en parte de dos antecedentes; en los que observaron aprendizaje apetitivo inducido por etanol en ratas infantas con dosis de 1,0 y 2,0 g/kg con solo dos sesiones de condicionamiento (Nizhnikov et al., 2009) y el otro trabajo Philpot et al. (2003) observaron preferencia en ratas adolescentes en los períodos tempranos y tardíos de esta etapa (DP25; 0,2 g/kg; DP45; 0,5-1,0 g/kg). Conocíamos que los efectos apetitivos del etanol en ratas infantas generalmente han sido asociados a dosis bajas y los efectos aversivos a dosis moderadas o altas (Molina et al., 2007; Pautassi, et al., 2008; Pautassi, et al., 2006). Estos estudios y el nuestro brindan apoyo a la concepción que el etanol es más propenso a inducir preferencia por un lugar (EC) a dosis relativamente bajas (i.e., 1,0 g/kg), en momentos en que los niveles de la droga en sangre están escalando (5-20 minutos post-administración). Es interesante mencionar que fue durante la fase ascendente de la curva de intoxicación con la droga donde, en los primeros experimentos de esta tesis, observamos los efectos estimulantes motores del etanol. Los estudios en humanos han vinculado los efectos positivos/apetitivos del etanol con este momento de la curva de intoxicación. Por ejemplo, Conrod et al. (1997) y más tarde King et al. (2002; 2011) mostraron que el aumento en la frecuencia cardíaca inducido por el alcohol durante la fase ascendente de la curva de alcohol en sangre (considerado un indicador de efecto estimulante del alcohol) correlacionaba positivamente con la percepción de los efectos positivos (i.e., euforia) inducidos por la droga; y que dicho incremento estaba exacerbado en individuos a riesgo de desarrollar problemas con la droga (i.e., consumidores pesados o con historia familiar positiva de problemas con el alcohol). Los hallazgos observados en esta tesis brindan apoyo a la noción que los adolescentes serían sensibles a los efectos positivos de la droga; inclusive serían más sensibles que sus pares adultos (Pautassi et al., 2008b, Philpot et al., 2003).

Era también un objetivo identificar sujetos susceptibles al reforzamiento inducido por el alcohol. Se visto que las ratas que exhiben elevada actividad locomotora (i.e., altas-responderas) en un campo abierto inescapable son más resistentes al condicionamiento aversivo inducido por anfetamina (Kunin et al., 2001). En nuestro caso evaluamos la relación entre la actividad espontánea y/o inducida por etanol en campo abierto; y las dos medidas de sensibilidad motivacional hacia el etanol mencionadas (AAS y CPL). Nuestra hipótesis, basada en la teoría psicomotora de la adicción (Wise y Bozarth, 1987), era que la actividad inducida por etanol estaría positiva y negativamente asociada, respectivamente, a la expresión de CPL y AAS por alcohol. Esta expectativa, sin embargo,

no fue corroborada como si se ha visto en otros trabajos entre CPL y el efecto psicomotor en anfetamina y cocaína (Jerlhag et al., 2010; Kim et al., 1996; Tzschentke y Schmidt, 1998), o en alcohol (Risinger et al., 1994). En este último trabajo evaluaron tres índices de medidas motivacionales del alcohol (consumo, AAS, CPP) en dos líneas de ratones criados selectivamente por su respuesta motora inducida por etanol (líneas “FAST” y “LOW”). Encontraron una correlación genética entre la sensibilidad estimulante motora y las medidas motivacionales. Los ratones FAST consumieron y prefirieron más de la droga, fueron más resistentes a desarrollar aversión por alcohol que los ratones SLOW. En cuanto a la preferencia condicionada a una textura durante el condicionamiento los ratones FAST mostraron mayor estimulación motora después de la administración de 1,0 y 2,0 g/kg mientras que los ratones LOW no lo hicieron. A pesar de estas diferencias en la que fueron condicionados con las dosis de 1,2 y 2,0 g/kg mostraron similar preferencia por la textura asociada a los efectos de la droga. Existen por otro lado, estudios que tampoco han logrado encontrar esta relación; por ejemplo, la supresión de los receptores opiáceos μ bloquea la expresión de CPP inducido por etanol, aunque no la activación motora inducida por la droga (Hall et al., 2001) y el haloperidol (antagonista dopaminérgico) inhibe la estimulación motora provocada por el etanol, aunque no afecta el CPL mediado por la droga (Cunningham et al., 1992).

A pesar de no encontrar relación entre el efecto estimulante motor y las medidas motivacionales, si encontramos que aquellos sujetos que recibieron vehículo o que permanecieron sin tratamiento (NT) durante la evaluación de CA mostraron una asociación positiva entre el nivel de ambulación en el CA y el CPL, y una asociación negativa entre dicha ambulación y la expresión de AAS. Es decir, aquellos que mostraron mayor actividad espontánea en CA expresaron mayor preferencia por la textura asociada a los efectos de la droga (i.e., lija, *Experimento 4*) y fueron más resistentes a la adquisición de AAS mediada por etanol (esto es, consumieron más del EC sacarina, *Experimento 3*). Estos resultados sugieren que aquellos individuos con mayor respuesta espontánea o reactividad a la novedad del contexto podrían ser más sensibles a los efectos apetitivos y menos sensibles a los efectos aversivos de etanol, y, por tanto, más vulnerables a la adicción (Nadal et al., 2002; Redolat et al., 2009; Schramm-Sapyta et al., 2010). El nivel actividad motora en ratas en un ambiente podría ser equiparable a las mediciones que, por ejemplo Zuckerman (2000), ha identificado como búsqueda de la novedad en humanos, las cuales a su vez se ha indicado predicen vulnerabilidad a la adicción

El nivel más bajo de sensibilidad a las propiedades aversivas del etanol lo encontramos en el grupo de ratas que habían sido expuestas previamente a la droga. Los animales tratados con etanol al DP28 (3,0 g/kg) no mostraron disminución en el consumo de sacarina (EC) respecto de su grupo control, después de que esta sustancia fuera asociada a la acción del etanol (*Experimento 3*). En el

Experimento 2 -donde la dosis de etanol fue levemente menor (2,5 g/kg)- hubo también una tendencia hacia este efecto de pre-exposición al EI (Randich y LoLordo, 1979; Riley y Simpson, 2001), si bien el mismo no alcanzó significancia estadística. Podría postularse así que, en los adolescentes, el umbral para la inducción de pre-exposición a los efectos aversivos a la droga se encuentra entre 2,5 y 3,0 g/kg (200-230 mg%, NES, aproximadamente). En algunos estudios el efecto de pre-exposición ha sido explicado en función del desarrollo de tolerancia funcional a los efectos de la droga tras la exposición repetida a la misma (Berman y Cannon, 1974; Davis y Riley, 2007). Una explicación alternativa podría ser que las claves contextuales presentes durante la exposición inicial a la droga pudieron asociarse con el EI (i.e., efecto de malestar inducido por la droga), y de esta forma, volver ineficaz, reducir o bloquear la capacidad del EC (sacarina) para señalar el efecto tóxico de la droga (de Brugada et al., 2003). No obstante, es menos probable que las claves/señales externas sirvieran para reducir el valor de la sacarina en un condicionamiento de sabor. En general, este efecto suele explicarse como una reducción de la eficacia del etanol como un EI aversivo. Vale mencionar que las dosis de etanol en la pre-exposición y condicionamiento fueron diferentes (3,0 y 2,5 g/kg; respectivamente). Algunas investigaciones han indicado que la magnitud del efecto de pre-exposición del EI estaría en función inversa a la magnitud del mismo durante el condicionamiento (Cannon et al., 1975). En nuestros experimentos, cuando ambas presentaciones eran la misma dosis (*Experimento 2*) el efecto de pre-exposición no alcanzó a ser eficaz; en tanto que cuando la primera administración fue medio gramo mayor (3,0 g/kg, *Experimento 3*) fue suficiente para inhibir el aprendizaje aversivo.

Tuvimos algunas limitaciones en los experimentos donde examinamos las correlaciones entre las medidas motivacionales (i.e., locomoción, CPL y AAS). En cada experimento solo examinamos el efecto de una sola dosis de etanol durante la prueba de actividad al DP28 (3,0 g/kg, *Experimento 3* y 2,5 g/kg, *Experimento 4*) y una sola dosis de etanol durante la/s sesiones de condicionamiento (1,0 g/kg, *Experimento 4* y 2,5 g/kg, *Experimento 3*) de CPL y AAS; respectivamente. La poca representatividad en términos de dosis limita, en parte, la generalidad de los resultados. Otro punto a tener en cuenta, es que esta serie de experimentos fueron conducidos en la cepa WKAH/Hok endocriada, las cuales exhiben una variabilidad genética menor a la cepa de ratas exocriadas. Es interesante notar, sin embargo, que incluso bajo estas limitaciones encontramos una asociación negativa entre la ambulación espontánea y AAS (*Experimento 3*); y una asociación positiva entre la primera y CPL (*Experimento 4*). Estos resultados son consistentes con los estudios llevados a cabo en ratas heterogéneas (Arias et al., 2009d) y concuerda con los supuestos que indican que la búsqueda de novedad predice efectos de las drogas (Nadal et al., 2002; Redolat et al., 2009). Cobra mayor relevancia cuando consideramos que los efectos motivacionales de las drogas son factores de

máxima importancia en la regulación de los procesos de búsqueda e ingesta de la droga (Cunningham, 2000).

Teníamos la expectativa encontrar que la activación inducida por etanol sería capaz de predecir el consumo de la droga (*Experimento 2 y 11*). Esta hipótesis no fue corroborada, al menos de forma consistente y conclusiva. En algunas oportunidades, aunque no siempre, la teoría psicomotora de la adicción (Wise y Bozarth, 1987) ha encontrado correlato empírico. Algunos trabajos que emplearon línea de ratas criadas selectivamente han indicado una relación positiva entre estimulación inducida por etanol (preferentemente a dosis bajas) y preferencia en el consumo de etanol. Por ejemplo, dosis 0,12-0,25 g/kg de etanol incrementan la locomoción en las ratas alcohol-preferring (P) aunque son ineficaces para inducir estimulación motora en las ratas alcohol-nonpreferring (NP); y cuando se emplean una rango de dosis mayor (i.e., entre 0,5-1,5 g/kg) las NP, pero no las P, exhiben un efecto depresor (Schechter, 1992; Waller et al., 1986). Dosis intermedias 0,25-0,50 g/kg provocan un perfil similar en las ratas Sardinian alcohol-preferreing (sP) respecto de las Sardinian alcohol-nonpreferring (sNP) (Agabio et al., 2001). En esta última línea de rata Colombo et al (1998) observaron que el consumo voluntario en las sP, bajo un esquema de 15 minutos de acceso a la droga, se sigue por un incremento en la actividad motora. También se ha visto que el empleo de un rango de dosis entre 0,25-0,75 g/kg aumenta la locomoción en ratas adolescentes P y high alcohol-drinking (HAD) aunque no ocurre esto en las NP y en las low alcohol-drinking (LAD) (Rodd et al., 2004). Asimismo, tanto las P como las HAD adolescentes son relativamente resistentes al efecto depresor de dosis más altas de etanol (Rodd et al., 2004), respecto de los pares adultos (Froehlich et al., 1988; Stewart et al., 1991, 1996) donde dosis $\geq 1,5$ g/kg en ratas P y menores en NP han resultado aversivas. Otro resultado importante (*Experimento 2*) fue que los individuos más sensibles al efecto estimulante motor del alcohol resultaron más sensibles a los efectos facilitadores de la exposición temprana al etanol sobre el consumo posterior. Esto último pudo determinarse una vez que caracterizamos sub-poblaciones de ratas adolescentes en función de su alta o baja reactividad inicial a los efectos del alcohol (altos y bajos respondedores, (AR-BR, respectivamente). Las diferencias en la sensibilidad a los efectos estimulantes del etanol entre ambas poblaciones no estuvieron asociadas a diferencias en la metabolización de la droga (*Experimento 2b*). Asimismo, las hembras tratadas con etanol y caracterizadas como altas respondedoras (AR) consumieron más alcohol durante las primeras 24 hs de acceso forzado a la droga que las tratadas con etanol bajas respondedoras (BR) y que las hembras que no fueron iniciadas con la droga en comparación con las tratadas con etanol pero categorizadas como bajas respondedoras (BR) y con las hembras que no fueron iniciadas con la droga. La importancia de estos resultados radica en que

corroborar nuestra hipótesis que las diferencias individuales en la sensibilidad hacia la droga están asociadas al perfil de consumo de alcohol en ratas adolescentes.

Por otro lado, encontramos que la mera exposición temprana a la droga (DP28) incrementó el consumo y preferencia posterior de alcohol (*Experimento 2 y 11*) en dosis moderadas-altas (2,5 y 3,25 g/kg) pero no en dosis moderadas-bajas (0,5 y 1,25 g/kg), bajo condiciones de acceso forzado – alcohol como único fluido disponible- (*Experimento 2*) y también cuando las ratas tuvieron acceso a otras soluciones además el alcohol (*Experimento 11*). Este efecto se expresó particularmente importante en hembras, las cuales consumieron aproximadamente 8 g/kg de etanol en las primeras 24 hs (*Experimento 2*). En otros trabajos también las hembras adolescentes muestran mayores valores de ingesta que los machos (Doremus et al., 2005; Loi et al., 2014; Piano et al., 2005; Sarviharju et al., 2001; Truxell et al., 2007). En el *Experimento 11* la administración de una dosis alta de etanol (3,25 g/kg) incrementó la preferencia por la droga al día siguiente. En este experimento el etanol era preparado en una solución de sacarosa al 1% v/v, aunque también se le ofrecía otras dos soluciones: una de agua y otra de sacarosa en la misma concentración con que se preparaba la solución de etanol. El incremento en el consumo de alcohol podría deberse a que los animales del grupo 3,25 g/kg consumían por el efecto reforzador de la sacarosa o su valor como suplemento calórico; no obstante este grupo de animales consumieron menos de la solución que tenía solo sacarosa; de modo que el incremento en la preferencia por el etanol no estuvo asociado a un incremento significativo en el consumo de etanol. La disminución en el consumo de una solución azucarada posterior a la administración aguda (Rosellini et al., 1984) o crónica (Hout et al., 2001) de estrés se ha considerado un indicador de estado emocional negativo (i.e., displacer).

Otra explicación para el mayor consumo de alcohol luego de la administración de la dosis de 3,25 g/kg podría vincularse a que una parte significativa del etanol no es metabolizado hepáticamente, sino que se elimina directamente por respiración, aliento, salivación y orina (Winger et al., 1992). La percepción del olor del etanol, excretado no metabólicamente, puede afectar la respuesta posterior hacia la droga (Molina y Chotro, 1989). Es decir, la excreción no metabólica tiene la capacidad de actuar como un EC que se asocia a los efectos incondicionales de la droga (EI) y posteriormente afecta la búsqueda y consumo del mismo. Chotro y Arias (2007) reportaron un aumento en la aceptación posterior del alcohol en ratas infantiles de 7 y 8 días que recibieron administración de una dosis 3,0 g/kg de etanol; mientras que esta misma dosis genera aversión por la droga más tarde en la infancia (DPs10-11, 14-15; Chotro y Arias, 2007; Molina y Chotro, 1989; respectivamente). En este sentido, el mayor consumo observado tras la exposición a dosis altas (2,5 y 3,25 g/kg) sumaría nueva información, de que la adolescencia puede ser otra de las etapas de desarrollo donde el aprendizaje quimiosensorial durante la intoxicación conduce a un aumento en la

predisposición al consumo del etanol.

Lamentablemente, no incorporamos en las pruebas ingesta una forma de medir temporalmente el perfil de consumo, por ejemplo mediante un licómetro; por tanto, no podemos afirmar que los animales hayan consumido suficiente etanol para inducir concentraciones de alcohol en sangre farmacológicamente relevantes. Así entonces, no podemos excluir la posibilidad que el consumo de alcohol haya estado modulado -al menos parcialmente- por factores orosensoriales (i.e., gusto/olor). También es posible que el consumo elevado de alcohol en el grupo tratado con la dosis 3,25 g/kg estuviera impulsado por los efectos de abstinencia aguda del alcohol. Bajo esta hipótesis de reforzamiento negativo, los animales habrían elevado su consumo para contrarrestar los efectos negativos (i.e., resaca) de la elevada intoxicación sufrida el día previo. Nótese que se ha indicado que veinticuatro horas posteriores a la administración de 3,0-4,0 g/kg de etanol, las ratas adultas exhiben hipertermia (Spiers y Fusco, 1992); mientras que las ratas adolescentes exhiben alteraciones en el sueño de onda lenta (Ehlers et al., 2013). Aunque no medimos u observamos signos evidentes de abstinencia, el consumo elevado de alcohol en ese experimento pudo haberse derivado por un efecto residual aversivo de la droga. Esto es ciertamente una hipótesis provisional; incluso se ha sugerido que los animales necesitarían de varias asociaciones entre los efectos de la resaca o abstinencia y los efectos del alcohol para aprender que su consumo alivia estos síntomas (Schulteis et al., 1996).

