

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INGESTA DE ETANOL EN RATAS ADOLESCENTES  
INICIADAS A LA DROGA: EVALUACIÓN DE FACTORES QUE  
PROMUEVEN EL CONSUMO DE LA DROGA CON ÉNFASIS  
EN EFECTOS DE LA EXPERIENCIA PRENATAL**

Por

**Lic. María Carolina Fabio**

**Director: Ricardo M. Pautassi**

**INIMEC-CONICET-UNC**



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**Córdoba, Argentina**

**2015**

## COMISIÓN ASESORA

Dr. Raúl Marín, Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas- CONICET-  
FCEFN

Dr. Víctor Molina, Instituto de Farmacología Experimental - FCQ

Dr. Ricardo M. Pautassi, INIMEC-CONICET

## DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

## TRIBUNAL

Firma: .....

Aclaración: .....

Firma: .....

Aclaración: .....

Firma: .....

Aclaración: .....

## Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Ricardo Pautassi, quién más que un director fue un mentor para mí. De más está decir que todo el trabajo que realicé en estos 5 años no hubiera sido posible sin que él me brindara su confianza al aceptarme para trabajar como su becaria. Gracias, Ricardo por enseñarme la disciplina del trabajo, la perseverancia y tolerancia a la frustración cuando las cosas no salen como uno espera, pero sobre todo, por darme el privilegio de trabajar con una persona humilde y generosa, como sos. Espero haber estado a la altura de las circunstancias y que estés conforme con mi trabajo.

Gracias por abrirme las puertas del laboratorio, donde conocí a excelentes personas que me brindaron su ayuda y, algunas de las cuales, me brindaron su amistad. A todos mis compañeros, les agradezco por los mates, las charlas, los almuerzos y los consejos varios (académicos, científicos y de la vida). De todos me llevo algún aprendizaje y gracias a todos he crecido en todos los aspectos. Especialmente, me gustaría dedicarle algunas palabras a aquellas que son más que compañeras para mí, y que alegraron mis días durante este período.

A Samanta March, aunque tu camino ahora ya no es el laboratorio. Quiero agradecerte porque tus ideas enriquecieron esta tesis y gracias a vos he incursionado en otros horizontes. Pero también por las risas, las confidencias, los consejos cuando entraba en alguna crisis.

A Marcela Culleré porque el “vórtice” nos acompañó un tiempo (pero creo que ya se ha ido por fin, ¿no?), igualmente, ¡lo que nos hemos divertido! Desde escuchar la radio mientras corríamos inmundos, hasta las tentadas en los congresos. Te deseo lo mejor en esta nueva etapa tuya y te agradezco de corazón por haber compartido conmigo parte del “vórtice”.

A Macarena Fernández, ¡mil gracias por la buena onda! Iluminaste mis días en el laboratorio y nos acompañamos en las malas, ultra-malas... ¡y en las buenas también! Gracias, loca, por la locura del día a día y porque me hiciste ver lo bueno de atenerse a los principios y valores de uno hasta el final.

A Larisa Guttlein, compañera de aventuras. Gracias por las risas, los mates, las charlas interminables y la cantidad de cosas en común que tenemos. Gracias por el aguante y la sinceridad, por hacer mi día a día más ameno... y por ser “mi estilista personal”.

Gracias Luciana Berardo y Florencia Anunziata quienes en calidad de “practicantes” no sólo colaboraron en el Experimento 2 del Capítulo 2 de este trabajo, sino que aceptaron que les

enseñara lo poco que sé, y de quienes aprendí a enseñar y a compartir el trabajo experimental. Gracias chicas por aceptarme como codirectora de la práctica. Gracias Luciana por aceptarme como codirectora de tu Trabajo Final para la Licenciatura en Psicología, estoy muy orgullosa de tus progresos y de todo el trabajo que hiciste. Pero más agradecida estoy por lo que hemos compartido “extra” al trabajo experimental.

Quiero agradecer, también, al INIMEC; en cuyas instalaciones no sólo llevé a cabo los experimentos, sino que me formé en la ciencia junto a excelentes profesionales. Particularmente quiero agradecer a la Dra. Soledad de Olmos, quién me enseñó todo lo que aprendí sobre inmunohistoquímica (espero haber aprendido por lo menos 1/10 de lo que ella sabe y con eso me doy por hecha). Gracias por la paciencia y la pedagogía de enseñar a una psicóloga que toda su vida hizo comportamiento, este tipo de técnicas. Gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio y enseñarme a la par mía todo lo que se. El Capítulo 2 de esta tesis es lo que es gracias a vos. Espero no haber sido una carga pesada.

Quiero agradecer, además, al laboratorio de la Dra. Vivas, especialmente, a las Dras. Andrea Godino y Ximena Caeiro, quienes no sólo me asesoraron técnicamente sino que también compartieron sus almuerzos conmigo en la primera etapa de esta tesis. Gracias porque me hicieron sentir cómoda y contenida. Entre ellas, aunque en la última etapa miembro de nuestro laboratorio, quiero agradecer a la Dra. Fabiola Macchionne, quien tuvo la infinita paciencia de enseñarme a correr RT-PCR. Gracias Fabi, por calmar mis ansiedades.

También quiero agradecer a todo el personal del bioterio del INIMEC por la constante ayuda que me han brindado y con quienes he compartido el día a día de trabajo experimental, básicamente, por ser “parte del decorado” del bioterio. Un especial “GRACIAS” a Romina Maiorano, quien siempre (textualmente, siempre) me ayudó con todos los materiales experimentales y que aguantó que me pase horas y horas dentro de la sala común cuando tenían que cambiar las cajas de los animales. Recuerdo con mucho cariño nuestras charlas existenciales. Gracias a Sergio Oms, Roberto Rovallo y Nicolás Manisch quienes me aguantaron en el grueso de mis experimentos, siempre con la mejor predisposición y buena onda.

Este trabajo no sería lo que es hoy sin el constante asesoramiento de los miembros de mi Comisión Asesora del Doctorado, el Dr. Raúl Marín y Dr. Víctor Molina. Sus aportes y consejos enriquecieron enormemente este trabajo. Además, quiero agradecer a Julio Linares, Eugenia por la buena predisposición y amable atención en la secretaría del Doctorado en Ciencias Biológicas.

Quiero agradecer, además, al Estado Argentino; gracias a quien hoy soy quien soy. Toda mi formación fue estatal (desde jardín hasta hoy) y si no fuera por la financiación de CONICET y SECyT/FONCyT, yo no hubiese podido pensar siquiera en hacer el doctorado. Este trabajo está en sus manos gracias al Estado y para mí es un orgullo vivir en un país donde aún la educación es libre y gratuita porque, por más que tengamos muchas cosas que criticar y mejorar al respecto, es un lujo que sólo en pocos lugares aún queda. Es un orgullo que en mi país aún se apuesta a la ciencia y, más aún, saber que uno puede viajar al exterior y no ser considerado un mal científico, por el contrario. Creo que esto lo construimos TODOS, así que agradecer a mi tierra no está de más.

Capítulo aparte, quiero agradecer a mi familia. A mi mamá, Graciela Montaldo quien desde que nací me apoya en cada emprendimiento que hago; de tenerla a las corridas con las miles de actividades extra que quería realizar de chica, hasta mi decisión de emprender estos primeros pasos en la carrera científica. Si hay algo que aprendí de vos es a ser responsable, trabajadora e intentar que mis actos sean coherentes con mis pensamientos. Gracias por nunca desalentarme y creer en mí en todo momento.

A mi papá, Roberto Fabio, quien también me apoya incondicionalmente en todos los proyectos que emprendo. Vos sos el responsable de que haya leído los libros que leí y de muchas de mi posiciones epistemológicas, de que sepa que cuando hay un problema “primero hay que fijarse en la solución más simple, que siempre suele ser eso” y a no desesperar cuando no hay solución aparente. Gracias porque no hubiese podido estudiar sin tu ayuda; y gracias por tus consejos y por compartir tu sabiduría conmigo; creo que más de uno en el laboratorio ha escuchado alguna de tus frases célebres. Pero sobre todo gracias porque, por más kilómetros que nos separe, siempre pude contar con vos.

A mis hermanos Ernesto, Cecilia y, sobre todo, a Agustín Fabio. ¡Qué decirte hermano querido! Creo que te debieran dar por lo menos el honoris causa en psicología. Gracias por bancarme en todas (y cuando digo todas, ¡me refiero a todas!). No es fácil describir el papel que siempre cumpliste en mi vida, sos mi hermano, mi amigo, mi tío, mi abuelo, etc... así que GRACIAS por ser y estar.

A Damián Seitor, mi compañero de vida. Agradecerte a vos es hasta redundante. Estuviste a mi lado aún antes de empezar esta tesis. Cada charla, congreso, resumen, informe que debía presentar pasaban por tus ojos y vos las leías/escuchabas atentamente aunque no tuviera nada que ver con tu formación. Cada viaje, cosa importante que hice, no hubiese sido igual sin tu planificación, apoyo y aliento constante. Gracias porque con vos aprendí lo que

significa ir a la par con alguien y emprender esta aventura fue mucho más grata con vos. Podría seguir por horas nombrando todo lo que te agradezco, así que GRACIAS por aguantarme y decidir compartir tu vida conmigo.

Gracias, Damián, por abrirme las puertas de tu familia, quienes también me han tenido que escuchar y aguantar en todo esto. Especialmente, quiero agradecer a tu mamá Marta Cerutti y a tu papá, Carlos Seitor, por todo el apoyo y cariño que me brindaron en este tiempo.

Desde ya pido disculpas porque no he podido expresar enteramente lo que siento por cada uno de ustedes; escribir estos agradecimientos ha sido más difícil para mí que los 5 años de trabajo que implicó esta tesis. Gracias a todo aquel que la lea y espero que los experimentos que aquí se describen sirvan de disparador a cualquier persona que quiera apostar a la ciencia. Espero haber contribuido con mi granito de arena, de alguna manera.

## Publicaciones Derivadas de la Tesis

Fabio MC, Nizhnikov ME, Spear NE, Pautassi RM (2014). Binge ethanol intoxication heightens subsequent ethanol intake in adolescent, but not adult, rats. *Dev Psychobiol.* 56(3):574-83. doi: 10.1002/dev.21101. Epub 2013 Jan 22.

Fabio MC, March SM, Molina JC, Nizhnikov ME, Spear NE, Pautassi RM (2013). Prenatal ethanol exposure increases ethanol intake and reduces c-fos expression in infralimbic cortex of adolescent inbred wistar rats, but does not alter motor activity or emission of ultrasonic vocalizations. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 103 842-852.

# Índice

<b>INGESTA DE ETANOL EN RATAS ADOLESCENTES INICIADAS A LA DROGA: EVALUACIÓN DE FACTORES QUE PROMUEVEN EL CONSUMO DE LA DROGA CON ÉNFASIS EN EFECTOS DE LA EXPERIENCIA PRENATAL.....</b>	<b>I</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>II</b>
<b>PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS.....</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>VII</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>18</b>
EVALUACIÓN DE LA INICIACIÓN ADOLESCENTE AL ETANOL SOBRE EL CONSUMO POSTERIOR DE LA DROGA .....	18
MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS GENERALES .....	24
DISEÑOS EXPERIMENTALES Y ANÁLISIS DE DATOS .....	27
EXPERIMENTO 1: EVALUACIÓN DE CONSUMO DE ETANOL EN RATAS ADOLESCENTES LUEGO DE DIFERENTES MODALIDADES DE EXPOSICIÓN AL ETANOL DURANTE ESTA ETAPA. ....	29
EXPERIMENTO 2: REPLICACIÓN DE CONSUMO DE ETANOL EN RATAS ADOLESCENTES, LUEGO DE UNA BREVE EXPOSICIÓN PREVIA A LA DROGA. ....	35
EXPERIMENTO 3: EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA INICIACIÓN AL ETANOL DURANTE LA ADULTEZ. ....	41
CONCLUSIONES GENERALES Y DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO .....	44
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>47</b>
EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL AL ETANOL DURANTE LA ADOLESCENCIA .....	47
MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS GENERALES .....	53
DISEÑOS EXPERIMENTALES Y ANÁLISIS DE DATOS .....	61
EXPERIMENTO 1: EVALUACIÓN DE INGESTA EN ADOLESCENTES EXPUESTOS AL ETANOL DURANTE LA GESTACIÓN TARDÍA. .	65
EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN CRÓNICA DE CONSUMO DE ALCOHOL EN ANIMALES EXPUESTOS A ETANOL DURANTE LA GESTACIÓN TARDÍA. ....	67
EXPERIMENTO 3: REACTIVIDAD FRENTE AL ETANOL EN ANIMALES EXPUESTOS A LA DROGA DURANTE LA GESTACIÓN TARDÍA .....	70
EXPERIMENTO 4: EVALUACIÓN DE CURVA DE METABOLIZACIÓN DE ETANOL EN ADOLESCENTES EXPUESTOS PRENATALMENTE AL ETANOL. ....	79
EXPERIMENTO 5: ACTIVACIÓN NEURONAL EN RATAS ADOLESCENTES EXPUESTAS A ETANOL DURANTE GESTACIÓN TARDÍA (REPLICACIÓN).....	80
EXPERIMENTO 6. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL AL ETANOL SOBRE ACTIVIDAD NEURONAL INDUCIDA POR ETANOL EN ACSH Y ACTIVIDAD DOPAMINÉRGICA INDUCIDA POR ETANOL EN ATV .....	82
EXPERIMENTO 7A: EVALUACIÓN DE EXTINCIÓN EN ANIMALES EXPUESTOS A ETANOL DURANTE GESTACIÓN TARDÍA.....	91
EXPERIMENTO 7B. EVALUACIÓN DE AVERSIÓN ADQUIRIDA AL SABOR INDUCIDA POR ETANOL, EN ANIMALES EXPUESTOS A LA DROGA DURANTE LA GESTACIÓN TARDÍA. ....	95
EXPERIMENTO 8. EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN DE RECEPTORES OPIÁCEOS EN ANIMALES EXPUESTOS A ETANOL DURANTE LA GESTACIÓN TARDÍA. ....	97
CONCLUSIONES GENERALES Y DISCUSIÓN DE CAPÍTULO .....	102
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>109</b>
ESTRÉS COMO FACTOR DE VULNERABILIDAD QUE PROMUEVE EL CONSUMO DE ETANOL EN LA ADOLESCENCIA .....	109



<i>MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS GENERALES</i> .....	113
DISEÑOS EXPERIMENTALES Y ANÁLISIS DE DATOS .....	115
EXPERIMENTO 1: EVALUACIÓN DE INGESTA EN ANIMALES AISLADOS ANTES Y DURANTE LA PRUEBA. ....	117
EXPERIMENTO 2: ESTRÉS TEMPRANO COMO PROMOTOR DE CONSUMO DE ETANOL EN ADOLESCENCIA .....	119
EXPERIMENTO 3: EL ESTRÉS POR INMOVILIZACIÓN PROMUEVE EL CONSUMO DE ETANOL EN ADOLESCENTES Y NO EN ADULTOS .....	126
CONCLUSIONES GENERALES Y DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO .....	132
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	<b>134</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>147</b>

## Abreviaturas

**A:** condición experimental en la que animales adolescentes permanecen alojados individualmente.

**AcC:** núcleo accumbens core

**AcSh:** núcleo accumbens shell

**ACS:** procedimiento de aversión condicionada al sabor.

**CLi:** cloruro de litio.

**CRF:** factor liberador de corticotrofina.

**DG:** día gestacional

**DP:** día postnatal

**GABA:** ácido gama amino butírico

**GABAérgico:** neurona que contiene y libera GABA

**HHA:** eje hipotálamo-hipofisario-adrenal.

**i.g.:** administración intragástrica

**IL:** corteza infralímbica

**i.p.:** administración intraperitoneal

**MS:** estrés temprano producido por separación materna diaria durante las primeras semanas de vida.

**MS15:** grupo experimental donde los animales fueron expuestos a separación materna diaria de 15 min durante las dos primeras semanas de vida.

**MS180:** grupo experimental donde los animales fueron expuestos a separación materna diaria de 180 min durante las dos primeras semanas de vida.

**N:** condición experimental en la que los animales permanecen alojados en grupo.

**Nacc:** núcleo accumbens

**NT:** grupo postnatal no tratado.

**PE:** grupo de animales tratados con etanol (dosis: 2,0 g/kg) durante los días gestacionales 17-20)

**PL:** corteza prefrontal

**PNT:** grupo prenatal no tratado.

**PV:** grupo de animales tratados con vehículo durante los días gestacionales 17-20

**ATV:** Área Tegmental Ventral

**RT-PCR:** evaluación de PCR cuantitativa en tiempo real.

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**USV:** vocalizaciones ultrasónicas emitidas por las ratas.

## Resumen

Se analizó, mediante un modelo animal, cómo el inicio del consumo de alcohol durante la adolescencia afecta el consumo posterior de la droga, así como factores que facilitan el inicio y escalada en el consumo de alcohol en esta etapa. Se observó que una breve exposición pasiva al etanol durante la adolescencia, pero no durante la adultez, aumentó el consumo voluntario y subsiguiente de alcohol. El consumo adolescente de alcohol fue, a su vez, significativamente promovido por la exposición a dosis moderadas de etanol durante la gestación tardía; así como por la exposición a estresores (i.e. aislamiento social, separación materna repetida y estrés por inmovilización). Una parte sustancial del trabajo analizó mecanismos comportamentales y neurales subyacentes al efecto promotor del consumo de alcohol que ejerce la exposición a la droga en útero. Las ratas adolescentes expuestas a etanol durante la gestación exhibieron menor sensibilidad a los efectos aversivos de la droga, alteraciones en la extinción de aprendizaje asociativo y en la expresión de genes de expresión tempranos en corteza prefrontal, núcleo accumbens y área tegmental ventral. Los resultados arrojan nueva luz sobre trayectorias de consumo que llevan al consumo problemático de alcohol.

## Abstract

The present work analyzed, using an animal model, how alcohol initiation exerts differential effects upon later alcohol consumption when occurs during adolescence or adulthood; as well as factors that promote the onset and escalation of alcohol consumption during adolescence. We found that a brief, passive exposure to ethanol during adolescence, but not during adulthood, enhanced subsequent voluntary ethanol consumption. Adolescent ethanol consumption was, in turn, promoted by moderate ethanol dosing during late gestation; and by stress exposure (i.e. social isolation, maternal separation and restraint). A significant fraction of the work scrutinized behavioral and neural mechanisms underlying the facilitative effect of gestational ethanol on later alcohol consumption. Adolescent rats given ethanol in-utero exhibited reduced sensitivity to the aversive effects of ethanol, deficits in the extinction of associative learning and in early

gene expression in prefrontal cortex; as well as alterations in ethanol-induced c-Fos expression in mesocorticolimbic areas. Altogether, these results provide new information for understanding trajectories that lead to alcohol-related problems.

## Introducción

Las trayectorias de consumo de alcohol pueden variar significativamente en función de factores genéticos, de la exposición a estresores ambientales como negligencia paterna o falta de apoyo social y de la exposición al alcohol en etapas tempranas de la vida como la vida fetal o los primeros meses de vida. En todos estos casos, la predisposición a consumir alcohol aumenta y, consecuentemente, estos factores son conocidos como factores de vulnerabilidad (Pautassi et al., 2011).

Los factores de vulnerabilidad juegan un importante papel en todos los estadios del desarrollo. Existe una etapa, sin embargo, donde el inicio, escalada e incidencia del consumo de alcohol aumentan bruscamente, observándose las tasas más elevadas de abuso y dependencia hacia la droga. Nos referimos al período entre los 12 a 24 años, conocido más comúnmente como adolescencia. En EEUU y España se ha observado que aproximadamente el 70% de los adolescentes se han iniciado en el consumo de alcohol hacia el final de la escuela secundaria (Fuentes-Almendras et al, 1999; Johnston et al., 2007). En China, en tanto, se ha observado un incremento significativo en el consumo de alcohol durante la primer década del SXXI, siendo la población de 18-19 años el segmento que más contribuyó a este incremento (Zhang & Cranney, 2008).

Si bien nuestro país presenta diferencias culturales con los países norteamericanos, europeos y asiáticos, las investigaciones realizadas hasta el momento han arrojado datos similares. En el relevamiento argentino de estudiantes de enseñanza media (SEDRONAR, 2010) se observó que el 72,3% de los sujetos entre 14 a 18 había consumido alcohol alguna vez en la vida. Si incluimos edades más tempranas (12 a 17 años) la prevalencia de vida de consumo en Argentina ronda el 50% (Alderete et al., 2008), en tanto que una investigación realizada en provincia de Buenos Aires encontró que el 38.4% de los adolescentes entre 11 y 16 años consumía alcohol al menos 6 veces al año (Mulassi et al., 2010). En este último estudio, la probabilidad de consumo de alcohol aumentaba 10 veces más si el mejor amigo también consumía. El consumo en niños preadolescentes argentinos es también elevado. Un estudio realizado en Córdoba (Argentina) encontró que el 15% de los niños de 8 a 12 años informaba tener acceso al menos una vez por mes a sorbos de alcohol de bebidas

como vino o cerveza. El 60% de los niños cordobeses de 8 a 11 años habían ya probado alcohol alguna vez (Pilatti et al., 2013).

El consumo de alcohol durante la adolescencia tiene numerosas consecuencias inmediatas, en el plano educacional, laboral y afectivo; y asimismo puede aumentar las probabilidades de un consumo problemático en la edad adulta (e.g., Anthony & Petronis, 1995). El trabajo de Grant y Dawson (1997) fue uno de los primeros en analizar este fenómeno -denominado “debut temprano”- y detectó un 40% de prevalencia de vida de dependencia al alcohol en aquellos que se habían iniciado al alcohol antes de los 15 años, pero sólo un 10% entre aquellos que habían demorado el inicio del consumo hasta los 22 años. Un estudio posterior (DeWit et al., 2000) evaluó abuso y dependencia al alcohol en cohortes con diferentes edades de inicio al consumo de alcohol pero igualados en los años pasados desde el inicio del consumo. Aquellos que habían empezado a consumir alcohol a los 14 años o antes exhibían tasas de abuso y dependencia significativamente mayores que aquellos que habían demorado la iniciación hasta los 19 años. Norström & Pape (2012) encontraron una asociación entre episodios de ingesta elevada en la adolescencia y síntomas de dependencia en la edad adulta, y se estimó que la prevalencia de estos últimos se podría reducir hasta un 15% si se eliminaran los episodios de ingesta elevada en adolescencia. En línea con estos resultados, Hingson y colaboradores (2006) encontraron, mediante un estudio de cohortes, que aquellos adolescentes que comenzaron a consumir antes de los 14 años experimentaban mayor riesgo de desarrollar dependencia que aquellos que comenzaban a tomar alcohol luego de los 21 años. Por otra parte, en un estudio longitudinal, se encontró que el 43.1% de los que consumieron alcohol a edad temprana (en ese estudio, definido como antes de los 18 años), presentaron problemas de uso y abuso de la droga en la adultez; además, el inicio temprano de consumo de alcohol predijo el uso de tabaco, marihuana y cocaína (Windle & Windle, 2012). Estos resultados sugieren que el comenzar a consumir alcohol durante la adolescencia, puede ser considerado como un factor de riesgo para el desarrollo de problemas de consumo de esta droga. Cabe preguntarse, por lo tanto, cuáles son las características propias de esta etapa que hacen al adolescente más vulnerable a desarrollar consumo exacerbado de alcohol y otras drogas.

El estadio adolescente del desarrollo es crucial para el modelado de la arquitectura cerebral, observándose sobreproducción y eliminación de sinapsis, así como cambios en la actividad metabólica y química del cerebro. Si bien usualmente los cambios de ánimo y comportamiento en la adolescencia se asocian con las alteraciones hormonales propias de la pubertad, se ha sugerido que los primeros estarían más relacionados con cambios en el SNC que se dan en esta etapa. Entre los cambios más importantes a nivel de SNC, se encuentran alteraciones en corteza prefrontal y en áreas del sistema límbico, que involucran al sistema de neurotransmisión dopaminérgica. Estas estructuras son sensibles a estresores y forman parte del sistema motivacional que participa en la detección y procesamiento de reforzadores naturales y drogas de abuso, conocido como sistema mesocorticolímbico (véase Spear, 2000; Crews et al., 2007).

La corteza prefrontal es un área involucrada en la regulación de toma de decisiones y otras funciones ejecutivas (e.g., planificación, conductas dirigidas a metas, inhibición de los impulsos), mientras que la amígdala, hipocampo y otras estructuras del sistema límbico juegan un papel importante en aprendizaje emocional, estados emocionales y el humor (Crews & Vetreno, 2011). Estos autores postulan que, siendo que en la adolescencia se dan cambios estructurales en áreas límbicas y prefrontales, el uso de drogas de abuso en el estadio adolescente produciría déficits en el control de los impulsos, promoviendo aún más el abuso de drogas (Crews et al., 2007; Crews & Vetreno, 2011; Gullo & Dawe, 2008). A su vez, la impulsividad, como observaron Hamilton y colaboradores (2014), está asociada al debut temprano de alcohol.

Durante la adolescencia, además, hay reducción de conexiones inhibitorias (i.e. GABAérgicas; Yu et al., 2006) y un aumento de glutamato, asociado a los receptores NMDA (neurotransmisor excitatorio; Kasanetz & Manzoni, 2009). Además la dopamina, neurotransmisor involucrado en la reactividad motivacional y a situaciones estresantes, alcanza durante esta etapa su nivel máximo en áreas del sistema límbico (Andersen et al., 1997). Como sugerimos previamente, estos cambios a nivel de SNC serían los principales responsables de la emergencia de comportamientos típicos de esta etapa del desarrollo, como la mayor impulsividad y búsqueda de la novedad, la mayor afiliación con los pares de la misma edad y el aumento en las conductas de riesgo (Spear, 2000; Bernheim et al., 2013). El incremento de estas últimas es consecuencia de una interacción entre la búsqueda de



nuevas sensaciones y la inmadurez del sistema de control (corteza prefrontal) que no es capaz de regular los impulsos de búsqueda de reforzadores (Steinberg, 2004). Esta falta de control sobre los impulsos, facilitaría que el adolescente se acerque al alcohol, en primer lugar, y no pueda frenar su consumo (Belin, 2008; Spear, 2012).

Otra característica propia de esta etapa adolescente es la vulnerabilidad al estrés (Spear, 2000). Los adolescentes presentan mayores niveles basales de corticosterona –una hormona relacionada al estrés- que los adultos (Spear et al., 2010) y ratas adolescentes evaluadas en un laberinto elevado en cruz -una prueba que evalúa componentes ansiogénicos- mostraron mayor ansiedad que sus contraparte adultas (Doremus et al., 2003; Estanislau & Morato, 2006; Lynn & Brown, 2010). Resultados similares se encontraron utilizando pruebas de miedo contextual (Brasser & Spear, 2004; Esmoris-Arranz et al., 2008). Los adolescentes, además, parecen ser más sensibles a las situaciones estresantes derivadas de las interacciones sociales (Spear et al., 2000). Siendo el alcohol una droga que a dosis bajas ejerce efectos ansiolíticos, es probable que los adolescentes, al ser más vulnerables al estrés, se acerquen a consumir alcohol a modo de “automedicación” para paliar los efectos de los estresores (Varlinskaya & Spear, 2010).

Como mencionáramos, muchos trabajos epidemiológicos (e.g. Grant & Dawson, 1997; deWit et al, 2000; Dawson et al, 2007; Guttmanova et al, 2012) indican que comenzar a consumir alcohol durante la adolescencia influye significativamente en el desarrollo de ingesta problemática de la droga ¿Cuáles serían, entonces, los mecanismos implicados en este fenómeno de “debut temprano”?

Una primera opción, sería considerar al debut temprano como un factor con suficiente peso como para generar de forma independiente un consumo exacerbado de alcohol durante la adolescencia; es decir, bajo esta perspectiva la iniciación al alcohol durante la adolescencia generaría per se, sin necesidad de interacción con otros factores, el desarrollo posterior de problemas de uso y abuso de la droga (Sartor et al., 2009). En ese sentido, Bratek y colaboradores (2013) indagaron una población con diagnóstico de dependencia al alcohol y encontraron que la mayoría habían comenzado a consumir antes de los 15 años. Otros estudios epidemiológicos ya reseñados (e.g. deWitt et al, 200; Hingson et al, 2006; Dawson et al, 2007, Windle & Windle, 2012) han arrojado evidencia consistente con un rol causal del debut temprano, pero no han podido controlar la

incidencia de otros factores (e.g. contexto familiar, factores genéticos, estresores ambientales, comorbilidad con otros trastornos) que podrían estar causando de forma independiente mayor ingesta de alcohol o, quizás, interactuando con el debut temprano. En ese sentido, aún no se sabe a ciencia cierta si puede haber otros factores implicados en esta asociación (Maimaris & Cambridge, 2014). Así entonces, es posible que la edad de inicio sea un marcador (Guttmanova et al., 2012) de otros factores ligados causalmente al consumo exacerbado, como historia familiar positiva de problemas con el alcohol (i.e. riesgo genético), o comorbilidad con otra enfermedad como depresión, trastornos de ansiedad o trastorno antisocial de la personalidad (Chen et al., 2009; Buchmann et al., 2009).

Siguiendo esta hipótesis, en una investigación se encontró que aquellos que comenzaban a consumir alcohol antes de los 16 años poseían variaciones en el gen del receptor M2 colinérgico (CHRM2), el cual a su vez está asociado al desarrollo de problemas de uso, abuso y dependencia de alcohol (Chorlian et al., 2013). Chen y colaboradores (2011) llevaron a cabo un perfil genotípico y fenotípico de alcohólicos irlandeses en función de su edad de inicio al consumo de alcohol. Estos autores encontraron que los adolescentes que se iniciaron tempranamente al alcohol son, en relación a aquellos que se iniciaron tardíamente, más propensos a desarrollar síntomas más severos de dependencia, poseen una mayor progresión hacia la dependencia, mayores expectativas hacia la droga y, además, poseen rasgos distintivos en los genes HTR1B y OPR $\mu$ 1.

En otro trabajo, donde analizaron muestras de gemelos, encontraron una correlación de 0.59 entre edad de inicio en el consumo de alcohol y el desarrollo de problemas de abuso de la droga (Sartor et al., 2009). Investigadores alemanes evaluaron, en una muestra de adolescentes entre 13 y 16 años, la relación entre inicio temprano en el consumo de alcohol y factores genéticos y ambientales (e.g. estresores durante la infancia y la gestación, problemas de conducta y emocionales, así como estilo de vida familiar y la cantidad de consumo de alcohol que muestran los pares). Se observó que los adolescentes que habían iniciado el consumo de alcohol antes de los 16 años fueron aquellos que comenzaron a fumar tempranamente, que exhibían riesgo genético de alcoholismo y cuyos pares eran consumidores de alcohol (Geels et al., 2013). Por otro lado, en un estudio en gemelos homocigóticos y visigóticos llevado a cabo por Young-Wolff y colaboradores

(2012), se observó que los problemas para controlar el consumo de alcohol en adolescentes que se iniciaron tempranamente al consumo de la droga, respondían a factores genéticos. Adicionalmente, se ha encontrado que aquellos adolescentes cuyos padres son alcohólicos, muestran una edad de inicio más temprana a la droga, así como una escalada más rápida hacia consumo abusivo de alcohol (Hussong et al., 2008). Todos estos estudios indican que el inicio temprano podría mantener una relación patogénica, pero no etiológica, con el consumo problemático de alcohol. Sin embargo, un estudio llevado a cabo en estudiantes universitarios de Córdoba (Argentina) encontró que la edad de inicio de consumo de alcohol conlleva un consumo elevado de etanol en la adultez, independientemente de la historia familiar de problemas con el alcohol (Pilatti et al., 2014); y otro estudio realizado en Australia con gemelos apoya la noción que la edad de inicio de consumo de alcohol depende más de variables ambientales y familiares que de la carga genética (Deutsch et al, 2013). De todos modos, en el estudio de Pilatti y colaboradores (2014) se observó que la frecuencia de consumo de alcohol aumentaba en aquellos adolescentes que exhibían tanto una historia familiar positiva de consumo como un inicio temprano al consumo de alcohol. Esto es, este trabajo sugería cierta interacción entre ambos factores.

Otro factor que podría mantener un efecto sinérgico con la edad de inicio de consumo de alcohol es la exposición a eventos estresantes. Como se mencionara anteriormente, los adolescentes son particularmente sensibles a los efectos del estrés, lo que los haría más propensos a consumir alcohol por sus propiedades ansiolíticas (véase, Spear et al, 2000). Existe evidencia de que un inicio temprano al consumo de alcohol facilita el consumo inducido por eventos estresantes (Dawson et al, 2007; Lee et al., 2012). Esta evidencia indica que la edad de inicio del consumo de alcohol, entendida como factor de riesgo para el desarrollo de abuso y dependencia, interactúa con el estrés como factor promotor del consumo etílico en adolescentes. Tal como se verá más adelante, el consumo de alcohol –droga que produce ansiólisis- podría estar asociado a una vulnerabilidad al estrés propia de la etapa adolescente, donde los adolescentes consumirían para paliar los efectos del estrés. Otros factores que interactúan con la edad de inicio del consumo de alcohol, son los factores ambientales (e.g. nivel de educación y ambiente familiar). Estos factores, sumados al debut temprano, son predictores de problemas asociados a la severidad del consumo de alcohol –por ejemplo, episodios de amnesia inducida por el

alcohol, desarrollo significativo de tolerancia, manejar ebrio- en la adultez (Chartier et al, 2011). En conjunto, la información reseñada parece indicar que la iniciación adolescente al consumo de alcohol, si bien es un factor de mucha influencia sobre el consumo posterior de esta droga, interactúa con factores ambientales (particularmente el estrés) y genéticos, los cuales podrán funcionar como promotores o atenuantes del desarrollo de problemas posteriores con la droga. La naturaleza exacta de la relación entre los factores es aún incierta y parecen ser necesarios más estudios, de mayor fineza analítica, que la esclarezcan.

Si el inicio del consumo de alcohol durante la adolescencia es un factor que influye en el posterior desarrollo de problemas con esta droga, cabe preguntarse sobre la existencia de períodos sensibles específicos dentro de esta etapa donde el inicio del consumo aumente aún más el riesgo a desarrollar problemas con el alcohol; o si el efecto del debut temprano por la droga responde a un patrón lineal. Al parecer, cuanto más temprano es el inicio del consumo de alcohol, mayor la probabilidad de seguir escalando en la ingesta de esta droga, tal como demuestra un estudio binacional (Estados Unidos y Australia) en el que adolescentes de 15 años que habían comenzado a consumir antes de los 13, presentaban un consumo más elevado de alcohol (Mason et al., 2011). Guttmanova y colaboradores (2011) llegan aún más lejos, postulando que los preadolescentes que comienzan a consumir alcohol antes de los 11 años presentan más riesgos de desarrollar problemas de abuso de la droga que aquellos que se inician entre los 14 y 16 años. Comenzar a tomar alcohol en esta etapa, además, parece generar mayor riesgo a desarrollar dependencia y abuso (Dawson et al, 2008; Hingson et al, 2006; Pitkänen et al, 2005). Adicionalmente, si se diferencia el inicio del consumo de alcohol de la primer intoxicación con la droga, puede observarse que el hecho de consumir en la adolescencia genera problemas de uso con alcohol independientemente de que la primer intoxicación se haya dado posteriormente, si bien cuanto más cercanas ambas variables en el tiempo, cobran mayor implicancia (Morean et al, 2012). Pilatti y colaboradores (2014) observaron en una muestra de niños de 8-12 años, que el 82% de aquellos que habían indicado gustar de su primer contacto con el alcohol (incluyendo sorbos) continuaron consumiendo, en relación a solo un 31% de aquellos que habían manifestado no gustar de su primera experiencia con el alcohol.

En conjunto, estos estudios sugieren que cuanto más temprano ocurre el primer consumo de la droga, mayores las probabilidades de abuso y dependencia de alcohol. A pesar de esta hipótesis lineal, existe evidencia de un período ventana más acotado para el desarrollo de síntomas de dependencia y consumo riesgoso, comprendido entre los 15 y 19 años (Behrendt et al., 2008). Posiblemente, esto se deba a que en esta edad el consumo es más independiente, menos controlado por los padres y, por lo tanto, más pasible de descontrolarse. Las contradicciones entre los diferentes hallazgos pueden deberse a diferencias en criterios de evaluación y de reconocimiento de criterios a la hora de categorizar el tipo de consumo de los participantes de los diferentes estudios. En el trabajo de Behrendt y colaboradores, por ejemplo, se evaluaba la edad de aparición del primer síntoma de dependencia y abuso, mientras que en los trabajos de Dawson y Pitkänen se evaluó la proporción de síntomas de abuso y dependencia en la adultez.

Existe, además, otra teoría que entiende el consumo excesivo y temprano de alcohol en la adolescencia y, por lo tanto, los efectos del debut temprano con alcohol- como una consecuencia de eventos ocurridos aún más temprano en el desarrollo, como la exposición al olor, sabor o a las propiedades farmacológicas de la droga durante la infancia, la gestación o la lactancia (Spear & Molina, 2005). Los autores afirman que durante estas exposiciones tempranas se produce un aprendizaje asociativo entre los estímulos quimiosensoriales del alcohol y los efectos incondicionales positivos, recompensantes del alcohol. De esta manera, cuando luego los adolescentes son re-expuestos al olor o sabor del alcohol, se reactivarían estas memorias apetitivas, las cuales promoverían el acercamiento al alcohol y su consumo (Pautassi et al., 2009).

Cabe destacar que, probablemente, las teorías mencionadas no sean excluyentes entre sí, pudiendo darse el caso que la iniciación adolescente tenga un peso considerable sobre el consumo posterior de la droga y que exposiciones a la droga más tempranas en el desarrollo, o la presencia de factores de riesgo genético o comorbilidad psiquiátrica, lleven al adolescente a comenzar a consumir alcohol de manera voluntaria, generando una suerte de “espiral” donde la exposición o presencia de un factor de vulnerabilidad en una etapa del desarrollo genera mayor consumo de alcohol en etapas posteriores -como la adolescencia- desencadenando, a su vez, los efectos del debut temprano que discutiéramos en párrafos anteriores (véase Miller & Spear, 2006).

Como ya adelantáramos, un período sensible donde un sujeto puede estar expuesto pasivamente al alcohol es el período gestacional (Spear & Molina, 2005). Información proveniente de estudios epidemiológicos sugiere que individuos nacidos de mujeres que consumen alcohol durante la gestación poseen mayor riesgo de desarrollar problemas de uso y abuso de alcohol (Baer et al., 1998; 2003, Yates et al., 1998). Además, la exposición a dosis moderadas de alcohol en útero, durante la gestación tardía de la rata, resulta en mayor preferencia y palatabilidad por esta droga durante la infancia (Chotro & Arias, 2003; Arias & Chotro, 2006). Sin embargo, hasta el momento, poco se sabe acerca de los mecanismos implicados en este fenómeno, así como su persistencia a lo largo del desarrollo. Más importante aún, poco se sabe acerca de los efectos que tiene la exposición prenatal al alcohol sobre el consumo de esta droga durante la adolescencia, así como su relación con el fenómeno de debut temprano. Una discusión más exhaustiva sobre este factor promotor del consumo adolescente, así como de los antecedentes directos en el tema, será tratada en el capítulo 2 del presente trabajo.

Otra teoría, quizás relacionada con la anterior, sugiere que el consumo durante la adolescencia genera alteraciones en el desarrollo neural, lo cual llevaría a desarrollar problemas con la droga (Guttmanova et al., 2012). El uso exacerbado de etanol durante la adolescencia interrumpe la maduración y desarrollo de la corteza prefrontal, generando déficits en el control de los impulsos y otras funciones ejecutivas; provocando una menor estabilidad en dichas áreas del SNC, lo cual promueve el desarrollo de problemas de abuso de alcohol (véase Crews et al., 2007). Además, puede que la exposición adolescente al etanol esté interfiriendo con el normal desarrollo socio-cognitivo activando, por ejemplo, el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, induciendo neuro-adaptación de receptores dopaminérgicos y glutamatérgicos en corteza prefrontal y alterando los procesos de plasticidad neural en este sistema (Pascual et al, 2009). Los últimos autores han comprobado, además, que la exposición a dosis repetidas de alcohol durante la adolescencia genera daños a nivel hipocampal y prefrontal como producto de neuroinflamación inducida por esta droga; causando déficits comportamentales y cognitivos a largo plazo (Pascual et al., 2007). Por lo tanto, el consumir alcohol -y otras drogas de abuso- durante la adolescencia podría alterar el normal desarrollo del SNC,

haciendo al organismo más vulnerable a desarrollar problemas de adicción (Crews et al., 2007).

Si bien la evidencia proveniente de modelos epidemiológicos brinda información valiosa y, quizás, más directa del fenómeno de debut temprano, no siempre es posible dilucidar el peso específico que cada factor ejerce sobre el fenómeno estudiado. Los modelos experimentales en animales resultan de gran utilidad, ya que cada uno de los factores mencionados puede manipularse de manera experimental e independiente. Por ejemplo, puede controlarse el tiempo y dosis exactas de intoxicación etílica, las condiciones ambientales (e.g. condiciones de alojamiento, estrés temprano, y social), así como generar exposiciones en otras etapas del desarrollo y observar su incidencia sobre el consumo de etanol adolescente; así como analizar mecanismos neurobiológicos implicados en cada uno de los fenómenos mencionados.

La rata ha sido ampliamente utilizada como un modelo animal para el estudio de efectos del alcohol durante el desarrollo. La convención es considerar el estadio adolescente del desarrollo en esta especie a partir del día postnatal (DP) 28 hasta el 42 (criterio estrecho, véase Spear et al., 2000) o DP 60 (criterio amplio, véase McCormick & Mathews, 2014). En esta etapa los animales muestran ciertas analogías con la adolescencia en el ser humano, por ejemplo, tienen una marcada preferencia social por congéneres de su misma edad y exhiben un drástico incremento en sus conductas de riesgo, y de búsqueda de la novedad; así como también hiperfagia, hiperdipsia y procesos madurativos hormonales homólogos a los observados en humanos (véase Spear 2000; McCormick et al, 2014).

En conjunto, la información reseñada indica que el consumo de alcohol durante la adolescencia favorecería o estaría asociado al desarrollo de problemas con el alcohol. Sin embargo, la naturaleza exacta del rol del debut temprano (causal, mediador o potenciador) es aún incierto y los modelos animales disponibles para el análisis de estos fenómenos aún no han permitido arrojar plena luz sobre este fenómeno (véase Capítulo 1 para una revisión sobre este fenómeno). Más aún, ciertos factores, como la vulnerabilidad al estrés y la exposición al alcohol aún más temprana en el desarrollo podrían estar a su vez modulando la escalada del consumo de etanol en esta etapa. A la luz de estos antecedentes, el objetivo principal del presente trabajo consistió en analizar el consumo de etanol en ratas

adolescentes expuestas a la droga en la adolescencia temprana, o durante la gestación tardía. Asimismo, nos propusimos analizar cómo el consumo adolescente de alcohol es modulado por la exposición previa a estresores; así como los efectos de la exposición prenatal sobre el consumo y los mecanismos implicados en este fenómeno.

En el primer capítulo de la presente tesis, se evaluarán los efectos que tiene la exposición controlada a dosis tipo “binge” de etanol durante la adolescencia temprana sobre el consumo de etanol posterior. Este patrón de exposición tipo “binge” o intensivo implica la ingesta episódica de grandes cantidades de alcohol, alcanzando concentraciones en sangre  $\geq 80$  mg/dl (Stolle et al., 2009); es prevalente en adolescentes y está asociado a déficits en capacidades de aprendizaje y a mayores probabilidades de abuso y dependencia hacia el alcohol en la vida adulta (Courtney & Polich, 2009). Guiados por la hipótesis de debut temprano de etanol como un factor que per se aumenta el consumo posterior, se esperaba mayor consumo en animales iniciados en la adolescencia, pero no en la adultez, que en los controles no iniciados.

Una vez confirmado el fenómeno de debut temprano, nos propusimos analizar algunos factores que podrían estar impulsando al adolescente a su primer acercamiento voluntario a la droga. Entre ellos, se encuentra la exposición a la droga en períodos más tempranos en el desarrollo (i.e. exposición prenatal; Capítulo 2), (véase Spear & Molina, 2005; Abate et al, 2008). Para ello, evaluamos el consumo de etanol en adolescentes luego de una exposición de dosis moderada de etanol durante la gestación tardía. Los animales expuestos a etanol en útero consumieron más etanol en una evaluación acotada durante la adolescencia media (4 sesiones de 2 h; días postnatales 36 a 39; Experimento 1). Este fenómeno se replicó utilizando una prueba de ingesta que abarcaba casi todo el período adolescente (4 semanas de evaluación, 18 h por sesión; Experimento 2). Una vez observado que la exposición prenatal promueve el consumo étílico en la adolescencia, se analizaron posibles mecanismos subyacentes a este fenómeno. Se encontró que los adolescentes expuestos a etanol en útero presentan alteraciones en la capacidad de extinción de aprendizajes asociativos (Experimento 7a) y menor sensibilidad a los efectos aversivos del alcohol (Experimento 7b); efectos que podrían estar asociados a una hipoactividad en corteza infralímbica (Experimentos 3 y 4), área asociada a la extinción de aprendizajes que involucran reforzadores naturales y drogas de abuso (Millan et al., 2011). Dado que la



exposición prenatal puede estar generando neuroadaptaciones en el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, se analizó actividad neural en núcleo accumbens y síntesis catecolaminérgica en área tegmental ventral (Experimento 6). Los resultados del Experimento 6 sugieren ciertos cambios en este sistema como producto del alcohol prenatal.

Por último, en el capítulo 3 del presente trabajo, se indagó acerca de la implicancia que tienen diferentes estresores (i.e. aislamiento social, separación materna, estrés por inmovilización) sobre el consumo adolescente de alcohol. Todos estos estresores promovieron el consumo de etanol, si bien en diferente magnitud. Un hallazgo de importancia fue que el estrés por inmovilización (Experimento 3) promovió el consumo de etanol en adolescentes, pero en adultos.

## Objetivos

**Objetivo General:** Indagar factores de vulnerabilidad asociados al consumo de alcohol durante la adolescencia, empleando un modelo animal de rata. Específicamente, se busca analizar los efectos de la iniciación adolescente al alcohol sobre el consumo posterior de esta droga, como así también ahondar sobre factores implicados en el fenómeno de iniciación adolescente, como la exposición prenatal a la droga y la influencia del estrés.

**Objetivos Específicos:**

1. Analizar la asociación entre la iniciación adolescente al alcohol y el posterior consumo de la droga.
2. Indagar los efectos de experiencias aún más tempranas en el desarrollo –i.e. exposición etílica en etapas gestacionales; estrés temprano como resultado de negligencia materna en el cuidado de la cría- como factores que predisponen al organismo adolescente a consumir etanol.
3. Analizar los efectos del estrés como factor modulador del fenómeno de iniciación temprana.
4. Realizar comparaciones ontogenéticas entre adolescentes y adultos.
5. Analizar los substratos neurales de los fenómenos estudiados.

## Capítulo 1

### *Evaluación De La Iniciación Adolescente Al Etanol Sobre El Consumo Posterior De La Droga*

Con frecuencia, el consumo voluntario de etanol comienza en la adolescencia y es considerado -en la mayoría de los países- como un factor de riesgo importante a la hora de desarrollar problemas de uso y abuso de la droga (Anthony & Petronis, 1995; Dawson et al., 2008). En Estados Unidos, por ejemplo, el 72,3% de los adolescentes de 17 años reportan haber bebido alcohol con anterioridad, siendo que un 30% del consumo regular ocurre durante la adolescencia (Johnston et al., 2007). En Argentina, 58% de niños menores de 12 reportaron haber consumido alcohol, al menos una vez (Pilatti et al., 2013).

Sin embargo -tal como se mencionara en la introducción general- la relación entre la edad de inicio al consumo de etanol y el desarrollo de problemas posteriores con la droga aún no ha sido del todo esclarecida. Aún queda abierto el interrogante acerca de si el debut temprano es suficiente para ocasionar consumo problemático posterior de etanol; o si el inicio temprano del consumo de alcohol está siendo promovido por otros rasgos distintivos y son éstos los que, a su vez, generan problemas de uso y abuso posteriores (hipótesis del marcador, véase Chen et al., 2011). También queda abierta la posibilidad, como ya se mencionara, de que el consumo de alcohol durante la adolescencia genere deterioros a nivel del SNC, generando vulnerabilidad al desarrollo de adicciones (e.g., Guttmanova et al., 2012).

Para responder estos interrogantes los modelos experimentales en animales -particularmente, en ratas- resultan de gran utilidad, ya que la dosis y el tiempo de intoxicación con etanol pueden ser cuidadosamente controlados y modelar la condición de interés. Existe evidencia acerca de las diferencias entre adolescentes y adultos en cuanto a su respuesta inicial frente a la droga (Silveri & Spear, 1999, 2000). Los adolescentes son más sensibles a los efectos reforzantes apetitivos y a la facilitación social inducida por la droga que los adultos (Pautassi et al., 2008; Spear & Varlinskaya, 2005, 2010); pero menos sensibles a los efectos aversivos e hipnótico-sedativos de la droga, que servirían como señales para moderar o terminar el consumo de la droga (Véase Spear & Varlinskaya, 2010).

Por ejemplo, los adolescentes se recuperan más rápidamente de los efectos hipnóticos de etanol, que los adultos (Silveri & Spear, 1998). En este último estudio, se observó que los adolescentes sujetos a una dosis de 2,5 g/kg de etanol recuperan más rápido el reflejo de enderezamiento y se despiertan con mayores niveles de etanol en sangre que ratas adultas sometidas al mismo tratamiento. Por otro lado, estos autores encontraron que los adolescentes, a diferencia de los adultos, desarrollan tolerancia rápida los efectos sedativos del etanol (Silveri & Spear, 1999) y que, además, son menos sensibles a los efectos hipotérmicos inducidos por esta droga (Silveri & Spear, 2000). Además, se ha observado que los adolescentes son resistentes a desarrollar ansiedad como producto de la abstinencia aguda a etanol, efecto que sí es observable en ratas adultas (Doremus et al., 2003). Por lo tanto, puede considerarse que, las características propias de los adolescentes los harían más propensos a mostrar consumo elevado de drogas y, en particular de etanol (véase Spear, 2012).

El consumo elevado de etanol durante la adolescencia generaría, a su vez, disrupciones en el SNC, que aumentarían la vulnerabilidad a desarrollar problemas de uso y abuso de etanol (Guttmanova et al., 2012). Por ejemplo, la exposición a etanol en ratas adolescentes genera cambios a largo plazo en hipocampo que pueden asociarse a procesos de neuro-degeneración inducida por la droga (Pascual et al., 2007). Por otro lado, la exposición a dosis elevadas de etanol durante la adolescencia genera tolerancia a los efectos del etanol sobre el funcionamiento cognitivo y la impulsividad (Semenova et al., 2012). Esto implica que los animales que han sido expuestos a etanol durante la adolescencia, no sienten luego los efectos aversivos de la droga, los cuales sirven para frenar o moderar el consumo etílico. De esta manera, se vería favorecido el consumo exacerbado de etanol en animales expuestos tempranamente a la droga.

Mediante el uso de diversos protocolos de ingesta, se ha podido observar que las ratas adolescentes consumen mayores cantidades de alcohol que las adultas. Por ejemplo, en una prueba de tres vías que duró 10 días consecutivos, García Burgos y colaboradores (2009) observaron que los adolescentes consumían más etanol, medido en g/kg de peso corporal, que los adultos. En una aproximación diferente, Hargreaves y colaboradores (2009) observaron que el acceso intermitente a etanol producía un patrón de consumo de tipo intensivo en los animales adolescentes, pero no en los adultos. Adicionalmente, las

ratas adolescentes consumieron significativamente más cantidades de etanol que las adultas bajo un paradigma de consumo de soluciones endulzadas de etanol (Maldonado et al., 2008). De manera similar, se observó mayor consumo de soluciones etílicas endulzadas en adolescentes en un paradigma limitado de doble botella (Broadwater et al., 2011). Doremus y colaboradores (2005) encontraron que las ratas adolescentes evaluadas mediante pruebas de elección de doble botella consumían cantidades significativamente mayores de etanol que los adultos a lo largo de las sesiones. Adicionalmente, el consumo voluntario de etanol por parte de estos animales adolescentes parecía depender de variables contextuales, como el tipo de tubo utilizado (tubo tipo ball-point vs. punta fina o “sipper”), el contexto social y la novedad de la evaluación. El estudio de Doremus y colaboradores pone en evidencia la importancia de las variables contextuales y los procedimientos utilizados para la evaluación de consumo de etanol en roedores.

Hay algunos trabajos que han puesto en duda la importancia del inicio temprano en el consumo como factor de riesgo. Vetter y colaboradores (2007) encontraron en pruebas de ingesta a largo plazo que animales adolescentes consumían grandes cantidades de etanol pero, al convertirse en adultos, este consumo decrecía notablemente. Un efecto similar fue observado en machos adolescentes que tenían acceso a consumo de cerveza intermitentemente; si bien los adolescentes consumían más etanol que los adultos, este efecto se disipaba a medida que crecían (Hargreaves et al., 2009). En conjunto, estos estudios sugieren -en contraposición con otros reseñados previamente- que el efecto de debut temprano de etanol se dispararía con el tiempo y que no sería un factor influyente a la hora de desarrollar problemas de uso y abuso de etanol posteriormente.

Quizás sea el caso que la vulnerabilidad al consumo se derive de la interacción entre debut temprano y otros factores de riesgo. En un estudio a largo plazo de evaluación de ingesta con períodos de privación de la droga, Siegmund y colaboradores (2005) no observaron evidencias de que el inicio del consumo de alcohol en la adolescencia, predisponga a un consumo exacerbado en la adultez, ni que aumente el consumo en los períodos de receso. Sin embargo, estos investigadores hallaron un consumo aumentado cuando los adolescentes eran expuestos durante la adolescencia y, además, experimentaban estrés. El mismo efecto fue observado, además, en adolescentes hembras (Fullgrabe et al., 2007). Esto podría sugerir, en concordancia con la “hipótesis del

marcador”, que el debut temprano de alcohol podría estar influenciado por otras variables (i.e. contexto de la prueba, exposición a estrés).

Otro trabajo que provee evidencia en contra del fenómeno de iniciación temprana al etanol es el llevado a cabo por García Burgos y colaboradores (2009). En el mismo se comparaba el consumo voluntario de etanol en ratas pre-adolescentes, adolescentes y adultas, y se encontró que los animales preadolescentes consumían mayores cantidades de etanol que los adolescentes y adultos; por lo tanto, el mayor consumo de etanol observado a temprana edad, parece disiparse con el tiempo. Sin embargo, luego de un período de privación de acceso de la droga, sólo los adultos consumían grandes cantidades de etanol, en comparación con los adolescentes y pre-adolescentes. En contraposición a esto, en un estudio llevado a cabo por Maldonado y colaboradores (2010) la exposición a altas dosis de etanol (5 g/kg i.p.) durante la adolescencia, pero no durante la adultez, aumentó el consumo posterior de etanol. En un trabajo más reciente, se encontró que los animales que fueron iniciados durante la adolescencia mediante autoadministración operante, consumían más etanol que adolescentes no iniciados; sin embargo, este fenómeno no se observaba cuando la iniciación se realizaba vía intraperitoneal (Gilpin et al., 2012). Este consumo voluntario, ocurría luego de una fase en la que se generaba dependencia hacia etanol mediante inhalación de vapor y los animales ya se encontraban en la edad adulta, por lo que los parámetros aquí utilizados no son comparables con modelos en los cuales no se pretende generar de manera forzada la dependencia hacia etanol, entre los que se incluye el presente trabajo. En otro estudio (Truxell et al., 2007), donde se compara el consumo de adolescentes y adultos iniciados a etanol a través de la técnica de consumo desde el piso (COF por sus siglas en inglés), se encontró que los adolescentes consumían mayores cantidades de etanol que los adultos. Broadwater y colaboradores (2011) observaron el efecto de debut temprano al etanol cuando los adolescentes se auto-administraban etanol vía operante (Broadwater et al., 2012) pero no cuando eran administrados de manera intermitente (día de por medio) con dosis de 4.0 g/kg i.p. Estos estudios parecen sugerir que la elección de dosis y ruta de administración juega un papel importante en el establecimiento de la preferencia hacia el etanol. Al parecer la autoadministración de etanol es más efectiva que la administración forzada para inducir facilitación del consumo posterior de la droga. Las inyecciones intraperitoneales

podrían ser consideradas como un estímulo que esté estableciendo condicionamiento aversivo, tal como se observó en el trabajo de Gilpin y colaboradores (2012). Algunos mecanismos que podrían estar explicando esto, por un lado, podría deberse a la estimulación nociceptiva como producto de la administración (i.e. el pinchazo y la irritación periférica de la i.p.); por otro lado, la administración intraperitoneal genera una intoxicación muy rápida, en cuestión de segundos si la dosis es muy alta. En relación a esto último, Hunt y Amit (1987) postularon que la rápida transición de sobrio a intoxicado puede representar un estímulo capaz de generar un condicionamiento de tipo aversivo.

Las variabilidad entre los diferentes estudios pueden deberse también a las diferencias en los parámetros utilizados a la hora de evaluar el consumo y la iniciación al etanol. Si bien, como acabamos de ver, el consumo voluntario o autoadministración parece ser más efectivo como método de iniciación (i.e., para inducir facilitación del consumo), tiene la limitante de que cada animal regula su consumo, lo que hace imposible controlar el nivel de la intoxicación. Por lo tanto, los resultados se confunden debido a la variabilidad en el consumo de los animales adolescentes y adultos (i.e., podría ser posible que los efectos promotores de la iniciación se restrinjan a los adolescentes simplemente porque estos toman más etanol). Otra limitante consiste en el uso de fases de iniciación al etanol muy extensas que obligan a que la evaluación final de consumo de etanol ocurra pasada la adolescencia, por lo que se confunden efectos de iniciación con cambios ontogenéticos en el consumo de la droga. El abordaje experimental descrito en este capítulo permite superar algunas de estas limitaciones. Específicamente, se evaluará el consumo de etanol en adolescentes y adultos iniciados de manera controlada (i.e. administración intragástrica) e intermitente; además, tanto la iniciación como la evaluación de consumo tendrán lugar dentro de la misma adolescencia para, así, compararla con el consumo de los adultos.

La hipótesis que subyace en este trabajo indica que los adolescentes consumirán más etanol que los adultos, y que esta diferencia se exacerbará en aquellos grupos pre-expuestos a la droga de manera pasiva vía intragástrica; es decir, que el hecho de administrar etanol a los adolescentes conllevará un aumento en el consumo étlico y que esto no se observará cuando los animales son administrados con la droga en la adultez. La vía de administración elegida, según la experiencia en el laboratorio, minimiza el estrés, a la vez que garantiza el control de la dosis administrada. Para cumplir este objetivo, en el

Experimento 1 se evaluó el patrón de consumo en adolescentes que habían sido expuestos a etanol de manera pasiva e intermitente, durante 4 días consecutivos, así como luego de un período de receso. Además, se midió la actividad locomotora inducida por el etanol durante la iniciación pasiva. Se encontró que el consumo de etanol en animales adolescentes iniciados a la droga aumentó luego de un período de receso, y que la iniciación al etanol no alteraba los patrones de actividad locomotora inducida por etanol.

En el Experimento 2 se replicó este fenómeno de mayor consumo etílico luego de un período de receso, con otra cepa de animales. Posteriormente, y para analizar si el efecto de debut temprano es privativo de la adolescencia, se realizó el mismo experimento en adultos (Experimento 3). En los adultos no se observó un aumento del consumo de etanol luego del receso. Dado que el período de receso de etanol, posiblemente, genere ansiedad como producto de la retirada de la droga, se llevaron a cabo en ambos experimentos (i.e. Experimento 2 y 3) evaluaciones en la prueba de luz/oscuridad el primer y último día de receso (véase introducción Experimento 2). Los resultados provenientes de esta prueba no arrojaron evidencia de ansiedad incrementada en adolescentes o adultos como producto del período de receso de alcohol.



## *Materiales y Procedimientos Generales*

### *Sujetos*

En el Experimento 1 se utilizaron ratas Wistar (WKAH/Hok) endocriadas. Para los Experimentos 2 y 3, debido a cambios de producción en nuestro proveedor en el bioterio del INIMEC-CONICET, se utilizaron ratas Wistar exocriadas. Debido a este cambio, se consideró necesario replicar los hallazgos del Experimento 1 en la cepa exocriada (véase Experimento 2).

Los animales nacieron y se criaron en el bioterio del INIMEC-CONICET bajo condiciones estándares de laboratorio hasta el momento de su utilización. El bioterio contó con condiciones controladas de temperatura (22-24°C) y luz artificial (ciclo luz-oscuridad 12:12 h con luces encendiéndose a las 08:00 h). Los nacimientos fueron examinados diariamente, considerándose el día de parto como día postnatal 0 (DP 0). Se realizó el raleo de las camadas al día postnatal (DP)1 y el destete al DP21. Luego del destete, los animales se alojaron en grupos de a cuatro por sexo, hasta el comienzo de los experimentos, en los que fueron alojados de a pares, de acuerdo con su condición experimental.

### *Administración de etanol (i.e. fase de iniciación)*

Para la administración de etanol o vehículo, los animales fueron intubados vía intragástrica mediante una cánula de polietileno (P50; Clay Adams) por la cavidad oral hasta el estómago del animal (aprox. 7 cm). La cánula se encontraba adosada a una jeringa de 3 ml con aguja 23 G que contenía una solución de 21% de etanol (Porta Hnos., Argentina; dosis: 2,5 g/kg) o vehículo (agua de pico) según la condición experimental.

### *Prueba de Locomoción (Experimento 1)*

Los animales fueron evaluados en una caja de medición de actividad (50 cm x 50 cm x 50 cm), equipada con sensores que permiten medir la distancia recorrida (cm) durante 5 min (ITCOMM, Córdoba). El animal era colocado en el centro de la recámara y la distancia recorrida era registrada en una computadora conectada al equipo.

### *Prueba de Ingesta de doble botella*

La evaluación de ingesta, en los Experimentos 1 a 3, consistió en una prueba de consumo de doble botella de 24 h. Las botellas contenían agua vs etanol 5,6% en una solución de 1% sacarosa y fueron cambiadas diariamente de posición para evitar

preferencias de lateralidad. Dado que muchas cepas heterogéneas de ratas –notablemente la Wistar- no son propensas a consumir soluciones alcohólicas sin endulzar (Spanagel, 2000), se decidió utilizar el etanol ligeramente endulzado para facilitar el acercamiento a la droga; la solución utilizada (i.e. 5,6% etanol en 1% sacarosa) fue elegida en base a literatura previa que también había examinado los efectos de iniciación temprana al etanol (Maldonado et al., 2008). Los animales adolescentes -Experimentos 1 y 2- permanecieron alojados individualmente en una caja estándar de alojamiento (30 x 20 x 42,5 cm) con un separador de alto impacto (27,5 x 18,5 cm) que las dividía, dejando un espacio de 27 x 18,5 x 20 cm en cada compartimento. Cada animal permanecía en una mitad de las cajas. Las cajas de alojamiento de los adultos -Experimento 3- medían 33,5 x 22 x 56 cm para que la relación entre la superficie de la misma y el tamaño del animal sea equiparable a la utilizada con los adolescentes. Se utilizaron rejas especiales con comedero en cada extremo. De esta manera, se podían colocar las botellas (sistema ballpoint) y la comida en cada compartimento fuera de la caja. Esto minimizó los riesgos de rotura de las botellas, así como los posibles errores de medición debido al roce de las mismas por parte del animal.

El consumo de etanol (g/kg) y agua (ml) se calculó pesando diariamente las botellas (balanza OHAUS traveller, 0,01 g de precisión,) y restando a este dato el promedio resultante de la medición diaria del peso de botellas en una caja control sin animales (control de pérdida). La cantidad de comida (g/kg) consumida se pesó con el objeto de controlar la posibilidad de que las diferencias de consumo de etanol se deban a hiperfagia.