En esta tesis también logramos desarrollar un modelo que predijo significativamente el consumo de alcohol en ratas adolescentes, más específicamente, mediante un conjunto de variables obtenidas en el *Experimento II*. Los animales eran evaluados secuencialmente en tres pruebas de comportamiento (LEC, CA y LO) y carecían de experiencia previa con la droga al momento la prueba de ingesta. El análisis de regresión múltiple indicó que los animales que mostraron mayor erguimiento y menor propensión a transitar el área central del campo abierto, y mayor porcentaje de entradas a los brazos abiertos del laberinto elevado en cruz fueron los que consumieron más alcohol. Este grupo de variables permitieron explicar un 22% de la variabilidad de los valores de ingesta del alcohol aunque no fueron útiles para explicar significativamente el consumo de sacarosa; la cual era presentada simultáneamente al alcohol durante la prueba de ingesta. Quizá una limitante importante del modelo fue que el porcentaje total de varianza explicada fue relativamente bajo (i.e., un 78% de la variabilidad total queda sin explicar). Cabe destacar, sin embargo, que una parte significativa de la predicción se consiguió mediante este modelo que incorpora solo variables de comportamiento. Estudios futuros deberían aprovechar estos hallazgos y ampliar el modelo a través de predictores genéticos u hormonales, por ejemplo. Más aun, el porcentaje total de la varianza explicada por el modelo fue similar al que otros estudios han desarrollado y que también buscaban predecir la ingesta

de etanol en función de variables de comportamiento (por ejemplo, Schramm-Sapyta et al., 2008).

Es importante mencionar que la conducta de “erguimiento” ha sido tradicionalmente considerada como una medida de exploración evocada por un estímulo nuevo, por ejemplo, el campo abierto (Crusio, 2000; van Abeelen, 1975; 1977). Se ha visto que las diferencias individuales en función del nivel de erguimiento de los animales (i.e., mucho y poco, altos y bajos, respectivamente) se manifiestan ante la presencia de estímulos nuevos, como la novedad de un contexto; en tanto que ante condiciones familiares la ambulación es similar en ambos grupos; estas diferencias sugieren que cada grupo procesaría diferencialmente la novedad (Pawlak y Schwarting, 2002). La exploración también ha servido para predecir la propensión a consumir etanol (Nadal et al., 2002) y otras drogas (Flagel et al., 2014). Similar a lo observado en otros trabajos (Schwarting et al., 1998; Thiel et al., 1999) las diferencias individuales en el campo abierto entre los animales en función del número de erguimiento no estuvieron relacionadas con los niveles de ansiedad en el laberinto elevado en cruz.

Según la regresión múltiple, un menor tiempo recorrido sobre el área central de CA estuvo asociado a mayor consumo de alcohol. Esta baja propensión a explorar el centro del CA puede reflejar ansiedad relativamente elevada y, por tanto, una mayor predisposición a consumir etanol por reforzamiento negativo, como una vía para aminorar este estado (Spanagel et al., 1995). La relación positiva entre el porcentaje de entradas a los brazos abiertos y el consumo de etanol, quizá fue menos esperada. Sin embargo, teniendo presente que el período bajo estudio fue la adolescencia, el tiempo pasado sobre los brazos abiertos pudo estar relacionada con otro aspecto de emocionalidad como, por ejemplo, la toma de riesgo y búsqueda de novedad las cuales han sido relacionadas consistentemente con el consumo de etanol y otras drogas. (Nagoshi et al., 1991; Stojek y Fischer, 2013).

En un interesante estudio (Macri et al., 2002) encontraron que ratones de 35 días de edad exhibieron menor evitación a explorar los brazos abiertos en un LEC que ratones de 61 días de edad. En contraste, la exploración en LEC en ratones de 48 días de edad en ambos brazos fue pareja. Los adolescentes exhibieron mayores conductas de riesgo [i.e., “stretched-attend posture”– postura del cuerpo extendido (cuello y hombros) de un animal mientras permanece en un mismo sitio], que sus pares adultos. Esta información sugiere que los adolescentes perciben los espacios abiertos con ansiedad, no obstante, ellos también exhiben búsqueda de novedad que los hace explorar y pasar tiempo en las secciones no protegidas del aparato. El experimento también indica, que a ciertas edades el LEC podría indicar búsqueda de novedad más que ansiedad y quizá el hecho de considerar múltiples variables de comportamiento permite comprender mejor el significado psicobiológico de una o más pruebas. Estos resultados son interesantes en el sentido que posiblemente las variables regresoras/predictoras de nuestro modelo (*Experimento 11*) pudieron haber estado reflejando otros aspectos de la emocionalidad además de ansiedad, como la toma de riesgo. Esto es simplemente un

supuesto, ya que la prueba de comportamiento no ha sido utilizada para evaluar este último comportamiento. Existen otras estrategias comportamentales, más específicas, para evaluar estos aspectos del comportamiento adolescente que exceden el campo de estudio de esta tesis, pero que podrían considerarse para futuras aproximaciones. Se podría evaluar la toma de decisiones relacionadas con el riesgo; por ejemplo, mediante la "Tarea de Globo Análogo" (Balloon Analog Risk Task; BART) (Hunt et al., 2005; Lejuez et al., 2002; 2003; White et al., 2008) adaptada para evaluación en roedores (Jentsch et al., 2010). Esta prueba al igual que la estrategia empleada mediante el modelo de regresión múltiple estuvo orientada a responder a uno los objetivos quizá más ambiciosos de la tesis doctoral; esto es, identificar factores de vulnerabilidad para la detección de poblaciones a riesgo de exhibir consumo problemático de alcohol.

La estrategia de discriminar sujetos por alguna característica de comportamiento (Klebaur y Bardo, 1999) que posibilitara predecir consumo de la droga, al mismo tiempo que detectar los individuos susceptibles de iniciarse tempranamente y/o desarrollar problemas con la droga posteriormente; fue eficaz. Observamos, sin embargo, algunas inconsistencias cuando indagamos consumo de alcohol en ratas adolescentes por reforzamiento negativo. El efecto ansiolítico de etanol ha sido propuesto como uno de los componentes que estarían mediando el consumo inicial de la droga aminorando los estados no placenteros asociados a la ansiedad, miedo y estrés (Kushner et al., 1990; Spanagel et al., 1995).

La evidencia sobre la relación entre ansiedad y consumo del etanol arroja resultados contradictorios. Una asociación entre ansiedad incrementada y abuso de etanol ha sido inferida en estudio en humanos (Kushner et al., 1990) y en animales (Bahi, 2013; Möller et al., 1997; Spanagel et al., 1995), pero algunos estudios preclínicos indicaron una relación opuesta (McMillen et al., 1998; Schuckit y Hesselbrock, 1994). Por ejemplo, se ha encontrado que ratas selectivamente criadas por una baja respuesta de ansiedad (LAB) consumen mayor alcohol que sus pares de alta respuesta de ansiedad (HAB) (Henniger et al., 2002). Similarmente, la exposición a estimulación nociceptiva periférica en roedores se ha visto aumenta, disminuye o no tiene efecto sobre la ingesta de etanol (para revisión y referencias, véase Pautassi et al., 2010).

En este trabajo de tesis observamos una relación negativa (*Experimento 11*) y positiva (*Experimento 12*) entre los niveles de respuesta de ansiedad y el consumo de la droga. En ambas aproximaciones experimentales los sujetos eran asignados a tres grupos: alto-, medio-, bajo-respondedores (AA, MA, y BA) que diferían en el nivel de respuesta de ansiedad. Los indicadores de dichos niveles de ansiedad se obtuvieron de las pruebas de comportamiento LEC (*Experimento 11*), y LEC y LO conjuntamente (*Experimento 12*). La razón por la cual incorporamos más de una prueba

en este último, era lograr una comprensión multivariada de la respuesta de ansiedad, como ha sido sugerido por Ramos (2008). Los autores entienden que las pruebas que miden ansiedad son susceptibles de proporcionar información de aspectos similares y diferentes de emocionalidad; por ello, una evaluación más confiable sería la integración de medidas que provengan de varias pruebas en simultáneo. Propusieron la denominada “prueba triple”, que implicaba una integración física del laberinto elevado en cruz, el campo abierto y la caja de luz-oscuridad en un mismo aparato (Ramos, 2008).

La estrategia de emplear más de un indicador para proporcionar una categoría ha sido utilizada en otros estudios (Parker, 1995; Pautassi et al., 2008a) y en nuestra experiencia favoreció sustancialmente la detección y caracterización del perfil de consumo de alcohol en las ratas adolescentes, en función de la respuesta de ansiedad. Otro antecedente que brinda apoyo a la estrategia es el trabajo de Nielsen et al. (1999) donde mostraron que la rotación y la locomoción en conjunto (aunque no locomoción por sí sola) predicen el consumo voluntario de etanol en ratas Long-Evans. Como hemos revisado anteriormente la actividad locomotora en campo abierto ha servido como indicador que predice el reforzamiento inducido por alcohol e ingesta. Los animales que presentan una mayor actividad locomotora o la falta de habituación exhiben mayor ingesta de etanol (Bisaga y Kostowski, 1993; Nadal et al., 2002).

Generalmente, para promover consumo de alcohol algunos estudios emplean fases prolongadas de acceso a la droga hasta desarrollar adquisición o, como también empleáramos en el *Experimento 2*, los animales son privados hídricamente (véase por ejemplo; Meisch y Thompson, 1972; Pepino et al., 2004; Ponce et al., 2008), o bien se les ofrece alcohol como único fluido disponible (Sinclair et al., 1992). También existen estrategias menos aversivas como el procedimiento de sustitución progresiva de sacarosa (Samson, 1986). Lo que se busca en todos casos es incrementar la motivación inicial hacia la droga y conservarla en el tiempo. El inconveniente, quizás el más importante, es que se requieren largos períodos de entrenamiento –i.e., varias sesiones de ingesta- para que se observen cambios entre los grupos en la evaluación del consumo o tratamientos bajo análisis. En nuestra experiencia cuando la prueba de ingesta duró 24 hs observamos cierta renuencia en los animales más ansiosos a consumir y preferir del alcohol; esto pudo deberse en parte a lo mencionado anteriormente. En otras palabras, es posible que el menor consumo de etanol en los animales alto ansiosos del *Experimento 11* obedezca simplemente a que la prueba era de muy corta duración y que, bajo esas circunstancias, prime una aversión por situaciones nuevas antes que una facilitación del consumo por la ansiedad. De hecho se ha señalado se requieren sesiones de ingesta repetidas para que los animales aprendan la contingencia entre el acceso a la droga y los efectos ansiolíticos provocados por la misma (Samson et al., 2000).

Parte de estos inconvenientes pudieron ser corregidos en el *Experimento 12*. En muy poco tiempo -DPs32-58- la combinación entre el consumo intermitente durante las horas en que permanecen apagada las luces –consumo “overnight”- y el empleo de un porcentaje bajo sacarosa (1 o 0,5%) para facilitar el inicio del consumo fue suficiente para inducir rápidamente la ingesta de etanol. Al respecto se ha visto que ratas expuestas al acceso intermitente de etanol en paradigmas de doble vía consumen altos volúmenes de la droga (Simms et al., 2008), equivalentes a los obtenidos en ratas genéticamente seleccionadas para preferir la droga (Bell et al., 2006). El principal hallazgo en esta última aproximación experimental (*Experimento 12*) fue que las ratas hembras adolescentes caracterizadas por tener un alto nivel de ansiedad basal exhibieron un consumo significativamente mayor al de sus pares con una respuesta de ansiedad media. Otro hallazgo importante fue que este efecto facilitador de la ansiedad sobre el consumo de etanol solo se expresó en aquellas hembras altas-ansiosas a las cuales no expusimos a estrés por restricción del movimiento. Las diferencias en el patrón de consumo en función de los niveles de respuesta de ansiedad se evidenciaron más fuertemente durante la sesiones de ingesta en que los animales podían optar por agua o una solución de etanol que ya no estaba endulzada.

Este experimento fue el primer trabajo, en nuestro conocimiento, que analizó el consumo de etanol en función de los niveles de respuesta de ansiedad en ratas adolescentes; y es consistente con algunos estudios, aunque no todos, que analizaron también este fenómeno pero en la adultez. En un estudio previo, Spanagel et al. (1995) encontraron un consumo significativamente mayor de etanol en ratas adultas "ansiosas" respecto de un grupo de ratas "no ansiosos", mediante un procedimiento de 8 días en el que los animales tenían acceso a concentraciones crecientes de etanol cada cuatro días (2 o 4% soluciones de etanol). Asimismo, las concentraciones de alcohol en sangre alcanzados por las ratas ansiosas fueron similares a las dosis de etanol que inducen efectos ansiolíticos en ratas evaluadas en LEC (i.e., 1,5 g/kg). Blatt y Takahashi (1999) reportaron que las ratas "ansiosas" exhiben condicionamiento de preferencia al lugar a dosis de etanol que no ejercen efectos apetitivos en ratas clasificadas como "normales" o "no ansiosas". En ambos trabajos se consideró como criterio de clasificación los puntajes obtenidos en LEC; en donde el punto de corte fue el tiempo pasado sobre los brazos abiertos como el porcentaje de entradas a los brazos abiertos de LEC.

En cambio, los hallazgos obtenidos en ratas criadas selectivamente por tener una respuesta de ansiedad o de consumo de alcohol exacerbada han sido menos consistentes. Por ejemplo, las ratas (P) “alcohol-preferring” ampliamente utilizadas como modelo de alcoholismo (Bell et al., 2006), pasan menos tiempo en los brazos abiertos de LEC y exhiben mayor condicionamiento de miedo que las ratas (NP) “alcohol-nonpreferring” (Stewart et al., 1993). Las ratas hembras Floripa L, seleccionados por explorar poco el área central de CA -índice de ansiedad elevada- exhibieron un mayor porcentaje

de preferencia de alcohol que las ratas machos y que las ratas Floripa H, seleccionados explorar mucho el centro del CA (Izidio y Ramos, 2007). Si bien estos antecedentes parecen favorecer la hipótesis de una asociación positiva entre la respuesta de la ansiedad y el consumo de alcohol, otros estudios con ratas Floripa no encontraron diferencias en la ingesta de etanol entre ambas líneas (Da Silva et al., 2004); y Henniger et al. (2002) encontraron sorprendentemente una relación inversa en ratas criados selectivamente por sus niveles de ansiedad (HAB y LAB; alto y baja respuesta de ansiedad). En otras palabras, las ratas LAB consumieron significativamente más de etanol que las HAB.

El estrés provocado por la restricción del movimiento previo a algunas de las sesiones de ingesta afectó el perfil de consumo únicamente a un grupo específico de animales. Observamos una caída en el consumo y preferencia de etanol en los animales de alta ansiedad; en tanto que en los animales de nivel de promedio de ansiedad vimos un leve, pero significativo, efecto facilitador provocado por esta fuente de estrés.

Los efectos del estrés sobre el consumo de alcohol/etanol no siempre han resultado sencillos y a veces han sido contradictorios. Por ejemplo, se ha indicado que la exposición a descargas eléctricas aumenta, disminuye o no produce alteración sobre la preferencia hacia el etanol (Füllgrabe et al., 2007; Pautassi, et al., 2010; Siegmund et al., 2005; Volpicelli et al., 1990). Supusimos que bajo nuestras condiciones la restricción del movimiento aumentaría el consumo de alcohol en los animales, y que este efecto estaría exacerbado en sujetos con una respuesta de ansiedad alta. Esta hipótesis no fue corroborada. Posiblemente la caída en el consumo en este grupo de animales –alto-ansiosos estresados- podría encontrar explicación en la ley propuesta en Yerkes-Dodson en 1908 y reformulada para los efectos del consumo de estrés sobre el consumo de alcohol por Miczek et al. (2008). Esta ley predice tanto un aumento como una reducción del consumo de drogas como efecto de la exposición a estrés moderado e intenso, respectivamente. En otras palabras, la relación entre el estrés y la ingesta de drogas se ajustan a una curva en forma de U invertida y, por lo tanto, una mayor ingesta tras la exposición a estrés se observaría solamente si los sujetos se encuentran en un “punto crítico” de la curva (Miczek et al., 2008). Según este razonamiento, los sujetos de alta-respuesta de ansiedad puede que percibieran el estrés provocado por la restricción del movimiento más intensamente que sus pares con ansiedad promedio o baja. Esto es, simplemente una hipótesis. Se requieren más aproximaciones en relación a los fenómenos aquí abordados para comprender la compleja relación entre el estrés y la respuesta de ansiedad; y su efecto sobre el consumo de la droga (Pohorecky, 1981).