Además, se tuvo en cuenta el consumo de agua/100 g durante la fase de re-exposición, de manera de controlar que el consumo de etanol no se deba a polidipsia.

#### *Prueba de luz oscuridad (Experimentos 2 y 3)*

La prueba de luz/oscuridad permite evaluar la actividad locomotora espontánea del animal en respuesta a estímulos aversivos. En la misma se pone al animal en conflicto entre su habilidad innata para explorar y la aversión natural que tienen los roedores por los ambientes espaciosos e iluminados (Bourin, 2003). Esta prueba permite al animal elegir entre un ambiente seguro y oscuro y uno iluminado e inseguro (por ser espacioso). Se empleó una caja de alto impacto (42 X 25 x 25 cm), que se encontraba subdividida en un compartimento pintado de negro (17.5 x 25 x 25 cm) y un compartimento pintado de

blanco (24,5 x 25 x 25 cm), ambos separados por una pared con una apertura a nivel del piso (6,5 cm X 6,5 cm). Del lado del compartimento oscuro y a 15 cm del extremo de la pared, se colocó una luz roja (25 W). Del lado del compartimento blanco, y a 15 cm, se colocó una luz fría (26 W). Cada animal fue colocado en el centro del compartimento oscuro al comenzar la evaluación. Se midió la latencia en pasar al compartimento blanco, así como el tiempo en que permaneció en cada compartimento y la frecuencia de cruces. En esta evaluación, se consideró la latencia a explorar el lado iluminado, así como el tiempo de permanencia en lado blanco y cruces hacia este compartimento, como una medida de comportamiento de tipo ansioso (Bourin et al., 2007).

Los fundamentos teóricos para la elección de cada una de las pruebas aquí descritas serán ampliados en mayor detalle en la introducción de los experimentos correspondientes.

## Diseños Experimentales y Análisis de Datos

**Experimento 1:** El objetivo del experimento fue evaluar patrones de consumo de etanol en adolescentes que habían sido iniciados a dosis moderadas de etanol (administración de 2,5 g/kg i.g) en 5, 2 o ninguna ocasión (grupos crónico, acotado y control, respectivamente). El presente experimento respondió a un diseño bifactorial con 3 niveles [iniciación (crónico, acotado o control)] x 2 niveles [sexo (machos o hembras)]. La particularidad de cada grupo experimental será detallada en la sección materiales y métodos correspondientes al Experimento 1. Los 5 grupos finales tenían entre 11 y 13 sujetos cada uno. Para las evaluaciones de actividad locomotora durante la fase de iniciación/administración de etanol, se llevó a cabo un ANOVA de medidas repetidas donde los factores independientes eran la iniciación y el sexo, la variable dependiente la distancia recorrida (cm) y los factores intrasujetos las 3 evaluaciones de actividad, realizadas al inicio, intermedio y final de la fase de iniciación.

Para la evaluación de Ingesta, se llevó a cabo un ANOVA de medidas repetidas para cada variable dependiente bajo análisis (gramos absolutos de alcohol consumido (g/kg), porcentaje de preferencia por etanol, consumo de agua [ml/100g], y g/kg consumidos de comida) tomando la iniciación y el sexo como factores independientes y las sesiones de ingesta de la fase de adquisición de ingesta (4 sesiones, véase Figura 1) como medidas intrasujetos. Para el consumo de etanol luego de la fase de receso (i.e. fase de re-exposición) se realizó un ANOVA factorial con iniciación como factor entre grupos.

Además, se llevaron a cabo análisis de correlaciones de Pearson entre los puntajes totales de actividad locomotora y los puntajes de ingesta para cada sesión (g/kg).

**Experimentos 2 y 3:** ambos responden al mismo diseño, tomando los mismos grupos experimentales que en el experimento anterior (i.e. crónico, acotado, control; esto es, animales con 5, 2 o ninguna exposición al alcohol durante la fase de iniciación) en ratas macho adolescentes (Experimento 2; grupos entre 10 y 12 sujetos por grupo) o adultos (Experimento 3; grupos entre 10 y 12 sujetos por grupo). Se agregó un grupo no tratado (NT) durante la iniciación, para evaluar el consumo de sacarosa a lo largo de las sesiones y como control adicional para las pruebas de luz/oscuridad. Para evaluar el consumo de

sacarosa en la primer sesión (véase materiales y métodos), se llevó a cabo un ANOVA factorial tomando como factores independientes la iniciación (crónico, acotado, control o NT) y como variable dependiente el consumo de sacarosa (ml/100g de peso corporal).

Para la evaluación de la fase de adquisición se llevó a cabo un ANOVA de medidas repetidas para cada variable dependiente por separado (g/kg de etanol consumidos, ml/100g de consumo de agua y porcentaje de preferencia) tomando la iniciación como factores independientes (i.e. crónico, acotado, control) y las 4 sesiones como factores intrasujetos. Al igual que en el Experimento 1, se analizaron estas variables dependientes en la fase de re-exposición mediante un ANOVA (factores independientes: iniciación; factores dependientes: g/kg consumidos, ml/100 g de vehículo, porcentaje de preferencia).

Para las evaluaciones de luz/oscuridad, se llevó a cabo un ANOVA de medidas repetidas para cada variable dependiente por separado (latencia en cruzar al compartimento blanco, cruces hacia el compartimento blanco y tiempo pasado en el compartimento blanco), tomando como factores independientes la iniciación (i.e. crónico, acotado, control y NT) y como medidas intrasujeto las 2 evaluaciones de luz/oscuridad (véase Figura 4). Además, se llevaron a cabo análisis de correlaciones de Pearson entre cada una de las variables dependientes mencionadas y los puntajes obtenidos para g/kg de etanol en la ingesta.

En todos los casos en que los ANOVAs arrojasen efectos estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) principales o interactivos entre factores entre-sujetos, el locus de este efecto fue analizado mediante análisis post-hoc de Tukey. En los casos de efectos estadísticamente significativos que involucraron medidas repetidas, se llevaron a cabo comparaciones planeadas. Este procedimiento se fundamenta en que no existe consenso acerca de cuál es la mejor prueba a posteriori de ANOVAs que arrojan interacciones entre factores entre y dentro. Específicamente, se ha sugerido que en estas ocasiones ninguno de los post-hoc disponibles maneja adecuadamente el error tipo I (Winer et al., 1991). Así entonces, entendemos que las comparaciones planeadas ofrecen -para este caso particular- un compromiso adecuado entre potencia y confiabilidad.

**Experimento 1:** evaluación de consumo de etanol en ratas adolescentes luego de diferentes modalidades de exposición al etanol durante esta etapa.

El objetivo fue evaluar patrones de consumo en adolescentes iniciados al etanol. Específicamente, se evaluó el consumo étílico inmediatamente después de un tratamiento de iniciación forzada a la droga, así como también luego de un período de privación de la droga (García-Burgos et al., 2009). El procedimiento de ingesta de alcohol utilizado posee analogías con el modelo utilizado por Spanagel (2000), donde fases de autoadministración de alcohol son separadas por períodos de privación de la droga. En ese modelo, los animales muestran un incremento en el consumo de alcohol y una propensión a preferir soluciones más concentradas, luego del período de privación de alcohol. Se ha sugerido que estos modelos de ingesta post-privación modelarían, al menos parcialmente, los fenómenos de búsqueda por la droga (craving) y recaída luego de la abstinencia, que son observados comúnmente en humanos (Spanagel et al., 1999). El utilizar una versión abreviada de este modelo -el modelo original es un proceso a largo plazo con sucesivas re-exposiciones que puede insumir hasta 6 meses- permitió observar si el consumo de etanol durante la adolescencia se ve incrementado luego de alguna de las modalidades de iniciación y, en particular, luego de una fase de privación de la droga. La hipótesis del presente experimento es que los animales iniciados a etanol durante la adolescencia consumirían mayores cantidades de etanol que los no iniciados.

Como medida adicional, se midió la actividad locomotora de los animales durante la fase de iniciación (3 mediciones; DP 28, 32 y 36). La prueba de locomoción es utilizada para evaluar los efectos estimulantes de drogas de abuso, que se teoriza presentan analogías con mecanismos biológicos del reforzamiento positivo (Wise & Bozarth, 1987). Estos últimos autores postulan que las drogas de abuso, en tanto reforzadores positivos, dispararían conductas de búsqueda (i.e. locomoción o actividad psicomotora); por lo tanto, a mayor actividad locomotora inducida por una droga (e.g. etanol), mayor sería su capacidad estimulante apetitiva. Es por ello que esta prueba ha sido presentada en la literatura de psicobiología del desarrollo como una medida indirecta de los efectos apetitivos inducidos por etanol en adolescentes (Acevedo et al., 2012) e infantes (Arias et al., 2009). La razón subyacente para utilizar esta prueba en el presente trabajo fue evaluar

la sensibilidad a la respuesta aguda frente a la droga que pudiera explicar los posteriores efectos de la iniciación sobre el consumo. Adicionalmente, las mediciones secuenciales motoras permitían evaluar el potencial desarrollo de tolerancia o sensibilización a los efectos motores de la droga (véase Faria et al., 2008). La sensibilización consiste en un aumento del efecto estimulante de una droga, luego de administraciones repetidas (Robinson & Becker, 1986) y se ha postulado que es un elemento clave en el fenómeno de adicción a drogas (Hunt & Lands, 1992; Robinson & Berridge, 1993).

#### Procedimientos

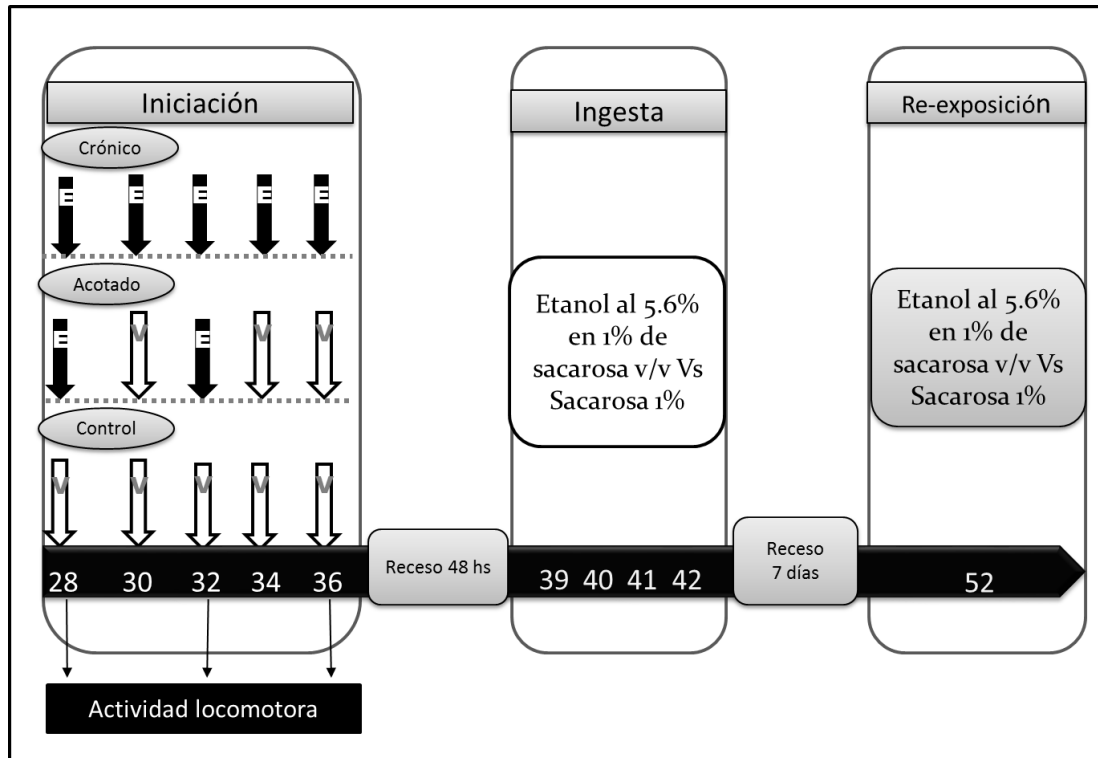
Se utilizaron 40 ratas Wistar (WKAH/Hok) endocriadas adolescentes machos y hembras provenientes de 8 camadas. La estrategia experimental constó de dos fases: fase de iniciación y fase de ingesta. Durante la fase de iniciación, los animales recibieron etanol (2,5 g/kg, i.g.) los DP 28, 30, 32, 34 y 36 (grupo crónico) o los DP 28 y 32 (grupo acotado). Con el objeto de equiparar la manipulación experimental, este último grupo recibió administraciones de vehículo (0,0 g/kg) los DP 30, 34 y 36. El grupo control, en tanto, fue administrado con vehículo (i.e., 0,0 g/kg) los DP 28, 30, 32, 34 y 36. La Figura 1 describe los diferentes grupos de una manera gráfica.

En los DP 28, 30 y 32 todos los sujetos recibieron la administración intragástrica correspondiente y luego fueron evaluados en su actividad motora en campo abierto durante cinco min.

En los DP 28, 30 y 32 los sujetos recibieron la administración intragástrica correspondiente y luego fueron evaluados en su actividad motora en campo abierto durante cinco min. El resto de los días recibían las administraciones correspondientes y retornaban a sus cajas hogar.

La fase de ingesta se subdividió, a su vez, en a) fase de adquisición, b) fase de receso de alcohol y c) fase de re-exposición (Figura 1). La fase de adquisición constó en una evaluación de doble botella con sesiones de 24 h durante 4 días consecutivos (DP 39-42). Durante esta fase y con el objeto de reducir el estrés inducido por el aislamiento, se permitió que los animales interactúen una vez por día con congéneres pertenecientes a la misma condición experimental. Durante el pesaje de botellas y comida, los animales eran puestos a interactuar en una caja una caja estándar de alojamiento.

Luego del período de adquisición, siguió un periodo de privación de alcohol de 7 días (DP 42-51), en el cual los animales fueron alojados en grupos de 4, cada vez que fue posible, de acuerdo a cómo fueron alojados en la fase de iniciación. Luego de este período, se evaluó el consumo (re-exposición) de la droga al DP52, siguiendo los parámetros explicados para la fase de adquisición.



**Figura 1.** Procedimientos experimentales para el Experimento 1. Fase de iniciación (panel izquierdo) para grupos crónico, acotado y control, donde las flechas rellenas representan administraciones intragástricas (i.g.) de 2,5 g/kg de etanol y las flechas blancas representan administración i.g. de vehículo (0,0 g/kg). La fase de ingesta corresponde a pruebas de doble botella durante 24 h. Las evaluaciones de actividad locomotora corresponden a los días postnatales 28, 32 y 36.

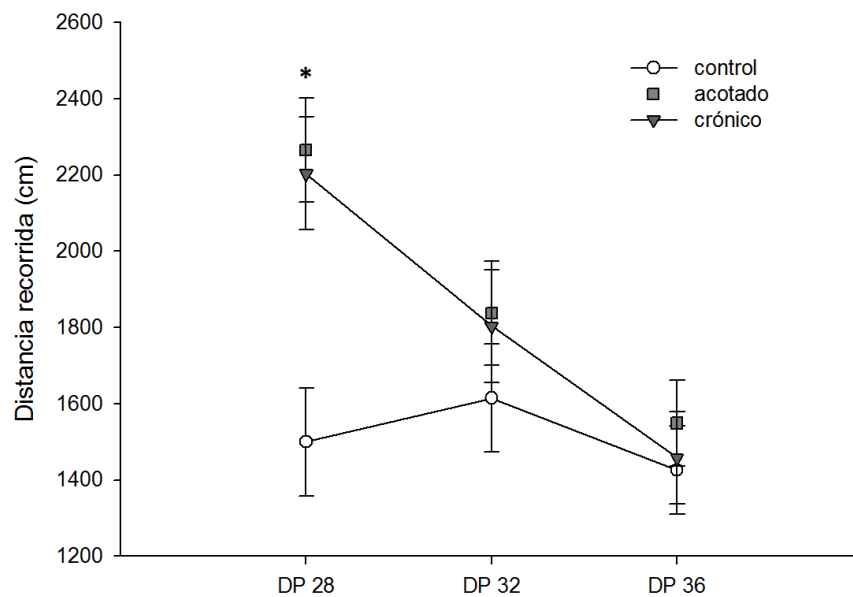
## Resultados y Conclusión

La administración de etanol indujo un incremento significativo en la actividad motora [efecto principal de iniciación  $F_{(2, 36)}=6,65$ ,  $p<0,01$ ], tal como indicó el ANOVA de medidas repetidas. Los análisis post-hoc de Tukey indican que los grupos expuestos a etanol presentan mayor actividad locomotora que el control administrado con vehículo. Además se observó un efecto principal de día de evaluación [ $F_{(2, 72)}=10,97$ ,  $p<0,01$ ]. Los análisis post-hoc de Tukey indican que la distancia recorrida fue significativamente menor en la sesión 3 (DP36) que en el resto de las sesiones. En la Figura 2 se ilustran las medias y EEM de distancia recorrida para cada grupo por sesión. La interacción entre iniciación y los días de



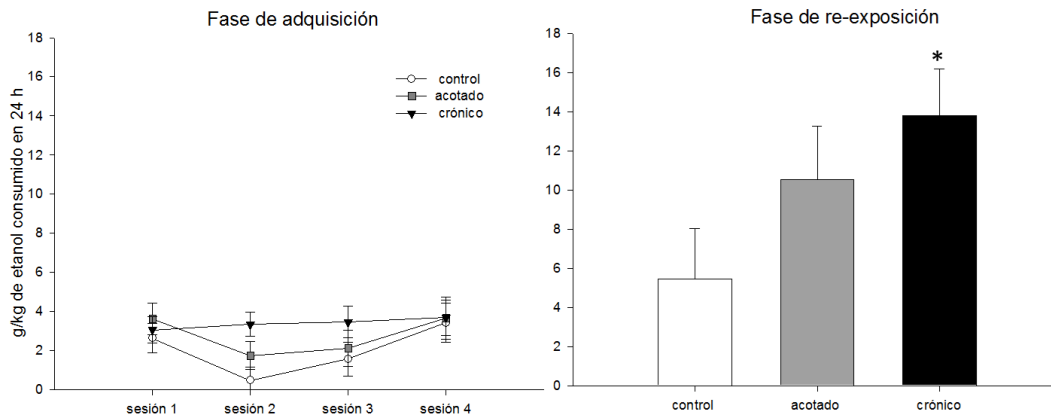
evaluación mostró una tendencia a ser significativa [ $F_{(4, 72)}=2,26, p=0,07$ ]. En la Figura 2 puede observarse que los grupos que fueron expuestos a etanol durante la primera sesión (DP 28) presentan mayor actividad locomotora con respecto al control, que no recibió etanol. Este efecto activador de la droga ya no se encuentra presente en las subsiguientes evaluaciones.

La hipótesis de encontrar una asociación entre los puntajes de activación motora y la ingesta de alcohol no recibió respaldo de los datos. Específicamente, no se observaron correlaciones significativas entre la distancia recorrida durante la iniciación y la ingesta. La ausencia de sensibilización motora es consistente con trabajos previos que indican que dicho fenómeno rara vez (pero véase Hoshaw & Lewis, 2001) se observa en ratas, y nuestra expectativa de que el uso de ratas adolescentes facilitara la expresión de sensibilización no se vio cumplida. Por otro lado, y no menos importante, en el presente experimento el grupo intermitente (5 administraciones) experimentó los efectos del etanol a veces en el campo abierto donde tenía lugar la prueba de actividad locomotora, pero otras veces sólo en su caja-hogar. La sensibilización al alcohol es altamente dependiente de claves contextuales; por lo tanto, este cambio de contexto pudo haber estado relacionado con el hecho de que no se observara este fenómeno de sensibilización. Sin embargo, un estudio llevado a cabo por Faria y colaboradores (2008) encontró -si bien en ratones- que los adultos, pero no los adolescentes, presentaban sensibilización dependiente del contexto. Por lo tanto, es posible que este fenómeno no pueda observarse durante la adolescencia. Otra posibilidad, es que la dosis utilizada (i.e. 2,5 g/kg) sea muy elevada para generar sensibilización, ya que cuando este fenómeno fue reportado en ratas (Hoshaw & Lewis, 2001), la dosis fue de 1,0 g/kg y, además, la vía de administración era diferente a la utilizada en este experimento (intraperitoneal vs intragástrica). En cuanto a la caída de la actividad motora inducida por etanol observada en la sesión 2 y 3, podría estar indicando la presencia de tolerancia a los efectos activadores de etanol. Nuevamente, dado que las administraciones de etanol no se dieron siempre en el contexto de la prueba de actividad locomotora, no es posible categorizar esta caída en la actividad locomotora como tolerancia a los efectos estimulantes de esta droga.



**Figura 2.** Distancia recorrida (cm) por animales iniciados al etanol de manera intermitente con 2 (acotado; n=10), 5 (crónico n=10) o 0 (control n=12) exposiciones a etanol (dosis 2,5 g/kg intragástrica). Los animales fueron evaluados en su actividad locomotora (distancia recorrida en cm) los días postnatales (DP) 28, 32 y 36. Se observó un efecto activador del etanol en la primer sesión (como denota el \*; efectos principales de iniciación y sesión, ambos  $p < 0,01$ , ANOVA de medidas repetidas), el cual se disipa en las sesiones subsiguientes. El factor sexo no arrojó efectos estadísticamente significativos, por lo que se presentan las medias colapsadas por este factor. Las barras indican EEM.

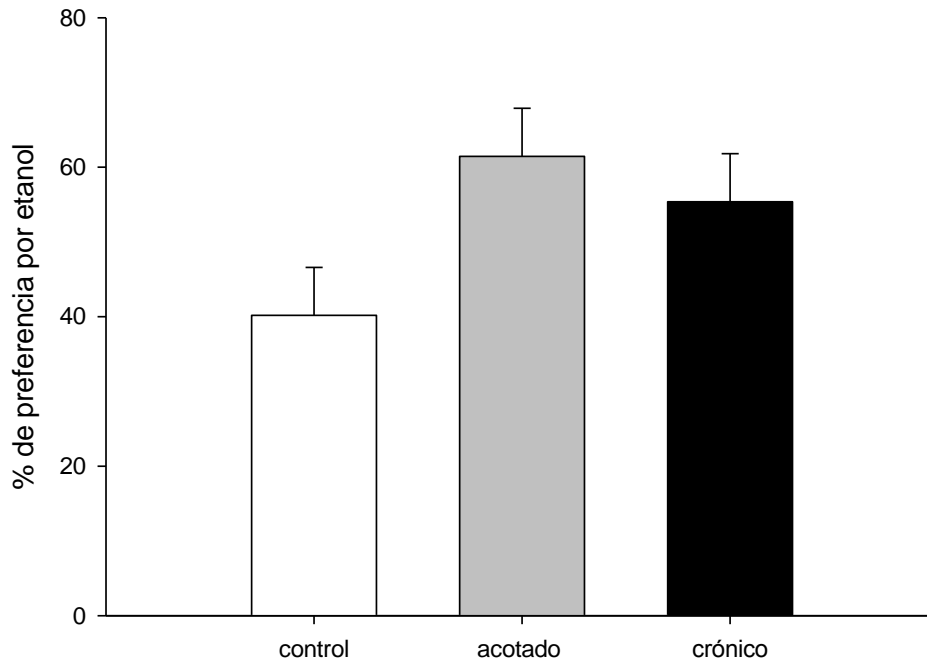
Los g/kg de etanol consumidos durante la fase de ingesta se presentan en la Figura 3. Los ANOVAs de medidas repetidas para la fase de adquisición (4 sesiones) no arrojaron diferencias significativas para g/kg consumidos, porcentaje de preferencia ni consumo de vehículo. En cuanto al consumo de comida, se observaron diferencias en la fase de adquisición para los factores sexo [ $F_{(1, 29)}=7,74$ ,  $p < 0,01$ ] y sesión [ $F_{(3, 87)}=21,73$ ,  $p < 0,01$ ]. De acuerdo con los análisis post-hoc de Tukey, los machos consumen significativamente más comida que las hembras; además, se observó un aumento significativo en el consumo de comida en las Sesiones 3 y 4. Las medias y EEM del consumo de comida para machos y hembras fueron  $1,51 \pm 0,06$  y  $1,25 \pm 0,070$ , respectivamente. Las medias y EEM del consumo de comida por sesión fueron  $1,23 \pm 0,05$ ,  $1,30 \pm 0,052$ ,  $1,45 \pm 0,06$  y  $1,53 \pm 0,056$ .



**Figura 3.** Consumo de etanol (g/kg) de animales iniciados a la droga de manera intermitente con 2 (acotado), 5 (crónico) o 0 (control) exposiciones a etanol, durante la fase de adquisición (panel izquierdo; 4 sesiones) y la fase de re-exposición luego de un período de receso de 7 días (panel derecho; fase de re-exposición). Los animales fueron administrados con etanol (dosis 2,5 g/kg i.g.) o vehículo, de acuerdo a la condición experimental, durante los días postnatales 28, 30, 32, 34 y 36. Se muestran las medias y EEM (barras verticales) de los animales colapsados por sexo, ya que este factor no arrojó diferencias estadísticamente significativas. El asterisco (\*) denota diferencia significativa ( $p < 0,05$  ANOVA factorial) entre el grupo crónico y control en la fase de re-exposición. No se observaron diferencias significativas durante la fase de adquisición.

El ANOVA factorial para g/kg de etanol consumidos en la sesión de re-exposición indicó un efecto principal de iniciación al alcohol [ $F_{(2, 30)}=3,69$ ,  $p < 0,05$ ]. De acuerdo con el análisis post-hoc de Tukey, el consumo de alcohol durante esta fase fue significativamente más elevado en el grupo de exposición crónica que en el control, mientras que el grupo acotado no difirió de ninguno de los dos grupos mencionados. El ANOVA factorial para porcentaje de preferencia en la fase de re-exposición, indicó una tendencia a la significación [ $F_{(2, 30)}=2,91$ ,  $p=0,070$ ] (véase la Figura 4). Por otro lado, se consideró el consumo de agua controlado por el peso del animal (ml/100g) en el día de re-exposición (DP 52); el cual no arrojó diferencias significativas entre los grupos considerados. En cuanto al consumo de comida durante la fase de re-exposición, el ANOVA factorial indicó un efecto de iniciación [ $F_{(2, 30)}=3,69$ ,  $p < 0,05$ ], donde los animales pertenecientes al grupo crónico consumen mayor cantidad de comida que el control.

En conclusión, este experimento indica que una mínima iniciación a la droga al inicio de la adolescencia induce un aumento significativo en el consumo de la droga, en términos de gramos por kilogramo de peso corporal, luego de un período de privación de 7 días.



**Figura 4.** Porcentaje de preferencia por etanol de animales iniciados a la droga de manera intermitente con 2 (acotado), 5 (crónico) o 0 (control) exposiciones a etanol durante la fase de re-exposición luego de un período de receso de 7 días. Los animales fueron administrados con etanol (dosis 2,5 g/kg intragástrica) o vehículo, de acuerdo a la condición experimental, durante los días postnatales 28, 30, 32, 34 y 36. Se muestran las medias y EEM (barras verticales). Se observó un efecto cercano a la significación estadística ( $p=0,70$ ; Anova de medidas repetidas).

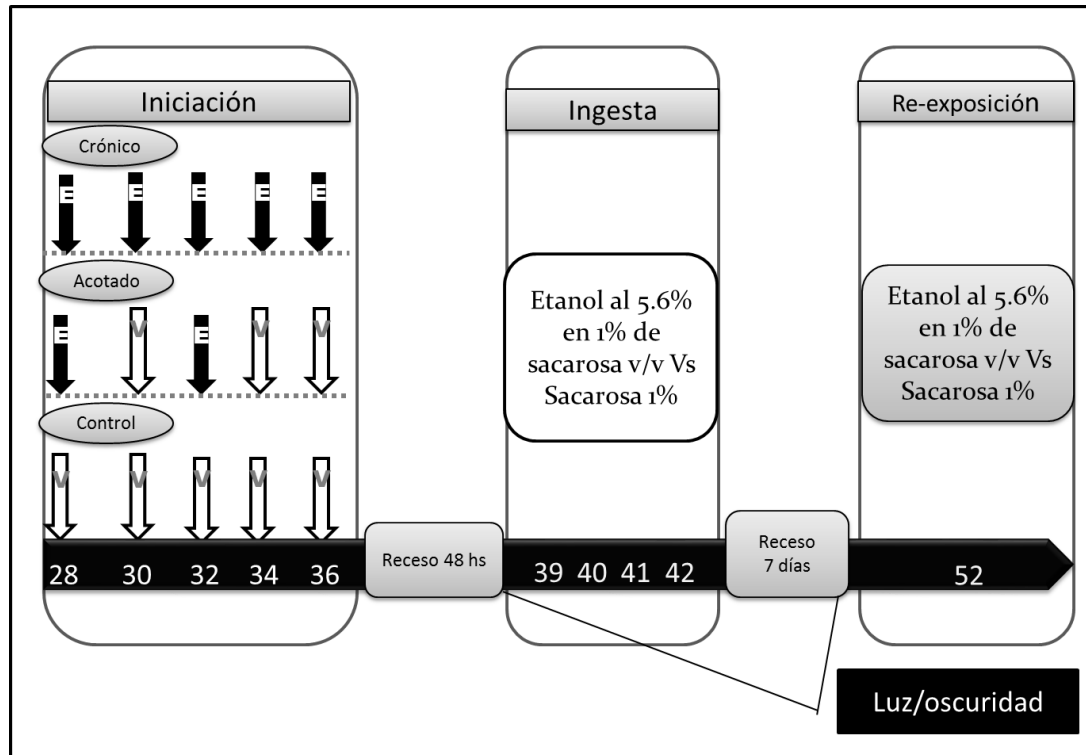
### Experimento 2: Replicación de consumo de etanol en ratas adolescentes, luego de una breve exposición previa a la droga.

El objetivo principal del presente experimento fue replicar el fenómeno observado anteriormente, de facilitación del consumo de alcohol post-receso en animales adolescentes que habían sido iniciados pasivamente al consumo de alcohol. Por un lado, el proceso de replicación aumenta significativamente la confiabilidad de los resultados. Por otra parte, en este caso esta necesidad se amplificó debido al cambio en la cepa utilizada (de endo a exocriada), tal como se explicó en el apartado de procedimientos generales.

Además se determinó, mediante la evaluación en el laberinto de transición luz/oscuridad, si los animales presentaban ansiedad durante el período de privación de alcohol. Es posible que, como fuera sugerido en otros estudios (Spanagel, 2000; Becker & Lopez, 2004; Siegmund et al., 2005; Füllgrabe et al., 2007) que observaron incrementos en el consumo de alcohol post-receso; que el mismo estuviera impulsado por un aumento en la ansiedad. La expectativa era replicar, en esta nueva cepa, el mayor consumo de etanol luego del período de receso de etanol en los animales adolescentes iniciados y que este aumento del consumo etílico correlacionara con mayor ansiedad en estos animales, con respecto a sus controles. Dada la ausencia de resultados significativos en el experimento anterior, no se realizó evaluación de actividad locomotora.

#### *Procedimientos*

Se utilizaron 29 ratas Wistar exocriadas adolescentes macho de 28 días al inicio del experimento y se utilizaron los mismo grupos del Experimento 1 (i.e. crónico, acotado, control). Se eligió trabajar con un sólo sexo, debido a que en el experimento anterior el factor sexo no arrojó efectos significativos. Los animales permanecían alojados de a pares de acuerdo a su condición. El experimento constó de una fase de iniciación y una fase de ingesta. Durante la iniciación los animales recibieron etanol (2,5 g/kg, i.g.) los DPs 28, 30, 32, 34, 36 (grupo crónico); o los DPs 28, 32 (grupo acotado). Con el objeto de equiparar la manipulación experimental, este último grupo recibió administraciones de vehículo (0,0 g/kg) los DPs 30, 34 y 36. El grupo control, en tanto, fue administrado con vehículo (i.e. 0,0 g/kg) equiparando las 5 administraciones que recibe el resto de los animales. Además, se agregó un grupo control adicional (grupo NT) que no recibió administración i.g. alguna; este grupo es particularmente importante a la hora de analizar los resultados de las pruebas de luz/oscuridad, de manera de poder observar si existe habituación a la caja de evaluación. La Figura 5 describe los diferentes grupos de una manera gráfica.



**Figura 5.** Protocolo experimental. Fase de iniciación (panel izquierdo) para grupos crónico, acotado y control, donde las flechas rellenas representan administraciones i.g. de 2,5 g/kg de etanol y las flechas blancas representan administración i.g. de vehículo (0,0 g/kg). La fase de ingesta corresponde a pruebas de doble botella durante 24 h. Las evaluaciones de luz/oscuridad corresponden a los DPs 38 y 50.

El DP 37 -justo después de la fase de iniciación y antes del comienzo de los procedimientos de ingesta- los animales se alojaron individualmente y se les presentó una botella con sacarosa al 1% vs una botella con agua. Este procedimiento nos permitió evaluar si los efectos promotores del consumo etílico en la prueba de ingesta son específicos para el alcohol o si se generalizan a otros reforzadores como la sacarosa. Esto es importante ya que el vehículo utilizado en las soluciones de etanol en la prueba de ingesta es sacarosa. Además, el grupo no tratado (NT) permaneció durante la fase de ingesta recibiendo 1% sacarosa vs agua; de esta manera, el diseño cuenta con un grupo que no tiene contacto con el etanol durante todo el experimento. Esto nos permitió observar si la facilitación en el consumo de etanol, que se observa luego de la de re-exposición, puede generalizarse a otros reforzadores como la sacarosa.

De manera similar al experimento previo, la fase de ingesta se subdividió en: a) fase de adquisición, b) fase de privación de alcohol, y c) fase de re-exposición (véase Figura 5). La fase de adquisición consistió en una evaluación de doble botella con sesiones de 24 h durante 4 días consecutivos (DPs 39-42) Durante esta fase de adquisición y con el objeto

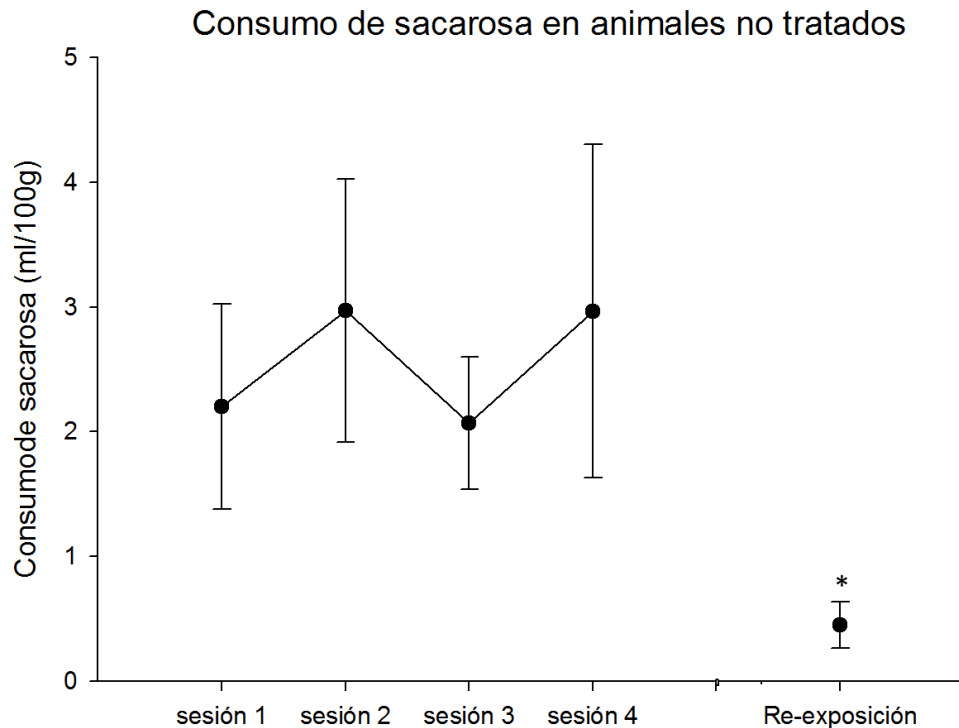
de reducir el estrés inducido por el aislamiento, se permitía que los animales interactúen una vez por día, a razón de una hora diaria aproximadamente, con los congéneres con los que fueron alojados durante la fase de iniciación.

Luego del período de adquisición, siguió un periodo de receso de alcohol de 7 días (DPs 42-51), en el cual los animales fueron re-alojados de a pares con los mismos congéneres de la fase de iniciación. Luego de este período, se evaluó el consumo (re-exposición) de la droga, siguiendo los parámetros explicados para la fase de adquisición.

Los DP 36 y 48 los animales fueron sometidos a una evaluación de respuesta de ansiedad, de 5 min de duración, en la caja luz/oscuridad.

#### *Resultados*

El ANOVA de una vía correspondiente al día en que los animales recibieron 1% sacarosa vs agua (DP38), no arrojó resultados significativos ( $p=0,67844$ ); lo que descartaría, en principio, que los animales iniciados se acercaran al etanol durante la fase de re-exposición debido a una preferencia basal diferencial por el vehículo de la solución etílica (1% sacarosa). Además, cuando se tiene en cuenta el grupo NT, al cual se le hizo un seguimiento del perfil de consumo de sacarosa, no se observa el fenómeno de incremento en el consumo post-receso (Figura 6). De hecho, en los sujetos no tratados se observa una bajada en el consumo de la solución de sacarosa luego del receso. Por lo tanto, esto sería un primer indicio de que el fenómeno de facilitación en el consumo por iniciación temprana que estamos caracterizando no se generaliza a la sacarosa, sino que pareciera ser exclusivo del etanol.



**Figura 6.** Consumo de sacarosa (ml/100g) de animales adolescentes no tratados durante la fase de iniciación a lo largo de la fase de adquisición (4 sesiones) y re-exposición (1 sesión, luego de un receso de 7 días). Los puntos denotan las medias y las barras verticales los E.E.M. El asterisco (\*) representa una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA de una medidas repetidas) en la sesión de Re-exposición con respecto a las 4 sesiones anteriores

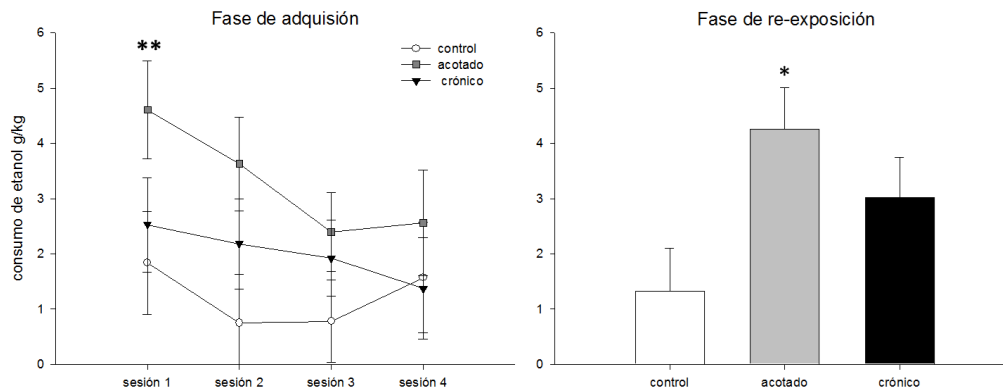
Tampoco se observaron a lo largo del protocolo diferencias entre los diferentes grupos en consumo de comida (g/kg) ni en la ingesta de agua (ml/100g).

El ANOVA de medidas repetidas para las primeras 4 sesiones de ingesta (fase de adquisición) indicó diferencias significativas de sesión [ $F_{(3,99)}=5,19$ ,  $p < 0,01$ ]. Análisis Post-Hoc de Tukey indican un consumo significativamente mayor de etanol durante la primer sesión, que durante las restantes. Los resultados se muestran en la Figura 7, panel izquierdo. No se observaron diferencias entre los diferentes grupos en consumo de comida (g/kg), porcentaje de preferencia por etanol, ni en la ingesta de agua (ml/100g) durante esta fase.

La iniciación al etanol aumentó el consumo durante la fase de re-exposición (Figura 7, panel derecho). El ANOVA de una vía arrojó un efecto significativo de tratamiento de iniciación [ $F_{(2,33)}= 3,73$ ,  $p < 0,05$ ]. Análisis post-hoc de Tukey revelaron un consumo significativamente mayor de etanol en el grupo acotado que en el control no iniciado. En



cuanto a la preferencia por etanol, consumo de vehículo y consumo de comida, no se observaron diferencias significativas.



**Figura 7.** Consumo de etanol (g/kg) de animales iniciados a la droga de manera intermitente con 2 (acotado), 5 (crónico) o 0 (control) exposiciones a etanol, durante la fase de adquisición (panel izquierdo; 4 sesiones) y la fase de re-exposición luego de un período de receso de 7 días (panel derecho; 1 sesión). Los animales fueron administrados con etanol (dosis 2,5 g/kg i.g.) o vehículo, de acuerdo a la condición experimental, durante los días postnatales 28, 30, 32, 34 y 36. Se muestran las medias y EEM (barras verticales). Durante la fase de adquisición hubo un efecto significativo de sesión (\*\* $p < 0,01$ , ANOVA de medidas repetidas) donde el consumo fue más elevado en la primer sesión (efecto señalado con ). Se encontró una diferencia estadísticamente significativa (\* $p < 0,05$ , ANOVA factorial) entre el grupo acotado y el control durante la fase de re-exposición.

Los ANOVAs de medidas repetidas para las evaluaciones de la prueba de luz/oscuridad para latencia a cruzar al compartimiento blanco y tiempo pasado en el compartimiento blanco, no arrojaron efectos significativos. Se observaron, en cambio, diferencias significativas entre ambas evaluaciones para la variable cruces hacia el compartimiento blanco [ $F_{(1,33)} = 4,27$ ,  $p < 0,05$ ]. Los análisis post-hoc de Tukey indicaron una disminución significativa en la cantidad de cruces entre la primera y la segunda evaluación (medias y EEM  $2,34 \pm 0,36$  y  $1,60 \pm 0,31$ ).

En cuanto al grupo NT, no se observaron diferencias significativas para ninguna de las variables consideradas en ambas evaluaciones de luz/oscuridad. No existiría, por lo tanto, habituación a la prueba ni al contexto asociado a ella.

Hemos replicado -en otra cepa de rata- lo observado en el experimento anterior, a saber, que la iniciación al etanol durante la adolescencia temprana facilita el consumo posterior de la droga; particularmente, luego de un periodo de privación. Existen, sin embargo, algunas diferencias entre los experimentos. En el Experimento 1 los animales que recibieron 5 administraciones de etanol (grupo crónico) expresaron mayor consumo de

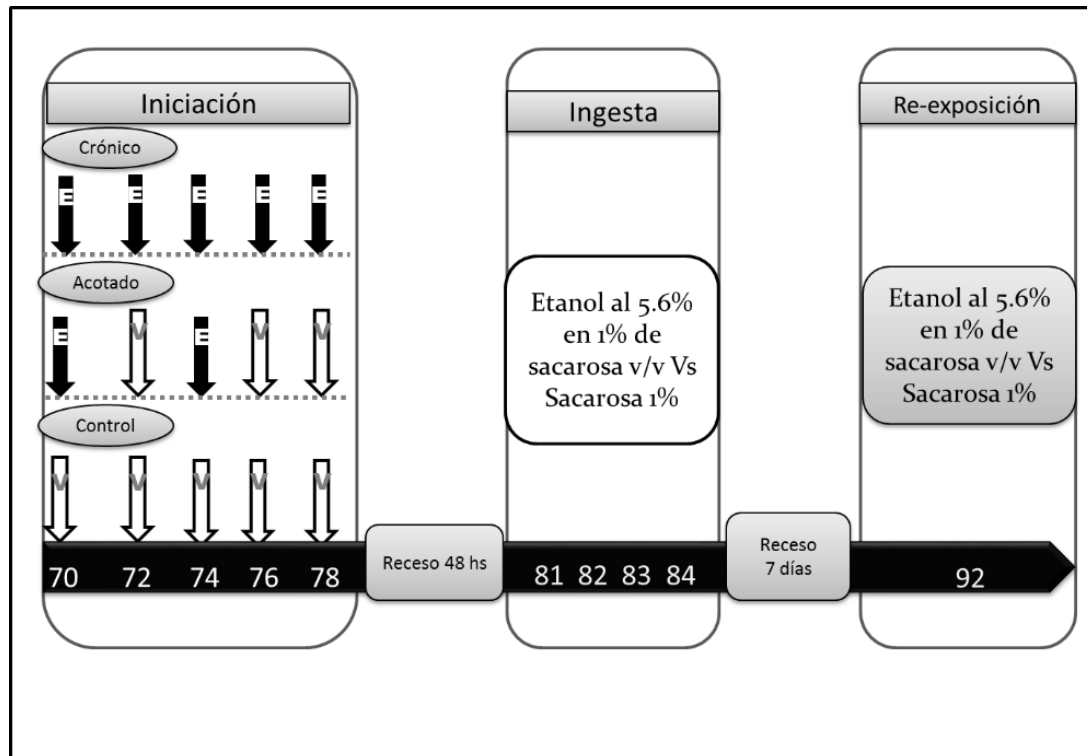
etanol post-receso que los demás grupos, mientras que en el presente experimento (Experimento 2) la diferencia en el consumo post-receso se observó en el grupo que recibió 2 administraciones (grupo acotado). Asimismo, los niveles generales de consumo de etanol, a lo largo de los grupos, fueron mucho mayores en el Experimento 1 que en el Experimento 2. Cabe destacar, sin embargo, la fortaleza e importancia funcional de la diferencia ligada a la iniciación al etanol, con el consumo post-receso alcanzando aproximadamente 15/g/kg/24h para el grupo crónico contra 5,0/g/kg/24h en grupos controles (Experimento 1) y 5,5 g/kg/24h en animales iniciados (grupo acotado), contra 2,0 g/kg/24h para el grupo control (Experimento 2). Posiblemente, las diferencias entre experimentos se deban a diferencias inherentes a las cepas utilizadas (endocriada vs exocriada) y a variaciones en los procedimientos entre experimentos, por ejemplo, en el Experimento 1 los animales fueron sometidos a evaluaciones de actividad locomotora en campo abierto durante la fase de iniciación, las cuales pueden ser experimentadas por el animal como un contexto aversivo. Asimismo, en el Experimento 2 pudimos recolectar información que sugiere que el consumo exacerbado en animales iniciados no se debe a una preferencia diferencial por el vehículo y que, al menos bajo las presentes circunstancias, el incremento post-receso no puede atribuirse a un aumento de ansiedad, inducido por el consumo repetido de la droga

### ***Experimento 3: Evaluación de los efectos de la iniciación al etanol durante la adultez.***

Partiendo de los resultados previos, se buscó dilucidar si el fenómeno de iniciación ocurre solamente durante la adolescencia, o puede generalizarse a otras etapas del desarrollo, cuando los sujetos ya están maduros (i.e. adultez). La hipótesis es que los adultos serán relativamente insensibles a los efectos promotores del etanol sobre el consumo de esta droga.

#### Procedimientos

Se utilizó un total de 21 machos adultos (DP 70 al comienzo del experimento) tomados de 7 camadas. En lo posible, los animales para este experimento provinieron de la división de las camadas del experimento anterior. Se mantuvieron las mismas modalidades de iniciación y condiciones que en el experimento anterior (Figura 8).



**Figura 8.** Protocolo experimental. Fase de iniciación (panel izquierdo) para grupos crónico, acotado y control, donde las flechas rellenas representan administraciones i.g. de 2,5 g/kg de etanol y las flechas blancas representan administración i.g. de vehículo (0,0 g/kg). La fase de ingestión corresponde a pruebas de doble botella durante 24 h. Las evaluaciones de luz/oscuridad corresponden a los DPs 79 y 90.

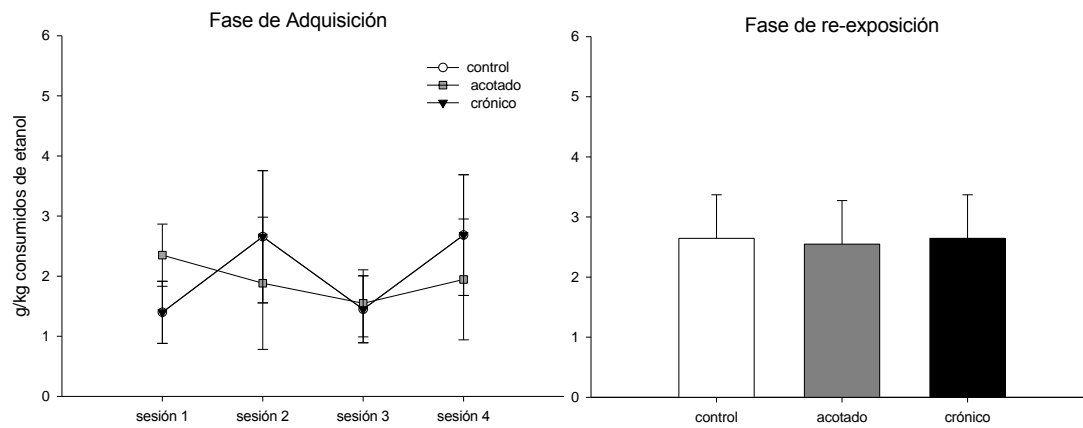
### Resultados

Los datos de consumo de alcohol fueron analizados por separado para la fase de adquisición y para la fase de re-exposición, mediante los ANOVAs que fueron descritos previamente en el experimento con adolescentes (véase también sección de diseño y análisis de datos del capítulo). Los ANOVAs indicaron la ausencia de efecto principal de iniciación o de interacción de días x iniciación en el caso de la fase de adquisición (Figura 9). Tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto al consumo de comida (g/kg), agua (ml/100g) o perfil de consumo de sacarosa en el grupo NT.

En cuanto a la evaluación de luz/oscuridad, al igual que en el experimento anterior, no se observaron diferencias significativas entre grupos para las variables consideradas.

Estos resultados indican que, en franca diferencia con lo observado en adolescentes, la iniciación al alcohol durante la adultez no afecta el posterior consumo de etanol durante las sesiones iniciales de exposición a la droga o luego de un periodo de privación de acceso a la droga. De esta manera, nuestros resultados son consistentes con los trabajos epidemiológicos que han caracterizado a la adolescencia como un periodo crítico, en el cual la iniciación a consumo de alcohol trae aparejado mayores riesgos para el

desarrollo de consumo problemático de alcohol, en comparación a cuando dicha iniciación es demorada hasta la adultez (e.g. Anthony & Petronis, 1995, Dawson et al., 2007, DeWit et al., 2000).



**Figura 9.** Consumo de etanol (g/kg) de animales adultos iniciados a la droga de manera intermitente con 2 (acotado), 5 (crónico) o 0 (control) exposiciones a etanol, durante la fase de adquisición (panel izquierdo; 4 sesiones) y la fase de re-exposición luego de un período de receso de 7 días (panel derecho; 1 sesión). Los animales fueron administrados con etanol (dosis 2,5 g/kg intragástrica) o vehículo, de acuerdo a la condición experimental, durante los días postnatales 70, 72, 74, 76 y 78. Se muestran las medias y EEM (barras verticales). No se observaron diferencias significativas en el consumo de etanol para ninguno de los grupos en ambas fases.

## Conclusiones generales y Discusión del Capítulo

En el presente capítulo se pudo observar cómo una breve iniciación a etanol (2 o 5 administraciones) aumenta el consumo de la droga en adolescentes pero no adultos, particularmente, luego de un periodo de receso o privación de acceso a la droga. Estos resultados están en concordancia con el fenómeno observado en la epidemiología y con algunos de los estudios realizados con animales, tal como se ha descrito en la introducción del capítulo (e.g. Doremus et al., 2005; Hargreaves et al., 2009; Broadwater et al, 2011). Una diferencia importante es que los estudios previos que observaron facilitación del consumo emplearon fases de iniciación al etanol muy prolongadas (llevando semanas y, a veces, meses) y, por lo general, la evaluación de los efectos tenía lugar en la adultez; en el presente trabajo, con tan sólo 2 administraciones de una dosis moderada/alta de etanol (i.e. 2,5 g/kg) se observó un incremento notable en el consumo de etanol hacia el final de la adolescencia, luego de un periodo de receso de 7 días.

Al comparar los presentes resultados con aquellos estudios donde se utilizaron fases de exposición prolongadas al etanol con sucesivas fases de receso y re-exposición (e.g. Spanagel, 2000; Bell et al., 2008), se debe tener en cuenta que dichos estudios tenían como objetivo generar dependencia al alcohol y producir tolerancia, dependencia física y síntomas de abstinencia. En contraposición, en el presente trabajo se ha utilizado un único período de receso de etanol, relativamente acotado y que no parece incrementar los comportamientos de tipo ansioso. Esto lleva a pensar que en los experimentos aquí presentados la exposición ética tanto en la fase de iniciación como en la adquisición, no es suficiente para generar dependencia física, tolerancia o abstinencia.

Otro factor a tener en cuenta es el uso de alcohol endulzado en las pruebas de ingesta. Existe la posibilidad de que el aumento en el consumo de etanol observado en los adolescentes se deba a que la iniciación temprana a etanol haya predispuesto a estos animales a buscar el consumo de sacarosa, ya sea por su palatabilidad o, simplemente, por su valor nutricional. Sin embargo, no hubo diferencias en el consumo de sacarosa (véase Experimentos 2 y 3) y tampoco se encontraron diferencias en el peso corporal, consumo de comida y agua, que pudiesen indicar un estado nutricional alterado debido a la exposición temprana al etanol.

La iniciación al etanol durante la temprana adolescencia generó un aumento en el consumo de etanol luego del período de receso de la droga, tanto en los grupos que recibieron 2 administraciones (Experimento 2) como en el de 5 administraciones (Experimento 1). Probablemente, las diferencias observadas entre ambos experimentos se deban a que se han utilizado cepas diferentes de ratas. Particularmente, en el Experimento 1 se utilizó una cepa endocriada y en el Experimento 2 una cepa exocriada.

No podemos descartar que la exposición temprana utilizada en este trabajo altere el patrón normal de desarrollo de ciertos sistemas de neurotransmisión. Algunos estudios apoyan esta posibilidad, y se ha observado que la exposición crónica-intermitente (i.e., 10 sesiones) durante la adolescencia altera el nivel basal de dopamina en el núcleo accumbens e induce una desregulación hacia abajo de los receptores dopaminérgicos y glutamatérgicos en corteza prefrontal, un indicador de menor actividad en dicha área (Pascual et al., 2009). Los receptores dopaminérgicos, que modulan el aprendizaje apetitivo inducido por etanol, alcanzan su pico al DP 28 y, luego, comienzan a declinar significativamente (Tarazi & Baldessarini, 2000). Por lo que el adolescente sería susceptible a sufrir cambios en el sistema de neurotransmisión dopaminérgica como producto de la exposición repetida a etanol.

Otra posibilidad es que los animales hayan adquirido preferencia condicionada a las propiedades orosensoriales del etanol -percibidas a través de las excreciones no metabólicas de la droga (orina y sudor)- ya sea por mera familiaridad o por su contigüidad con las propiedades farmacológicas, post-absortivas de la droga. Es decir, bajo esta posibilidad los animales habrían asociado el olor proveniente de su propio sudor y orina (estímulo condicionado) a los efectos farmacológicos incondicionales del etanol (estímulo incondicionado; para un ejemplo de este tipo de procesamiento sensorial véase Molina et al., 1989). Por otro lado, los animales expuestos a 5 administraciones –en el Experimento 2- pudieron haber desarrollado una aversión condicionada al etanol que competiría con la preferencia adquirida los primeros días. Otros estudios han encontrado, de manera similar, que diferentes modalidades de exposición pueden generar preferencia hacia la droga o, por el contrario, aversión condicionada. Por ejemplo, en el estudio de Broadwater y colaboradores (2011) no se observó un efecto de iniciación temprana al etanol cuando los animales eran iniciados de manera intermitente (día de por medio) con dosis de 4,0 g/kg

i.p. Este efecto fue observable únicamente cuando los adolescentes se auto-administraban vía operante soluciones endulzadas de etanol (Broadwater et al., 2012). En el estudio de Gilpin y colaboradores (2012) las inyecciones intraperitoneales actuaron como un estímulo aversivo que generaba aversión hacia el etanol, en contraposición con un régimen de autoadministración. Es posible, entonces, que las administraciones i.g. actúen como estímulo aversivo cuando se dan con mayor regularidad (5 administraciones) y que no interfieran con el condicionamiento apetitivo cuando ocurren con menor frecuencia (2 administraciones).

Si bien se han encontrado evidencias en los dos primeros experimentos de que el consumo de etanol aumenta luego de una breve exposición en la adolescencia, no se ha podido contestar al interrogante de si la iniciación al etanol durante la adolescencia genera efectos que perduren a largo plazo. Al respecto, se necesitaría realizar evaluaciones más extensas y analizar los sustratos neurales subyacentes a este fenómeno.

Por otro lado, ¿es suficiente la iniciación al etanol durante la adolescencia temprana para generar problemas de uso y abuso de la droga? ¿Qué otros factores estarían exacerbando este fenómeno? Algunos de esos interrogantes serán tratados en los siguientes capítulos.

## Capítulo 2

### *Evaluación De Los Efectos De La Exposición Prenatal Al Etanol Durante La Adolescencia*

La transición desde el consumo experimental hacia el consumo problemático de alcohol, la cual suele ocurrir en la adolescencia, está modulada por numerosos factores. Entre los factores más influyentes, a la hora de diferenciar aquellas personas que controlarán el consumo de aquellos que desarrollarán problemas de abuso de alcohol, se encuentra la predisposición genética y la edad de inicio del consumo. Tal como se trató en el primer capítulo, aquellos sujetos que comienzan a consumir alcohol en la adolescencia temprana, tienen mayor riesgo de mostrar un consumo excesivo de la droga; y algunas investigaciones indican que este efecto podría exacerbarse en sujetos con historia familiar positiva de problemas con el alcohol (Pilatti et al., 2014).

Otro factor que podría estar promoviendo el pasaje hacia el consumo problemático de alcohol, tal como lo indican estudios epidemiológicos (Alati et al., 2008; Baer et al., 2008), es la exposición en etapas aún más tempranas del desarrollo, como el embarazo o la lactancia. A la fecha, varios trabajos pre-clínicos han indicado que la exposición prenatal al etanol promueve el consumo posterior (véase Chotro et al., 2007; Abate et al., 2008; Brys et al., 2014). Sin embargo, estos estudios o han utilizado exposiciones a dosis altas de alcohol durante toda la preñez (e.g. Randall et al., 1983; Nash et al., 1984;) o han analizado, mayormente, la preferencia hacia etanol durante la infancia (Díaz-Cenzano et al., 2013; Miranda-Morales et al., 2014) o adultez (Abel et al., 1981). Algunos de estos estudios también se interesaron por la respuesta de los animales al olor a etanol, y como la exposición al olor afecta el subsiguiente consumo de alcohol (Eade et al., 2010).

Muy pocos estudios, de aquellos que evaluaron los efectos de la exposición prenatal al alcohol sobre el consumo posterior de la droga en adolescencia, han utilizado exposiciones a dosis moderadas de etanol durante la gestación y los pocos existentes sólo han medido consumo en una o dos sesiones, por lo que es desconocido si hay efectos persistentes y de largo plazo de la experiencia prenatal con la droga. En el trabajo de Reyes y colaboradores (1985), por ejemplo, la exposición a dosis elevadas de etanol en útero (4%-7%) durante toda la gestación, no fue efectiva para aumentar la preferencia por etanol



durante la adolescencia. Chotro y Arias (2003), en tanto, encontraron que pre-adolescentes (DPs26-27) expuestos a dosis de 1,0 g/kg y 2,0 g/kg durante la gestación tardía (DGs 17-20) consumieron mayores cantidades de etanol en un único test de una vía (donde no es posible evaluar preferencia por la droga). En definitiva, son necesarias más investigaciones para establecer la ubicuidad, magnitud y persistencia del aparente efecto permisivo de la exposición fetal al alcohol sobre el consumo de la droga en la adolescencia.

Los mecanismos subyacentes al aumento en la preferencia hacia el etanol luego de la exposición en útero son mayormente hipotéticos. Una posibilidad es que la exposición fetal al etanol promueva familiarización con las propiedades orosensoriales de la droga (i.e. hipótesis de la “mera exposición”; Molina & Spear, 2005); o que se conforme un aprendizaje de tipo asociativo entre las propiedades orosensoriales del etanol (estímulo condicionado, EC) y los efectos apetitivos de la droga (estímulo incondicionado; EI) percibidos a través de la madre (Arias & Chotro, 2005; Abate et al., 2008). Otra posibilidad, complementaria a la anterior, es que la exposición prenatal vuelva a los sujetos más sensibles a las propiedades reforzantes apetitivas o menos sensibles a las propiedades reforzantes aversivas del etanol. En ese sentido, se ha observado que la exposición prenatal al etanol genera tolerancia a la hipotermia inducida por la droga, la cual es uno de los componentes aversivos del estado de intoxicación etílica (Abel et al., 1981). Por otro lado, Becker y colaboradores (1995) observaron que la exposición prenatal al etanol aumenta los efectos estimulantes locomotores de la droga. También se observó que la exposición prenatal a dosis de 1,0 g/kg durante los DGs 17-20 aumentó la preferencia por etanol durante la infancia, cuando las crías fueron evaluadas mediante la técnica de pezón artificial (Nizhnikov et al, 2006). Además, una breve exposición a dosis moderadas de etanol en útero (2,0 g/kg; DGs 17-20) facilitó el reforzamiento apetitivo mediado por etanol en infantes y alteró la expresión de condicionamiento aversivo mediado por etanol (Pautassi et al., 2012).

El objetivo principal de este capítulo fue analizar los efectos de la exposición prenatal a dosis moderadas de etanol durante la gestación tardía sobre el consumo de alcohol durante la adolescencia, superando las limitaciones de los trabajos reseñados y evaluando posibles mecanismos subyacentes a los efectos del tratamiento prenatal. Para ello, luego de establecer que la exposición moderada al etanol durante la gestación tardía

aumenta el consumo de la droga durante la adolescencia (Experimento 1) y que este efecto persiste por varias semanas (Experimento 2), se llevaron a cabo experimentos con el fin de analizar diferentes variables que podrían arrojar luz sobre los mecanismos subyacentes, neurales y comportamentales, a este fenómeno.

En el Experimento 3 se analizaron los efectos de la exposición prenatal al etanol sobre la actividad locomotora y la emisión de vocalizaciones ultrasónicas (apetitivas y aversivas) inducidas por la droga, durante la adolescencia. Este experimento se basó en la hipótesis de que la exposición prenatal al alcohol aumenta los efectos hedónicos apetitivos, y disminuye los efectos aversivos del alcohol (Pautassi et al., 2012). Se parte también de evidencia que indica que la exposición prenatal a etanol genera fenotipos comportamentales específicos. Por ejemplo, se ha visto que la exposición prenatal a dosis altas de etanol (i.e. 6,0 g/kg DG 6-15) generó mayor hiperactividad, impulsividad y déficit de atención en animales adultos (Kim et al., 2013). Otro trabajo mostró que animales expuestos a etanol en útero mediante dieta líquida, poseen hiperactividad en pruebas de locomoción, así como déficits de atención e impulsividad (Brys et al., 2014). En un modelo de exposición prenatal similar al utilizado en este trabajo (2,0 g/kg i.g. DG 17-20), animales infantiles (DP13) que habían sido expuestos a etanol en la gestación mostraron mayor actividad locomotora basal que aquellos que recibieron vehículo prenatal (Arias et al., 2008). Sin embargo, en otro trabajo crías de 21 días de edad que habían sido expuestas a etanol durante toda la gestación y lactancia, exhibieron menor actividad locomotora basal que los controles, así como menor frecuencia de conductas de ansiedad como auto-calamamiento y conductas verticales (Carneiro et al., 2005). Otro trabajo no observó alteraciones en la actividad motora de animales expuestos a 3,0 o 5,0 g/kg de etanol durante toda la gestación (Randall et al, 1999). Dursun y colaboradores (2006) detectaron que animales adultos que habían sido expuestos a dosis altas de etanol durante toda la gestación (6,0 g/kg i.g.) presentaban neofobia, si bien no hiperactividad, en la prueba de campo abierto y laberinto elevado en cruz. Probablemente, la hiperactividad observada en modelos de exposición prenatal a etanol esté relacionada a la dosis y a la cantidad de exposiciones que reciben los animales en útero. Por ejemplo, en el trabajo de Brys y colaboradores, la dieta líquida ocasionaba consecuencias teratológicas como diferencias de peso y mortalidad de las crías, mientras que la exposición moderada usada en este

trabajo y en trabajos con exposiciones similares (Dominguez et al., 1996; Arias et al., 2008; Pueta et al., 2011), no genera diferencias de peso, ni mortalidad de las crías. Teniendo en cuenta esta información, el principal objetivo del Experimento 3 fue evaluar posibles diferencias a nivel comportamental entre animales expuestos a etanol en útero y sus controles, de manera basal y frente a etanol.