En general, las variables que analizamos a lo largo de esta tesis no se vieron afectadas por el factor sexo: tanto machos como hembras respondieron de manera similar frente a los diferentes

desafíos experimentales. Una respuesta disociada entre los sexos sólo se observó cuando evaluamos consumo de etanol. Las hembras consumieron más alcohol que los machos en forma general. Asimismo, observamos que el mayor consumo de alcohol se manifestó en los animales con alta reactividad motora inducida por el etanol, particularmente en las hembras (*Experimento 2*) y también en aquellas hembras con alta respuesta de ansiedad basal (*Experimento 12*) Esta diferencia entre los sexos es consistente con antecedentes previos (Adams, 1995; Adams et al., 1991; Almeida et al., 1996; Doremus et al., 2005; Lancaster y Spiegel, 1992; Li y Lumeng, 1984; Loi et al., 2014; Piano et al., 2005; Sarviharju et al., 2001). Por ejemplo, Lancaster y Spiegel (1992) evaluaron ingesta de cerveza en la cepa de ratas Long-Evans a concentraciones de 5% o 10% durante 15 días. En dicho estudio indistintamente de las concentraciones ofrecidas las hembras consumieron más alcohol que los machos. En otro estudio (Blanchard et al., 1993) observaron que las hembras mostraron mayor incremento en la liberación de dopamina en el NACC en respuesta a la administración de etanol, asimismo consumieron más de la droga que los machos bajo un esquema operante. La falta de discriminación entre las concentraciones y la mayor liberación de dopamina inducida por la administración de etanol parecen indicar que las hembras serían más sensibles a los efectos reforzantes de la drogas respecto de los pares machos. También se ha sugerido que las hormonas gonadales podrían estar modulando la respuesta neuroquímica hacia etanol; particularmente en las regiones del cerebro asociadas al sistema de recompensa mesocorticolímbico. Algunos trabajos sugieren que las diferencias en los mecanismos dimórficos sexuales en el cerebro (Fernandez-Ruiz et al., 1992; McGivern et al., 1991) como los niveles de hormonas ováricas circulantes en las ratas hembras adultas pueden influir en la ingesta de etanol (Adams et al., 1996), posiblemente a través de variaciones cíclicas en la capacidad de respuesta de los sistemas de recompensa hacia el etanol (Blanchard y Glick, 1995). De hecho, se ha indicado que la ingesta de etanol en las ratas hembras varía durante el ciclo estral, siendo el consumo más bajo en proestro cuando los niveles de estrógeno son más altos (Forger y Morin, 1982; Morin y Forger, 1982). No obstante, existen otros trabajos que indican que el consumo de etanol no se ve afectado por el ciclo estral de la rata (Ford et al., 2002; Roberts et al., 1998).

La mayoría de los estudios que indagan las diferencias en los perfiles de consumo en función del sexo se han centrado preferentemente en animales adultos. Posiblemente, las explicaciones aquí mencionadas en función de estas diferencias no sean aplicables al período ontogenético de nuestro estudio, es decir durante la adolescencia. Generalmente, comenzamos a trabajar en la adolescencia temprana cuando las hembras aun no presentan ciclo estales.

En resumen, el objetivo fundacional de este trabajo doctoral era la confección de un modelo

que predijera consumo de alcohol durante la adolescencia. Esperábamos también desarrollar estrategias metodológicas para la detección de poblaciones de adolescentes a riesgo de iniciarse y mostrar un consumo elevado de la droga.

Para ello indagamos sobre una serie de variables de comportamiento y cómo era la sensibilidad hacia los efectos motivacionales de la droga en los adolescentes. A tal fin, pudimos introducir y estudiar en profundidad la estimulación motora inducida por la droga como un indicador fiable para la detección de sujetos propensos a iniciarse y consumir más de la droga que aquellos sujetos menos sensibles a dicha activación; y comprobamos que en principio a ciertas dosis este efecto no estaría asociado a potenciales efectos ansiolíticos.

Pudimos reflejar la importancia que cobra la experiencia temprana con el alcohol para modular el consumo de la droga posterior; particularmente, frente a dosis altas-moderadas. Tan solo una experiencia con la droga, durante la adolescencia inicial, fue suficiente para alterar la respuesta hacia la droga en términos de consumo durante la adolescencia tardía.

Los adolescentes se mostraron capaces de aprender sobre los consecuencias aversivas y apetitivas del alcohol. Ambos efectos estuvieron asociados al nivel de ambulación en campo abierto. Lo que nos permitió conocer otra característica que haría más vulnerable a cierto grupo de individuos respecto de otros; puesto que aquellos individuos más reactivos al contexto en términos motores percibieron más los efectos apetitivos y menos los aversivos de la droga. El consumo de alcohol en las ratas adolescentes estuvo asociado tanto a los efectos estimulantes como a los efectos ansiolíticos del alcohol. Observamos que en el interior de un mismo grupo de referencia de pares era posible detectar diferencias individuales en la sensibilidad hacia la droga que se asociaron al consumo posterior de alcohol. Aparentemente, y según indican los resultados obtenidos en el *Experimento 11*, ambos efectos motivacionales estarían regulados por mecanismos independientes. Otro aporte de suma importancia de dicho experimento fue que logramos diseñar un modelo de predicción de consumo mediante la identificación de marcadores de comportamiento que están presentes conjuntamente en un mismo individuo.

Resumiendo, sindicamos como factores de vulnerabilidad para la reactividad hedónica al etanol y para la ingesta de esta droga en ratas adolescentes a (a) la iniciación temprana a la droga, (b) la variabilidad natural en los niveles de respuesta de ansiedad, (c) la reactividad motora ante contextos novedosos y (d) la estimulación motora inducida por los efectos agudos de la droga.

Bajo diferentes condiciones los resultados ayudaron a caracterizar poblaciones de adolescentes más vulnerables a iniciarse en el consumo de la droga. Las diferentes estrategias aquí abordadas podrían ser consideradas en futuros estudios para diferenciar entre los adolescentes que adoptarán un consumo problemático de alcohol de aquellos que conservaran un consumo controlado

de la droga, a pesar de tener una libre disponibilidad de la misma. Asimismo podrían ampliarse y refinarse contemplando predictores genéticos, neurales y hormonales.

Lejos de ser exhaustiva esta tesis, se requieren más y nuevos abordajes experimentales que permitan identificar mejor las condiciones que promueven consumo elevado de alcohol durante la adolescencia así como los factores que median la relación entre la iniciación temprana de etanol y la vulnerabilidad al abuso y dependencia de etanol.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo MB, Molina JC, Nizhnikov ME, Spear NE, Pautassi RM (2010) High ethanol dose during early adolescence induces locomotor activation and increases subsequent ethanol intake during late adolescence. *Dev Psychobiol*, 52(5):424-40.
- Adams N (1995) Sex differences and the effects of tail pinch on ethanol drinking in Maudsley rats. *Alcohol*, 12(5):463-8.
- Adams N, Oldham TD (1996) Seminatural housing increases subsequent ethanol intake in male Maudsley Reactive rats. *J Stud Alcohol*, 57(4):349-51.
- Adams N, Shihabi ZK, Blizard DA (1991) Ethanol preference in the Harrington derivation of the Maudsley Reactive and Non-Reactive strains. *Alcohol Clin Exp Res*, 15(2):170-4.
- Agabio R, Carai MA, Lobina C, Pani M, Reali R, Vacca G, Gessa GL, Colombo G (2001) Alcohol stimulates motor activity in selectively bred Sardinian alcohol-preferring (sP), but not in Sardinian alcohol-nonpreferring (sNP), rats. *Alcohol*, 23(2):123-6.
- Alati R, Mamun A, Williams GM, O'Callaghan M, Najman JM, Bor W (2006) In utero alcohol exposure and prediction of alcohol disorders in early adulthood: a birth cohort study. *Arch Gen Psychiatry*, 63(9):1009-16.
- Alati R, Najman JM, Kinner SA, Mamun AA, Williams GM, O'Callaghan M, Bor W (2005) Early predictors of adult drinking: a birth cohort study. *Am J Epidemiol*, 162(11):1098-107
- Alaux-Cantin S, Warnault V, Legastelois R, Botia B, Pierrefiche O, Vilpoux C, Naassila M (2013) Alcohol intoxications during adolescence increase motivation for alcohol in adult rats and induce neuroadaptations in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology*, 67:521-31.
- Alderete E, Kaplan CP, Nah G, Perez-Stable EJ (2008). Problemas relacionados con el consumo de alcohol en jóvenes de la provincia de Jujuy, Argentina. *Salud Publica Mex*, 50(4):300-7.
- Almeida OF, Shoaib M, Deicke J, Fischer D, Darwish MH, Patchev VK (1998) Gender differences in ethanol preference and ingestion in rats. The role of the gonadal steroid environment. *J Clin Invest*, 101(12):2677-85.

- Andersen SL, Dumont NL, Teicher MH (1997) Developmental differences in dopamine synthesis inhibition by (+/-)-7-OH-DPAT. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 356(2):173-81.
- Anderson RI, Varlinskaya EI, Spear LP (2008) Isolation stress and ethanol-induced conditioned taste aversion in adolescent and adult male rats. Paper presented at the 41st Annual Meeting of the International Society for Developmental Psychobiology, Washington DC, Nov. 12– 15.
- Anderson RI, Varlinskaya EI, Spear LP (2010) Ethanol-induced conditioned taste aversion in male sprague-dawley rats: impact of age and stress. *Alcohol Clin Exp Res*, 34(12):2106-15
- Anestis MD, Selby EA, Joiner TE (2007) The role of urgency in maladaptive behaviors. *Behav Res Ther*, 45:3018–29.
- Archer J (1973) Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav*, 21(2):205-35.
- Arias C, Mlewski EC, Miller S, Molina JC, Spear NE (2009a) Novelty modulates the stimulating motor effects of ethanol in preweanling rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 92(3):448-56.
- Arias C, Mlewski EC, Molina JC, Spear NE (2009b) Ethanol induces locomotor activating effects in preweanling Sprague–Dawley rats. *Alcohol*, 43, 13–23.
- Arias C, Mlewski EC, Molina JC, Spear NE (2009c). Naloxone and baclofen attenuate ethanol's locomotor-activating effects in preweanling Sprague–Dawley rats. *Behav. Neurosci*, 123, 172–180.
- Arias C, Molina JC, Mlewski EC, Pautassi, RM, Spear N (2008) Acute sensitivity and acute tolerance to ethanol in preweanling rats with or without prenatal experience with the drug. *Pharmacol. Biochem. Behav*, 89, 608–622.
- Arias C, Molina JC, Spear NE (2009d) Ethanol-mediated aversive learning as a function of locomotor activity in a novel environment in infant Sprague-Dawley rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 92(4):621-8.
- Arias C, Pautassi RM, Molina JC, Spear NE (2010) A comparison between taste avoidance and conditioned disgust reactions induced by ethanol and lithium chloride in preweanling rats *Dev Psychobiol*, 52(6):545-57.

- Arizzi MN, Correa M, Betz AJ, Wisniecki A, Salamone JD (2003) Behavioral effects of intraventricular injections of low doses of ethanol, acetaldehyde, and acetate in rats: studies with low and high rate operant schedules. *Behav Brain Res*, 147(1-2):203-10.
- Arizzi-LaFrance MN, Correa M, Aragon CM, Salamone JD (2006) Motor stimulant effects of ethanol injected into the substantia nigra pars reticulata: importance of catalase-mediated metabolism and the role of acetaldehyde. *Neuropsychopharmacology*, 31(5):997-1008.
- Aseltine RH Jr, Gore SL (2000) The variable effects of stress on alcohol use from adolescence to early adulthood. *Subst Use Misuse*, 35(5):643-68.
- Assaad JM (2002) The heart rate response to alcohol intoxication and its relationship with alcohol consumption, delinquency, and intoxicated aggressive and disinhibited behaviors. Doctoral dissertation, McGill University, Québec.
- Badiani A, Oates MM, Fraioli S, Browman KE, Ostrander MM, Xue CJ, Wolf ME, Robinson TE (2000) Environmental modulation of the response to amphetamine: dissociation between changes in behavior and changes in dopamine and glutamate overflow in the rat striatal complex. *Psychopharmacology (Berl)*, 151(2-3):166-74.
- Badishtov BA, Overstreet DH, Kashevskaya OP, Viglinskaya IV, Kampov-Polevoy AB, Seredenin SB, Halikas JA (1995) To drink or not to drink: open field behavior in alcohol-preferring and nonpreferring rat strains. *Physiol Behav*, 57(3):585-9.
- Baer JS, Barr HM, Bookstein FL, Sampson PD, Streissguth AP (1998) Prenatal alcohol exposure and family history of alcoholism in the etiology of adolescent alcohol problems. *J Stud Alcohol*, 59(5):533-43.
- Baer JS, Sampson PD, Barr HM, Connor PD, Streissguth AP (2003) A 21-year longitudinal analysis of the effects of prenatal alcohol exposure on young adult drinking. *Arch Gen Psychiatry*, 60(4):377-85.
- Bahi A (2013) Individual differences in elevated plus-maze exploration predicted higher ethanol consumption and preference in outbred mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 10583-8.

- Bardo MT, Bevins RA (2000) Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology (Berl)*, 153(1):31-43.
- Bardo MT, Donohew RL, Harrington NG (1996) Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behav Brain Res*, 77(1-2):23-43.
- Becker A, Grecksch G, Kraus J, Loh HH, Schroeder H, Holtt V (2002) Rewarding effects of ethanol and cocaine in mu opioid receptordeficient mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 365:296–302
- Belin D, Berson N, Balado E, Piazza PV, Deroche-Gamonet V (2011) High-novelty-preference rats are predisposed to compulsive cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology*, 36(3):569-79.
- Bell RL, Rodd ZA, Engleman EA, Toalston JE, McBride WJ (2014) Scheduled access alcohol drinking by alcohol-preferring (P) and high-alcohol-drinking (HAD) rats: modeling adolescent and adult binge-like drinking. *Alcohol*, 48(3):225-34
- Bell RL, Rodd ZA, Hsu CC, Lumeng L, Li TK, Murphy JM, McBride WJ (2004) Effects of concurrent access to a single concentration or multiple concentrations of ethanol on ethanol intake by periadolescent high-alcohol-drinking rats. *Alcohol*, 33(2):107-15.
- Bell RL, Rodd ZA, Lumeng L, Murphy JM, McBride WJ (2006) The alcohol-preferring P rat and animal models of excessive alcohol drinking. *Addict Biol*, 11(3-4):270-88.
- Bell RL, Rodd ZA, Schultz JA, Peper CL, Lumeng L, Murphy JM, McBride WJ (2008) Effects of short deprivation and re-exposure intervals on the ethanol drinking behavior of selectively bred high alcohol-consuming rats. *Alcohol*, 42(5):407-16.
- Bell RL, Sable HJ, Colombo G, Hyytiä P, Rodd ZA, Lumeng L (2012) Animal models for medications development targeting alcohol abuse using selectively bred rat lines: neurobiological and pharmacological validity. *Pharmacol Biochem Behav*, 103,119-155.
- Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci*, 3(9):728-39.

- Benes FM, Turtle M, Khan Y, Farol P (1994) Myelination of a key relay zone in the hippocampal formation occurs in the human brain during childhood, adolescence, and adulthood. *Arch Gen Psychiatry*, 51(6):477-84.
- Berman RF, Cannon DS (1974) The effect of prior ethanol experience on ethanol-induced saccharin aversions. *Physiol Behav*, 12(6):1041-4.
- Bienkowski P, Koros E, Kostowski W (2001) Novelty-seeking behaviour and operant oral ethanol self-administration in Wistar rats. *Alcohol Alcohol*, 36(6):525-8.
- Bisaga A, Kostowski W (1993) Individual behavioral differences and ethanol consumption in Wistar rats. *Physiol Behav*, 54(6):1125-31.
- Blakemore SJ, Choudhury S (2006) Development of the adolescent brain: implications for executive function and social cognition. *J Child Psychol Psychiatry*, 47(3-4):296-312.
- Blanchard BA, Glick SD (1995) Sex differences in mesolimbic dopamine responses to ethanol and relationship to ethanol intake in rats. *Recent Dev Alcohol*, 12:231-41.
- Blanchard BA, Glick SD (1995) Sex differences in mesolimbic dopamine responses to ethanol and relationship to ethanol intake in rats *Recent Dev Alcohol*, 12: 231-41.
- Blanchard BA, Steindorf S, Wang S, Glick SD (1993) Sex differences in ethanol-induced dopamine release in nucleus accumbens and in ethanol consumption in rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 17(5):968-73.
- Blanchard BA, Steindorf S, Wang S, Glick SD (1993) Sex differences in ethanol-induced dopamine release in nucleus accumbens and in ethanol consumption in rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 17(5):968-73.
- Blanchard DC, Blanchard RJ (1988) Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol*, 39:43-68.
- Blatt SL, Takahashi RN (1999) Experimental anxiety and the reinforcing effects of ethanol in rats. *Braz J Med Biol Res*, 32(4):457-61.

- Boerngen-Lacerda R, Souza-Formigoni ML (2000) Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? *Pharmacol Biochem Behav*, 67(2):225-32.
- Boileau I, Assaad JM, Pihl RO, Benkelfat C, Leyton M, Diksic M, Tremblay RE, Dagher A (2003) Alcohol promotes dopamine release in the human nucleus accumbens. *Synapse*, 15;49(4):226-31.
- Brasser SM, Spear NE (2004) Contextual conditioning in infants, but not older animals, is facilitated by CS conditioning. *Neurobiol Learn Mem*, 81(1):46-59.
- Brenhouse HC, Andersen SL (2011) Developmental trajectories during adolescence in males and females: a cross-species understanding of underlying brain changes. *Neurosci Biobehav Rev*, 35(8):1687-703.
- Broadwater M, Spear LP (2014) Consequences of adolescent or adult ethanol exposure on tone and context fear retention: effects of an acute ethanol challenge during conditioning. *Alcohol Clin Exp Res*, 38(5):1454-60.
- Brown SA (1985) Expectancies versus background in the prediction of college drinking patterns. *J Consult Clin Psychol*, 53(1):123-30.
- Brunell SC, Rajendran P, Spear LP (2001). Ethanol intake and stress adaptation in adolescent and adult rats. *Soc. Neurosci. Abstr.* 27: 877.12.
- Brunell SC, Spear LP (2005) Effect of stress on the voluntary intake of a sweetened ethanol solution in pair-housed adolescent and adult rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 29(9):1641-53
- Brunelle C, Assaad JM, Barrett SP, AVila C, Conrod PJ, Tremblay RE, Pihl RO (2004) Heightened heart rate response to alcohol intoxication is associated with a reward-seeking personality profile. *Alcohol Clin Exp Res*, 28(3):394-401.
- Buchmann AF, Schmid B, Blomeyer D, Becker K, Treutlein J, Zimmermann US, Jennen-Steinmetz C, Schmidt MH, Esser G, Banaschewski T, Rietschel M, Schumann G, Laucht M (2009) Impact of age at first drink on vulnerability to alcohol-related problems: testing the marker hypothesis in a prospective study of young adults. *J Psychiatr Res*, 43(15):1205-12

- Bunney EB, Appel SB, Brodie MS (2000) Cocaine potentiates ethanol-induced excitation of dopaminergic reward neurons in the ventral tegmental area. *J Pharmacol Exp Ther*, 293(2):383-9.
- Bush DE, Vaccarino FJ (2007) Individual differences in elevated plus-maze exploration predicted progressive-ratio cocaine self-administration break points in Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 194(2):211-9.
- Busse GD, Riley AL (2002) Modulation of cocaine-induced place preferences by alcohol. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 26:1373–1381.
- Busse GD, Riley AL (2004) Cocaine, but not alcohol, reinstates cocaine-induced place preferences. *Pharmacol Biochem Behav*, 78:827–833.
- Cailhol S, Mormède P (2001) Sex and strain differences in ethanol drinking: effects of gonadectomy. *Alcohol Clin Exp Res*, 25(4):594-9.
- Caldwell EE, Riccio DC (2010) Alcohol self-administration in rats: Modulation by temporal parameters related to repeated mild social defeat stress. *Alcohol*, 44(3):265-74.
- Camarini R, Hodge CW (2004) Ethanol preexposure increases ethanol self-administration in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 79(4):623-32.
- Camarini R, Nogueira Pires ML, Calil HM (2000) Involvement of the opioid system in the development and expression of sensitization to the locomotor-activating effect of ethanol. *Int J Neuropsychopharmacol*, 3(4):303-9.
- Cannon DS, Berman RF, Baker TB, Atkins CA (1975) Effect of preconditioning unconditioned stimulus experience on learned taste aversions. *J Exp Psychol Anim Behav Process*, 1(3):270-84.
- Cappell H, Herman CP (1972) Alcohol and tension reduction. A review. *Q J Stud Alcohol*, 33(1):33-64.
- Carey KB, Correia CJ (1997) Drinking motives predict alcohol-related problems in college students. *J Stud Alcohol*, 58(1):100-5.

- Carlson SR, Johnson SC, Jacobs PC (2010) Disinhibited characteristics and binge drinking among university student drinkers. *Addict Behav*, 35:242-51. doi: 10.1016/j.addbeh.2009.10.020.
- Carmona S, Proal E, Hoekzema EA, Gispert JD, Picado M, Moreno I, Soliva JC, Bielsa A, Rovira M, Hilferty J, Bulbena A, Casas M, Tobeña A, Vilarroya O (2009) Vento-striatal reductions underpin symptoms of hyperactivity and impulsivity in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, 66(10):972-7.
- Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P (2002). Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res*, 134: 49–57.
- Carpenter KM, Hasin D (1998) A prospective evaluation of the relationship between reasons for drinking and DSM-IV alcohol-use disorders. *Addict Behav*, 23(1):41-6.
- Carpenter KM, Hasin DS (1998) Reasons for drinking alcohol: Relationships with DSM-IV alcohol diagnoses and alcohol consumption in a community sample. *Psychology of Addictive Behaviors*, 12(3), 168-84.
- Carrara-Nascimento PF, Griffin WC 3rd, Pastrello DM, Olive MF, Camarini R (2011) Changes in extracellular levels of glutamate in the nucleus accumbens after ethanol-induced behavioral sensitization in adolescent and adult mice. *Alcohol*, 45(5):451-60.
- Casey BJ, Getz S, Galvan A (2008) The adolescent brain. *Dev Rev*, 28(1):62-77.
- Casey BJ, Jones RM, Hare TA (2008) The adolescent brain. *Ann NY Acad Sci*, 1124:111–126.
- Casey BJ, Trainor RJ, Orendi JL, Schubert AB, Nystrom LE, Giedd JN, Castellanos FX, Haxby JV, Noll DC, Cohen JD, Forman SD, Dahl RE, Rapoport JL (1997) A Developmental Functional MRI Study of Prefrontal Activation during Performance of a Go-No-Go Task. *J Cogn Neurosci*, 9(6):835-47.
- Castellanos RN, Rubia K, Conrod P J (2011). Response inhibition and reward response bias mediate the predictive relationships between impulsivity and sensation seeking and common and unique variance in conduct disorder and substance misuse. . *Alcohol Clin Exp Res*, 35:140–55.

- Chester JA, de Paula Barrenha G, DeMaria A, Finegan A (2006) Different effects of stress on alcohol drinking behaviour in male and female mice selectively bred for high alcohol preference. *Alcohol Alcohol*, 41(1):44-53.
- Choleris E, Thomas AW, Kavaliers M, Prato FS (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neurosci Biobehav Rev*, 25(3):235-60.
- Chuck TL, McLaughlin PJ, Arizzi-LaFrance MN, Salamone JD, Correa M (2006) Comparison between multiple behavioral effects of peripheral ethanol administration in rats: sedation, ataxia, and bradykinesia. *Life Sci*, 79(2):154-61.
- Ciccocioppo R, Angeletti S, Chhada M, Perfumi M, Froidi R, Massi M (1999a) Conditioned taste aversion induced by ethanol in alcohol-preferring rats: influence of the method of ethanol administration. *Pharmacol Biochem Behav*, 64(3):563-6.
- Ciccocioppo R, Panocka I, Froidi R, Quitadamo E, Massi M (1999b) Ethanol induces conditioned place preference in genetically selected alcohol-preferring rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 141(3):235-41.
- Colombo G, Agabio R, Lobina C, Reali R, Vacca G, Gessa GL (1998) Stimulation of locomotor activity by voluntarily consumed ethanol in Sardinian alcohol-preferring rats. *Eur J Pharmacol*, 357(2-3):109-13.
- Colombo G, Lobina C, Carai MA, Gessa GL (2006) Phenotypic characterization of genetically selected Sardinian alcohol-preferring (sP) and -non-preferring (sNP) rats. *Addict Biol*, 11(3-4):324-38.
- Congdon E, Canli T (2005) The endophenotype of impulsivity: reaching consilience through behavioral, genetic, and neuroimaging approaches. *Behav Cogn Neurosci Rev*, 4(4):262-81.
- Conger JJ (1951) The effects of alcohol on conflict behavior in the albino rat. *Q J Stud Alcohol*, 12(1):1-29.

- Conrod PJ, Peterson JB, Pihl RO (2001) Reliability and validity of alcohol-induced heart rate increase as a measure of sensitivity to the stimulant properties of alcohol. *Psychopharmacology*, 157(1):20-30.
- Conrod PJ, Peterson JB, Pihl RO, Mankowski S (1997) Biphasic effects of alcohol on heart rate are influenced by alcoholic family history and rate of alcohol ingestion. *Alcohol Clin Exp Res*, 21(1):140-9.
- Conrod PJ, Pihl RO, Vassileva J (1998). Differential sensitivity to alcohol reinforcement in groups of men at risk for distinct alcoholism subtypes. *Alcohol Clin Exp Res*, 22:585–97.
- Constantinidis C, Goldman-Rakic PS (2002) Correlated discharges among putative pyramidal neurons and interneurons in the primate prefrontal cortex. *J Neurophysiol*, 88(6):3487-97.
- Cools AR, Gingras MA (1998) Nijmegen high and low responders to novelty: a new tool in the search after the neurobiology of drug abuse liability. *Pharmacol Biochem Behav*, 60(1):151-9.
- Correa M, Arizzi MN, Betz A, Mingote S, Salamone JD (2003) Locomotor stimulant effects of intraventricular injections of low doses of ethanol in rats: acute and repeated administration. *Psychopharmacology (Berl)*, 170(4):368-75.
- Correa M, Sanchis-Segura C, Aragon CM (2001) Influence of brain catalase on ethanol-induced loss of righting reflex in mice. *Drug Alcohol Depend*, 65(1):9-15.
- Crabbe JC, Bell RL, Ehlers C (2010) Human and laboratory rodent low response to alcohol: is better consilience possible? *Addict Biol*, 15(2):125-44.
- Crabbe JC, Cameron AJ, Munn E, Bunning M, Wahlsten D (2008) Overview of mouse assays of ethanol intoxication. *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 9: Unit 9.26.
- Crawley J, Goodwin FK (1980) Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav*, 13(2):167-70.
- Crawley JN (1985) Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci Biobehav Rev*, 9(1):37-44.

- Crews F, He J, Hodge C (2007) Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav*, 86(2):189-99.
- Crews FT, Mdzinarishvili A, Kim D, He J, Nixon K (2006) Neurogenesis in adolescent brain is potently inhibited by ethanol. *Neuroscience*, 137:437-45.
- Crusio WE (2001) Genetic dissection of mouse exploratory behaviour. *Behav Brain Res*, 125(1-2):127-32.
- Cunningham CL, Fidler TL, Hill KG (2000) Animal models of alcohol's motivational effects. *Alcohol Res Health*, 24(2):85-92.
- Cunningham CL, Gremel CM, Groblewski PA (2006) Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nat Protoc*, 1(4):1662-70.
- Cunningham CL, Henderson CM (2000) Ethanol-induced conditioned place aversion in mice. *Behav Pharmacol*, 11(7-8):591-602.
- Cunningham CL, Malott DH, Dickinson SD, Risinger FO (1992) Haloperidol does not alter expression of ethanol-induced conditioned place preference. *Behav Brain Res*, 50(1-2):1-5.
- Cunningham CL, Niehus JS, Noble D (1993) Species difference in sensitivity to ethanol's hedonic effects. *Alcohol*, 10(2):97-102.
- Cunningham CL, Pharter LK (1992) Conditioning trial duration affects ethanol-induced conditioned place preference in mice. *Animal Learning y Behavior*, 20 (2):187-94.
- Cunningham CL, Smith R, McMullin C. (2003) Competition between ethanol-induced reward and aversion in place conditioning. *Learning y Behavior*, 31:273-80.
- Cunningham CL, Tull LE, Rindal KE, Meyer PJ (2002) Distal and proximal pre-exposure to ethanol in the place conditioning task: tolerance to aversive effect, sensitization to activating effect, but no change in rewarding effect. *Psychopharmacology (Berl)*, 160(4):414-24.
- Da Silva GE, Ramos A, Takahashi RN (2004) Comparison of voluntary ethanol intake by two pairs of rat lines used as genetic models of anxiety. *Braz J Med Biol Res*, 37(10):1511-7.

- Da Silva GE, Vendruscolo LF, Takahashi RN (2005) Effects of ethanol on locomotor and anxiety-like behaviors and the acquisition of ethanol intake in Lewis and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*, 77(6):693-706.
- Dahl RE, Gunnar MR (2009) Heightened stress responsiveness and emotional reactivity during pubertal maturation: implications for psychopathology. *Dev Psychopathol*, 21(1):1-6.
- Davis CM, Riley AL (2007) The effects of cocaine preexposure on cocaine-induced taste aversion learning in Fischer and Lewis rat strains. *Pharmacol Biochem Behav*, 87(1):198-202.
- Dawson DA, Grant BF, Li TK (2007) Impact of age at first drink on stress-reactive drinking. *Alcohol Clin Exp Res*, 31(1):69-77.
- Dawson DA, Li TK, Grant BF (2008) A prospective study of risk drinking: at risk for what? *Drug Alcohol Depend*, 95(1-2):62-72.
- de Brugada I, Gonzalez F, Candido A (2003) The role of injection cues in the associative control of the US pre-exposure effect in flavour aversion learning. *Q J Exp Psychol B*, 56(3):241-52.
- de Wit H, Phillips TJ (2012) Do initial responses to drugs predict future use or abuse? *Neurosci Biobehav Rev*, 36(6):1565-76.
- Dellu F, Piazza PV, Mayo W, Le Moal M, Simon H (1996) Novelty-seeking in rats--biobehavioral characteristics and possible relationship with the sensation-seeking trait in man. *Neuropsychobiology*, 34(3):136-45.
- DePoy L, Daut R, Brigman JL, MacPherson K, Crowley N, Gunduz-Cinar O, Pickens CL, Cinar R, Saksida LM, Kunos G, Lovinger DM, Bussey TJ, Camp MC, Holmes A (2013) Chronic alcohol produces neuroadaptations to prime dorsal striatal learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(36):14783-8.
- Depue RA, Collins PF (1999) Neurobiology of the structure of personality: dopamine, facilitation of incentive motivation, and extraversion. *Behav Brain Sci*, 22(3):491-517.
- Depue RA, Iacono WG (1989) Neurobehavioral aspects of affective disorders. *Annu Rev Psychol*, 40:457-92.

- DeWit DJ, Adlaf EM, Offord DR, Ogborne AC (2000) Age at first alcohol use: a risk factor for the development of alcohol disorders. *Am J Psychiatry*, 57(5):745-50.
- Dick DM, Agrawal A (2008) The Genetics of Alcohol and Other Drug Dependence. *Alcohol Research y Health*, 31: 111-118.
- Dick DM, Smith G, Olausson P, Mitchell SH, Leeman RF, O'Malley SS, Sher K (2010) Understanding the construct of impulsivity and its relationship to alcohol use disorders. *Addict Biol*, 15(2):217-26.
- Dickinson SD, Kashawny SK, Thiebes KP, Charles DY (2009) Decreased sensitivity to ethanol reward in adolescent mice as measured by conditioned place preference. *Alcohol Clin Exp Res*, 33(7):1246-51.
- Dominguez HD, Bocco G, Chotro MG, Spear NE, Molina JC (1993) Operant responding controlled by milk or milk contaminated with alcohol as positive reinforcers in infant rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 44(2):403-9.
- Doremus TL, Brunell SC, Rajendran P, Spear LP (2005) Factors influencing elevated ethanol consumption in adolescent relative to adult rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 29(10):1796-808.
- Doremus-Fitzwater TL, Varlinskaya EI, Spear LP (2009) Social and non-social anxiety in adolescent and adult rats after repeated restraint. *Physiol Behav*, 97(3-4):484-94.
- Ducci F, Goldman D (2008) Genetic approaches to addiction: genes and alcohol. *Addiction*, 103(9):1414-28.
- Ducci F, Goldman D (2012) The genetic basis of addictive disorders. *Psychiatr Clin North Am*, 35(2):495-519.
- Duke MA, Meier TL, Bolanos CA, Crawford CA, McDougall SA (1997) Paradoxical effects of kappa-opioid stimulation on the locomotor activity and Fos immunoreactivity of the preweanling rat: role of dopamine receptors. *Behav Neurosci*, 111(5):1114-22.
- Duncan PM, Alici T, Woodward JD (2000) Conditioned compensatory response to ethanol as indicated by locomotor activity in rats. *Behav Pharmacol*, 11(5):395-402.