Pocos estudios han analizado actividad neural, espontánea o inducida por etanol, en adolescentes expuestos a esta droga durante la gestación (Vilpoux et al., 2009), siendo que la mayoría de los estudios evalúan estos efectos durante la adultez (e.g. Diaz et al., 2014; Sickmann et al., 2013). En los Experimentos 3 y 4, se examinó la actividad neuronal en el sistema mesocorticolímbico en adolescentes que habían sido expuestos, o no, en útero a etanol y desafiados con una dosis de 2,5 g/kg postnatalmente. Además, se analizaron los niveles de etanol en sangre con el objetivo de determinar diferencias en la metabolización de etanol producto de tolerancia hacia la droga adquirida prenatalmente (Experimento 5).

Dado que el área tegmental ventral (ATV) posee, preponderantemente, neuronas dopaminérgicas, en el Experimento 6 se evaluó actividad dopaminérgica en ATV. Dado que ATV es parte del sistema mesocorticolímbico, también analizó actividad neural (medida mediante conteo de células c-Fos activadas) en núcleo AcSh. Se ha visto, por ejemplo, que el equilibrio entre receptores dopaminérgicos 1 y 2 (D1 y D2 respectivamente) se ve afectado en animales que han sido expuestos a 6,0 g/kg de etanol i.g. durante casi toda la gestación observándose, además, anormalidades persistentes en la plasticidad dopaminérgica en estriado dorsal (Zhou et al., 2012). En un modelo similar, Randall y colaboradores (1999), encontraron que animales que habían sido expuestos a 3,0 g/kg de etanol i.g. durante los DGs 8-20, poseían menor número de sitios de unión para D2 dopaminérgicos en estriado ventral, efecto que se veía revertido al aplicar metilfenidato, droga que potencia la actividad dopaminérgica. También se observó en cultivos de células de hipocampo, una menor cantidad de receptores D1, como producto de la exposición prenatal a etanol (Naseer et al., 2014). Los efectos del etanol prenatal sobre el sistema dopaminérgico se observaron, además, en relación a una menor actividad del precursor del receptor D1, si bien los niveles de dopamina no se vieron afectados (Diaz et al., 2014). Sin embargo, también existe evidencia de que los animales expuestos a etanol en útero poseen

mayor cantidad de transportadores dopaminérgicos en estriado (Kim et al, 2013); posiblemente, se deba a una diferencia en las técnicas empleadas en los estudios. Aun así, es notorio que la exposición a etanol en útero altera, de cierta manera, el sistema dopaminérgico. Por tal motivo, en el experimento 6 del presente capítulo, se determinó la actividad dopaminérgica en área tegmental ventral, en adolescentes expuestos o no a etanol in-útero y desafiados postnatalmente con diferentes dosis de esta droga.

El etanol posee propiedades aversivas que pueden detectarse mediante el paradigma de aversión condicionada al sabor (ACS) y se ha sugerido que aquellos que son menos sensibles a los efectos aversivos de la droga son más propensos a escalar en el consumo de etanol (Schram-Sapyta et al., 2010). Se decidió evaluar mediante ACS a adolescentes expuestos a etanol en útero, bajo las hipótesis que la exposición prenatal alteraría las capacidades de aprendizaje asociativo y la sensibilidad hedónica a la droga. En estas hipótesis fuimos guiados tanto por estudios previos (Pautassi et al., 2012) como por los resultados del Experimento 4, en el cual observamos alteraciones inducidas por el alcohol prenatal en corteza prefrontal infralímbica, un área clave en la extinción de memorias aversivas (véase Millan et al., 2011). Así entonces, analizamos (Experimento 7a) la habilidad para adquirir y extinguir memorias aversivas utilizando un reforzador no étílico (cloruro de litio, un potente agente emético).

En el experimento 7b, nos propusimos evaluar posibles diferencias en la sensibilidad frente a los efectos aversivos del etanol. Para cumplir con este objetivo, realizamos un protocolo de ACS utilizando etanol como EI y salina como EC. Tal como Pautassi y colaboradores (2012) observaron en infantes, hipotetizábamos que los adolescentes expuestos a etanol prenatalmente en útero exhibirían una menor aversión adquirida al sabor inducida por etanol, en comparación con animales no expuestos a la droga in-útero. Si este fuera el caso, los animales expuestos a la droga durante la gestación tardía podrían consumir más cantidades de etanol, dado que no serían capaces de percibir las propiedades aversivas del etanol y, por ende, frenar su consumo.

Chotro y Arias (2003) sugirieron que la adquisición de aprendizaje asociativo in útero, mediado por alcohol, depende de la activación del sistema opiáceo. En línea con esta hipótesis, Díaz-Cenzano y Chotro (2010) reportaron que ratas infantes con tan sólo dos episodios de exposición prenatal (dosis: 2,0 g/kg; DGs 19 y 20), consumían mayores

cantidades de etanol que pares no expuestos prenatalmente al alcohol, y que este efecto era bloqueado por la administración de naloxona (antagonista general del sistema opiáceo) en la gestación. El sistema opiáceo también media aprendizaje apetitivo postnatal mediado por alcohol. En conjunto, los trabajos de Miranda-Morales et al (2012), Nizhnikov y colaboradores (2009) y Pautassi et al. (2012) indican que los receptores opiáceos mu, delta y kappa están implicados en el establecimiento de condicionamiento operante apetitivo y en condicionamiento de preferencia al lugar por etanol en ratas infantiles. Más aún, un trabajo reciente (Nizhnikov et al., 2014) encontró una reducción en la expresión sináptosomal del receptor kappa opioide en el núcleo accumbens, amígdala e hipocampo de ratas infantiles expuestas prenatalmente al etanol (1,0 g/kg, DGs 17-20). Además, en este estudio, se encontró que las ratas infantiles que habían sido expuestas a etanol durante la gestación tardía, fueron insensibles al aumento de consumo etílico inducido por nor-BNI (un antagonista opiáceo específico del receptor kappa). En conjunto, esta evidencia sugiere que alteraciones en el número, densidad o funcionalidad de los receptores opiáceos pueden subyacer a las alteraciones comportamentales y a la respuesta neuronal alterada luego de la exposición prenatal a etanol. En función de estos antecedentes, en el experimento 8 se analizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) la expresión de receptores opiáceos (mu, delta y kappa) en adolescentes luego de la exposición (o no) a etanol en útero.

En resumen, los experimentos de esta sección indagan el efecto facilitador de la experiencia prenatal con alcohol sobre el consumo en la adolescencia, y potenciales mecanismos neurales y comportamentales subyacentes a este efecto

## *Materiales y Procedimientos Generales*

### *Tratamiento Prenatal*

Durante los días gestacionales 17 al 20 las hembras preñadas pertenecientes al grupo etanol (PE) recibieron una administración intragástrica diaria de 0,015 ml/g de una solución de 16,8% v/v de etanol (vehículo: agua de pico a temperatura ambiente; dosis de etanol: 2,0 g/kg); las hembras pertenecientes al grupo control (PV) recibieron un volumen similar de agua de pico. Para la administración de etanol o vehículo, los animales fueron intubados vía intragástrica mediante una cánula de polietileno (clay Adams) por la cavidad oral hasta el estómago del animal (aproximadamente. 7 cm). La cánula se encontraba adosada a una jeringa de 5 ml con aguja 21 G que contenía una solución de 16,8% de etanol (Porta Hnos.; o vehículo (agua de pico) según la condición experimental.

### *Administraciones de etanol durante la adolescencia (Experimentos 3, 4, 5 y 6)*

Los animales recibieron alcohol o vehículo vía intragástrica, como ha sido descrito en el Capítulo 1 y en el apartado anterior. Brevemente, en el momento de ser evaluados (véase procedimientos específicos de cada experimento) se les introdujo suavemente una cánula de polietileno en la cavidad oral y se le administró 2,5 g/kg de etanol (solución al 21% v/v) o vehículo directamente en el estómago.

### *Prueba de Ingesta de doble vía de 2 horas por sesión (Experimento 1)*

En este experimento, la ingesta de etanol fue evaluada a partir del DP 35, en sesiones de 2 h. Los animales eran pesados antes de cada sesión. Durante las sesiones de ingesta, los animales eran colocados en jaulas individuales con dos tubos graduados que contenían una solución etílica (3% v/v el primer día, e incrementando 1% hasta llegar a 6% la cuarta sesión; DP 39) o vehículo (agua de pico). La posición de los tubos de agua y etanol eran contrabalanceados entre sesiones para evitar preferencia de lugar. Se tomó como medida de consumo los mililitros consumidos y se transformaron a g/kg de etanol consumidos y porcentaje de preferencia [(ml etanol consumidos/ml totales consumidos) x 100]. Los animales sólo tenían acceso a líquidos durante las 2 horas que duraba cada sesión de ingesta, el resto del día permanecían en grupos de 4 en cajas con viruta y tenían acceso a comida ad-libitum (22 h de privación de agua). Este protocolo ha sido ampliamente

utilizado para detectar los efectos del consumo temprano de etanol mediado por la lactancia (Ponce et al., 2008) o administraciones intragástricas (Acevedo et al., 2010).

*Prueba de Ingesta intermitente de 18 horas (Experimento 2)*

Se utilizó un esquema de ingesta intermitente (Simms et al., 2008) de 4 semanas, siguiendo parámetros utilizados en experimentos anteriores llevados a cabo en el laboratorio (datos sin publicar). Durante la primera semana (DPs 30-35), los animales tuvieron acceso a una botella de 5% de etanol en una solución de 1% sacarosa vs 1% de sacarosa durante 18 horas; las botellas se colocaban los lunes, miércoles y viernes a las 18pm y se retiraban los martes, jueves y sábados a las 10am. A partir de la segunda semana (DPs 37-42) los animales tenían acceso a 5% etanol vehiculizado en 0,5% sacarosa vs 0,5% sacarosa; mientras que en las semanas 3 (DPs 44-49) y 4 (DPs 51-55) los animales accedían a 5% etanol (vehículo: agua de pico) vs agua. De esta manera, el protocolo combina la utilización del endulzante, con una sustitución progresiva donde los animales terminan respondiendo por la droga vehiculizada en agua. Durante la prueba de doble botella, los animales se mantuvieron alojados individualmente; y durante los días de receso, se mantuvieron alojados de a pares. El esquema intermitente de consumo también sirve para mimetizar, al menos parcialmente, la intermitencia con la que suelen tomar los adolescentes (e.g. Hargreaves et al., 2009). Debe destacarse que la prueba permite evaluar a los sujetos durante toda la adolescencia, desde su inicio hasta que los animales casi están entrando en lo que se considera adultez joven. Las cajas de alojamiento y materiales utilizados fueron similares a los descritos en el Capítulo 1.

El consumo de etanol (g/kg) y agua (ml/100 g de peso corporal) se midió pesando diariamente las botellas (balanza OHAUS traveller 0,01 g de precisión,) y restando a este dato el promedio resultante de la medición diaria del peso de botellas en una caja control sin animales (control de pérdida o "spillage"). Se calculó también el porcentaje de preferencia por el alcohol.

*Prueba de Locomoción (Experimento 3)*

Se evaluó a los animales bajo parámetros similares a los explicados en el Capítulo 1. Brevemente, los animales fueron evaluados en una caja de medición de actividad (50 x 50 x 50 cm), equipada con sensores que permiten medir la distancia recorrida (cm) durante 5

min (ITCOMM, Córdoba). El animal era colocado en el centro de la recámara y la distancia recorrida era registrada en una pc conectada al equipo.

*Evaluación de emisión de vocalizaciones ultrasónicas (Experimento 3)*

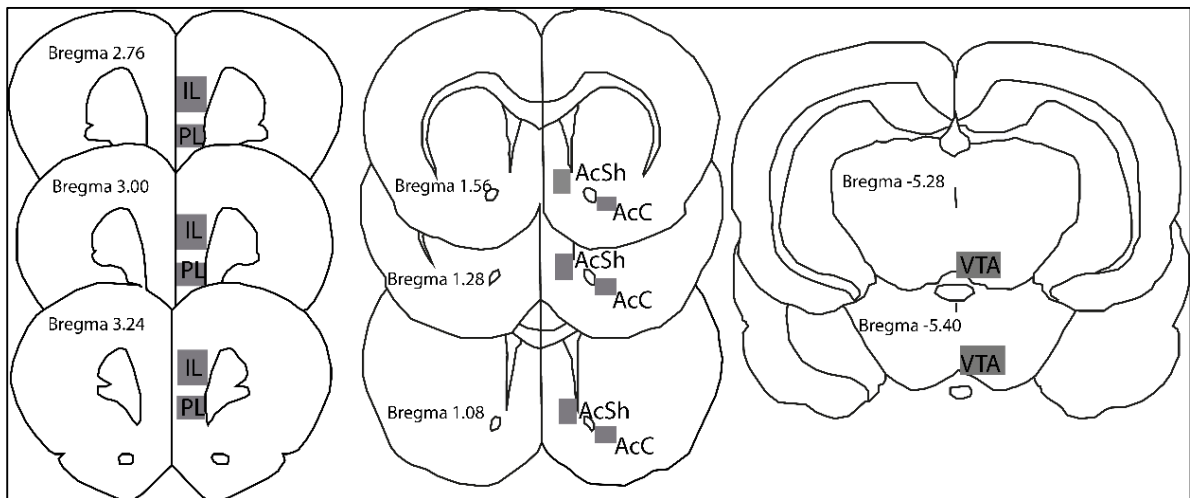
Se midió la emisión de vocalizaciones ultrasónicas en una caja aislada de sonido equipada con un micrófono capaz de captar ultrasonidos, adosado a una computadora que permite medir emisiones ultrasónicas en bandas determinadas (MED-PC, St. Albans, USA). Estas vocalizaciones corresponden a patrones que emiten las ratas y que son asociados a estados afectivos positivos y aversivos (Véase Panksepp, 2007). De acuerdo con la literatura previa (Panksepp & Burdof, 2003), se tomaron en cuenta las vocalizaciones correspondientes a las bandas de 20-30 y 50-60 kHz, consideradas como indicadores de efectos aversivos y apetitivos, respectivamente. Se darán más detalles acerca de los fundamentos teóricos de la utilización de la prueba, en la sección de introducción del experimento correspondiente.

*Evaluación de actividad de c-Fos (Experimentos 3 y 5) y Tirosina Hidroxilasa (TH; Experimento 6)*

El protocolo de inmunohistoquímica fue similar al realizado por de Olmos y colaboradores (2009) y Faria y colaboradores (2008). 90 min luego de la administración de etanol o vehículo, los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (solución 30%, dosis 0,001 ml/g de peso corporal; vía i.p.). Luego, utilizando como solución lavadora salina heparinizada (0,9 % salina; 10 U/1 ml de heparina sódica) y como solución fijadora 4% de paraformaldehído (SigmaAldrich, St. Louis, MO, EEUU) en solución 0,1 M de fosfato buffer (pH 7,4). Para que terminen de fijarse, se dejaron los cerebros durante 12 h en el cráneo y, luego, se los colocó en una solución de 30% sacarosa a 4° C hasta su utilización. Se cortaron los cerebros en 4 series de secciones coronales de 40 µm. Los procedimientos de inmunohistoquímica para c-Fos se realizaron en 2 series. Se bloqueó la reacción de peroxidasa incubando los cortes en una solución de 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10% metanol y 0,01 M PB. Luego, se realizaron 3 lavados en PB y se los incubó durante 1h en la solución bloqueadora (5% normal horse serum; NHS, Invitrogen, Nueva Zelandia). Una vez realizado este paso, se incubaron los cortes a temperatura ambiente durante la noche en el anticuerpo primario contra la proteína c-Fos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU) diluido 1:2000 µl en 0,01 M PB conteniendo 0,3% Triton X-100 + 1% NHS. A la mañana siguiente, luego de 3



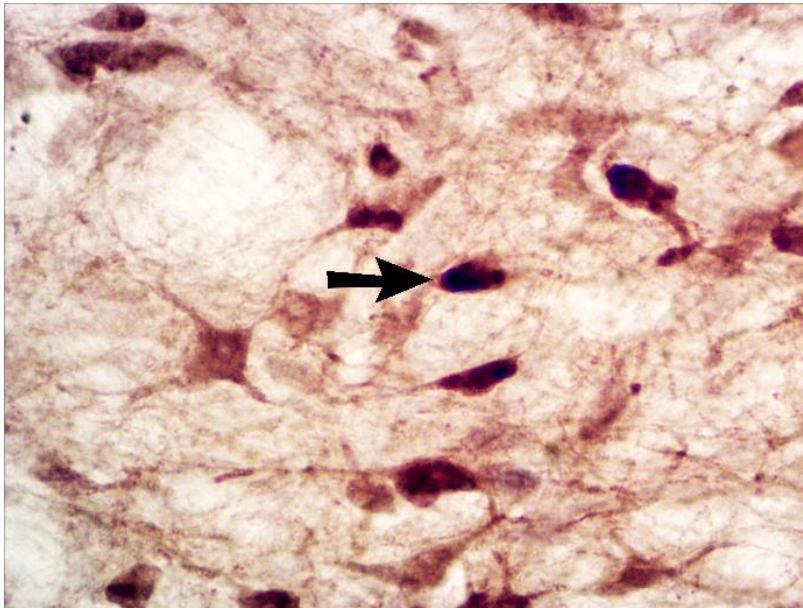
lavados en 0,01 M PB, se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario biotilnado donkey anti-rabbit (Jackson Laboratories, West Grove, PA) diluido 1:500 en 1% NHS. Luego de 3 lavados, los cortes se incubaron durante 60 min en el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC Elite Kit; Vector Labs, Burlingame, CA, EEUU), diluido 100:5000 en 1% NHS. Se revelaron los cortes con una solución de 0,05% 3–3–diamino-benzidina tetra hydrochloride (DAB, SigmaAldrich, St. Louis, MO, EEUU) y 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Una vez revelados, los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados; deshidratados y cubiertos utilizando pegamento DPX (SigmaAldrich, St. Louis, MO, EEUU).



**Figura 10.** Diagrama esquemático de las secciones cerebrales adaptadas del atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson (2007). Las figuras representan los niveles antero-posteriores aproximados (al Bregma) de las áreas seleccionadas para su análisis. La localización y tamaño considerado para cada region [PL (corteza prelímbica), IL (corteza infralímbica), AcSh (núcleo accumbens shell), AcC (núcleo accumbens core) ] y ATV (área tegmental ventral)] se indican con un cuadrado gris.

Para el Experimento 5, se realizó una doble tinción. Luego de revelar para c-Fos, se procedió a teñir los cortes de ATV con un anticuerpo anti TH (Millipore, Billerica, MA, EEUU) diluido 1:1000µl en 0,01 PB conteniendo 0,3% Triton X-100 + 1% NHS. A la mañana siguiente, luego de 3 lavados en 0,01M PB, se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario biotilnado donkey anti-rabbit (Jackson Laboratories, West Grove, PA) diluido 1:500 µl en 1% NHS. Luego de 3 lavados, los cortes se incubaron durante 60 min en el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC Elite Kit; Vector Labs, Burlingame, CA, EEUU), diluido 100:5000 µl en 1% NHS. En este caso particular, el c-Fos se reveló con una solución de 0,05% 3–3–diamino-benzidina tetra hydrochloride (DAB, SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA) y 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>con + 0,5 ml de ClCo 0,5% + 0,5 ml de ClNi 0,5% (color negro) y la TH se reveló con solución de 0,05% 3–3–diamino-benzidina tetra hydrochloride (color marrón;

Figura 11). Una vez revelados, los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados; deshidratados y cubiertos utilizando pegamento DPX (SigmaAldrich, St. Louis, MO, EEUU)



**Figura 11.** Microfotografía en la cual se ilustra (flecha negra) se muestra un ejemplo de doble marcación de una célula catecolaminérgica marcada para TH (marrón) y activada para c-Fos (negro).

Se tomaron 3 fotos de las áreas seleccionadas (Figura 10). Siguiendo los lineamientos del atlas de Watson y Paxinos (2007). Para corteza infralímbica y prelímbica (IL y PL, respectivamente; Experimento 3 y 5), se tuvo en cuenta el bregma 3,34 mm, 3,00 mm y 2,76 mm; para núcleo accumbens core (AcC; Experimentos 3 y 5) y Shell (AcSh; Experimentos 3, 5 y 6) se sacaron fotos de los bregmas 1,68 mm, 1,44 mm y 1,08 mm; para área tegmental ventral (ATV; Experimento 6) se tomaron fotos en los bregmas -5,28 mm y -5,40 mm. Las fotos se tomaron con el microscopio A Primo Star iLed equipado con una cámara Axicam ERc 5s (Zeiss, Jena, Alemania). Se contaron las medias del número de células activadas en cada núcleo analizado, utilizando el software FIJI Is Just Image J (Schindelin et al., 2012). El número de células activadas para las 3 fotografías por sección fue promediado para su subsiguiente análisis.

#### *Determinación de niveles de etanol en sangre (Experimento 4)*

Se extrajo una muestra de sangre (200  $\mu$ l) del tronco, mediante un tubo capilar heparinizado. Los viales con las muestras fueron guardados a -20 °C hasta su utilización. Los niveles de etanol en sangre se obtuvieron a través de cromatografía gaseosa de columna (Hewlett Packard 5890, Wilmington, DE). Más en detalle, las muestras se

incubaron en baño térmico (60 °C) durante 30 min. El componente volátil (butanol) se inyectó luego al cromatógrafo a través de una jeringa de precisión (Hamilton Co., Reno, NV). La temperatura de la columna, horno y detector se precisaron a 60 °C, 150 °C y 250 °C, respectivamente. Los niveles de etanol en sangre se expresaron en mg/dl de fluido corporal (mg%).

*Evaluación de Condicionamiento de Aversión al Sabor (ACS; Experimento 7a y 7b)*

La evaluación de consumo de sacarina (0,1%; Experimento 7a) y Salina (NaCl 0,9%; Experimento 7b) se llevó a cabo en las mismas cajas de alojamiento, divididas por separadores y con las rejillas descritas en el Capítulo 1 para los procedimientos de ingesta. Se utilizaron los tubos de vidrio graduados, ya descritos para el experimento 1 del presente capítulo. Las dosis de CLi y Etanol (estímulos incondicionados en los Experimentos 7a y 7b, respectivamente), se administraron vía intraperitoneal, utilizando salina como vehículo. Los procedimientos serán explicados en la sección correspondiente al experimento 7.

*RT-PCR Cuantitativa (Experimento 8)*

Microdissección: Cada cerebro fue colocado en una matriz disponible comercialmente y cortado coronalmente, para obtener 3 áreas que contengan la región prefrontal (IL), núcleo accumbens shell (AcSh); y área tegmental ventral (ATV). Luego, gracias al uso de un micrótopo de congelación, se obtuvo una rebanada de 600 µm de espesor desde la altura 3,72 mm hasta 2,76mm en relación al bregma (desde el plate 9 al plate 12 del atlas de Paxinos y Watson) para IL; para AcSh, se obtuvo una rebanada de 600 µm de espesor desde la altura 1,68 mm hasta 0,96 mm en relación al bregma (desde el plate 19 al plate 22 del atlas de Paxinos y Watson); por último, para el área ATV, se obtuvo una rebanada de 500 µm de espesor desde la altura -6,12 mm hasta -6,36mm en relación al bregma (desde el plate 84 al plate 86 del atlas de Paxinos & Watson, 2007). Con el uso de una lupa y un microdisseccionador de 2mm de diámetro, se realizaron los micropunches del IL, AcSh y ATV de acuerdo a las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (2007) y se procedió como detalla Ruginsk et al, 2010. Posteriormente, cada punch fue colectado en un tubo conteniendo 500 µl de Trizol (Invitrogen) y, con la ayuda de una jeringa 30G, se realizó la homogenización del tejido. El aislamiento del ARN total fue realizado siguiendo las instrucciones del fabricante. Los homogeneizados se incubaron 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se agregó 50 µl de cloroformo helado. Las muestras se agitaron

vigorosamente durante 15 seg y se centrifugaron a 12000 g durante 15 min a 4 °C. Se transfirió la fase superior acuosa a otro tubo y se agregó 125 µl de isopropanol helado. Nuevamente, las muestras fueron agitadas vigorosamente para luego ser almacenadas durante toda la noche a -20°C para la decantación del ARN. Al día siguiente, las muestras fueron centrifugadas a 12000 g durante 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con etanol 75% en agua libre de RNAsas y se centrifugó a 12000 g durante 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en agua libre de RNAsas y se solubilizó en horno de hibridación a 60 °C durante 10 min. El ARN total aislado fue tratado con 1µl de DNAsa I (Ambion) durante 20 min a 37 °C. Posteriormente se procedió a la cuantificación del mismo y a la estimación de la integridad, a través de la absorbancia a 260 nm y a 280 nm. Ambas mediciones fueron realizadas en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS. La integridad y calidad del ARN total extraído fue verificada en un gel de agarosa (Biodinamics) al 1,2% con 4µl de bromuro de etidio (10 mg/ml, Promega). Las muestras fueron corridas electroforéticamente en una cuba electroforética con su fuente de poder (BioRad) durante 60 min a 90 mV y amperaje constante. Finalizada la corrida, las bandas de las subunidades ribosomales GADPH y 28S fueron visualizadas en un High performance ultraviolet transilluminator.

Retranscripción (RT): A continuación, a 1 µg de ARN total se le agregó una mezcla de reacción de 20 µl conteniendo buffer de reacción (M-MLV 5X Reaction Buffer Promega), 40 µl de un inhibidor de ribonucleasas (Invitrogen), dNTPs 1mM (Fermentas), 1 µg de hexámeros aleatorios (Biodinamics) y 100 µl de transcriptasa reversa M-MLV (Promega). La síntesis del ADN copia (ADNc) se llevó a cabo a 37 °C durante 60 min, seguido de 5 min a 95 °C en un termociclador Multigene Labnet International, Inc. Una vez finalizada la RT, las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta la cuantificación por PCR en tiempo real. Como control negativo, se utilizó un tubo de reacción en ausencia de ARN.

PCR en Tiempo Real: El análisis cuantitativo de la PCR se realizó utilizando el QuantiTect SYBR Green PCR Kit para Real Time 1X (QIAGEN-GMBH), 10 pmoles de cada oligonucleótido y 2 µl de ADNc (100 ng), en un volumen final de reacción de 20 µl, por duplicado. La reacción de amplificación en tiempo real se llevó a cabo en un equipo de PCR en tiempo real Mx3005P QPR Systems STRATGENE (Agilent Technologies). Se utilizaron pares de oligonucleótidos (Invitrogen) específicos para cada gen de interés: GADPH,  $\mu$ ,  $\delta$  y

κ. En la Tabla 1 se detalla la secuencia de cada uno de los oligonucleótidos, el número de pares de bases y el largo del amplicón. Las condiciones de amplificación comprendieron una pre-incubación a 95 °C por 15 min seguido de la etapa de amplificación del ADNc durante 40 ciclos: 95 °C x 30'' -desnaturalización- 55 °C x 1' -annealing- 72 °C x 30'' -elongación-. Las diferencias cuantitativas entre las muestras se determinaron a través del cálculo de la expresión relativa entre el gen de interés y el gen de expresión constitutiva (GADPH). El cálculo de la expresión relativa se obtuvo aplicando el modelo matemático descrito por Pfaffl (2001), utilizándose el gen de la subunidad ribosomal menor GADPH como gen de expresión constitutiva. A partir de los Ct obtenidos para cada muestra de interés se calculó la expresión relativa. Además del control específico de cada grupo experimental (i.e. animales PV machos y hembras como controles de animales PE machos y hembras), se utilizó un control adicional, compuesto por un pool de muestras correspondientes a todos los machos PV a la cual se refirió el resto de las muestras.

Gen blanco		Secuencia 5'-3'	Largo de cada oligonucleótido
GADPH	sentido	TGTGAACGGATTTGGCCGTA	20
	antisentido	ATGAAGGGGTCGTTGATGGC	20
MU	sentido	CTGTCTGCCACCCAGTCAA	20
	antisentido	TGCAATCTATGGACCCCTGC	20
DELTA	sentido	TCGTCCGGTACACTAAGCTG	20
	antisentido	GGCCACGTTTCCATCAGGTA	20
KAPPA	sentido	CCAAAGTCAGGGAAGATGTGGA	22
	antisentido	TCAAGCGCAGGATCATCAGG	20

**Tabla 1.** Secuencias de oligonucleótidos, el número de pares de bases y el largo del amplicón de cada gen objeto utilizado en la técnica de RT-PCR.

## *Diseños Experimentales y Análisis de Datos*

*Experimento 1:* El objetivo del primer experimento fue evaluar el consumo de etanol en animales adolescentes tratados con etanol (PE) o vehículo (PV) durante la gestación tardía (DG 17-20, dosis 2,0 g/kg i.g.). El experimento responde a un diseño factorial 2 [tratamiento prenatal (PE, o PV)] x 2 [sexo (macho o hembra)]. Los 4 grupos finales tenían entre 7 y 8 sujetos cada uno. Para cada variable dependiente analizada (i.e. peso corporal; g/kg consumidos de etanol; porcentaje de preferencia por etanol; consumo de fluidos totales), se realizaron diferentes ANOVAs de medidas repetidas tomando como factores entre grupos el tratamiento prenatal (PE, PV) y sexo (macho, hembra) y como factor intragrupo la sesión (4 sesiones). Los efectos significativos ( $p < 0,05$ ) se analizaron mediante análisis post-hoc de Tukey

*Experimento 2:* El experimento anterior evaluó consumo de etanol en adolescentes tratados con etanol en útero, pero sólo en 4 sesiones de 2 horas cada una. El Experimento 2, que responde a un diseño 2 [tratamiento prenatal (PE, PV)] x 2 [sexo (macho, hembra)], tuvo como objetivo replicar y ampliar este hallazgo. Para ello se midió consumo de etanol en animales tratados (o no) con etanol en útero durante toda la adolescencia (4 semanas, entre los días postnatales 30 a 56). Los 4 grupos finales tenían entre 8 y 11 sujetos cada uno. Se realizaron ANOVAs de medidas repetidas para cada variable dependiente bajo análisis: g/kg, porcentaje de preferencia, consumo de fluidos totales (ml/100g) y peso corporal, utilizando como variables independientes el tratamiento prenatal y el sexo; y como medidas repetidas, las 12 sesiones de ingesta a las que fueron expuestos los sujetos.