- Duranceaux NC, Schuckit MA, Eng MY, Robinson SK, Carr LG, Wall TL (2006) Associations of variations in alcohol dehydrogenase genes with the level of response to alcohol in non-Asians. *Alcohol Clin Exp Res*, 30(9):1470-8.
- Durston S, Hulshoff Pol HE, Casey BJ, Giedd JN, Buitelaar JK, van Engeland H (2001) Anatomical MRI of the developing human brain: what have we learned? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 40:1012–20.
- Dyr W, Kostowski W (2008) Warsaw high-preferring (WHP) and Warsaw low-preferring (WLP) lines of rats selectively bred for high and low voluntary ethanol intake: preliminary phenotypic characterization. *Alcohol*, 42(3):161-70.
- Ehlers CL, Desikan A, Wills DN (2013) Developmental differences in EEG and sleep responses to acute ethanol administration and its withdrawal (hangover) in adolescent and adult Wistar rats. *Alcohol*, 47(8):601-10.
- Eisenberg DT, Mackillop J, Modi M, Beauchemin J, Dang D, Lisman SA, Lum JK, Wilson DS (2007) Examining impulsivity as an endophenotype using a behavioral approach: a DRD2 TaqI A and DRD4 48-bp VNTR association study. *Behav Brain Funct*, 10; 3:2.
- Ennaceur A, Michalikova S, Bradford A, Ahmed S (2005) Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. *Behav Brain Res*, 159: 247–66.
- Ennaceur A, Michalikova S, Chazot PL (2006) Models of anxiety: responses of rats to novelty in an open space and an enclosed space. *Behav Brain Res*, 171(1):26-49.
- Enoch MA (2003) Pharmacogenomics of alcohol response and addiction. *Am J Pharmacogenomics*, 3(4):217-32.
- Fahlke C, Hansen S (1999) Effect of local intracerebral corticosterone implants on alcohol intake in the rat. *Alcohol Alcohol*, 34(6):851-61.
- Faria RR, Lima Rueda AV, Sayuri C, Soares SL, Malta MB, Carrara-Nascimento PF, da Silva Alves A, Marcourakis T, Yonamine M, Scavone C, Giorgetti Britto LR, Camarini R (2008)

Environmental modulation of ethanol-induced locomotor activity: Correlation with neuronal activity in distinct brain regions of adolescent and adult Swiss mice. *Brain Res*, 1239:127-40.

Fernandez-Ruiz J, De Miguel R, Hernandez ML, Cebeira M, Ramos JA (1992) Comparisons between brain dopaminergic neurons of juvenile and aged rats: Sex-related differences. *Mech Ageing Dev*, 63:45-55

Festing MF (2010) Inbred strains should replace outbred stocks in toxicology, safety testing, and drug development. *Toxicol Pathol*, 38(5):681-90.

Fidler TL, LoLordo VM (1996) Failure to find postshock increases in ethanol preference. *Alcohol Clin Exp Res*, 20(1):110-21.

File SE (1993) The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behav Brain Res*, 58(1-2):199-202.

File SE (2001) Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res*, 125(1-2):151-7.

Files FJ, Lewis RS, Samson HH (1994) Effects of continuous versus limited access to ethanol on ethanol self-administration. *Alcohol*, 11(6):523-31.

Files FJ, Samson HH, Denning CE, Marvin S (1998) Comparison of alcohol-preferring and nonpreferring selectively bred rat lines. II. Operant self-administration in a continuous-access situation. *Alcohol Clin Exp Res*, 22(9):2147-58.

Fillmore MT, Jude R (2011) Defining "binge" drinking as five drinks per occasion or drinking to a .08% BAC: which is more sensitive to risk? *Am J Addict*, 20(5):468-75.

Finn PR, Sharkansky EJ, Brandt KM, Turcotte N (2000) The effects of familial risk, personality, and expectancies on alcohol use and abuse. *J Abnorm Psychol*, 109(1):122-33.

Fischer S, Smith GT (2008) Binge eating, problem drinking, and pathological gambling: Linking behavior to shared traits and social learning. *Pers Individ Dif*, 44:789–800.

- Fishbein DH, Herman-Stahl M, Eldreth D, Paschall MJ, Hyde C, Hubal R, Hubbard S, Williams J, Ialongo N (2006) Mediators of the stress-substance-use relationship in urban male adolescents. *Prev Sci*, 7(2):113-26.
- Flagel SB, Waselus M, Clinton SM, Watson SJ, Akil H (2014) Antecedents and consequences of drug abuse in rats selectively bred for high and low response to novelty. *Neuropharmacology*, 76 Pt B425-36.
- Ford MM, Eldridge JC, Samson HH (2002) Microanalysis of ethanol self-administration: estrous cycle phase-related changes in consumption patterns. *Alcohol Clin Exp Res*, 26:635-43.
- Forger NG, Morin LP (1982) Reproductive state modulates ethanol intake in rats: effects of ovariectomy, ethanol concentration, estrous cycle and pregnancy. *Pharmacol Biochem Behav*, 17(2):323-31.
- Frantz K, Van Hartesveldt C (1999) The locomotor effects of MK801 in the nucleus accumbens of developing and adult rats. *Eur J Pharmacol*, 368(2-3):125-35.
- Fraser LM, Brown RE, Hussin A, Fontana M, Whittaker A, O'Leary TP, Lederle L, Holmes A, Ramos A (2010) Measuring anxiety- and locomotion-related behaviours in mice: a new way of using old tests. *Psychopharmacology (Berl)*, 211(1):99-112.
- Froehlich JC, Harts J, Lumeng L, Li TK (1988) Differences in response to the aversive properties of ethanol in rats selectively bred for oral ethanol preference. *Pharmacol Biochem Behav*, 31(1):215-22.
- Fukushiro DF, Josino FS, Saito LP, Berro LF, Morgado F, Frussa-Filho R (2012) Acute and chronic ethanol differentially modify the emotional significance of a novel environment: implications for addiction. *Int J Neuropsychopharmacol*, 15(8):1109-20.
- Fullgrabe MW, Vengeliene V, Spanagel R (2007) Influence of age at drinking onset on the alcohol deprivation effect and stress-induced drinking in female rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 86(2):320-6.

- Funk D, Vohra S, Lê AD (2004) Influence of stressors on the rewarding effects of alcohol in Wistar rats: studies with alcohol deprivation and place conditioning. *Psychopharmacology (Berl)*, 176(1):82-7.
- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *287(5457):1433-8*.
- Gauvin DV, Briscoe RJ, Goulden KL, Holloway FA (1994) Aversive attributes of ethanol can be attenuated by dyadic social interaction in the rat. *Alcohol*, 11(3):247-51.
- Giedd JN (2004) Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci*, 1021:77-85.
- Giedd JN, Blumenthal J, Jeffries NO, Castellanos FX, Liu H, Zijdenbos A, Paus T, Evans AC, Rapoport JL (1999) Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nat Neurosci*, 2(10):861-3.
- Giedd JN, Clasen LS, Lenroot R, Greenstein D, Wallace GL, Ordaz S, Molloy EA, Blumenthal JD, Tossell JW, Stayer C, Samango-Sprouse CA, Shen D, Davatzikos C, Merke D, Chrousos GP (2006) Puberty-related influences on brain development. *Mol Cell Endocrinol*, 254-255:154-62.
- Giedd JN, Lenroot RK, Shaw P, Lalonde F, Celano M, White S, Tossell J, Addington A, Gogtay N (2008) Trajectories of anatomic brain development as a phenotype. *Novartis Found Symp*, 289:101-12.
- Gingras MA, Cools AR (1995) Differential ethanol intake in high and low responders to novelty. *Behav Pharmacol* 6:718-23.
- Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, Nugent TF 3rd, Herman DH, Clasen LS, Toga AW, Rapoport JL, Thompson PM. (2004) Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(21):8174-9.
- Goldman MS, Brown SA, Christiansen BA, Smith GT (1991) Alcoholism and memory: broadening the scope of alcohol-expectancy research. *Psychol Bull*, 110(1):137-46.

- Goldstein RZ, Volkow ND (2002) Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am J Psychiatry*, 159:1642–52.
- Gomez JL, Lewis MJ, Luine VN (2012) The interaction of chronic restraint stress and voluntary alcohol intake: effects on spatial memory in male rats. *Alcohol*, 46(5):499-504.
- Gottesman II, Gould TD (2003) The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry*, 160(4):636-45.
- Gould E. (1999) Serotonin and hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*, 21(2):46S-51S.
- Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ (2007) Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci*, 30(5):220-7.
- Grant BF, Dawson DA (1997) Age at onset of alcohol use and its association with DSM-IV alcohol abuse and dependence: results from the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. *J Subst Abuse*, 9:103-10.
- Grau E, Ortet G (1999) Personality traits and alcohol consumption in a sample of non-alcoholic women. *Pers Individ Dif*, 27:1057-66.
- Gray JA, Moran PM, Grigoryan G, Peters SL, Young AM, Joseph MH (1997) Latent inhibition: the nucleus accumbens connection revisited. *Behav Brain Res*, 88(1):27-34.
- Greeley J, Oei T (1999) Alcohol and Tension Reduction. En: Leonard KE, Blane HT, editors. *Psychological Theories of Drinking and Alcoholism*. 2nd edition. New York: Guilford Press; pp. 14–53.
- Green AS, Grahame NJ (2008) Ethanol drinking in rodents: is free-choice drinking related to the reinforcing effects of ethanol? *Alcohol*, 42(1):1-11.
- Gregus A, Wintink AJ, Davis AC, Kalynchuk LE (2005). Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behav Brain Res*, 156:105–14.

- Guttmanova K, Bailey JA, Hill KG, Lee JO, Hawkins JD, Woods ML, Catalano RF (2011) Sensitive periods for adolescent alcohol use initiation: predicting the lifetime occurrence and chronicity of alcohol problems in adulthood. *J Stud Alcohol Drugs*, 72(2):221-31.
- Guttmanova K, Hill KG, Bailey JA, Lee JO, Hartigan LA, Hawkins JD, Catalano RF (2012) Examining explanatory mechanisms of the effects of early alcohol use on young adult alcohol dependence. *J Stud Alcohol Drugs*, 73(3):379-90.
- Haertzen CA, Kocher TR, Miyasato K (1983) Reinforcements from the first drug experience can predict later drug habits and/or addiction: results with coffee, cigarettes, alcohol, barbiturates, minor and major tranquilizers, stimulants, marijuana, hallucinogens, heroin, opiates and cocaine. *Drug Alcohol Depend*, 11(2):147-65.
- Hall CS (1934) Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J. Comp Psychol*, 18:385-403.
- Hall FS, Sora I, Uhl GR (2001) Ethanol consumption and reward are decreased in mu-opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 154:43–49.
- He J, Crews F. (2007) Neurogenesis Decreases during Brain Maturation from Adolescence to Adulthood. *Pharmacol Biochem Behav*, 86:327–33.
- Hefner K, Holmes A (2007) An investigation of the behavioral actions of ethanol across adolescence in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 191(2):311-22.
- Henniger MS, Spanagel R, Wigger A, Landgraf R, Holter SM (2002) Alcohol self-administration in two rat lines selectively bred for extremes in anxiety-related behavior. *Neuropsychopharmacology*, 26(6):729-36.
- Herman JP, Cullinan WE (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*, 20(2):78-84.
- Hingson RW, Heeren T, Winter MR (2006) Age of alcohol-dependence onset: associations with severity of dependence and seeking treatment. *Pediatrics*, 118(3):755-63.
- Holdstock L, King AC, de Wit H (2000) Subjective and objective responses to ethanol in moderate/heavy and light social drinkers. *Alcohol Clin Exp Res*, 24(6):789-94.

- Holson RR, Pearce B (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol Teratol*, 14(3):221-8.
- Hoshaw BA, Lewis MJ (2001) Behavioral sensitization to ethanol in rats: evidence from the Sprague-Dawley strain. *Pharmacol Biochem Behav*, 68(4):685-90.
- Hsu LC, Bendel RE, Yoshida A (1988) Genomic structure of the human mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene. *Genomics*, 2(1):57-65.
- Hunt MK, Hopko DR, Bare R, Lejuez CW, Robinson EV (2005) Construct validity of the Balloon Analog Risk Task (BART): associations with psychopathy and impulsivity. *Assessment*, 12: 416–28.
- Huot RL, Thirivikraman KV, Meaney MJ, Plotsky PM (2001) Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology (Berl)*, 158(4):366-73.
- Hüppi PS, Dubois J (2006) Diffusion tensor imaging of brain development. *Semin Fetal Neonatal Med*, 11(6):489-97.
- Ikemoto S, Panksepp J (1996) Dissociations between appetitive and consummatory responses by pharmacological manipulations of reward-relevant brain regions. *Behav Neurosci*, 110(2):331-45.
- Imperato A, Di Chiara G (1986) Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *J Pharmacol Exp Ther*, 239(1):219-28.
- Insel TR, Miller LP, Gelhard RE (1990) The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain--I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience*; 35(1):31-43.
- Izidio GS, Ramos A (2007) Positive association between ethanol consumption and anxiety-related behaviors in two selected rat lines. *Alcohol*, 41(7):517-24.
- Jentsch JD, Woods JA, Groman SM, Seu E (2010) Behavioral characteristics and neural mechanisms mediating performance in a rodent version of the Balloon Analog Risk Task. *Neuropsychopharmacology*, 35(8):1797-806.

- Jerlhag E, Egecioglu E, Dickson SL, Engel JA (2010) Ghrelin receptor antagonism attenuates cocaine- and amphetamine-induced locomotor stimulation, accumbal dopamine release, and conditioned place preference. *Psychopharmacology (Berl)*, 211(4):415-22.
- Johnston LD, O'Malley PM., Bachman JG, Schulenberg JE (2013). *Monitoring the Future national results on drug use: 2012 Overview, Key Findings on Adolescent Drug Use*. Ann Arbor: Institute for Social Research, The University of Michigan.
- Kalivas PW, Sorg BA, Hooks MS (1993) The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. *Behav Pharmacol*, 4(4):315-334.
- Kaplow JB, Curran PJ, Angold A, Costello EJ (2001) The prospective relation between dimensions of anxiety and the initiation of adolescent alcohol use. *J Clin Child Psychol* 30:316–26.
- Karadayian AG, Busso MJ, Feleder C, Cutrera RA (2013) Alterations in affective behavior during the time course of alcohol hangover. *Behav Brain Res*, 253:128-38.
- Kassel JD, Jackson SI, Unrod M (2000) Generalized expectancies for negative mood regulation and problem drinking among college students. *J Stud Alcohol*, 61(2):332-40.
- Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ (1981) Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 5(2):247-51.
- Kawakami SE, Quadros IM, Takahashi S, Suchecki D (2007) Long maternal separation accelerates behavioural sensitization to ethanol in female, but not in male mice. *Behav Brain Res*, 184(2):109-16.
- Kim HS, Park WK, Jang CG, Oh S (1996) Inhibition by MK-801 of cocaine-induced sensitization, conditioned place preference, and dopamine-receptor supersensitivity in mice. *Brain Res Bull*, 40(3):201-7.
- King AC, de Wit H, McNamara PJ, Cao D (2011) Rewarding, stimulant, and sedative alcohol responses and relationship to future binge drinking. *Arch Gen Psychiatry*, 68(4):389-99.
- King AC, Houle T, de Wit H, Holdstock L, Schuster A (2002) Biphasic alcohol response differs in heavy versus light drinkers. *Alcohol Clin Exp Res*, 26(6):827-35.

- King AC, McNamara PJ, Hasin DS, Cao D (2014) Alcohol challenge responses predict future alcohol use disorder symptoms: a 6-year prospective study. *Biol Psychiatry*, 75(10):798-806.
- Klebaur JE, Bardo MT (1999) Individual differences in novelty seeking on the playground maze predict amphetamine conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav*, 63(1):131-6.
- Klebaur JE, Bevins RA, Segar TM, Bardo MT (2001) Individual differences in behavioral responses to novelty and amphetamine self-administration in male and female rats. *Behav Pharmacol*, 12(4):267-75.
- Kliethermes CL (2005) Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. *Neurosci Biobehav Rev*, 28(8):837-50.
- Koob GF, Rassnick S, Heinrichs S, Weiss F (1994) Alcohol, the reward system and dependence. *EXS*, 71:103-14
- Koros E, Kostowski W, Bienkowski P (1999a) Operant responding for ethanol in rats with a long-term history of free-choice ethanol drinking. *Alcohol Alcohol* 34:685-89
- Koros E, Piasecki J, Kostowski W, Bienkowski P (1999b) Development of alcohol deprivation effect in rats: lack of correlation with saccharin drinking and locomotor activity. *Alcohol Alcohol* 34:542-50.
- Kotlinska J, Biala G, Rafalski P, Bochenski M, Danysz W (2004) Effect of neramexane on ethanol dependence and reinforcement. *Eur J Pharmacol*, 503:95–98.
- Kunin D, Gaskin S, Borjas MB, Smith BR, Amit Z (2001) Differences in locomotor response to an inescapable novel environment predict sensitivity to aversive effects of amphetamine. *Behav Pharmacol*, 12(1):61-7.
- Kuntsche E, Knibbe R, Gmel G, Engels R (2005) Why do young people drink? A review of drinking motives. *Clin Psychol Rev*, 25(7):841-61.
- Kushner MG, Sher KJ, Beitman BD (1990) The relation between alcohol problems and the anxiety disorders. *Am J Psychiatry*, 147(6):685-95.

- Kushner MG, Sher KJ, Wood MD, Wood PK (1994) Anxiety and drinking behavior: moderating effects of tension-reduction alcohol outcome expectancies. *Alcohol Clin Exp Res*, 18(4):852-60.
- Lancaster FE, Brown TD, Coker KL, Elliott JA, Wren SB (1996) Sex differences in alcohol preference and drinking patterns emerge during the early postpubertal period. *Alcohol Clin Exp Res*, 20(6):1043-9.
- Lancaster FE, Spiegel KS (1992) Sex differences in pattern of drinking. *Alcohol*, 9(5):415-20.
- Landgraf R, Wigger A (2002) High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. *Behav Genet*, 32(5):301-14.
- Larson R, Richards MH (1991) Daily companionship in late childhood and early adolescence: changing developmental contexts. *Child Dev*, 62(2):284-300.
- Laviola G, Adriani W, Terranova ML, Gerra G (1999) Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models. *Neurosci Biobehav Rev*, 23(7):993-1010.
- Lê AD, Harding S, Juzytsch W, Funk D, Shaham Y (2005) Role of alpha-2 adrenoceptors in stress-induced reinstatement of alcohol seeking and alcohol self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 179(2):366-73.
- Lê AD, Israel Y, Juzytsch W, Quan B, Harding S (2001) Genetic selection for high and low alcohol consumption in a limited-access paradigm. *Alcohol Clin Exp Res*, 25(11):1613-20.
- Lee LO, Young-Wolff KC, Kendler KS, Prescott CA (2012) The effects of age at drinking onset and stressful life events on alcohol use in adulthood: a replication and extension using a population-based twin sample. *Alcohol Clin Exp Res*, 36(4):693-704.
- Leigh BC (1989) In search of the Seven Dwarves: issues of measurement and meaning in alcohol expectancy research. *Psychol Bull*, 105(3):361-73.
- Lejuez CW, Aklin W, Bornovalova M, Moolchan ET (2005) Differences in risk-taking propensity across inner-city adolescent ever- and never-smokers. *Nicotine Tob Res*, 7(1):71-9.

- Lejuez CW, Aklin WM, Zvolensky MJ, Pedulla CM (2003) Evaluation of the Balloon Analogue Risk Task (BART) as a predictor of adolescent real-world risk-taking behaviours. *J Adolesc*, 26: 475–79.
- Lejuez CW, Magidson JF, Mitchell SH, Sinha R, Stevens MC, de Wit H (2010) Behavioral and biological indicators of impulsivity in the development of alcohol use, problems, and disorders. *Alcohol Clin Exp Res*, 34(8):1334-45.
- Lejuez CW, Read JP, Kahler CW, Richards JB, Ramsey SE, Stuart GL, Strong DR, Brown RA (2002) Evaluation of a behavioral measure of risk taking: the Balloon Analogue Risk Task (BART). *J Exp Psychol*, 8: 75–84.
- Lenroot RK, Giedd JN (2006) Brain development in children and adolescents: insights from anatomical magnetic resonance imaging. *Neurosci Biobehav Rev*, 30(6):718-29.
- Levenson RW, Sher KJ, Grossman LM, Newman J, Newlin DB (1980) Alcohol and stress response dampening: pharmacological effects, expectancy, and tension reduction. *J Abnorm Psychol*, 89(4):528-38.
- Lewis DA (1997) Development of the prefrontal cortex during adolescence: insights into vulnerable neural circuits in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 16(6):385-98.
- Lewis DA, Cruz D, Eggen S, Erickson S (2004) Postnatal development of prefrontal inhibitory circuits and the pathophysiology of cognitive dysfunction in schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci*, 1021:64-76.
- Li TK, Lumeng L (1984) Alcohol preference and voluntary alcohol intakes of inbred rat strains and the National Institutes of Health heterogeneous stock of rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 8(5):485-6.
- Linseman MA (1987) Alcohol consumption in free-feeding rats: procedural, genetic and pharmacokinetic factors. *Psychopharmacology (Berl)*, 92(2):254-61.
- Lister RG (1990) Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther*, 46(3):321-40.

- Little PJ, Kuhn CM, Wilson WA, Swartzwelder HS (1996) Differential effects of ethanol in adolescent and adult rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 20:1346– 51.
- Logue S, Chein J, Gould T, Holliday E, Steinberg L (2014) Adolescent mice, unlike adults, consume more alcohol in the presence of peers than alone. *Developmental Science*, 17 (1):79–85.
- Loi B, Colombo G, Maccioni P, Carai MA, Franconi F, Gessa GL (2014) High alcohol intake in female Sardinian alcohol-preferring rats. *Alcohol*, 48(4):345-51.
- Luna B, Padmanabhan A, O'Hearn K (2010) What has fMRI told us about the development of cognitive control through adolescence? *Brain Cogn*, 72(1):101-13.
- Luna B, Sweeney JA (2004) The emergence of collaborative brain function: FMRI studies of the development of response inhibition. *Ann N Y Acad Sci*, 1021:296-309.
- Luna B, Thulborn KR, Munoz DP, Merriam EP, Garver KE, Minshew NJ, Keshavan MS, Genovese CR, Eddy WF, Sweeney JA (2001) Maturation of widely distributed brain function subserves cognitive development. *Neuroimage*, 13(5):786-93.
- Lynch WJ, Kushner MG, Rawleigh JM, Fiszdon J, Carroll ME (1999) The effects of restraint stress on voluntary ethanol consumption in rats. *Exp Clin Psychopharmacol*, 7(4):318-23.
- Mackie CJ, Castellanos-Ryan N, Conrod PJ (2011) Personality moderates the longitudinal relationship between psychological symptoms and alcohol use in adolescents. *Alcohol Clin Exp Res*, 35(4):703-16.
- Macri S, Adriani W, Chiarotti F, Laviola G (2002) Risk taking during exploration of a plus-maze is greater in adolescent than in juvenile or adult mice. *Anim Behav*, 64:541–6.
- Maimaris W1, McCambridge J (2014) Age of first drinking and adult alcohol problems: systematic review of prospective cohort studies. *J Epidemiol Community Health*, 68(3):268-74.
- Malberg JE, Duman RS (2003) Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology*, 28:1562–71.

- Maldonado AM, Finkbeiner LM, Alipour KK, Kirstein CL (2008) Voluntary ethanol consumption differs in adolescent and adult male rats using a modified sucrose-fading paradigm. *Alcohol Clin Exp Res*, 32(9):1574-82.
- Maldonado AM, Finkbeiner LM, Kirstein CL (2008) Social interaction and partner familiarity differentially alter voluntary ethanol intake in adolescent male and female rats. *Alcohol*, 42(8):641-8.
- Marglin SH, MacKechnie DK, Mattie ME, Hui YH, Reid LD (1998) Ethanol with small doses of morphine establishes a conditioned place preference. *Alcohol*, 5(4):309-13.
- Markham JA, Morris JR, Juraska JM (2007) Neuron number decreases in the rat ventral, but not dorsal, medial prefrontal cortex between adolescence and adulthood. *Neuroscience*, 144(3):961-8.
- Markwiese BJ, Acheson SK, Levin ED, Wilson WA, Swartzwelder HS (1998) Differential effects of ethanol on memory in adolescent and adult rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 22(2):416-21.
- Martijena ID, Lacerra C, Bustos SG, Molina VA (2001) Chronic benzodiazepine administration facilitates the subsequent development of ethanol dependence. *Brain Res*, 891:236–46.
- Masur J, Boerngen R (1980) The excitatory component of ethanol in mice: a chronic study. *Pharmacol Biochem Behav*, 13(6):777-80.
- Masur J, Oliveira de Souza ML, Zwicker AP (1986) The excitatory effect of ethanol: absence in rats, no tolerance and increased sensitivity in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 24(5):1225-8.
- Matsuzawa S, Suzuki T, Misawa M (1998) Conditioned fear stress induces ethanol-associated place preference in rats. *Eur. J. Pharmacol*, 341:127–30.
- McBride WJ, Rodd ZA, Bell RL, Lumeng L, Li TK (2014) The alcohol-preferring (P) and high-alcohol-drinking (HAD) rats animal models of alcoholism. *Alcohol*, 48(3):209-15.
- McCormick CM (2010) An animal model of social instability stress in adolescence and risk for drugs of abuse. *Physiol Behav*, 99(2):194-203.

- McCormick CM, Mathews IZ (2007) HPA function in adolescence: role of sex hormones in its regulation and the enduring consequences of exposure to stressors. *Pharmacol Biochem Behav*, 86:220–33.
- McCrae RR, Costa PT Jr, Ostendorf F, Angleitner A, Hrebícková M, Avia MD, Sanz J, Sánchez-Bernardos ML, Kusdil ME, Woodfield R, Saunders PR, Smith PB (2000) Nature over nurture: temperament, personality, and life span development. *J Pers Soc Psychol*, 78(1):173-86.
- McEwen BS (2000) Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol Psychiatry*, 48(8):721-31.
- McGivern RF, Barron S (1991) Influence of prenatal alcohol exposure on the process of neurobehavioral sexual differentiation. *Alcohol Health Res World*, 15:115-25.
- McGue M (1999) Phenotyping alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res*, 23(5):757-8.
- McKinzie DL, Eha R, Murphy JM, McBride WJ, Lumeng L, Li TK (1996) Effects of taste aversion training on the acquisition of alcohol drinking in adolescent P and HAD rat lines. *Alcohol Clin Exp Res*, 20(4):682-7.
- McMillen BA, Means LW, Matthews JN (1998) Comparison of the alcohol-preferring P rat to the Wistar rat in behavioral tests of impulsivity and anxiety. *Physiol Behav*, 63(3):371-5.
- Meisch RA, Thompson T (1972) Ethanol intake during schedule-induced polydipsia. *Physiol Behav*, 8(3):471-5.
- Meyer PJ, Meshul CK, Phillips TJ (2009) Ethanol- and cocaine-induced locomotion are genetically related to increases in accumbal dopamine. *Genes Brain Behav*, 8(3):346-55.
- Miczek KA, Yap JJ, Covington HE, 3rd (2008) Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacol Ther*, 120(2):102-28.
- Miranda-Morales RS, Molina JC, Spear NE, Abate P (2010) Participation of the endogenous opioid system in the acquisition of a prenatal ethanol-related memory: effects on neonatal and preweanling responsiveness to ethanol. *Physiol Behav*, 101(1):153-60.

- Miranda-Morales RS, Spear NE, Nizhnikov ME, Molina JC, Abate P (2012) Role of mu, delta and kappa opioid receptors in ethanol-reinforced operant responding in infant rats. *Behav Brain Res*, 234(2):267-77.
- Molina JC, Chotro MG (1989) Acute alcohol intoxication paired with aversive reinforcement: ethanol odor as a conditioned reinforcer in rat pups. *Behav Neural Biol*, 52(1):1-19.
- Molina JC, Pautassi RM, Truxell E, Spear N (2007) Differential motivational properties of ethanol during early ontogeny as a function of dose and postadministration time. *Alcohol*, 41(1):41-55.
- Molina JC, Ponce LF, Truxell E, Spear NE (2006) Infantile sensitivity to ethanol's motivational effects: Ethanol reinforcement during the third postnatal week. *Alcohol Clin Exp Res*, 30(9):1506-19.
- Moller C, Wiklund L, Sommer W, Thorsell A, Heilig M (1997) Decreased experimental anxiety and voluntary ethanol consumption in rats following central but not basolateral amygdala lesions. *Brain Res*, 760(1-2):94-101.
- Morales M, Schatz KC, Anderson RI, Spear LP, Varlinskaya EI (2014) Conditioned taste aversion to ethanol in a social context: impact of age and sex. *Behav Brain Res*, 15: 261:323-7.
- Morales M, Varlinskaya EI, Spear LP (2012) Evidence for conditioned place preference to a moderate dose of ethanol in adult male Sprague-Dawley rats. *Alcohol*, 46(7):643-8.
- Morin LP, Forger NG (1982) Endocrine control of ethanol intake by rats or hamsters: Relative contribution of the ovaries, adrenals and steroids. *Pharmacol Biochem Behav*, 17:529-37.
- Morzorati SL, Marunde RL, Downey D (2010) Limited access to ethanol increases the number of spontaneously active dopamine neurons in the posterior ventral tegmental area of nondependent P rats. *Alcohol*, 44(3):257-64.
- Muigg P, Hetzenauer A, Hauer G, Hauschild M, Gaburro S, Frank E, Landgraf R, Singewald N (2008) Impaired extinction of learned fear in rats selectively bred for high anxiety--evidence of altered neuronal processing in prefrontal-amygdala pathways. *Eur J Neurosci*, 28(11):2299-309.

- Nadal R, Armario A, Janak PH (2002) Positive relationship between activity in a novel environment and operant ethanol selfadministration in rats. *Psychopharmacology*, 162:333–8.
- Nadal R, Rotllant D, Márquez C, Armario A (2005) Perseverance of exploration in novel environments predicts morphine place conditioning in rats. *Behav Brain Res*, 165(1):72-9.
- Nagoshi CT, Wilson JR, Rodriguez LA (1991) Impulsivity, sensation seeking, and behavioral and emotional responses to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*, 15(4):661-7.
- Nees F, Tzschope J, Patrick CJ, Vollstädt-Klein S, Steiner S, Poustka L, Banaschewski T, Barker GJ, Büchel C, Conrod PJ, Garavan H, Heinz A, Gallinat J, Lathrop M, Mann K, Artiges E, Paus T, Poline JB, Robbins TW, Rietschel M, Smolka MN, Spanagel R, Struve M, Loth E, Schumann G, Flor H; IMAGEN Consortium (2012) Determinants of early alcohol use in healthy adolescents: the differential contribution of neuroimaging and psychological factors. *Neuropsychopharmacology*, 37(4):986-95.
- Nestler EJ (2000) Genes and addiction. *Nat Genet*, 26(3):277-81.
- Newlin DB, Thomson JB (1990) Alcohol challenge with sons of alcoholics: a critical review and analysis. *Psychol Bull*, 108(3):383-402.
- Nielsen DM, Crosley KJ, Keller RW Jr, Glick SD, Carlson JN (1999) Rotation, locomotor activity and individual differences in voluntary ethanol consumption. *Brain Res* 823:80–87.
- Nixon K, Crews FT (2002) Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurochem*, 83:1087–93.
- Nizhnikov ME, Pautassi RM, Truxell E, Spear NE (2009) Opioid antagonists block the acquisition of ethanol-mediated conditioned tactile preference in infant rats. *Alcohol*, 43(5):347-58.
- Nocjar C, Middaugh LD, Tavernetti M (1999) Ethanol consumption and place-preference conditioning in the alcohol-preferring C57BL/6 mouse: relationship with motor activity patterns. *Alcohol Clin Exp Res*, 23(4):683-92.
- Nowak KL, Ingraham CM, Mckinzie DL, McBride WJ, Lumeng L, Li TK, Murphy JM (2000) An assessment of novelty-seeking behavior in alcohol-preferring and non-preferring rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 66(1):113-21.

- Oberlin BG, Grahame NJ (2009) High-alcohol preferring mice are more impulsive than low-alcohol preferring mice as measured in the delay discounting task. *Alcohol Clin Exp Res*, 33(7):1294-303.
- Oei TP, Morawska A (2004) A cognitive model of binge drinking: the influence of alcohol expectancies and drinking refusal self-efficacy. *Addict Behav*, 29(1):159-79.
- Otoni EB (2000) EthoLog 2.2 a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, Instruments, y Computers*, 32(3), 446-49.
- Overstreet DH, Knapp DJ, Breese GR (2004) Similar anxiety-like responses in male and female rats exposed to repeated withdrawals from ethanol. *Pharmacol Biochem Behav*, 78(3):459-64.
- Parker LA (1995) Rewarding drugs produce taste avoidance, but not taste aversion. *Neurosci Biobehav Rev*, 19(1):143-57.
- Pascual M, Boix J, Felipo V, Guerri C (2009) Repeated alcohol administration during adolescence causes changes in the mesolimbic dopaminergic and glutamatergic systems and promotes alcohol intake in the adult rat. *J Neurochem*, 108(4):920-31.
- Pastor R, Aragon CM (2008) Ethanol injected into the hypothalamic arcuate nucleus induces behavioral stimulation in rats: an effect prevented by catalase inhibition and naltrexone. *Behav Pharmacol*, 19(7):698-705.
- Pastor R, Aragon CM. (2006) The role of opioid receptor subtypes in the development of behavioral sensitization to ethanol. *Neuropsychopharmacology*, 31(7):1489-99.
- Pastor R, Sanchis-Segura C, Aragon CM (2002) Ethanol-stimulated behaviour in mice is modulated by brain catalase activity and H₂O₂ rate of production. *Psychopharmacology (Berl)*, 165(1):51-9.
- Pattij T, Vanderschuren LJ (2008) The neuropharmacology of impulsive behaviour. *Trends Pharmacol Sci*, 29(4):192-9.
- Paus T, Keshavan M, Giedd JN (2008) Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nat Rev Neurosci*, 9(12):947-57.