*Experimento 3:* Nos propusimos evaluar la reactividad emocional basal (i.e., emisión de vocalizaciones ultrasónicas apetitivas y aversivas, y actividad motora) y la modulación de la misma por la intoxicación con etanol, en animales adolescentes que habían sido expuestos a etanol en útero. Un objetivo importante era evaluar la actividad neural basal e inducida por etanol (i.e., expresión de c-Fos en PL, IL, AcC y AcSh) en dichos animales. El experimento empleó un diseño factorial 2 [tratamiento prenatal (PE, PV)] x 3 [tratamiento postnatal (etanol: 2,5 g/kg i.g., vehículo o no tratados: NT)] x 2 [Sexo (macho o hembra)]. Los 12 grupos finales tenían entre 7 y 9 sujetos cada uno. Para el análisis de la actividad locomotora se llevó a cabo un ANOVA de medidas repetidas, tomando como factores independientes el tratamiento prenatal, tratamiento postnatal y sexo; como variable dependiente se utilizó la distancia recorrida (cm); y como medidas repetidas,

los min de evaluación (5 min). Para analizar la frecuencia y duración de vocalizaciones ultrasónicas emitidas (variables dependientes), se realizaron ANOVAs factoriales separados para cada banda de emisión (i.e. banda apetitiva, banda aversiva); esto se debe a que, basalmente, la banda apetitiva presentó menor frecuencia significativa de emisiones que la banda aversiva en el ANOVA de medidas repetidas ómnibus [ $F_{(1, 78)}=68,04$ ,  $p<0,01$ ]. En cuanto a la actividad neural (c-Fos) se realizó un ANOVA factorial para cada área estudiada (PL, IL, AcC, AcSh) tomando como factores independientes tratamiento prenatal, postnatal y sexo, y como variable dependiente el promedio de células c-Fos positivas. Se analizó un  $n=6$  por grupo de cerebros.

*Experimento 4:* En el presente experimento se analizaron posibles diferencias en cuanto a la metabolización de etanol, mediante la medición de alcohol en sangre (mg%) por cromatografía gaseosa. Se empleó un diseño 2 [tratamiento prenatal (PE o PV)] x 3 [tiempo de medición de alcohol en sangre (30 min, 60 min o 180 min)] x 2 [sexo (macho o hembra)]. Los 12 grupos finales tenían entre 5 y 8 sujetos cada uno. Se realizó un ANOVA factorial tomando como factores independientes el tratamiento prenatal, sexo y –dado que los tiempos post-administración corresponden a grupos independientes- tiempo de medición.

*Experimento 5:* Este experimento analizó posibles diferencias en activación neural (c-Fos) basal o inducida por etanol entre animales tratados prenatalmente con etanol o vehículo. Se empleó un diseño factorial 2 [tratamiento prenatal (PE, PV)] x 3 [tratamiento postnatal (2,5 g/kg etanol, vehículo o no tratado)]. Los 6 grupos finales tenían entre 5 y 6 sujetos cada uno. Se realizó un ANOVA factorial para cada área estudiada (PL, IL, AcC, AcSh) tomando como factores independientes tratamiento prenatal, postnatal y sexo y como variable dependiente el promedio de células c-Fos positivas.

*Experimento 6:* De manera de analizar en más profundidad posibles diferencias en sistema mesocorticolímbico de animales tratados con etanol en útero, se evaluó actividad neural en núcleo accumbens Shell, así como actividad catecolaminérgica en Área Tegmental Ventral (ATV, por sus siglas en inglés). El experimento empleó un diseño factorial 3 [tratamiento prenatal (PE, PV o PNT)] x 4 [tratamiento postnatal (salina; 1,25 g/kg; 2,5 g/kg y 3,25 g/kg)]. Los 12 grupos finales tenían entre 3 y 5 sujetos cada uno. Para cada área en análisis (i.e. AcSh y ATV) se realizó, en una primera instancia, un ANOVA factorial para los grupos controles tratados postnatalmente con salina, de manera de analizar posibles diferencias basales en actividad de c-Fos y c-Fos + TH. Esto es, se tomó

como factor independiente el tratamiento prenatal y como variable dependiente el número de células positivas para c-Fos o c-Fos + TH (ATV). Para analizar la actividad neural y catecolaminérgica inducida por etanol, se tomó como variable dependiente el porcentaje de activación en relación al promedio de su grupo control específico (grupo salina). Para confirmar que un grupo determinado estuviera exhibiendo activación neural o catecolaminérgica inducida por etanol, se realizaron pruebas *t* contra una muestra teórica para confirmar que los porcentajes con respecto al control difieran de 100%.

*Experimento 7a y 7b:* El Experimento 7a tuvo como objetivo evaluar posibles diferencias entre animales PE y PV en cuanto a la adquisición y extinción de aprendizajes asociativos. El mismo fue inspirado por resultados del Experimento 5, que indicó que los animales PE exhibían menor activación neural en corteza infralímbica, la cual participa en la extinción de aprendizajes asociativos. La hipótesis, por lo tanto, era que los animales PE no exhibirían déficits en la adquisición de aprendizaje asociativo, pero demorarían más sesiones para dejar de expresar este aprendizaje. En otras palabras, esperábamos encontrar déficits en la extinción, en estos animales con historia gestacional de etanol. Se realizaron cinco sesiones de evaluación/extinción.

El Experimento 7b, en tanto, tuvo como objetivo evaluar posibles diferencias entre animales tratados con etanol y controles en cuanto a la sensibilidad a los efectos aversivos del etanol. A diferencia del anterior, se realizó sólo una sesión de evaluación.

En el Experimento 7a se empleó un diseño factorial 3 [tratamiento prenatal (PV, PE o PNT)] x 5 [dosis de cloruro de litio administrada a los sujetos durante el condicionamiento (CLi, 0,0 M, 0,1 M, 0,2 M o 0,3 M)] y en el Experimento 7b se empleó un diseño 3 [tratamiento prenatal (PV, PE, PNT) x 2 tratamiento postnatal (2,5 g/kg etanol i.p., salina)]. En el Experimento 7a se midió el consumo de sacarina teniendo en cuenta el peso del animal [(ml totales consumidos x peso del animal) / 100] y sobre esta variable se aplicó un ANOVA factorial para el día del condicionamiento, en el cual se tomaron como factores entre grupos el tratamiento prenatal (etanol, vehículo y no tratado: grupos PE, PV y NT, respectivamente) y las dosis de litio utilizadas durante el condicionamiento (0,0 M, 0,1 M, 0,2 M y 0,3 M). Los 8 grupos finales tenían entre 7 y 12 sujetos cada uno. Además se llevó a cabo un ANOVA de medidas repetidas utilizando como variable dependiente las 5 sesiones de evaluación de consumo de sacarina (i.e. sesiones de extinción), y como factores independientes el tratamiento prenatal y las dosis de CLi.



En el Experimento 7b se analizó el consumo de solución salina durante el día del condicionamiento y durante el día de test mediante ANOVAs factoriales, los cuales tomaron como factores el tratamiento prenatal (PE, PV, PNT) y el tratamiento postnatal con etanol (0,0 o 2,5 g/kg). Los 4 grupos finales tenían entre 7 y 11 sujetos cada uno.

La razón para analizar el consumo del día de condicionamiento y evaluación/extinción por separado radica en que los mismos tuvieron diferente duración de tiempo (i.e. 30 min de condicionamiento y 60 min de evaluación/extinción). Mediante el uso de un tiempo relativamente corto de exposición al EC durante el condicionamiento se trató de evitar efectos no deseados de inhibición latente (i.e. seguridad aprendida hacia el EC que interfiera con la adquisición del aprendizaje aversivo).

*Experimento 8:* El Experimento 8 tuvo como objetivo analizar ARN mensajero (ARNm) de receptores opiáceos ( $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ ), en animales PE y PV. El Experimento respondió a un diseño 2 [tratamiento prenatal (PE, PV)] X 2 [sexo (macho, hembra)]. Se realizaron ANOVAs factoriales separados para cada área en análisis (IL, AcSh y ATV), y para cada gen objeto en particular ( $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ ).

Tal como se describió en el Capítulo 1, se realizaron análisis post-hoc de Tukey para cada factor principal o interactivo significativo que involucre medidas entre-sujetos. Para factores significativos que involucren medidas repetidas en interacción con medidas entre-sujetos, se realizaron análisis de comparaciones planeadas. En los casos que así se requiriera, se analizaron ANOVAs secuenciales.

## Experimento 1: Evaluación de Ingesta en adolescentes expuestos al etanol durante la gestación tardía.

El objetivo fue evaluar el efecto de la exposición a dosis moderadas de etanol durante la gestación tardía sobre el consumo de la droga, durante la adolescencia. La exposición prenatal al etanol aumenta el consumo de alcohol en ratas infantiles (Chotro et al., 2003; Arias & Chotro, 2005); sin embargo, la persistencia de este efecto hasta la adolescencia es incierto y poco estudiado (pero véase. Chotro & Arias, 2009; Diaz-Cenzano & Chotro, 2010).

### *Materiales y Métodos*

Se utilizó un total de 61 ratas Wistar-King Aptekman Hokkaido (WKAH/Hok); adolescentes (28 machos y 33 hembras) provenientes de 16 camadas. Tal como mencionáramos en el Capítulo 1, esta cepa endocriada era la que estaba disponible en el bioterio del INIMEC por ese entonces.

El día postnatal 35, los animales tuvieron una sesión de 24 h de adaptación a dos tubos graduados con agua en sus cajas de alojamiento. Los DPs 36-39 se evaluó el consumo voluntario de etanol utilizando un protocolo de ingesta estandarizado descrito en el apartado de procedimientos generales. Brevemente, los adolescentes tuvieron acceso simultáneo a agua y una solución de etanol durante 2 h (3% en la primera sesión, incrementándose en 1% por día hasta alcanzar 6% en la última sesión). Para evitar sobrerrepresentación de camadas en un tratamiento prenatal específico cada vez que se evaluó más de un macho y una hembra por camada, se promediaron dichas medidas individuales por sexo y tratamiento. Finalmente, cada grupo contó con 7-8 unidades de análisis.

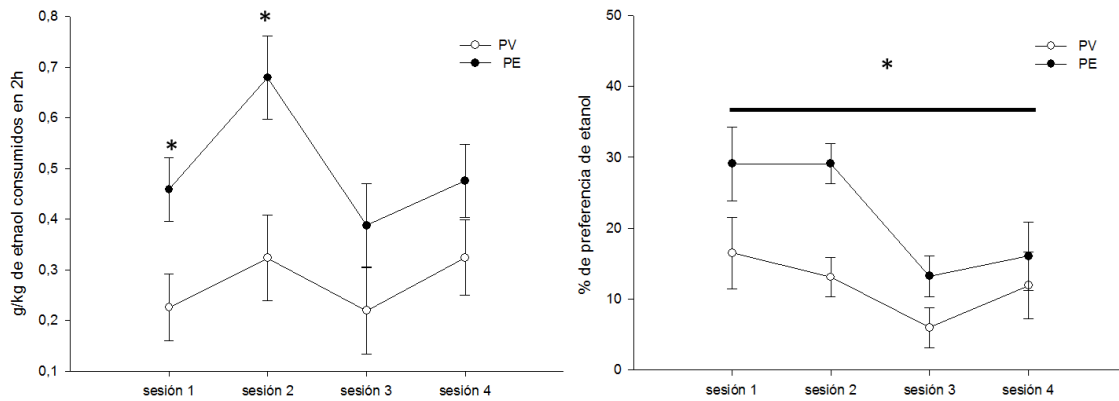
### Resultados

Para cada variable dependiente analizada (i.e. peso corporal; consumo total de líquidos; consumo de etanol), se realizaron diferentes ANOVAs de medidas repetidas teniendo como factores de comparación entre grupos a tratamiento prenatal (PE, PV) y sexo (macho, hembra) y como factor intragrupo las sesiones (4 sesiones).

El ANOVA de medidas repetidas para la variable peso corporal (g), arrojó un efecto significativo del factor sesión [ $F_{(3, 81)}=17,21$ ,  $p<0,01$ ]. Análisis post-hoc de Tukey indicaron que los animales mostraron, en general, mayor peso durante la primera sesión (DP36). Las medias  $\pm$  EEM del peso (g) en los animales expuestos prenatalmente a etanol (PE) fueron  $85,36 \pm 7,01$ ,  $80,21 \pm 11,77$ ,  $77,84 \pm 11,00$  y  $79,15 \pm 12,72$ ; mientras que las medias de los animales expuestos a vehículo prenatal (PV) fueron  $84,82 \pm 9,95$ ,  $80,33 \pm 7,24$ ,  $78,35 \pm 6,88$  y  $78,02 \pm 6,77$  para cada sesión (i.e. DP 36, DP37, DP38 y DP 39, respectivamente).

En cuanto al análisis de la variable de consumo de líquido total (ml/100g); se observó un efecto principal de sesión [ $F_{(3, 81)}=11,07$ ;  $p<0,01$ ], el cual indicó un aumento de consumo de líquidos a lo largo de las sesiones, como lo confirma el análisis post hoc de Tukey. Las Medias  $\pm$  EEM colapsando tratamiento prenatal y sexo fueron DP 36,  $6,32 \pm 0,32$ ; DP 37,  $7,68 \pm 0,32$ ; DP 38,  $8,55 \pm 0,48$  y DP 39,  $8,35 \pm 0,39$ .

Las medias  $\pm$  EEM para consumo de etanol se muestran en la Figura 12 (panel izquierdo: g/kg consumidos; panel derecho: porcentaje de preferencia). El ANOVA indicó que los animales con exposición prenatal al etanol mostraron un incremento en el consumo (g/kg) y en porcentaje de preferencia en relación a sus controles [efecto principal de tratamiento prenatal [ $F_{(1,27)}=9,86$ ,  $p<0,01$ ; y  $F_{(1,25)}=9,48$ ,  $p<0,01$  respectivamente]. Este efecto sobre el consumo de etanol como producto de la experiencia prenatal fue relativamente constante en todas las sesiones. Se observó, además, un efecto principal de sesión para g/kg [ $F_{(3,81)}=3,38$ ,  $p<0,05$ ] y porcentaje de preferencia [ $F_{(3, 75)}=5,17$ ,  $p<0,01$ ]. Análisis post-hoc de Tukey indicaron un consumo en g/kg significativamente mayor en la segunda sesión que en el resto. En cuanto a la preferencia por etanol, los análisis post-hoc indicaron mayor consumo significativo en las 2 primeras sesiones con respecto a la tercer sesión.



**Figura 12.** Consumo de etanol de animales adolescentes que habían sido expuestos a etanol en útero (PE; dosis 2,0 g/kg DG 17-20) o a vehículo (PV). Se evaluó el consumo de etanol durante 4 sesiones (DP 37-39 de los animales). En el panel izquierdo, se muestra el consumo de etanol en términos de g/kg de etanol consumidos; en el panel de la derecha, se muestra el consumo en términos de porcentaje de preferencia por el etanol. No se observaron efectos significativos de sexo para ninguno de los factores considerados. Para g/kg consumidos (panel izquierdo) se observó un efecto interactivo de sesión x tratamiento prenatal, donde los animales PV consumieron mayores cantidades de etanol que los PV en las primeras dos sesiones (\* $p < 0,05$ , ANOVA de medidas repetidas). Para porcentaje de preferencia (panel izquierdo) se observó un efecto principal de tratamiento prenatal ( $p < 0,01$ , ANOVA de medidas repetidas).

Estos resultados sugieren que la exposición prenatal aumenta el consumo de etanol durante la adolescencia. Cabe destacar que, en este experimento, las sesiones de evaluación eran acotadas (2 h), se daban sólo durante cuatro días, y eran precedidas por 22 h de privación de agua, lo cual suma al estrés hídrico como variable de confusión. El próximo experimento de esta tesis doctoral intentará resolver parte de estas limitaciones.

### **Experimento 2:** Evaluación crónica de consumo de alcohol en animales expuestos a etanol durante la gestación tardía.

En el experimento anterior, se observó que animales expuestos a dosis moderadas de etanol en útero (2,0 g/kg; DGs 17-20) mostraron un incremento significativo en el consumo de esta droga, con respecto a sus controles, cuando fueron evaluados los DPs 36-39 en un protocolo de ingesta acotado de doble vía. Este protocolo implicó un importante estrés hídrico (véase Pepino et al., 2004; Ponce et al., 2004; 2008) y una evaluación muy acotada en el tiempo (i.e. 4 sesiones de 2 h cada una). Dado el potencial factor de confusión que introducía el estrés hídrico, y que el interés de este trabajo radica en observar la persistencia de los efectos del etanol prenatal durante toda la adolescencia, se decidió emplear un protocolo de evaluación de ingesta en el que animales adolescentes -expuestos

o no a la droga durante la gestación tardía- son evaluados en un esquema de ingesta intermitente (Simms et al., 2008) durante 4 semanas. De esta manera, se pudo establecer un perfil de los patrones de consumo étílico en animales expuestos a etanol en útero a lo largo de toda la adolescencia minimizando, a su vez, factores de confusión.

#### *Materiales y Métodos*

Se utilizó un total de 37 ratas Wistar adolescentes provenientes de 32 camadas. Durante los días gestacionales 17 al 20 las hembras preñadas recibieron una i.g. de etanol (grupo PE, n = 18) o vehículo (grupo PV, n = 19). El diseño del experimento fue un 2 (exposición prenatal) X 2 (sexo). Los animales permanecieron en condiciones de alojamiento estándar hasta el momento de ser evaluados en el protocolo de ingesta (DP 37).

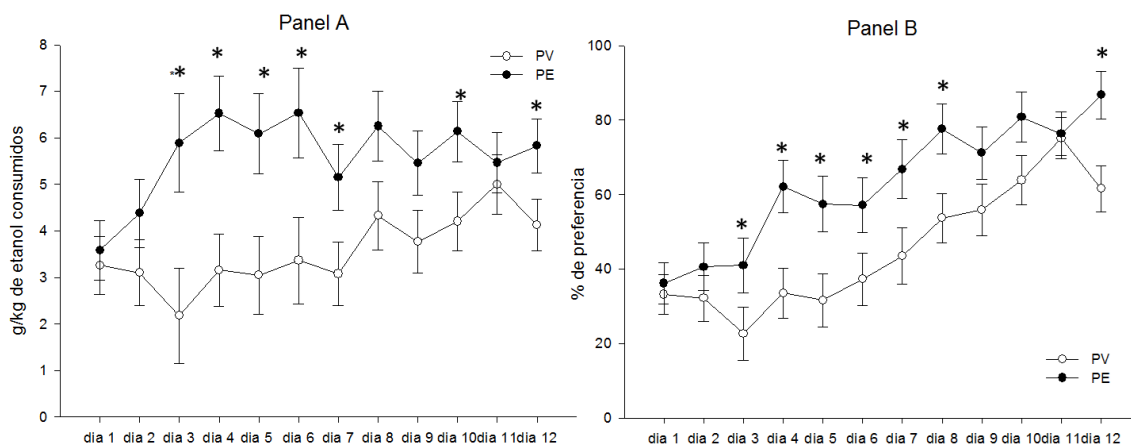
Para la evaluación de ingesta de alcohol se utilizó un esquema de ingesta intermitente de 4 semanas (Simms et al., 2008), siguiendo los parámetros explicados en el apartado de procedimientos generales. Brevemente, los animales fueron expuestos a 12 sesiones de doble botella (18 h de duración) día de por medio. Para motivar el acercamiento a las soluciones etílicas, las primeras 3 sesiones las botellas –tanto de etanol como de vehículo- estaban endulzadas con 1% de sacarosa. A partir de la 4ta sesión, se fue retirando el endulzante (0,5 % de sacarosa) hasta llegar a utilizar agua como vehículo en la séptima sesión (véase apartado de procedimientos generales para más detalles).

#### *Resultados*

Cuando se analizó el peso corporal de los animales a lo largo de las sesiones, se observaron efectos principales de sexo [ $F_{(1, 32)}=54,50$ ,  $p<0,01$ ], sesión [ $F_{(11, 352)}=239,67$ ,  $p<0,01$ ]; y un efecto interactivo entre sexo y sesión [ $F_{(11, 352)}=34,28$ ,  $p<0,01$ ]. En general, los animales fueron aumentando de peso a lo largo de las sesiones y los machos pesaban más que las hembras. Análisis post-hoc de Tukey confirmaron la diferencia de peso entre machos y hembras y comparaciones planeadas confirmaron que la diferencia fue constante a lo largo de las sesiones (todas las  $p<0,05$ ).

Se realizó un ANOVA de medidas repetidas sobre el consumo de etanol (g/kg y porcentaje de preferencia), usando como variables independientes el tratamiento prenatal y el sexo; y como medidas repetidas, las 12 sesiones de ingesta a las que fueron sometidos

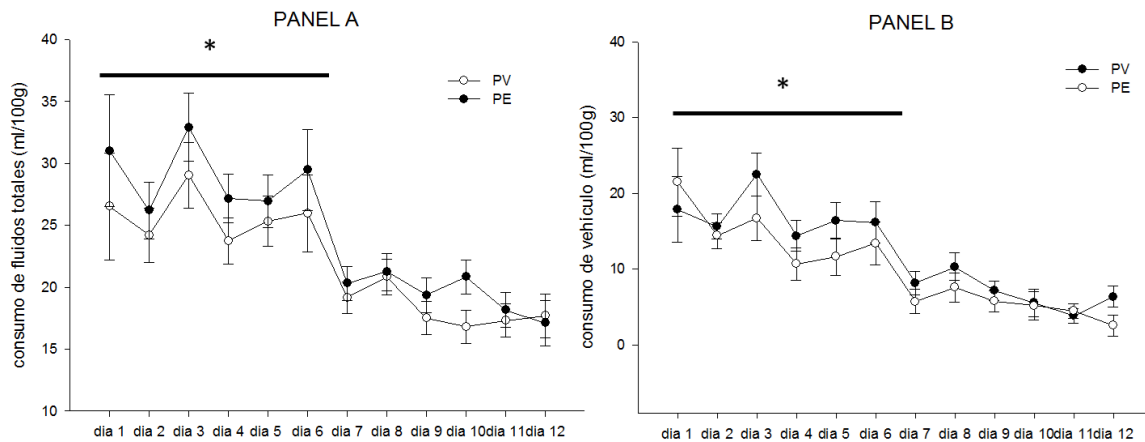
los sujetos. El ANOVA para g/kg de etanol consumidos indicó efectos principales significativos de tratamiento prenatal [ $F_{(1, 33)}= 6,56, p<0,05$ ]; sesión [ $F_{(11, 363)}=2,79, p<0,01$ ] y un efecto interactivo significativo de tratamiento prenatal x sesiones [ $F_{(11, 363)}=2,16, p<0,05$ ]. Análisis post-hoc de Tukey y comparaciones planeadas confirmaron que los animales expuestos a etanol en útero consumieron más g/kg de etanol que los controles (Figura 13, Panel A), e indicaron que las diferencias significativas entre los grupos comienzan a partir de la Sesión 3 y se mantienen a lo largo de las sesiones, a excepción de los días 8, 9 y 11. En términos de porcentaje de preferencia, se observó un efecto significativo principal de tratamiento prenatal [ $F_{(1, 32)}=4,98, p<0,05$ ], de sesión [ $F_{(11, 352)}=22,14, p<0,01$ ] y un efecto significativo de la interacción entre sesión y sexo [ $F_{(11, 352)}=3,37, p<0,01$ ] (Figura 13, Panel B). Análisis post-hoc de Tukey confirmaron que los animales expuestos a etanol en útero prefieren significativamente más el etanol que sus controles.



**Figura 13.** Consumo de etanol de animales adolescentes machos y hembras expuestos a etanol en útero (PE; dosis 2,0 g/kg DG 17-20) o a vehículo (PV). Se evaluó el consumo de etanol (5,6% v/v en 1% de sacarosa) o vehículo en sesiones intermitentes (3 sesiones por semana durante 4 semanas) de 18h de duración. En el panel A, se muestra el consumo de etanol en términos de g/kg de etanol consumidos; en el panel B, se muestra el consumo en términos de porcentaje de preferencia por el etanol. Los puntos representan las medias colapsadas por sexo por no resultar significativo el factor. Las barras, los EEM. Los asteriscos indican diferencias significativas entre PE y PV (\* $p<0,05$ , ANOVAs de medidas repetidas).

Los resultados indican que los animales expuestos al etanol en útero consumen más de la droga que sus controles, y que este efecto se observa en sesiones en los cuales el alcohol esta endulzado, como así también cuando el alcohol deja de estar endulzado. Esta diferencia en consumo, además, persiste de manera prolongada, durante toda la adolescencia. En nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que ha hecho un seguimiento a mediano plazo de la ingesta de alcohol en adolescentes expuestos al alcohol

durante la gestación tardía, y que da cuenta de la persistencia de los efectos de la experiencia prenatal con la droga.



**Figura 14.** Consumo de fluidos totales (ml/100g; PANEL A) y consumo de vehículo (ml/100g; PANEL B) de animales expuestos a dosis moderada de etanol (PE; 2,0 g/kg) o vehículo (PV, agua de pico) durante los días gestacionales 17-20. Se observó un efecto principal de sesión para el consumo de fluidos totales y consumo de vehículo (graficado con asterisco y barra horizontal), donde las primeras 6 sesiones el consumo total de fluidos era mayor. Los puntos indican las medias y las barras los EEM.

Por último, en cuanto al consumo general de líquidos (ml/100g), se observó que el mismo fue incrementando a lo largo de los días [efecto significativo principal de sesiones;  $F_{(11, 385)}=13,19$ ,  $p<0,01$  (Figura 14, Panel A)]. Los análisis de comparaciones planeadas indicaron que el consumo total de fluidos fue más alto las primeras 6 sesiones, cuando ambas soluciones estaban endulzadas [ $F_{(1,35)}=55,33$   $p<0,01$ ]. El ANOVA para consumo de vehículo también arrojó diferencias entre sesiones [ $F_{(11, 330)}=8,33$ ,  $p<0,01$  (Figura 14, Panel B)]. Las comparaciones planeadas indicaron mayor consumo en las primeras 6 sesiones que en las restantes, [ $F_{(1,30)}=45,96$   $p<0,01$ ]. En ninguno de los análisis se observó un efecto principal significativo de tratamiento prenatal, ni este factor interactuó significativamente con las sesiones de evaluación. Estos resultados indican que la diferencia en ingesta absoluta y preferencia por alcohol causada por el tratamiento prenatal es exclusiva hacia el etanol y no se debe a una preferencia inespecífica hacia la sacarosa o a polidipsia inducida por el acceso intermitente.

### *Experimento 3: Reactividad frente al Etanol en Animales expuestos a la droga durante la gestación tardía*

En los experimentos anteriores hemos observado que la exposición prenatal a dosis moderadas de etanol durante la gestación tardía aumentó el consumo de la droga durante

la adolescencia. Los factores subyacentes a este fenómeno, sin embargo, son aún inciertos. Una posibilidad sería que los adolescentes expuestos prenatalmente al etanol, muestren diferencias en sensibilidad a los efectos estimulantes del alcohol, lo cual podría indicar diferencias en la capacidad reforzante de la droga. Otra alternativa, es que los adolescentes expuestos al alcohol en útero exhiban ansiedad incrementada. Bajo esta última posibilidad el consumo de alcohol exacerbado estaría impulsado por el efecto ansiolítico de la droga, en un intento de mitigar esta ansiedad exacerbada. Para añadir evidencia confirmatoria (o no) de estas posibilidades, se evaluaron ratas adolescentes expuestas al etanol durante la gestación tardía (DGs 17-20) en actividad locomotora y emisión de vocalizaciones ultrasónicas (USV). Los animales fueron evaluados sin que medie manipulación o administración de drogas (grupo no tratado; NT), o luego de la administración de etanol (2,5 g/kg) o vehículo (i.e. 0,0 g/kg).

Las ratas preadolescentes suelen emitir USV cuando están estresadas o separadas de su madre (Blumberg & Alberts, 1990; Kraebel et al., 2002). Las vocalizaciones ultrasónicas que han sido caracterizadas como aversivas en animales adultos rondan el rango entre 20-30 kHz y las vocalizaciones consideradas apetitivas, entre el rango de 50-60 kHz (Panksepp & Burgdorf, 2003). En vista de que los animales expuestos a etanol en útero presentan preferencias hacia esta droga luego en el desarrollo (e.g. Chotro et al., 1991; Chotro et al, 2007; Arias & Chotro, 2006; Pautassi et al., 2012), la hipótesis subyacente al uso de esta técnica en adolescentes PE fue que éstos mostrarían mayor frecuencia de emisiones de vocalizaciones ultrasónicas apetitivas frente al etanol luego de la administración de 2,5 g/kg i.g. Mientras que se esperaba que los animales PV emitieran mayor cantidad de vocalizaciones de tipo aversivas frente a esta situación experimental.

La exposición prenatal a etanol genera ciertos fenotipos característicos, entre ellos, hiperactividad motora tanto en adultos (e.g., Kim et al., 2014, Brys et al., 2014) como en infantes (Arias et al., 2008). Así entonces, medimos actividad locomotora en campo abierto, en animales PE y PV administrados con etanol (2,5 g/kg), vehículo (0,0 g/kg), o sin tratamiento. La prueba de campo abierto es utilizada para evaluar los efectos estimulantes de drogas de abuso, que se teorizan presentan homologías con mecanismos biológicos del reforzamiento positivo (Wise & Bozarth, 1987; véase introducción de Experimento 1,



Capítulo 1). Nuestra hipótesis era que el etanol prenatal exacerbaría tanto la locomoción espontánea como la inducida por etanol en ratas adolescentes.

La administración sistémica de etanol genera activación en numerosas áreas del SNC tanto cuando es administrado de manera aguda, como luego de un tratamiento crónico (si bien el mapa de activación es diferente en uno y otro caso, véase Vilpoux et al., 2009). Es posible hipotetizar que la exposición prenatal a etanol podría alterar la actividad neural del SNC y la respuesta neural al etanol postnatal. Por ejemplo, en un estudio se analizó la actividad neural a partir de la expresión de c-Fos en hipocampo de animales adultos que habían sido expuestos a etanol en útero (0,0; 0,5 o 2,0 g/kg i.g. durante la última semana gestacional). Se observó que el etanol reducía, y de manera dosis-dependiente, la activación de este gen de expresión temprana, indicador de actividad neural (Jang et al., 2005). En otro estudio, Lawrence y colaboradores (2008) encontraron aumento en actividad de núcleo accumbens en hembras y una disminución en la actividad neural de los machos en este núcleo -medida por c-Fos- luego de la exposición a 4,5 g/kg i.g. de etanol durante toda la gestación (DGs 1-22); este efecto sexualmente dimórfico se observó sólo cuando los animales eran expuestos a un contexto de juego social. Al parecer, las pruebas con componentes sociales son más sensibles para detectar alteraciones neurales luego de la exposición a alcohol in-útero. Luego de un test de interacción social se observó menor actividad en la corteza prelímbica de animales expuestos a etanol en útero que en animales que habían sido expuestos a vehículo (Hamilton et al., 2010). Los estudios de Jang y Lawrence demuestran no sólo que la exposición a etanol en útero resulta en déficits a nivel comportamental, sino también que estas diferencias pueden correlacionarse con menor activación de c-Fos en áreas asociadas al aprendizaje (i.e. hipocampo) o al circuito de recompensa (e.g. núcleo accumbens). En base a estos antecedentes, el objetivo del presente experimento fue analizar actividad neural de ratas adolescentes expuestas prenatalmente a la dosis de etanol que, en los experimentos previos, había promovido a corto y largo plazo el consumo de la droga. Para ello, se midió la activación de c-Fos en áreas del sistema mesocorticolímbico (i.e. corteza prefrontal y núcleo accumbens) de manera basal y luego de la administración de etanol (2,5 g/kg i.g.). La hipótesis s fue que los animales PE presentarían diferencias de activación neural basal

en las áreas estudiadas (posiblemente una hipoactivación). Por otro lado, esperábamos encontrar mayor activación de c-Fos inducida por etanol postnatalmente

### *Materiales y Métodos*

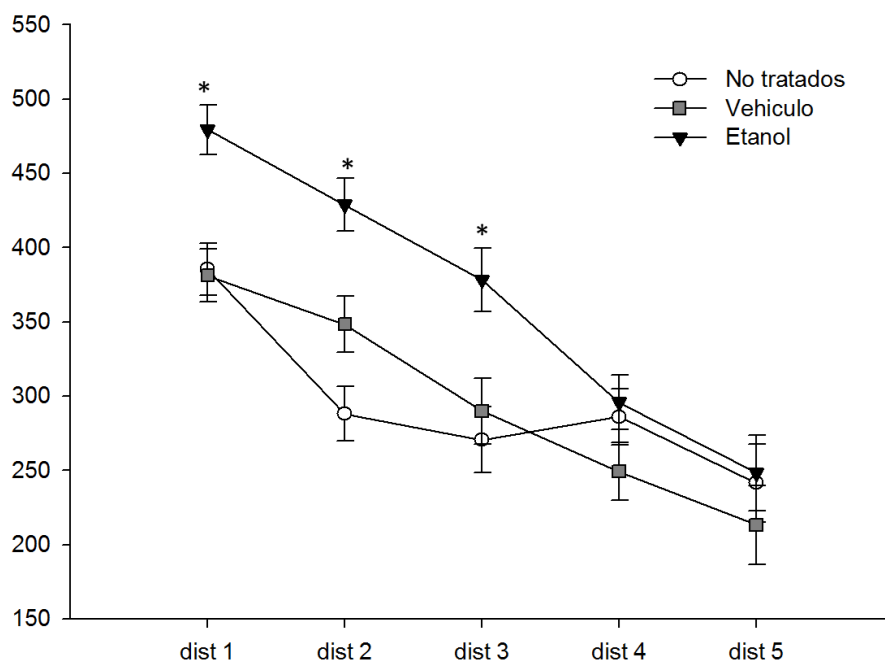
El experimento empleó un diseño factorial 2 [tratamiento prenatal (PE, PV)] x 3 [tratamiento post-natal con etanol (0,0 o 2,5 g/kg, o NT)] x 2 [Sexo (macho o hembra)]. Se utilizaron 96 ratas Wistar machos y hembras adolescentes (DP 36), representativos de 16 camadas. Los animales provinieron de hembras preñadas que recibieron una administración intragástrica diaria de 0,015 ml/g de una solución de 16,8% v/v de etanol (grupo PE; vehículo: agua de pico a temperatura ambiente; dosis de etanol: 2,0 g/kg; n= 8 hembras preñadas) o un volumen similar de vehículo (grupo PV; n= 8 hembras preñadas) durante los días gestacionales 17 al 20. Las crías fueron destetadas al DP21. Al DP 36, los animales recibieron una dosis de 2,5 g/kg i.g. de etanol (grupo postnatal etanol: 2,5 g/kg), vehículo (grupo postnatal vehículo: 0,0 g/kg) o no recibieron tratamiento farmacológico (NT). A los 5 min post-administración, fueron evaluados en una caja de medición de actividad, equipada con sensores, que permiten medir la distancia recorrida (cm) durante 5 min (ITCOMM, Córdoba). Luego, se midió la emisión de vocalizaciones ultrasónicas en una caja aislada de sonido equipada con un micrófono sensible, adosado a una computadora que permite medir emisiones ultrasónicas en bandas determinadas (MED-PC, St. Albans, USA).