- Pautassi RM, Arias C, Molina JC, Spear N (2008a) Domperidone interferes with conditioned disgust reactions but not taste avoidance evoked by a LiCl-paired taste in infant rats. *Dev Psychobiol*, 50(4):343-52.
- Pautassi RM, Camarini R, Quadros IM, Miczek KA, Israel Y (2010) Genetic and environmental influences on ethanol consumption: perspectives from preclinical research. *Alcohol Clin Exp Res*, 34(6):976-87.
- Pautassi RM, Godoy JC, Spear NE, Molina JC (2002) Early responsiveness to stimuli paired with different stages within the state of alcohol intoxication. *Alcohol Clin Exp Res*, 26(5):644-54.
- Pautassi RM, Myers M, Spear LP, Molina JC, Spear NE (2008b) Adolescent but not adult rats exhibit ethanol-mediated appetitive second-order conditioning. *Alcohol Clin Exp Res*, 32(11):2016-27.
- Pautassi RM, Nizhnikov ME, Acevedo MB, Spear NE (2012a) Early role of the κ opioid receptor in ethanol-induced reinforcement. *Physiol Behav*, 105(5):1231-41.
- Pautassi RM, Nizhnikov ME, Fabio MC, Spear NE (2011) An acetaldehyde-sequestering agent inhibits appetitive reinforcement and behavioral stimulation induced by ethanol in preweanling rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 97(3):462-9.
- Pautassi RM, Nizhnikov ME, Spear NE (2009) Assessing appetitive, aversive, and negative ethanol-mediated reinforcement through an immature rat model. *Neurosci Biobehav Rev*, 33(6):953-74.
- Pautassi RM, Nizhnikov ME, Spear NE, Molina JC (2012b) Prenatal ethanol exposure leads to greater ethanol-induced appetitive reinforcement. *Alcohol*, 46(6):585-93.
- Pautassi RM, Sanders S, Miller S, Spear N, Molina JC (2006) Early ethanol's anxiolytic effects assessed through an unconditional stimulus revaluation procedure. *Alcohol Clin Exp Res*, 30(3):448-59.
- Pawlak CR, Karrenbauer BD, Schneider P, Ho YJ (2012) The Elevated Plus-Maze Test: Differential Psychopharmacology of Anxiety-Related Behavior. *Emotion Review*, 4(1):98-115.

- Peana AT, Enrico P, Assaretti AR, Pulighe E, Muggironi G, Nieddu M, Piga A, Lintas A, Diana M (2008) Key role of ethanol-derived acetaldehyde in the motivational properties induced by intragastric ethanol: a conditioned place preference study in the rat. *Alcohol Clin Exp Res*, 32(2):249-58.
- Pedersen W, Skrondal A (1998) Alcohol consumption debut: predictors and consequences. *J Stud Alcohol*, 59:32-42.
- Pepino MY, Abate P, Spear NE, Molina JC (2004) Heightened ethanol intake in infant and adolescent rats after nursing experiences with an ethanol-intoxicated dam. *Alcohol Clin Exp Res*, 28(6):895-905.
- Peters EN, Khondkaryan E, Sullivan TP (2012) Associations between expectancies of alcohol and drug use, severity of partner violence, and posttraumatic stress among women. *J Interpers Violence*, 27(11):2108-27.
- Petry NM (2001) Delay discounting of money and alcohol in actively using alcoholics, currently abstinent alcoholics, and controls. *Psychopharmacology (Berl)*, 154(3):243-50.
- Phillips TJ, Roberts AJ, Lessov CN (1997) Behavioral sensitization to ethanol: genetics and the effects of stress. *Pharmacol Biochem Behav*, 57(3):487-93.
- Philpot RM, Badanich KA, Kirstein CL (2003) Place conditioning: age-related changes in the rewarding and aversive effects of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*, 27(4):593-9.
- Piano MR, Carrigan TM, Schwertz DW (2005) Sex differences in ethanol liquid diet consumption in Sprague-Dawley rats. *Alcohol*, 35(2):113-8.
- Piazza PV, Deminière JM, Le Moal M, Simon H (1989) Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science*, 245(4925):1511-3.
- Piazza PV, Deminière JM, Maccari S, Mormède P, Le Moal M, Simon H (1999) Individual reactivity to novelty predicts probability of amphetamine self-administration. *Behav Pharmacol*, 1(4):339-45.

- Piazza PV, Deroche-Gamonent V, Rouge-Pont F, Le Moal M (2000) Vertical shifts in self-administration dose-response functions predict a drug-vulnerable phenotype predisposed to addiction. *J Neurosci*, 20(11):4226-32.
- Piazza PV, Maccari S, Deminière JM, Le Moal M, Mormède P, Simon H (1999) Corticosterone levels determine individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(6):2088-92.
- Pilatti A, Caneto F, Garimaldi JA, Vera B del V, Pautassi RM (2014) Contribution of time of drinking onset and family history of alcohol problems in alcohol and drug use behaviors in Argentinean college students. *Alcohol*, 49(2):128-37.
- Pilatti A, Godoy JC, Brussino SA, Pautassi RM (2013) Patterns of substance use among Argentinean adolescents and analysis of the effect of age at first alcohol use on substance use behaviors. *Addict Behav*, 38(12):2847-50.
- Pitkänen T, Lyyra AL, Pulkkinen L (2005) Age of onset of drinking and the use of alcohol in adulthood: a follow-up study from age 8-42 for females and males. *Addiction*, 100(5):652-61.
- Pohorecky LA (1981) The interaction of alcohol and stress. A review. *Neurosci Biobehav Rev*, 5(2):209-29.
- Ponce LF, Pautassi RM, Spear NE, Molina JC (2004) Nursing from an ethanol-intoxicated dam induces short- and long-term disruptions in motor performance and enhances later self-administration of the drug. *Alcohol Clin Exp Res*, 28(7):1039-50.
- Ponce LF, Pautassi RM, Spear NE, Molina JC (2008) Ethanol-mediated operant learning in the infant rat leads to increased ethanol intake during adolescence. *Pharmacol Biochem Behav*, 90(4):640-50.
- Poulos CX, Le AD, Parker JL (1995) Impulsivity predicts individual susceptibility to high levels of alcohol self-administration. *Behav Pharmacol*, 6(8):810-14.
- Prescott CA, Kendler KS (1999) Age at first drink and risk for alcoholism: a noncausal association. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34, 101–107.

- Prut L, Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*, 463:3–33.
- Quinn PD, Stappenbeck CA, Fromme K (2011) Collegiate heavy drinking prospectively predicts change in sensation seeking and impulsivity. *J Abnorm Psychol*, 120(3):543-56.
- Quintanilla ME, Israel Y, Sapag A, Tampier L (2006) The UChA and UChB rat lines: metabolic and genetic differences influencing ethanol intake. *Addict Biol*, 11(3-4):310-23.
- Quoilin C, Didone V, Tirelli E, Quertemont E (2010) Ontogeny of the stimulant and sedative effects of ethanol in male and female Swiss mice: gradual changes from weaning to adulthood. *Psychopharmacology (Berl)*, 212(4):501-12.
- Quoilin C, Didone V, Tirelli E, Quertemont E (2012) Chronic ethanol exposure during adolescence alters the behavioral responsiveness to ethanol in adult mice. *Behav Brain Res*, 229(1):1-9.
- Quoilin C, Didone V, Tirelli E, Quertemont E (2014) Higher long-lasting ethanol sensitization after adolescent ethanol exposure in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 231(8):1821-9.
- Ramos A (2008) Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends Pharmacol Sci*, 29(10):493-8.
- Ramos A, Berton O, Mormede P, Chaouloff F (1997) A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav Brain Res*, 85(1):57-69.
- Ramos A, Mormede P (1998) Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci Biobehav Rev*, 22(1):33-57.
- Randich A, LoLordo VM (1979) Associative and nonassociative theories of the UCS preexposure phenomenon: implications for Pavlovian conditioning. *Psychol Bull*, 86(3):523-48.
- Read JP, Wood MD, Kahler CW, Maddock JE, Palfai TP (2003) Examining the role of drinking motives in college student alcohol use and problems. *Psychol Addict Behav*, 17(1):13-23.
- Redolat R, Pérez-Martínez A, Carrasco MC, Mesa P (2009) Individual differences in novelty-seeking and behavioral responses to nicotine: a review of animal studies. *Curr Drug Abuse Rev*, 2(3):230-42.

- Rezvani AH, Levin ED (2004) Adolescent and adult rats respond differently to nicotine and alcohol: motor activity and body temperature. *Int J Dev Neurosci*, 22(5-6):349-54.
- Riley A, Simpson G. (2001) The attenuating effects of drug preexposure on taste aversion conditioning: Generality, experimental parameters, underlying mechanisms, and implications for drug use and abuse. En RR Mowrer, y SB Klein, *Handbook of contemporary learning theories*. Mahwah, NJ: Lawrence Erlbaum. Associates, Inc.
- Risinger FO, Cunningham CL (1992) Ethanol produces rapid biphasic hedonic effects. *Ann N Y Acad Sci*, 654:506-8.
- Risinger FO, Malott DH, Prather LK, Niehus DR, Cunningham CL (1994) Motivational properties of ethanol in mice selectively bred for ethanol-induced locomotor differences. *Psychopharmacology (Berl)*, 116(2):207-16.
- Risinger FO, Malott DH, Prather LK, Niehus DR, Cunningham CL (1996) Motivational properties of ethanol in mice selectively bred for ethanol-induced locomotor differences. *Psychopharmacology (Berl)*, 116(2):207-16.
- Ristuccia RC, Spear LP (2008) Autonomic responses to ethanol in adolescent and adult rats: a dose-response analysis. *Alcohol*, 42(8):623-9.
- Roberts AJ, Lessov CN, Phillips TJ (1995) Critical role for glucocorticoid receptors in stress- and ethanol-induced locomotor sensitization. *J Pharmacol Exp Ther*, 275(2):790-7.
- Roberts AJ, Smith AD, Weiss F, Rivier C, Koob GF (1998) Estrous cycle effects on operant responding for ethanol in female rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 22:1564-69. Acevedo MB, Nizhnikov ME, Spear NE, Molina JC, Pautassi RM (2013) Ethanol-induced locomotor activity in adolescent rats and the relationship with ethanol-induced conditioned place preference and conditioned taste aversion. *Dev Psychobiol*, 55(4):429-42.
- Roberts BW, Walton KE, Viechtbauer W (2006) Patterns of mean-level change in personality traits across the life course: a meta-analysis of longitudinal studies. *Psychol Bull*, 132:1-25.
- Robinson TE, Berridge K (2001) Incentive-sensitization and addiction. *Addiction*, 96(1):103-14.

- Robinson TE, Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev*, 18(3):247-91.
- Robinson TE, Berridge KC (2000) The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction*, 95 Suppl 2:S91-117.
- Robinson TE, Berridge KC (2008) Review. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 363(1507):3137-46.
- Rockman GE, Hall A, Glavin GB (1986) Effects of restraint stress on voluntary ethanol intake and ulcer proliferation in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 25(5):1083-7.
- Rodd ZA, Bell RL, McKinzie DL, Webster AA, Murphy JM, Lumeng L, Li TK, McBride WJ (2004) Low-dose stimulatory effects of ethanol during adolescence in rat lines selectively bred for high alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res*, 28(4):535-43.
- Rodd-Henricks ZA, Bell RL, Kuc KA, Murphy JM, McBride WJ, Lumeng L, Li TK (2002) Effects of ethanol exposure on subsequent acquisition and extinction of ethanol self-administration and expression of alcohol-seeking behavior in adult alcohol-preferring (P) rats: II. Adult exposure. *Alcohol Clin Exp Res*, 26(11):1642-52.
- Rodd-Henricks ZA, Bell RL, Kuc KA, Murphy JM, McBride WJ, Lumeng L, Li TK (2001) Effects of concurrent access to multiple ethanol concentrations and repeated deprivations on alcohol intake of alcohol-preferring rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 25(8):1140-50.
- Rodgers RJ, Johnson NJ (1995) Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 52(2):297-303.
- Roma PG, Rinker JA, Serafine KM, Chen SA, Barr CS, Cheng K, Rice KC, Riley AL (2008) Genetic and early environmental contributions to alcohol's aversive and physiological effects. *Pharmacol Biochem Behav*, 91(1):134-9.
- Romeo RD (2010) Adolescence: a central event in shaping stress reactivity. *Dev Psychobiol*, 52(3):244-53.

- Rosellini RA, DeCola JP, Plonsky M, Warren DA, Stilman AJ (1984) Uncontrollable shock proactively increases sensitivity to response-reinforcer independence in rats. *J Exp Psychol Anim Behav Process*, 10(3):346-59.
- Roske I, Baeger I, Frenzel R, Oehme P (1994) Does a relationship exist between the quality of stress and the motivation to ingest alcohol? *Alcohol*, 11(2):113-24.
- Rosow I, Kuntsche E (2013) Early onset of drinking and risk of heavy drinking in young adulthood--a 13-year prospective study. *Alcohol Clin Exp Res*, 37 Suppl 1:E297-304.
- Sable HJ, White SL, Steinpreis RE (2004) Effects of chronic naltrexone treatment in rats on place preference and locomotor activation after acute administration of cocaethylene or ethanol plus cocaine. *Alcohol*, 33:51-61.
- Samson HH (1986) Initiation of ethanol reinforcement using a sucrose-substitution procedure in food- and water-sated rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 10(4):436-42.
- Samson HH, Chappelle AM (1995) Home-cage ethanol consumption and motor activity: lack of relation to either initial activity or amphetamine-induced locomotion. *Alcohol* 12:37-42.
- Samson HH, Pfeffer AO, Tolliver GA (1988) Oral ethanol self-administration in rats: models of alcohol-seeking behavior. *Alcohol Clin Exp Res*, 12(5):591-8.
- Samson HH, Schwarz-Stevens K, Tolliver GA, Andrews CM, Files FJ (1992) Ethanol drinking patterns in a continuous-access operant situation: effects of ethanol concentration and response requirements. *Alcohol*, 9(5):409-14.
- Sánchez-Catalán MJ, Hipólito L, Zornoza T, Polache A, Granero L (2009) Motor stimulant effects of ethanol and acetaldehyde injected into the posterior ventral tegmental area of rats: role of opioid receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, 204(4):641-53.
- Sanchis-Segura C, Correa M, Miquel M, Aragon CM (2005a) Catalase inhibition in the Arcuate nucleus blocks ethanol effects on the locomotor activity of rats. *Neurosci Lett*, 376(1):66-70.
- Sanchis-Segura C, Grisel JE, Olive MF, Ghazizadeh S, Koob GF, Roberts AJ, Cowen MS (2005b) Role of the endogenous opioid system on the neuropsychopharmacological effects of ethanol: new insights about an old question. *Alcohol Clin Exp Res*, 29(8):1522-7.

- Sarviharju M, Jaatinen P, Hyytia P, Hervonen A, Kiianmaa K (2001) Effects of lifelong ethanol consumption on drinking behavior and motor impairment of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Alcohol*, 23(3):157-66.
- Schramm-Sapyta NL, DiFeliceantonio AG, Foscue E, Glowacz S, Haseeb N, Wang N, Zhou C, Kuhn CM (2010) Aversive effects of ethanol in adolescent versus adult rats: potential causes and implication for future drinking. *Alcohol Clin Exp Res*, 34(12):2061-9.
- Schramm-Sapyta NL, Francis R, MacDonald A, Keistler C, O'Neill L, Kuhn CM (2014) Effect of sex on ethanol consumption and conditioned taste aversion in adolescent and adult rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 231(8):1831-9.
- Schramm-Sapyta NL, Kingsley MA, Rezvani AH, Propst K, Swartzwelder HS, Kuhn CM (2008) Early ethanol consumption predicts relapse-like behavior in adolescent male rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 32(5):754-62.
- Schramm-Sapyta NL, Morris RW, Kuhn CM (2006) Adolescent rats are protected from the conditioned aversive properties of cocaine and lithium chloride. *Pharmacol Biochem Behav*, 84(2):344-52.
- Schuckit MA, Hesselbrock V (1994) Alcohol dependence and anxiety disorders: what is the relationship? *Am J Psychiatry*, 151(12):1723-34.
- Schulteis G, Hyytia P, Heinrichs SC, Koob GF (1996) Effects of chronic ethanol exposure on oral self-administration of ethanol or saccharin by Wistar rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 20(1):164-71.
- Schwartzing RK, Thiel CM, Muller CP, Huston JP (1998) Relationship between anxiety and serotonin in the ventral striatum. *Neuroreport*, 9(6):1025-9.
- Secretaría de Programación para la Prevención de la Drogadicción y la Lucha contra el Narcotráfico [SEDRONAR] (2011). Quinta Encuesta Nacional a Estudiantes de Enseñanza Media 2011 Informe Final de Resultados. Provincia de Mendoza.
- Shaw D, Annett JM, Doherty B, Leslie JC (2007) Anxiolytic effects of lavender oil inhalation on open-field behaviour in rats. *Phytomedicine*, 14: 613–20.