A los 90 min post-administración, se realizó una perfusión intracardíaca a los animales y se fijaron los cerebros en paraformaldehído al 4%. Se eligió este tiempo post-administración, debido a que el máximo de expresión de este gen de expresión temprana se alcanza entre los 90 y 120 min post-estímulo (Kóvacs, 2008). Un día después, los cerebros se conservaron en sacarosa al 30%. Posteriormente, se realizaron procedimientos de inmunohistoquímica para detectar la expresión de c-Fos en áreas pertenecientes al circuito mesocorticolímbico (i.e. IL, PL, AcC y AcSh) siguiendo los parámetros explicados en la sección de procedimientos generales.

### *Resultados*

Los animales desafiados postnatalmente con etanol (2,5. g/kg i.g.) demostraron mayor activación locomotora que los animales del grupo vehículo (0,0 g/kg) y que los

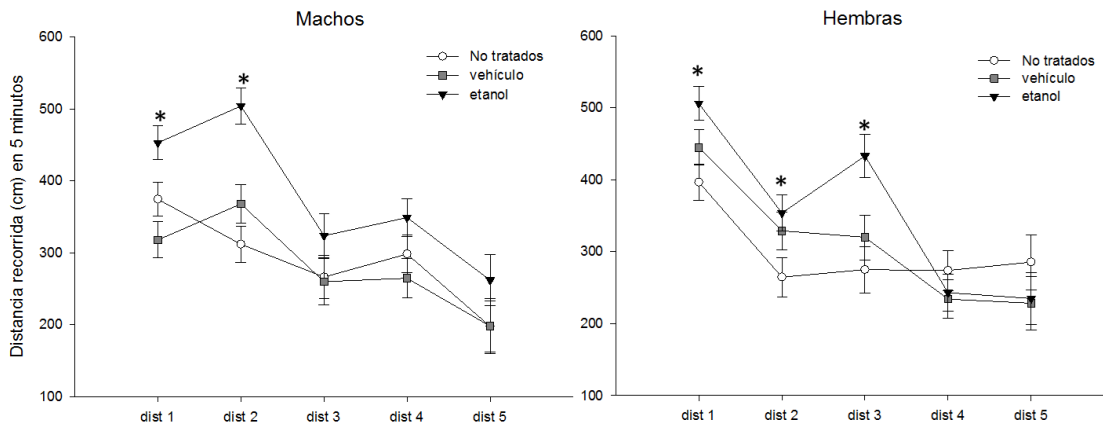
animales NT, [ $F_{(2, 91)} = 11.38, p < 0,01$ ] y esta actividad fue independiente del tratamiento prenatal. Además, se observó un efecto principal de los min de medición [ $F_{(8, 364)} = 2,86, p < 0,01$ ] y una interacción entre tratamiento postnatal y min de medición [ $F_{(8, 364)} = 2,86, p < 0,01$ ]. Tal como confirma el análisis de comparaciones planeadas, la diferencia entre los animales desafiados con 2,5 g/kg de etanol y los controles no tratados y vehículo (los cuales no difieren entre sí) se expresa en los primeros 3 min de la prueba. Estos resultados indican un efecto motor estimulante del etanol, pero no corroboran nuestras hipótesis de que este fenómeno estaría exacerbado en sujetos PE, ni que estos últimos exhibirían hiperactividad general (i.e., aún sin recibir etanol).



**Figura 15.** Medias y EEM de actividad locomotora (distancia recorrida en cm) minuto a minuto (panel izquierdo) en animales desafiados con una dosis de 2,5 g/kg (i.g.), vehículo (0,0) y no tratados. En este gráfico se colapsó el factor prenatal por falta de significancia estadística. Los asteriscos (\*) denotan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos postnatal etanol y los controles (vehículo, No tratados).

Además, se observaron interacciones significativas entre minuto de medición y sexo [ $F_{(4, 364)} = 9,63, p < 0,01$ ] y tratamiento postnatal x minuto de medición x sexo [ $F_{(8, 364)} = 1,98, p < 0,05$ ] (Figura 16). El análisis de comparaciones planeadas confirmó que las diferencias entre machos y hembras se presentan en el primer minuto de evaluación. Además, cuando se analiza mediante comparaciones planeadas las diferencias en las hembras, minuto a minuto, los animales que recibieron 2,5g/kg en agudo presentan mayor actividad que los

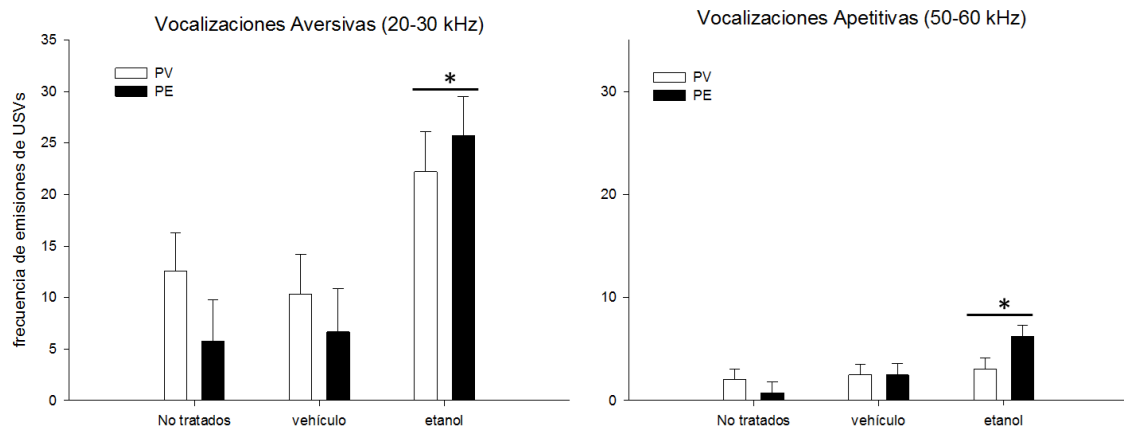
animales no tratados; pero esta diferencia no se presenta entre los animales que recibieron etanol y los que recibieron vehículo durante los dos primeros min, siendo significativa únicamente en el Minuto 3. Esto puede deberse a que las hembras fueron más sensibles al estrés producido por la administración intragástrica que los machos, quienes no mostraron esta particularidad.



**Figura 16.** Distancia recorrida (cm) de animales adolescentes machos (panel izquierdo) y hembras (panel derecho) que habían sido sometidos a etanol prenatal (2,0 g/kg) o vehículo (0,0 g/kg) durante los DGs 17-20. La evaluación de actividad locomotora se llevó a cabo a los 5 min post-administración de 2,5 g/kg de etanol o vehículo; además, fueron evaluados animales no manipulados (grupo no tratado) como un control adicional. Los puntos representan las medias y las barras los EEM. Se colapsó el factor prenatal por falta de significancia estadística.

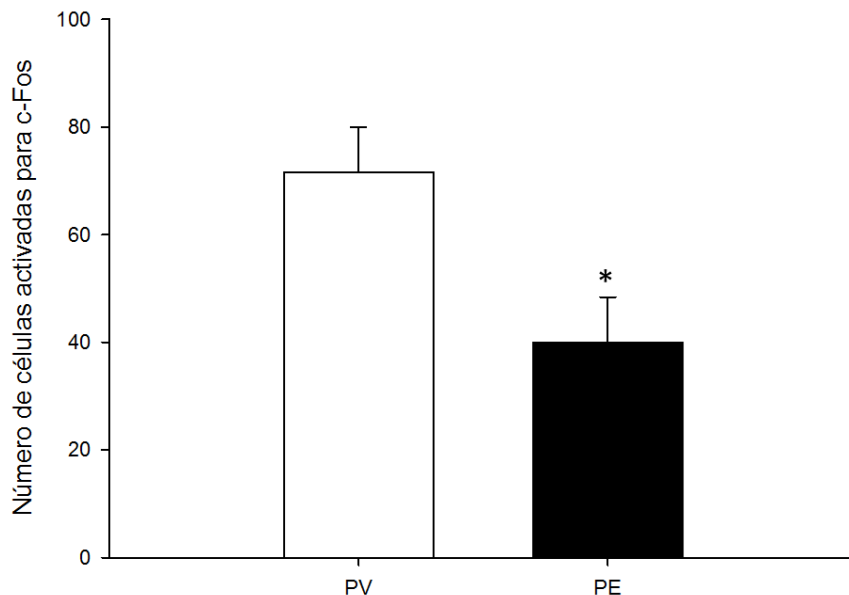
La exposición prenatal no ejerció efectos significativos sobre la frecuencia de emisión de vocalizaciones ultrasónicas, tanto aversivas como apetitivas. Como se observa en la figura 17, los animales emitieron más vocalizaciones aversivas que apetitivas y este efecto fue significativamente mayor luego de la administración postnatal de alcohol. El ANOVA factorial para la banda aversiva (20-30 KHz) indicó un efecto principal de tratamiento postnatal [ $F_{(2, 78)}=10,22, p<0,01$ ]. Análisis post-hoc de Tukey indicaron mayor cantidad de vocalizaciones ultrasónicas aversivas luego de la administración de alcohol que de vehículo, o que en los animales no tratados. Esto sugiere que la dosis alta utilizada en este experimento ejerció un efecto farmacológico, quizás de tipo ansiogénico, agregado al estrés propio de la manipulación durante las pruebas (Figura 17, panel izquierdo). Por otro lado, el ANOVA factorial para la banda apetitiva (50-60 KHz) también arrojó un efecto significativo de tratamiento postnatal [ $F_{(2, 78)}=5,19, p<0,01$ ]. Mediante análisis post-hoc de Tukey se observó que los animales tratados postnatalmente con

etanol emitieron más vocalizaciones apetitivas que el grupo control no tratado (Figura 17, panel derecho).



**Figura 17.** Frecuencia de emisión de vocalizaciones ultrasónicas aversivas (panel derecho) y apetitivas (panel izquierdo) de animales tratados con 2,0 g/kg de etanol (PE) o vehículo (PV) en útero durante la gestación tardía y administrados de forma aguda con 2,5 g/kg de etanol, vehículo o; no tratados 10 min antes de ser evaluados. Las barras representan las medias y los EEM. En el panel izquierdo, el asterisco ilustra la diferencia significativa entre los animales tratados con etanol postnatal y el resto de los grupos; en el panel derecho, la diferencia significativa señalada con asterisco (\*) se encuentra entre el grupo tratado con etanol postnatal y el control no tratado. El tratamiento prenatal no ejerció efectos significativos.

En relación a las pruebas neuroquímicas, ni el tratamiento prenatal ni el postnatal con etanol ejercieron un efecto significativo en la expresión de c-Fos en PL, AcC o AcSh. Sin



**Figura 18.** Promedio de número de células de corteza infralímbica marcadas positivamente para c-Fos en animales tratados con 2,0 g/kg de etanol (PE) o vehículo (PV) durante la gestación tardía (días gestacionales 17 a 20). Se colapsó el factor postnatal (administración de etanol (2,5 g/kg), vehículo o no manipulados), así como el factor sexo, por no alcanzar significancia estadística. Las barras denotan la media y EEM. El asterisco denota diferencia estadísticamente significativa entre PE y PV.

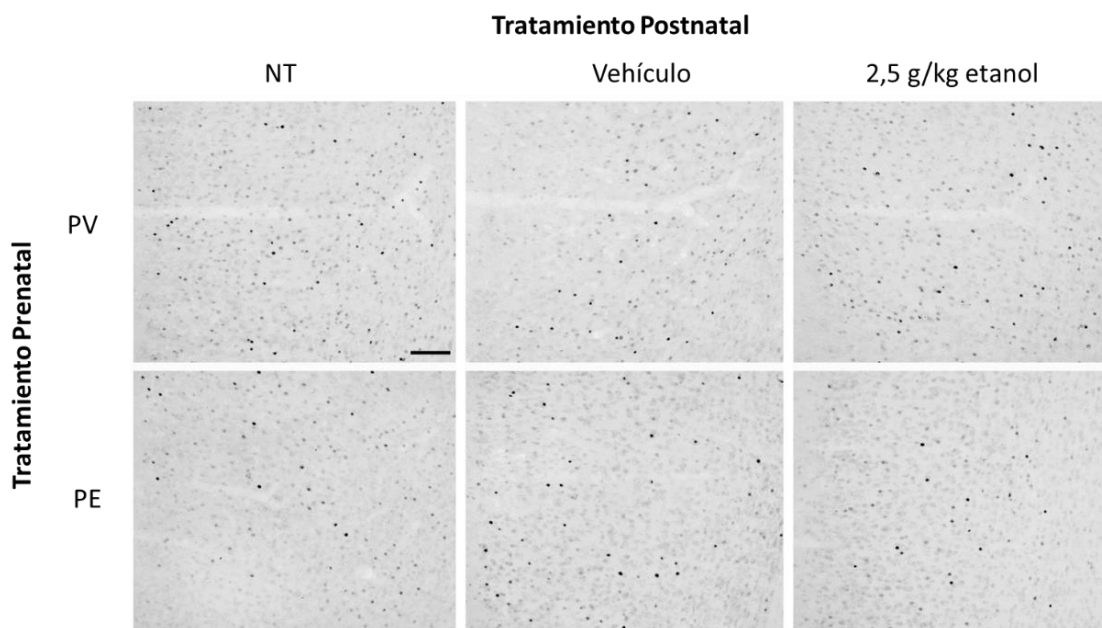
embargo, e interesantemente, se observó un efecto principal de tratamiento prenatal [ $F_{(1,47)} = 6,79$ ;  $p < 0,05$ ] sobre la activación de c-Fos en corteza infralímbica [IL, véase Figura 18; (nótese que, en el gráfico, se han colapsado los resultados en función del tratamiento postnatal y sexo, los cuales no afectaron la expresión de c-Fos)]. Los adolescentes con una historia de exposición prenatal a etanol presentaron menor marcación de c-Fos (i.e., general, independientemente del tratamiento prenatal) en corteza infralímbica que los controles expuestos a vehículo en útero, tal como confirmaron los análisis post-hoc. En la Tabla 2 se presentan las medias y EEM del número de c-Fos positivas para las áreas analizadas. En la figura 19 se ilustra la activación de células activadas en área IL, en función de tratamiento prenatal.

Tratamiento Prenatal	Tratamiento Postnatal	Experimento 3				Experimento 4			
		IL	PL	AcbC	AcbSh	IL	PL	AcbC	AcbSh
<b>Vehículo prenatal</b> <b>(DG 17-20)</b>	No tratados	60,65 ± 14,41	39,58 ± 4,97	2,87 ± 0,56	13,20 ± 3,01	39,53 ± 9,94	30,57 ± 9,89	3,40 ± 1,06	6,13 ± 2,53
	Vehículo	64,55 ± 13,99	54,25 ± 15,05	2,87 ± 0,74	9,17 ± 1,35	34,20 ± 5,93	41,47 ± 13,91	17,00 ± 13,73	8,70 ± 2,04
	Etanol (2.5 g/kg)	83,16 ± 23,07	44,92 ± 10,62	2,41 ± 0,92	11,83 ± 1,84	40,73 ± 8,13	30,28 ± 3,49	3,60 ± 1,24	6,93 ± 2,45
	No tratados	29,71 ± 5,19	27,67 ± 5,51	3,80 ± 2,69	8,92 ± 2,03	15,21 ± 4,63	16,92 ± 6,00	3,50 ± 0,78	1,67 ± 0,95
	Vehículo	43,03 +/- 8,08	34,96 +/- 7,24	5,24 +/- 2,83	15,17 +/- 3,99	29,56 +/- 13,31	50,67 +/- 13,31	3,33 ± 1,07	9,33 ± 1,76
	Etanol (2.5 g/kg)	47,91 ± 12,16	31,25 ± 5,97	6,15 ± 3,11	15,27 ± 6,04	24,00 ± 7,61	35,63 ± 5,95	2,17 ± 1,38	11,67 ± 4,26

**Tabla 2.** Número de células c-Fos positivas en corteza infralímbica y (IL and PL, respectivamente); y en núcleo accumbens core y shell (AcC y AcSh, respectivamente) en los experimentos 3 y 4 como producto de la exposición prenatal a 2,0 g/kg de etanol o vehículo (DG 17-20) y tratamiento postnatal durante la adolescencia (0,0 o 2,5 g/kg etanol, i.g., o no tratados). Los valores expresan las medias ± EEM.

En resumen, en el presente experimento se indagaron indicadores comportamentales y neurales en animales adolescentes expuestos prenatalmente al alcohol, en una modalidad que -en experimentos previos- había resultado en un consumo exacerbado de alcohol. El presente experimento apuntaba a indagar posibles mecanismos comportamentales y neurales que expliquen este fenómeno. Se observó, en concordancia con otros resultados de nuestro laboratorio (e.g. Acevedo et al., 2010) y del Capítulo 1 de este trabajo, activación locomotora inducida por una dosis relativamente elevada de etanol

(2,5 g/kg). Este efecto estimulante, sin embargo, no fue afectado por la exposición prenatal a la droga, como tampoco lo fue la actividad motora basal o espontánea. Trabajos previos que utilizaron este modelo de exposición prenatal han reportado hiperactividad motora basal durante la infancia (e.g. Arias et al, 2008; Brys et al, 2013, Kim et al, 2014). Esta aparente contradicción puede deberse a que este efecto de la exposición prenatal o bien desaparece en estadios posteriores del desarrollo o bien se ve aminorado cuando los sujetos se ven expuestos a la interacción con pares post-separación materna (como fue el caso en el presente experimento).



**Figura 19.** Microfotografías correspondientes a corteza infralímbica en animales adolescentes (DP37-39) no manipulados (NT), desafiados con una administración i.g. de vehículo o 2,5 g/kg de etanol; y que habían sido expuestos a etanol en útero (PANEL INFERIOR; PE; 2,0 g/kg) o expuestos a vehículo (PANEL SUPERIOR; PV) durante los DGs 17-20. Los puntos negros corresponden a núcleos de células positivas para c-Fos. Se colapsó el factor sexo, dado que no alcanzó significancia estadística.

La frecuencia de vocalizaciones ultrasónicas tampoco fue afectada por la experiencia prenatal. Sin embargo, la prueba arrojó información valiosa. En general, los animales emitieron más USV aversivos que apetitivos y este efecto fue exacerbado por la administración de alcohol. Se hipotetiza, entonces, que la manipulación asociada al experimento fue aversiva y que fue exacerbada por el alcohol. El etanol, al igual que otras drogas de abuso, genera efectos reforzantes positivos y negativos durante el transcurso del mismo episodio de intoxicación (Koob et al., 2004; Pautassi et al., 2009; Riley, 2011). En otras palabras, si bien la situación de evaluación sería per se aversiva para los animales, el

etanol estaría actuando en este caso como un aditivo, aumentando aún más dicha experiencia negativa.

Ni la prueba de actividad motora ni la de emisión de ultrasonidos indicaron diferencia entre animales expuestos o no al alcohol in-útero que brinden indicios de porqué los animales tratados con la droga aumentaban su consumo en la adolescencia. No obstante, se observó que los adolescentes que recibieron etanol vía uterina durante la gestación tardía exhibieron menor activación en corteza infralímbica. Esta área parece ser la responsable del inhibir la búsqueda de drogas psicotrópicas como cocaína o de estímulos condicionados que predicen estas drogas. Corteza infralímbica se encargaría, particularmente, de favorecer la extinción de estas conductas (Millan, 2011). Como se mencionara anteriormente, una hipótesis que subyace al aumento de preferencia por etanol en ratas expuestas a esta droga en útero, es que las mismas hayan aprendido una asociación entre las propiedades orosensoriales del etanol y sus consecuencias farmacológicas apetitivas (véase Molina & Spear, 2005; Abate et al., 2008). El hecho de que tengan, además, menor actividad en un área del SNC asociada a un deterioro de la capacidad de extinguir aprendizajes asociativos -como es IL- podría implicar que los animales no sean capaces de extinguir el aprendizaje hacia etanol, ocurrido en útero y que persistan en la búsqueda y consumo del psicotrópico aún en presencia de consecuencias adversas derivadas del consumo. Por lo tanto, es posible que un factor por el cual el consumo de etanol se viera exacerbado durante la adolescencia, implique una falla en este mecanismo neurobiológico de control, como resultado de la exposición in-útero.

***Experimento 4:*** Evaluación de curva de metabolización de etanol en adolescentes expuestos prenatalmente al etanol.

Una hipótesis alternativa para explicar el consumo diferencial de alcohol luego de la experiencia prenatal es que los adolescentes expuestos a la droga durante la gestación tardía presenten diferencias en la metabolización de alcohol. Podía ser posible, por ejemplo, que los animales PE exhiban tolerancia metabólica a la droga. Con el fin de indagar esta posibilidad, se midieron los niveles de alcohol en sangre -a diferentes puntos post-administración de 2,5 g/kg, i.g.- en adolescentes expuestos prenatalmente o no, al etanol.



### *Materiales y Métodos*

Se empleó un diseño 2 [tratamiento prenatal (PE o PV)] X 3 [tiempo de medición (30, 90 o 60 min)] X 2 [sexo (macho o hembra)]. Se utilizaron 72 animales Wistar machos y hembras (DP 36) tratados prenatalmente como se ha descrito anteriormente. Los animales recibieron una dosis de etanol de 2,5 g/kg i.g. y se tomaron muestras de sangre -en sujetos independientes- en los tiempos post-administración 30, 90 y 120 min. Se analizaron las muestras obtenidas mediante cromatografía gaseosa, tal como se explicó en el apartado de procedimientos generales.

### *Resultados*

El ANOVA reveló una ausencia de efectos principales significativos o interacciones significativas. Los niveles de etanol en sangre (mg%, medias  $\pm$  EEM) a los 30, 90 y 120 min post-administración fueron: 126,74  $\pm$  6,04, 119,23  $\pm$  16,35, 114,63  $\pm$  11,25, 120,71  $\pm$  11,22, 117,81  $\pm$  9,87, para adolescentes expuestos a etanol o vehículo en útero.

### ***Experimento 5:*** Activación neuronal en ratas adolescentes expuestas a etanol durante gestación tardía (replicación).

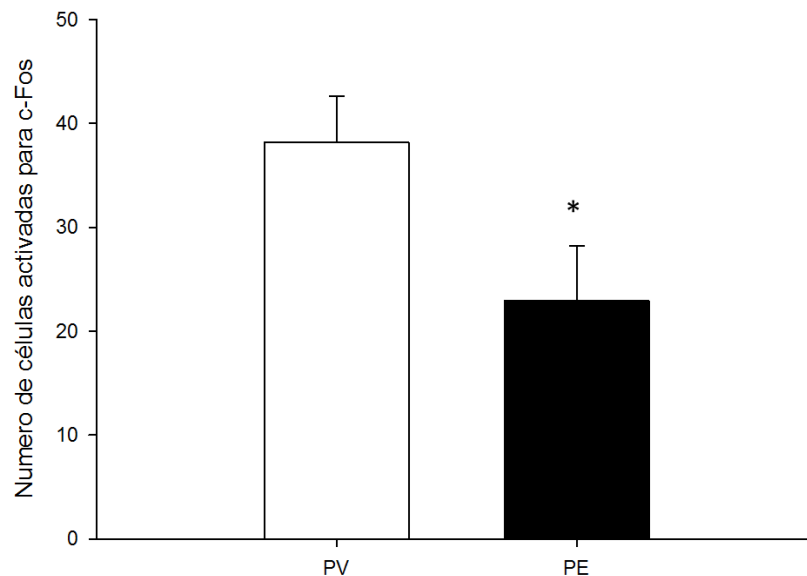
En el Experimento 3, se observó que animales que recibieron etanol vía uterina durante la gestación tardía, muestran en la adolescencia menor actividad de c-Fos en corteza infralímbica (IL, Figura 18), un área asociada a la capacidad de controlar la recaída en el consumo de drogas (Millan, 2011). Este efecto no se observó en otras áreas, como corteza prelímbica (PL), núcleo accumbens core (AcC) y Shell (AcSh). Sin embargo, el análisis de estas estructuras, se realizó en cerebros provenientes de animales que habían sido previamente sujetos a pruebas de reactividad locomotora y evaluación de emisiones de ultrasonidos. Por lo tanto, la manipulación inherente a estos procedimientos puede ser un factor de confusión a la hora de interpretar estos resultados. Una evidencia de esto es la considerable cantidad de marcación basal en las estructuras analizadas. Era necesario, entonces, replicar este experimento, a fin de observar actividad neuronal en estas áreas cerebrales (IL, PL, AcC, AcSh) en animales con exposición prenatal al alcohol o a vehículo, pero sin evaluación comportamental postnatal.

### ***Materiales y Métodos***

Dado que en el Experimento 3 no se observaron efectos de sexo, se decidió trabajar con machos solamente. El experimento empleó un diseño factorial 2 [tratamiento prenatal (PE, PV)] x 3 [tratamiento postnatal (0,0 o 2,5 g/kg etanol i.g.; o NT)]. Se utilizaron 30 ratas Wistar machos adolescentes (DP 36), representativos de 10 camadas.

### Resultados

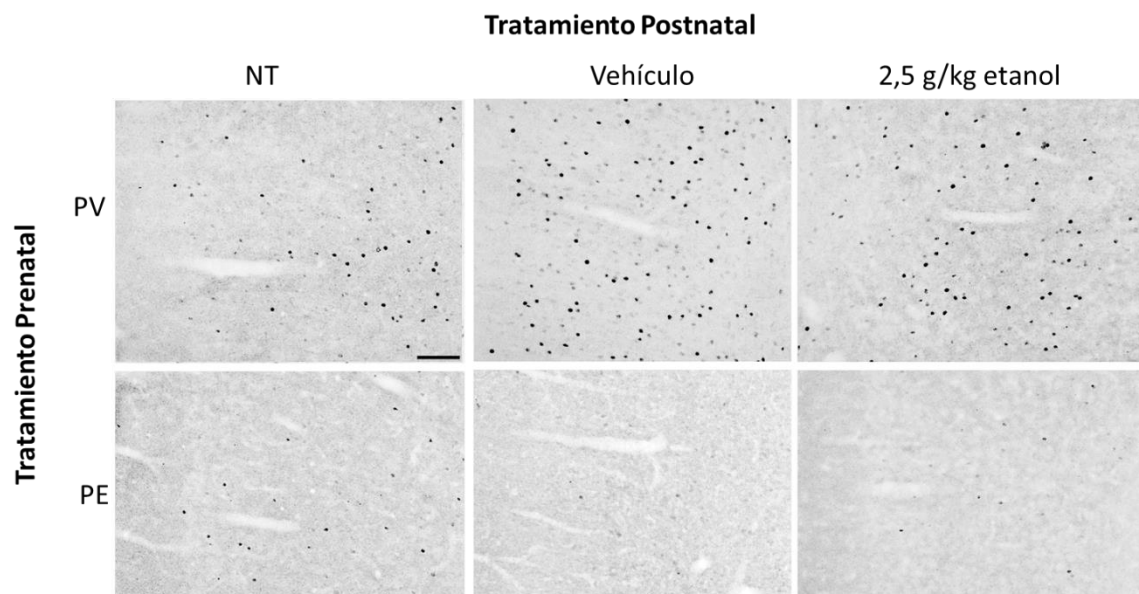
El ANOVA factorial tuvo en cuenta los factores tratamiento prenatal (PE, PV), tratamiento postnatal (etanol, vehículo y NT). Se observó un efecto significativo del factor tratamiento prenatal, [ $F_{(1,20)} = 4,84$ ;  $p < 0,05$ ] para el área IL (Figura 20). Los animales expuestos a 2,0 g/kg de etanol durante la gestación tardía exhibieron menor activación en dicha área que los animales tratados con vehículo. Nuevamente, no se observaron diferencias significativas en las demás áreas (véase Tabla 2) ni efectos significativos de la administración post-natal de alcohol.



**Figura 20.** Promedio de número de células de corteza infralímbica marcadas positivamente para c-Fos en animales tratados con 2,0 g/kg de etanol (PE) o vehículo (PV) durante la gestación tardía (días gestacionales 17 a 20). Los datos de esta figura se encuentran colapsados por tratamiento postnatal (NT, 0,0 o 2,5 g/kg). El mismo no ejerció un efecto significativo principal ni interaccionó significativamente con los demás factores. Las barras denotan la media y EEM. El asterisco denota diferencia estadísticamente significativa entre PE y PV.

Estudios previos indican que la exposición aguda a etanol induce activación de c-Fos en varias regiones del cerebro, incluyendo corteza prefrontal y núcleo accumbens (véase Vilpoux et al., 2009). Sin embargo, tanto en el Experimento 3 como en el presente, no se

observó actividad diferencial como producto de la inyección i.g. de etanol. Posiblemente esto se deba al uso de intubación como ruta de administración utilizada. Existe evidencia de que la administración de dosis de 3,0 g/kg de etanol vía intraperitoneal genera una activación relativamente constante de expresión de c-Fos en el cerebro a los 10 min post-administración hasta los 240 min; mientras que la administración i.g. de etanol genera dos picos de marcación de este gen de expresión temprana, a los 30 y 240 min post-administración (Ryabinin et al., 1997). Probablemente, el hecho de haber perfundido a los animales a los 90 min hizo que perdiéramos ese pico de actividad de c-Fos. Más allá de esto, un resultado relevante del presente trabajo fue la replicación de una menor actividad basal en IL luego de un tratamiento prenatal con etanol.



**Figura 21.** Microfotografías correspondientes a corteza infralímbica en animales machos adolescentes (DP37-39) no manipulados (NT), desafiados con una administración i.g. de vehículo o 2,5 g/kg de etanol; y que habían sido expuestos a etanol en útero (PANEL INFERIOR; PE; 2,0 g/kg) o expuestos a vehículo (PANEL SUPERIOR; PV) durante los DGs 17-20. Los puntos negros corresponden a núcleos de células positivas para c-Fos.