- Sher KJ, Bartholow BD, Wood MD (2000) Personality and substance use disorders: a prospective study. *J Consult Clin Psychol*, 68(5):818-29.
- Shin SH, Hong HG, Jeon SM (2012) Personality and alcohol use: the role of impulsivity. *Addict Behav*, 37(1):102-7.
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, 410:372–6.
- Shram MJ, Funk D, Li Z, Lê AD (2006) Periadolescent and adult rats respond differently in tests measuring the rewarding and aversive effects of nicotine. *Psychopharmacology (Berl)*, 186(2):201-8.
- Siegmund S, Vengeliene V, Singer MV, Spanagel R (2005) Influence of age at drinking onset on long-term ethanol self-administration with deprivation and stress phases. *Alcohol Clin Exp Res*, 29(7):1139-45.
- Silveri MM, Spear LP (1998) Decreased sensitivity to the hypnotic effects of ethanol early in ontogeny. *Alcohol Clin Exp Res*, 22(3):670-6.
- Silveri MM, Spear LP (2000) Ontogeny of ethanol elimination and ethanol-induced hypothermia. *Alcohol*, 20(1):45-53.
- Silveri MM, Spear LP (2004) The effects of NMDA and GABAA pharmacological manipulations on acute and rapid tolerance to ethanol during ontogeny. *Alcohol Clin Exp Res*, 28(6):884-94.
- Simms JA, Steensland P, Medina B, Abernathy KE, Chandler LJ, Wise R, Bartlett SE (2008) Intermittent access to 20% ethanol induces high ethanol consumption in Long-Evans and Wistar rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 32(10):1816-23.
- Sinclair JD, Hyytia, P. Nurmi, M (1992) The limited access paradigm: description of one method. *Alcohol* 9:441–444.
- Sinclair JD, Senter RJ (1968) Development of an alcohol-deprivation effect in rats. *Q J Stud Alcohol*, 29(4):863-7.

- Söderpalm AH, de Wit H (2002) Effects of stress and alcohol on subjective state in humans. *Alcohol Clin Exp Res*, 26(6):818-26.
- Sommer W, Hyytiä P, Kiianmaa K (2006). The alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats: neurobiology of the regulation of alcohol drinking. *Addict Biol*, 11(3-4):289-309.
- Song M, Wang XY, Zhao M, Wang XY, Zhai HF, Lu L (2001) Role of stress in acquisition of alcohol-conditioned place preference in adolescent and adult mice. *Alcohol Clin Exp Res*, 31(12):2001-5.
- Sowell ER, Mattson SN, Thompson PM, Jernigan TL, Riley EP, Toga AW (2001) Mapping callosal morphology and cognitive correlates: effects of heavy prenatal alcohol exposure. *Neurology*, 57(2):235-44.
- Sowell ER, Thompson PM, Leonard CM, Welcome SE, Kan E, Toga AW (2004a) Longitudinal mapping of cortical thickness and brain growth in normal children. *J Neurosci*, 24(38):8223-31.
- Sowell ER, Thompson PM, Toga AW (2004b) Mapping changes in the human cortex throughout the span of life. *Neuroscientist*, 10(4):372-92.
- Spanagel R, Höltner SM (1999) Long-term alcohol self-administration with repeated alcohol deprivation phases: an animal model of alcoholism? *Alcohol Alcohol*, 34(2):231-43.
- Spanagel R, Höltner SM. (2000) Pharmacological validation of a new animal model of alcoholism. *J Neural Transm*, 107(6):669-80.
- Spanagel R, Montkowski A, Allingham K, Stohr T, Shoaib M, Holsboer F, Landgraf R (1995) Anxiety: a potential predictor of vulnerability to the initiation of ethanol self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 122(4):369-73.
- Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev*, 24(4):417-463.
- Spear LP, Varlinskaya EI (2005) Adolescence Alcohol sensitivity, tolerance, and intake. *Recent Dev Alcohol*, 17:143-59.

- Spear NE, Molina JC. (2005) Fetal or infantile exposure to ethanol promotes ethanol ingestion in adolescence and adulthood: a theoretical review. *Alcohol Clin Exp Res*, 29(6):909-29.
- Spiers DE, Fusco LE (1992) Delayed thermoregulatory changes in the immature rat following a single injection of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*, 16(1):41-7.
- Sprague JE, Maickel RP (1994) Effects of stress and ebitatide (Hoe-427) on free-choice ethanol consumption: comparison of Lewis and Sprague-Dawley rats. *Life Sci*, 55(11):873-8.
- Stacy AW, Widaman KF, Marlatt GA (1990) Expectancy models of alcohol use. *J Pers Soc Psychol*, 58(5):918-28.
- Stacy MS, Brown SA, Christiansen BA, Smith GT (1991) Alcoholism and memory: broadening the scope of alcohol-expectancy research. *Psychol Bull*, 110(1):137-46.
- Stanford SC (2007) The Open Field Test: reinventing the wheel. *J Psychopharmacol*, 21(2):134-5.
- Steimer T (2002) The biology of fear- and anxiety-related behaviors. *Dialogues Clin Neurosci*, 4(3):231-49.
- Steinberg L (2009) Should the science of adolescent brain development inform public policy? *Am Psychol*, 64(8):739-50.
- Steinmetz JE, Blankenship MR, Green JT, Smith GB, Finn PR (2000) Evaluation of behavioral disinhibition in P/NP and HAD1/LAD1 rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 24(6):1025-39.
- Stevenson RA, Besheer J, Hodge CW (2008) Comparison of ethanol locomotor sensitization in adolescent and adult DBA/2J mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 197(3):361-70.
- Stewart RB, Gatto GJ, Lumeng L, Li TK, Murphy JM (1993) Comparison of alcohol-preferring (P) and nonpreferring (NP) rats on tests of anxiety and for the anxiolytic effects of ethanol. *Alcohol*, 10(1):1-10.
- Stewart RB, Grupp LA (1986) Conditioned place aversion mediated by orally self-administered ethanol in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 24(5):1369-75.

- Stewart RB, Grupp LA (1989) Conditioned place aversion mediated by self-administered ethanol in the rat: a consideration of blood ethanol levels. *Pharmacol Biochem Behav*, 32(2):431-7.
- Stewart RB, McBride WJ, Lumeng L, Li T-K, Murphy JM (1991) Chronic alcohol consumption in alcohol-preferring P rats attenuates subsequent conditioned taste aversion produced by ethanol injections. *Psychopharmacology*, 105:530–34.
- Stewart RB, Murphy JM, McBride WJ, Lumeng L, Li T-K (1996) Place conditioning with alcohol in alcohol-preferring and -nonpreferring rats. *Pharmacol Biochem Behav* 53:487–91.
- Stojek M, Fischer S (2013) Impulsivity and motivations to consume alcohol: a prospective study on risk of dependence in young adult women. *Alcohol Clin Exp Res*, 37(2):292-9.
- Stone EA, Quartermain D (1997) Greater behavioral effects of stress in immature as compared to mature male mice. *Physiol Behav*, 63(1):143-5.
- Teicher MH, Andersen SL, Hostetter JC Jr. (1995) Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. *Brain Res Dev Brain Res*, 21;89(2):167-72.
- Thiel CM, Muller CP, Huston JP, Schwarting RK (1999) High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience*, 93(1):243-51.
- Thrivikraman KV, Huot RL, Plotsky PM (2002) Jugular vein catheterization for repeated blood sampling in the unrestrained conscious rat. *Brain Research Protocols*, 1084-94.
- Tipps ME, Moschak TM, Mitchell SH (2014) Behavioral disinhibition in mice bred for high drinking in the dark (HDID) and HS controls increases following ethanol. *Drug Alcohol Depend*, 1;136:149-52.
- Truxell EM, Molina JC, Spear NE (2007) Ethanol intake in the juvenile, adolescent, and adult rat: effects of age and prior exposure to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*, 31(5):755-65.
- Tseng KY, O'Donnell P (2007) D2 dopamine receptors recruit a GABA component for their attenuation of excitatory synaptic transmission in the adult rat prefrontal cortex. *Synapse*, 61(10):843-50.

- Tzschentke TM, Schmidt WJ (1998) Discrete quinolinic acid lesions of the rat prelimbic medial prefrontal cortex affect cocaine- and MK-801-, but not morphine- and amphetamine-induced reward and psychomotor activation as measured with the place preference conditioning paradigm. *Behav Brain Res*, 97(1-2):115-27.
- Ukai M, Kameyama T (1985) Multi-dimensional analyses of behavior in mice treated with U-50,488H, a purported kappa (non-mu) opioid agonist. *Brain Res*, 337(2):352-6.
- Urbán R, Kökönyei G, Demetrovics Z (2008) Alcohol outcome expectancies and drinking motives mediate the association between sensation seeking and alcohol use among adolescents. *Addict Behav*, 33(10):1344-52.
- van Abeelen JH (1975) Genetic analysis of behavioural responses to novelty in mice. *Nature*, 254(5497):239-41.
- van Abeelen JH (1977) Rearing responses and locomotor activity in mice: single-locus control. *Behav Biol*, 19(3):401-4.
- van Erp AM, Tachi N, Miczek KA (2001) Short or continuous social stress: suppression of continuously available ethanol intake in subordinate rats. *Behav Pharmacol*, 12(5):335-42.
- Vanderschuren LJ, Niesink RJ, Van Ree JM (1997) The neurobiology of social play behavior in rats. *Neurosci Biobehav Rev*, 21(3):309-26.
- Vanderschuren LJ, Pierce RC (2010) Sensitization processes in drug addiction. *Curr Top Behav Neurosci*, 3:179-95.
- Varlinskaya EI, Doremus-Fitzwater TL, Spear LP (2010) Repeated restraint stress alters sensitivity to the social consequences of ethanol in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 96(2):228-35.
- Varlinskaya EI, Spear LP (2002) Acute effects of ethanol on social behavior of adolescent and adult rats: role of familiarity of the test situation. *Alcohol Clin Exp Res*, 26(10):1502-11.
- Varlinskaya EI, Spear LP (2004) Changes in sensitivity to ethanol-induced social facilitation and social inhibition from early to late adolescence. *Ann N Y Acad Sci*, 1021:459-61.

- Varlinskaya EI, Spear LP (2006) Differences in the social consequences of ethanol emerge during the course of adolescence in rats: social facilitation, social inhibition, and anxiolysis. *Dev Psychobiol*, 48(2):146-61.
- Varlinskaya EI, Spear LP (2008) Attenuated aversive effects of ethanol among adolescent rats are diminished further in adolescent males by the presence of a social partner. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32 I (Suppl. 1), 94A.
- Varlinskaya EI, Spear LP (2012) Increases in anxiety-like behavior induced by acute stress are reversed by ethanol in adolescent but not adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 100(3):440-50.
- Vengeliene V, Siegmund S, Singer MV, Sinclair JD, Li TK, Spanagel R (2003) A comparative study on alcohol-preferring rat lines: effects of deprivation and stress phases on voluntary alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res*, 27(7):1048-54.
- Verdejo-García A1, Lawrence AJ, Clark L (2008) Impulsivity as a vulnerability marker for substance-use disorders: review of findings from high-risk research, problem gamblers and genetic association studies. *Neurosci Biobehav Rev*, 32(4):777-810.
- Vetter CS, Doremus-Fitzwater TL, Spear LP (2007) Time course of elevated ethanol intake in adolescent relative to adult rats under continuous, voluntary-access conditions. *Alcohol Clin Exp Res*, 31(7):1159-68.
- Vetter-O'Hagen C, Varlinskaya E, Spear L (2009) Sex differences in ethanol intake and sensitivity to aversive effects during adolescence and adulthood. *Alcohol Alcohol*, 44(6):547-54.
- Volpe JJ (2000). Overview: normal and abnormal human brain development. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 6(1):1-5.
- Volpicelli JR, Ulm RR, Hopson N (1990) The bidirectional effects of shock on alcohol preference in rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 14(6):913-6.
- Wahlstrom D, Collins P, White T, Luciana M (2010) Developmental changes in dopamine neurotransmission in adolescence: behavioral implications and issues in assessment. *Brain Cogn*, 72(1):146-59.

- Walker BM, Ehlers CL (2009) Age-related differences in the blood alcohol levels of Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 91(4):560-5.
- Walker E, Bollini AM (2002) Pubertal neurodevelopment and the emergence of psychotic symptoms. *Schizophr Res*, 54(1-2):17-23.
- Wall TL, Nemeroff CB, Ritchie JC, Ehlers CL (1994) Cortisol responses following placebo and alcohol in Asians with different ALDH2 genotypes. *J Stud Alcohol*, 55(2):207-13.
- Waller MB, Murphy JM, McBride WJ, Lumeng L, Li TK (1986) Effect of low dose ethanol on spontaneous motor activity in alcohol-preferring and -nonpreferring lines of rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 24(3):617-23.
- Warner LA, White HR (2003) Longitudinal effects of age at onset and first drinking situations on problem drinking. *Subst Use Misuse*, 38(14):1983-2016.
- Weinberg J, Sliwowska JH, Lan N, Hellemans KG (2008) Prenatal alcohol exposure: foetal programming, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sex differences in outcome. *J Neuroendocrinol*, 20(4):470-88.
- White AM, Matthews DB, Best PJ (2000) Ethanol, memory, and hippocampal function: a review of recent findings. *Hippocampus*, 10(1):88-93.
- White AM, Swartzwelder HS (2005) Age-related effects of alcohol on memory and memory-related brain function in adolescents and adults. *Recent Dev Alcohol*, 17:161-76.
- White AM, Truesdale MC, Bae JG, Ahmad S, Wilson WA, Best PJ, Swartzwelder HS (2002) Differential effects of ethanol on motor coordination in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 73(3):673-7.
- White TL, Lejuez CW, de Wit H (2008) Test-retest characteristics of the Balloon Analogue Risk Task (BART). *Exp Clin Psychopharmacol*, 16: 565–570.
- Whiteside SP, Lynam DR (2001) The Five Factor Model and impulsivity: using a structural model of personality to understand impulsivity. *Pers Individ Dif*, 30(4):669-89.

- Wilbertz G, van Elst LT, Delgado MR, Maier S, Feige B, Philipsen A, Blechert J (2012) Orbitofrontal reward sensitivity and impulsivity in adult attention deficit hyperactivity disorder. *Neuroimage*, 60(1):353-61.
- Wilhelm CJ, Mitchell SH (2008) Rats bred for high alcohol drinking are more sensitive to delayed and probabilistic outcomes. *Genes Brain Behav*, 7(7):705-13.
- Windle M, Spear LP, Fuligni AJ, Angold A, Brown JD, Pine D, Smith GT, Giedd J, Dahl RE (2008) Transitions into underage and problem drinking: developmental processes and mechanisms between 10 and 15 years of age. *Pediatrics*, 4:S273-89.
- Winer BJ (1991) *Statistical principles in experimental design*, 2nd edition. New York: McGraw-Hill
- Winger G, Hofmann FG, Woods JH (1992). En: *A handbook on drug and alcohol abuse*. The biomedical aspects. 3rd ed. New York: Oxford University Press.
- Wise RA, Bozarth MA (1987) A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev*, 94(4):469-92.
- Witt ED (1994) Mechanisms of alcohol abuse and alcoholism in adolescents: a case for developing animal models. *Behav Neural Biol*, 62(3):168-77.
- Witt ED (2010) Research on alcohol and adolescent brain development: opportunities and future directions. *Alcohol*, 44(1):119-24.
- Wolffgramm J, Heyne A (1991) Social behavior, dominance, and social deprivation of rats determine drug choice. *Pharmacol Biochem Behav*, 38(2):389-99.
- Xiao C, Zhang J, Krnjević K, Ye JH (2007) Effects of ethanol on midbrain neurons: role of opioid receptors. *Alcohol Clin Exp Res*, 31(7):1106-13.
- Yakovlev PI, Lecours AR (1967) The myelogenetic cycles of regional maturation of the brain. En: Minkowski A. *Regional development of the brain in early life*. Oxford: Blackwell Scientific; p. 3-70.
- Yates MA, Juraska JM. (2008) Pubertal ovarian hormone exposure reduces the number of myelinated axons in the splenium of the rat corpus callosum. *Exp Neurol*, 209(1):284-7.

- Yates WR, Cadoret RJ, Troughton EP, Stewart M, Giunta TS (1998) Effect of fetal alcohol exposure on adult symptoms of nicotine, alcohol, and drug dependence. *Alcohol Clin Exp Res*, 22(4):914-20.
- Yoshida A, Huang IY, Ikawa M (1984) Molecular abnormality of an inactive aldehyde dehydrogenase variant commonly found in Orientals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(1):258-61.
- Youngentob SL, Glendinning JI (2009) Fetal ethanol exposure increases ethanol intake by making it smell and taste better. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(13):5359-64.
- Zakharova E, Miller J, Unterwald E, Wade D, Izenwasser S (2009) Social and physical environment alter cocaine conditioned place preference and dopaminergic markers in adolescent male rats. *Neuroscience*, 163(3):890-7.
- Zuckerman M (1986) Sensation seeking and the endogenous deficit theory of drug abuse. *NIDA Research Monograph*, 74:59-70.
- Zuckerman M, Kuhlman DM (2000) Personality and risk-taking: common biosocial factors. *J Pers*; 68(6):999-1029.