### Experimento 6. Efectos de la exposición prenatal al etanol sobre actividad neuronal inducida por etanol en AcSh y actividad dopaminérgica inducida por etanol en ATV

En los Experimentos 3 y 5 se observó que animales expuestos a etanol durante la gestación tardía presentan menor actividad neuronal (c-Fos) en corteza infralímbica que animales expuestos a vehículo. Sin embargo, no observamos diferencias en la actividad de c-Fos inducida por la administración postnatal de etanol. La ausencia de ese fenómeno nos impidió analizar si la exposición prenatal al etanol modula –como es nuestra hipótesis– la

activación neural inducida por etanol en áreas como núcleo accumbens. Por lo tanto, el objetivo de este experimento fue replicar las condiciones del anterior, cambiando la vía de administración post-natal de etanol a intraperitoneal, la cual fue utilizada exitosamente en trabajos previos para inducir c-Fos por etanol (Ryabinin et al., 1997; Faria et al. 2008). De esta manera, hipotetizamos, la absorción del etanol sería más rápida y podríamos observar la actividad de c-Fos inducida por el desafío de etanol y sus posibles interacciones con la exposición prenatal. Además, utilizamos un mayor abanico de dosis de etanol (i.e. 1,25 g/kg, 2,5 g/kg y 3,25 g/kg).

Otro objetivo del presente experimento fue evaluar actividad dopaminérgica en área tegmental ventral. Este objetivo parte de evidencia que indica que algunas diferencias comportamentales entre animales expuestos a etanol durante toda la gestación y sus controles (i.e. hiperactividad, conductas exploratorias) se ven alteradas cuando se potencia o inhibe la actividad de los receptores dopaminérgicos D1 (Sobrian et al., 2005). Asimismo, en cultivos de neuronas hipocampales pertenecientes a embriones de ratas al día gestacional 17, se observó que el etanol genera una regulación hacia abajo de receptores D1, así como inducción de muerte neuronal (Naseer et al., 2014). Por otro lado, Carneiro et al (2005) encontraron que los animales que fueron expuestos a dosis bajas (0,5 g/kg) o altas (4,0 g/kg) de etanol durante toda la gestación y lactancia, poseen menor actividad de receptores dopaminérgicos (D1 y D2). Además, animales expuestos a etanol durante toda la gestación presentan menores niveles de actividad dopaminérgica cuando adultos (Choong et al., 2004). La modulación dopaminérgica de la neurotransmisión GABAérgica también se ve afectada en adolescentes expuestos a etanol durante el tercer trimestre de gestación (Díaz et al., 2014). En conjunto, estos trabajos indican que el sistema de neurotransmisión dopaminérgica sufriría una desregulación, en el sentido de presentar hipoactividad dopaminérgica como producto de la exposición prenatal.

En función de estos antecedentes, el presente experimento analizó la co-localización de tirosina hidroxilasa (TH) con activación de c-Fos en área tegmental ventral como producto de la exposición prenatal moderada (2,0 g/kg) de etanol durante los DGs 17-20, luego de la administración postnatal de diferentes dosis de etanol o su vehículo. La TH es una enzima que participa en la síntesis de catecolaminas, entre ellas la dopamina. El ATV, en tanto, es el sitio de donde parten los cuerpos celulares dopaminérgicos que forman

el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (Oades & Halliday, 1986). Entre el 60-75% de las neuronas de ATV son dopaminérgicas, siendo el resto mayormente gabaérgicas (Barrot et al., 2012). Así entonces, al observar activación de TH en ATV, puede deducirse que se está observando principalmente activación dopaminérgica.

#### *Materiales y métodos*

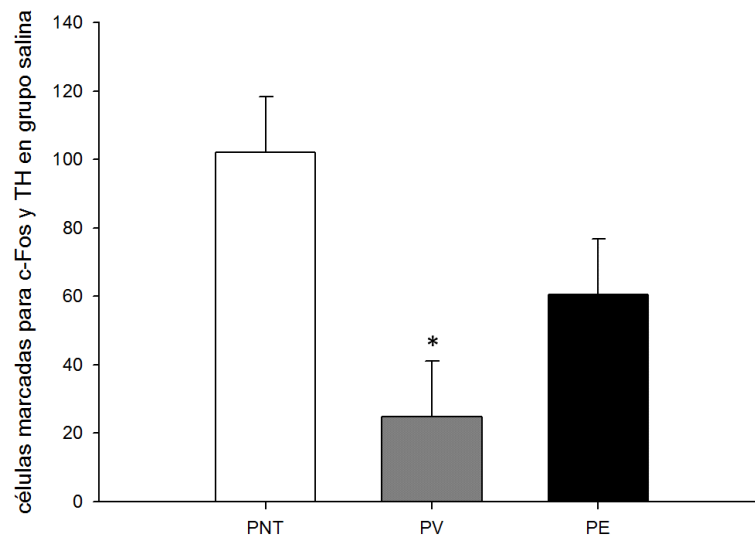
Preliminarmente, y para detectar el tiempo post-administración en el cual se observan más claramente los efectos de etanol sobre c-Fos en núcleo accumbens, se llevó a cabo un experimento piloto donde se analizó la expresión de c-Fos en animales administrados i.p. con 2,5 g/kg de etanol o vehículo a los 60, 90 o 120 min en IL, PL y AcSh. En base a los resultados obtenidos (no incluidos en el presente trabajo), se eligió utilizar el intervalo de medición 90 min post-administración, ya que fue el intervalo que mostró mayor marcación de c-Fos.

En el experimento principal, se utilizaron 48 ratas Wistar hembras (DPs 37-39) provenientes de 12 camadas, representativas de cada uno de los tratamientos prenatales. La razón de que se utilizaran únicamente hembras en este experimento fue que experimentos previos de esta tesis indicaron ausencia de efectos de sexo en actividad neural luego de alcohol pre o postnatal. Asimismo, esta decisión nos permitió utilizar los machos derivados de estas camadas para otros experimentos que analizaron mecanismos subyacentes a efectos del alcohol prenatal (véase experimentos 7a y 7b).

Se empleó un diseño factorial 2 [exposición prenatal (0,0, 2,0 g/kg o sin tratamiento; PNT)] x 4 [tratamiento postnatal (0,0 g/kg; 1,25; 2,5 o 3,25 g/kg i.p.)]. Para los 8 grupos finales, se utilizó n=4 sujetos por condición experimental. Se replicaron los procedimientos descritos en los Experimentos 3 y 5 (véase apartado procedimientos generales del presente capítulo). Brevemente, el día de la perfusión los animales recibieron, vía intraperitoneal, una de las dosis de etanol (0,0 g/kg, 1,25 g/kg, 2,5 g/kg, 3,25 g/kg o 0,0 g/kg). Se perfundió intracardiácamamente a los animales a los 90 min post-administración, e inmediatamente se fijaron los cerebros en paraformaldehído al 4%. Un día después, los cerebros se conservaron en sacarosa al 30%. Posteriormente, se realizaron procedimientos de inmunohistoquímica para detectar la expresión de c-Fos en Accumbens Shell, y doble marcado de c-Fos y tiroxina hidroxilasa en ATV (anti c-Fos + anti TH; Figura 10).

## Resultados

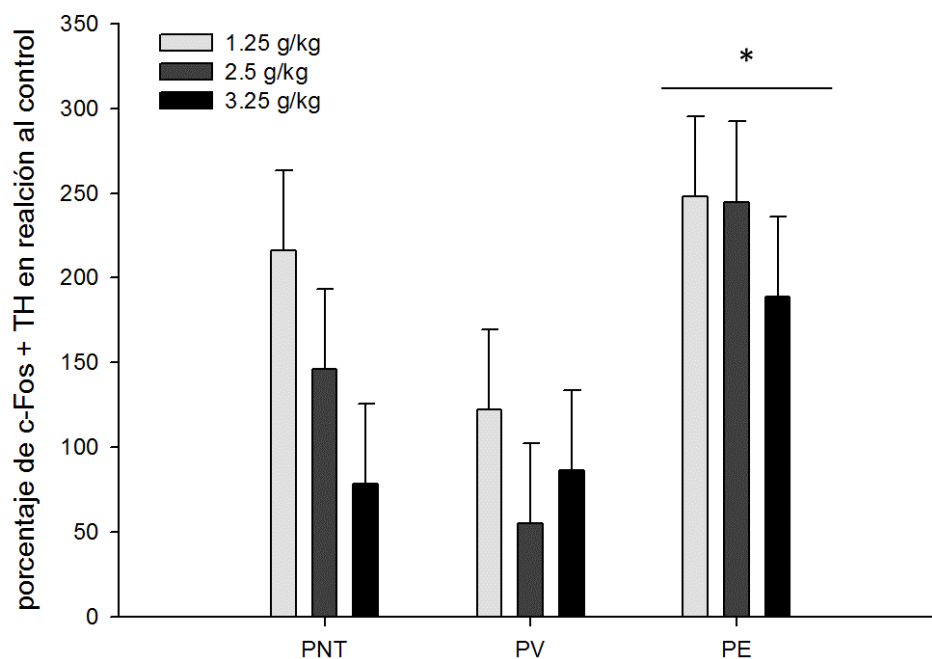
El número de cuerpos celulares que co-expresaron c-Fos y TH en ATV (considerado en este trabajo como un indicador de actividad catecolaminérgica) fue primero analizado en los grupos postnatalmente tratados con 0,0 g/kg etanol (grupo salina), en función del tratamiento prenatal (PE, PV o PNT). El objetivo de este análisis fue indagar posibles diferencias basales (i.e., independientemente del tratamiento postnatal con etanol) en función de la exposición in-útero. El ANOVA correspondiente indicó un efecto significativo del tratamiento prenatal [ $F_{(2, 9)}=5,68$ ,  $p<0,05$ ], y análisis post-hoc de Tukey indicaron que el grupo PV exhibe una actividad catecolaminérgica basal significativamente menor que la exhibida por el grupo PNT (Figura 22). En otras palabras, la manipulación prenatal (i.e., los procedimientos de manipulación y administración asociados a las intubaciones) durante los DG 17-20 parece disminuir el tono basal dopaminérgico en ATV; y este efecto parece ser revertido –al menos parcialmente – por el etanol prenatal.



**Figura 22.** Promedio de número de células de ATV marcadas positivamente para c-Fos y TH en animales adolescentes hembras tratados con 2,0 g/kg de etanol (PE), vehículo (PV) o no tratados (PNT) durante la gestación tardía (días gestacionales 17 a 20). Se muestran las medias y EEM de los grupos tratados postnatalmente con una inyección de salina (0,0 g/kg). El asterisco denota diferencia estadísticamente significativa entre PV y PNT.

Posteriormente, se llevó a cabo un ANOVA factorial, tomando como factores independientes el tratamiento prenatal (PE, PV y PNT) y el tratamiento post-natal (1,25; 2,5 o 3,25 g/kg). Se tomó como variable dependiente el porcentaje de activación de células

doblemente marcadas para c-Fos y TH (véase Figura 10) en relación al grupo salina, para cada uno de los grupos prenatales. El objetivo fue evaluar posibles alteraciones en la activación neural inducida por alcohol en ATV, en función de los tratamientos prenatales. Se observó un efecto principal de tratamiento prenatal [ $F_{(2, 27)}=6,54, p<0,01$ ]. Análisis post-hoc de Tukey señalaron una activación catecolaminérgica inducida por alcohol (independientemente de la dosis) significativamente más elevada en el grupo PE que en el control tratado con vehículo en la gestación (PV). El grupo PE también exhibió mayor activación que el grupo PNT, pero esta diferencia no alcanzó significancia estadística (contraste de Tukey;  $p=0,10$ ) (véase Figura 23). En otras palabras, los animales PE mostraron un aumento en su activación dopaminérgica en ATV, luego de recibir etanol, en relación a un grupo control que experimentó intubación de vehículo durante la gestación.

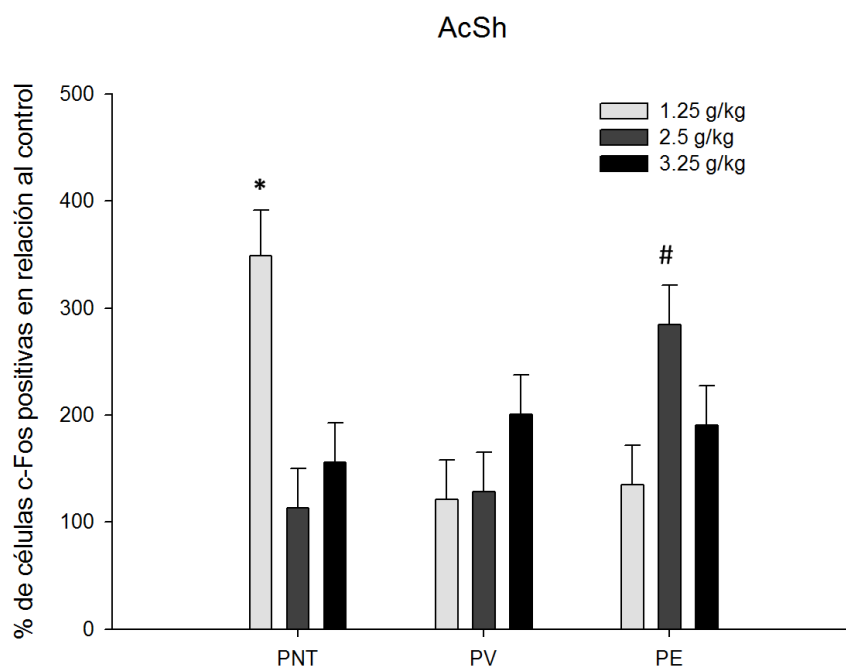


**Figura 23.** Porcentaje de células marcadas positivamente para c-Fos y TH en ATV, en animales tratados prenatalmente con 2,0 g/kg de etanol (PE), vehículo (PV) o no tratados (PNT) durante la gestación tardía (DGs 17-20); y tratados postnatalmente con 1,25 g/kg; 2,5 g/kg o 3,25 g/kg i.p en relación a su control (grupo salina). Las barras denotan la media y EEM. El asterisco denota diferencia significativa entre PE y PV, independientemente de la dosis utilizada.

El ANOVA previo indica diferencias entre grupos respecto a activación dopaminérgica inducida por alcohol, pero no indica si dichos grupos están exhibiendo activación neural significativa, respecto de su propio control vehículo. Para confirmar la existencia de activación dopaminérgica en ATV, inducida por alcohol, se realizaron pruebas

*t* de una muestra, contra el valor teórico de 100%, el cual representa el monto de activación del grupo control correspondiente. Debido a que, en este caso, el ANOVA solamente había indicado un efecto principal de tratamiento prenatal, se realizaron tres pruebas *t*, una por cada tratamiento prenatal. Las pruebas indicaron que el nivel de activación dopaminérgica en el grupo prenatal etanol (PE) -pero no en los grupos PE o PNT- fue significativamente superior a 100% [ $t_{(11)}=3,72, p<0,05$ ].

En relación a activación de c-Fos en AcSh, se realizaron los mismos pasos estadísticos que para ATV. Esto es, primero se analizaron mediante ANOVA de una vía posibles diferencias basales entre los grupos PE, PV y PNT. Es decir, considerando sólo animales tratados postnatalmente con vehículo (i.e. grupo salina), para cada una de las condiciones prenatales. Luego, se realizó un ANOVA factorial para analizar diferencias en activación relativa (% en relación al grupo tratado con vehículo) inducida por etanol, en función de los tratamientos prenatales. Finalmente, para confirmar la expresión de activación neural inducida por etanol, se realizaron pruebas *t* de una muestra contra el valor teórico de 100%.



**Figura 24.** Porcentaje de células marcadas positivamente para c-Fos en AcSh, en animales tratados prenatalmente con 2,0 g/kg de etanol, vehículo o no tratados durante la gestación tardía (DGs 17-20); y tratados postnatalmente con 1,25 g/kg; 2,5 g/kg o 3,25 g/kg i.p en relación a su control (grupo salina). Las barras denotan la media y EEM. EL asterisco denota diferencia significativa del grupo PNT con respecto a los demás para la dosis 1,25 g/kg. El numeral (#) indica diferencia estadísticamente significativa entre PE y los demás grupos para la dosis 2,5 g/kg.



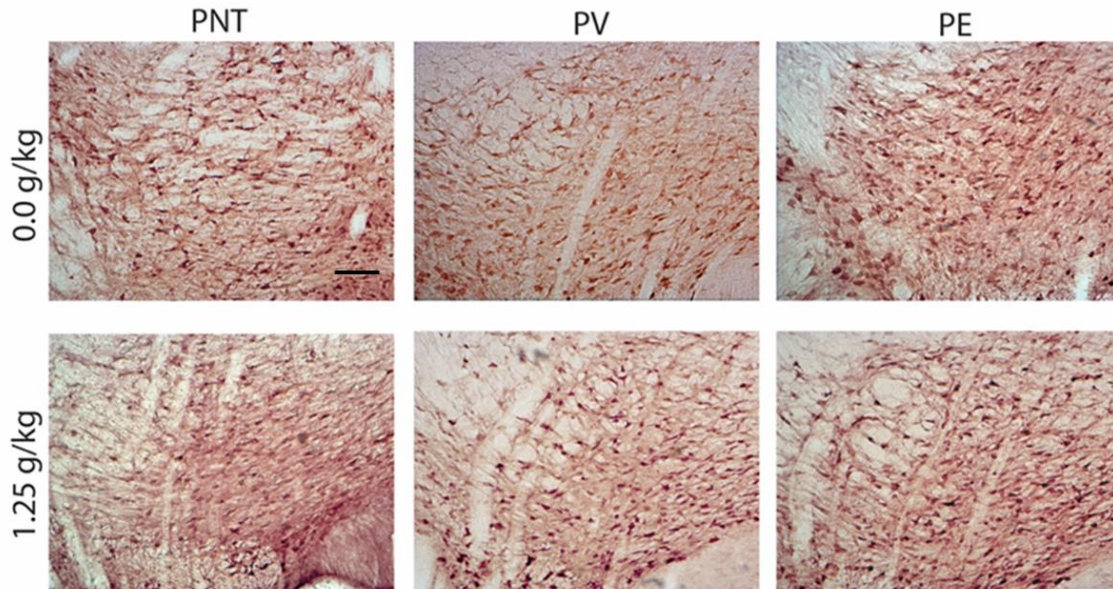
El ANOVA de una vía indicó que el tratamiento prenatal no ejerció un efecto significativo sobre los puntajes de actividad neural basal en AcSh. Las medias observadas fueron  $16,58 \pm 7,61$ ,  $24,25 \pm 7,61$  y  $19,17 \pm 7,61$ , en los grupos PNT, PV y PE, respectivamente.

Sobre los valores de activación relativa de c-Fos en AcSh se realizó un ANOVA factorial (factores de comparación entre grupos: tratamiento prenatal y tratamiento postnatal). Se observó un efecto interactivo entre tratamiento prenatal y postnatal [ $F_{(4, 26)}=7,56$ ,  $p<0,05$ ] (véase Figura 24). Para entender mejor esta interacción se realizaron ANOVAs secuenciales para cada una de las dosis de etanol administradas postnatalmente (factor de comparación entre grupo: tratamiento prenatal). El ANOVA para la dosis de 1,25 g/kg indicó un efecto significativo de tratamiento prenatal [ $F_{(2, 8)}=7,73$ ,  $p<0,05$ ] y análisis post-hoc de Tukey indicaron significativamente mayor activación de c-Fos en el grupo PNT, que en PV o PE. El ANOVA para la dosis de 2,5 g/kg también indicó un efecto significativo [ $F_{(2, 9)}=5,51$ ,  $p<0,05$ ], pero en este caso el Tukey indicó significativamente mayor activación de c-Fos en el grupo PE que en los grupos PNT o PV. El ANOVA para la dosis más alta de 3,25 g/kg indicó la ausencia de efecto significativo de tratamiento prenatal.

Las pruebas *t* para los grupos PNT-1,25 g/kg y PE-2,5 g/kg indicaron una tendencia a la significación estadística (ambas  $p=0,06$ ).

Las microfotografías ilustrando los resultados de c-Fos + TH en ATV y c-Fos en AcSh, se encuentran en la figura 25 y 26, respectivamente. Estos resultados indican que los animales expuestos a etanol en útero presentan una mayor activación catecolaminérgica en ATV inducida por etanol, un área asociada al circuito de recompensa, que participa en el reforzamiento positivo de drogas de abuso (Nestler et al., 2013). Esto parece diferir de lo observado en trabajos previos provenientes de diferentes modelos de administración prenatal, donde la actividad espontánea dopaminérgica de animales adultos se ve disminuida luego de exposición prenatal a la droga (Choong & Shen, 2004; Carneiro et al., 2005, Díaz et al., 2014). Seguramente, las diferencias observadas en relación a estos trabajos reseñados, radica en la dosis

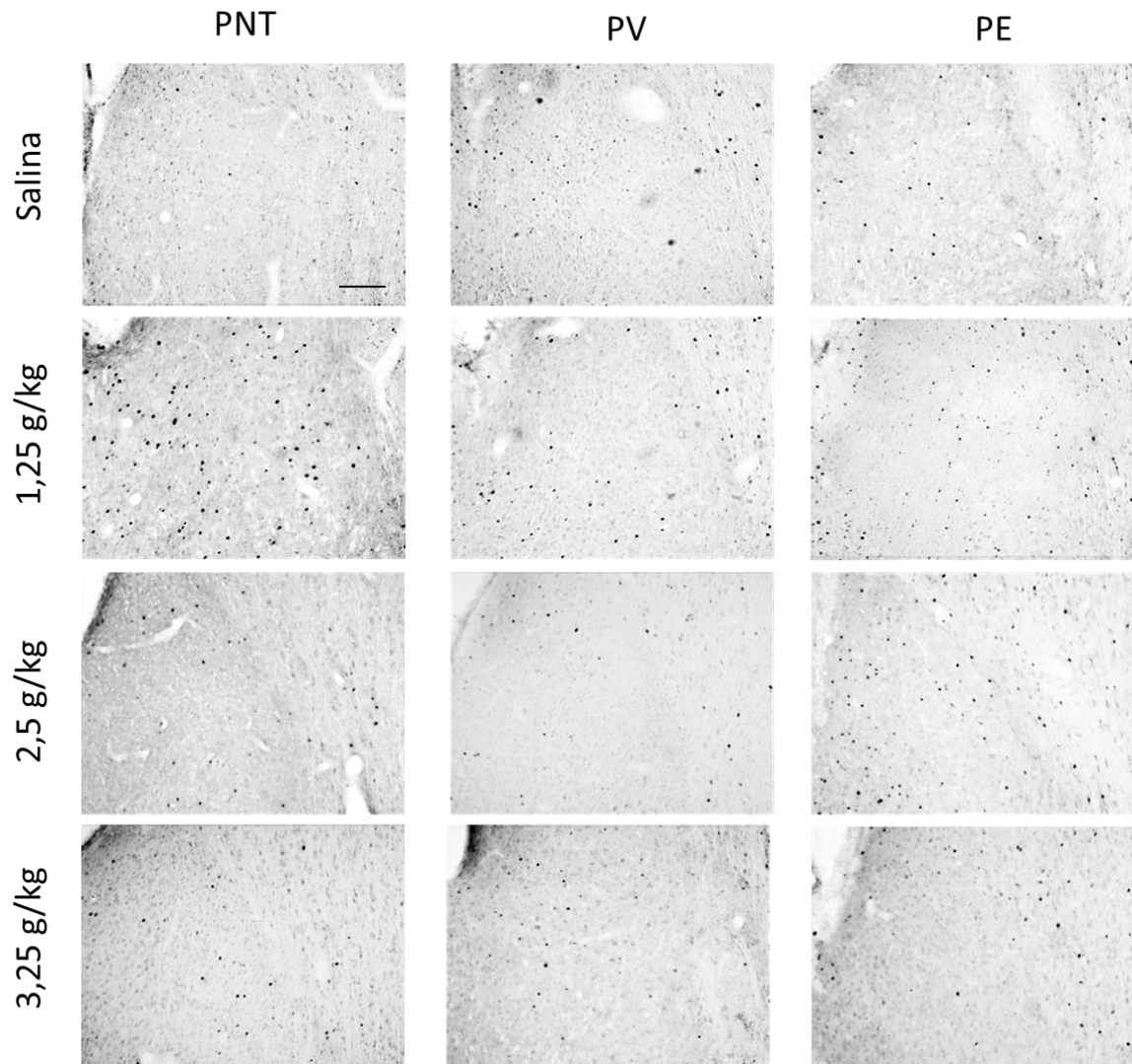
de etanol utilizada, así como la cantidad de exposiciones prenatales a las que fueron expuestas los animales. Se ampliará sobre estas diferencias en la discusión general.



**Figura 25.** Microfotografías de cortes coronales de ATV doblemente marcados para c-Fos (negro) y TH (marrón) pertenecientes a animales no tratados (PNT; columna izquierda) tratados con vehículo (PV; columna central) y tratados con 2,0 g/kg de etanol (PE; columna derecha) durante los DGs 17-20. Las fila superior representa a animales tratados con salina postnatal y la inferior, a animales tratados con 1,25 g/kg de etanol. Dado que las diferencias significativas se observaron entre tratamientos prenatal independientemente de la dosis, se eligió 1,25 g/kg a manera ilustrativa. La línea horizontal representa 100µm.

La mayor activación catecolaminérgica inducida por etanol en ATV podría explicar la preferencia por la droga observada en los Experimentos 1 y 2 de este capítulo. Dado que el alcohol produce una mayor activación en ATV en adolescentes expuestos a etanol, es posible que éstos consuman mayores cantidades de esta droga por su sensibilidad a los efectos reforzantes de la misma. Los resultados observados en AcSh, en tanto, fueron concordantes con los de ATV. En AcSh observamos que el grupo no tratado prenatalmente (PNT) exhibió significativamente más activación que sus pares de los grupos PE y PV luego de recibir 1,25 g/kg. Tras la dosis de 2,5 g/kg, en tanto, es el grupo PE, pero no el PV o el PNT, el que es sensible a la activación neural inducida por la droga. Es decir, que los animales PE necesitaron una dosis mayor de etanol que los PNT para exhibir actividad neural inducida por etanol; o dicho de otra manera, la exposición al etanol prenatal resultó en un corrimiento a la derecha de la curva dosis-respuesta. Probablemente, esto implique que los animales PE necesiten consumir mayores cantidades de etanol para sentir los mismos efectos reforzantes que los animales no expuestos a etanol en útero. Esta idea se

basa en evidencia acerca de que la inhibición farmacológica de AcSh aumenta la conducta de búsqueda y consumo de estímulos gustativos (Arias-Carrión et al., 2014). EL hecho de que la maquinaria dopaminérgica en ATV vea aumentada su actividad para los animales PE, cobra vital importancia, sobre todo si se tiene en cuenta que una mayor actividad dopaminérgica en circuito mesocorticolímbico está asociada a una mayor vulnerabilidad a desarrollar adicción (Leyton & Vezina, 2014).



**Figura 26.** Microfotografías de cortes coronales de AcSh pertenecientes a animales no tratados (PNT; columna izquierda) tratados con vehículo (PV; columna central) y tratados con 2,0 g/kg de etanol (PE; columna derecha) durante los DGs 17-20. Las filas representan a animales tratados con salina, 1,25 , 2,5 y 3,25 g/kg de etanol. Los puntos negros representan células c-Fos positivas y La línea horizontal representa 100µm.

Por otro lado, debe destacarse que la mera manipulación prenatal parece ejercer un efecto a largo plazo en estos animales, tal como se observa en la menor activación basal catecolaminérgica en los grupos PV con respecto a los PNT. Estos resultados indican que las manipulaciones inherentes a la administración prenatal (i.e., la mera administración de

vehículo), que pueden equipararse a aquellas que se utilizan en paradigmas de estrés prenatal (véase discusión), generan una regulación hacia abajo del tono dopaminérgico basal en esta importante área. Por lo tanto, estos resultados arrojan nueva información a favor de la idea que esta manipulación prenatal (administración intragástrica durante DGs 17 a 20) podría considerarse, también, un tipo de estresor prenatal (véase discusión del Capítulo 2 para una discusión sobre estrés prenatal).

### ***Experimento 7a:*** Evaluación de Extinción en Animales Expuestos a Etanol Durante Gestación Tardía

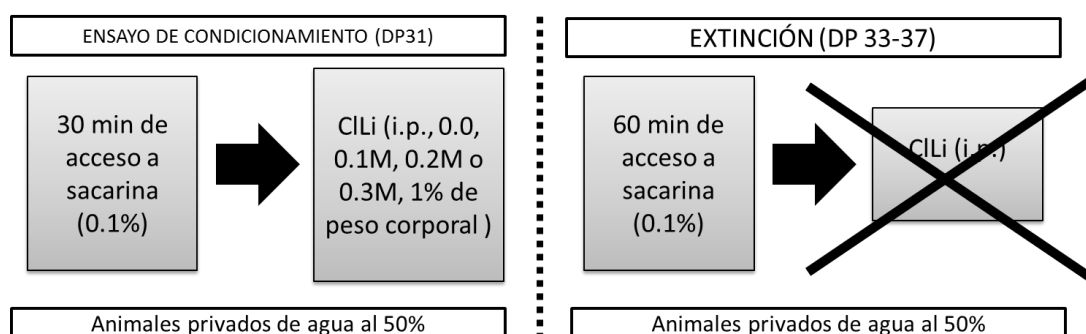
Se empleó un diseño factorial 3 [tratamiento prenatal (PE, PV, PNT)] x 5 [dosis de cloruro de litio (CLi [cloruro de litio], 0,0 M, 0,10 M, 0,2 M, 0,3 M)]. Se utilizaron 104 ratas Wistar adolescentes machos provenientes de 16 camadas (n=8 PE; n=8 PV; n=8 NT). Los animales se obtuvieron de madres administradas con etanol o vehículo los DGs 17-20. Estos animales provenían de las camadas utilizadas en el Experimento 6, (donde sólo se habían utilizado las adolescentes hembras, derivadas de cada una de las camadas). Se realizó un protocolo de ACS similar al utilizado en nuestro laboratorio por Acevedo y colaboradores (2012). Brevemente, al DP 30 se condicionó el consumo de una solución de 0,1% sacarina (estímulo condicionado; EC; duración de la sesión de ingesta: 30 min) al malestar inducido por CLi (estímulo incondicionado, EI; dosis: 0,0 M, 0,1M, 0,2M, 0,3M). El cloruro de litio fue administrado vía i.p. inmediatamente después de la finalización de la sesión de ingesta de sacarina. Luego de 24 h de descanso en que tenían acceso libre a agua y comida, los animales fueron re-expuestos al EC durante 60 min. En este día no se administró cloruro de litio al finalizar la sesión de ingesta (i.e. ensayo de extinción). En los días sucesivos (DPs 32-37) los animales fueron sujetos a ensayos de extinción adicionales, todos ellos de 60 min de duración. Así entonces, las sesiones de condicionamiento y evaluación difirieron en longitud temporal (30 y 60 min, respectivamente). La razón de ello fue evitar posibles efectos de inhibición latente durante el condicionamiento.

Tanto el día anterior como los días previos a las extinciones, los animales fueron privados de agua al 50% de su consumo, de manera de favorecer el consumo del EC. Esta privación no dificultó el normal crecimiento de los animales, quienes continuaron

umentando de peso normalmente, según la comparación con curvas de crecimiento controles de nuestro bioterio. El protocolo y diseños están ilustrados en la Figura 27.

### Materiales y Métodos

Se llevó a cabo un diseño factorial 3 [tratamiento prenatal (PE, PV, PNT)] x 5 [dosis de cloruro de litio (CLi; 0,0 M, 0,10 M, 0,2 M, 0,3 M)]. Se utilizaron 104 ratas Wistar adolescentes machos provenientes de 16 camadas (n=8 PE; n=8 PV; n=8 NT). Los animales se obtuvieron de madres administradas con etanol o vehículo los DGs 17-20. Estos animales provenían de las camadas utilizadas en el Experimento 6, (donde sólo se habían utilizado las adolescentes hembras, derivadas de cada una de las camadas). Se realizó un protocolo de ACS similar al utilizado en nuestro laboratorio por Acevedo y colaboradores (2012). Brevemente, al DP30 se condicionó el consumo de una solución de 0,1% sacarina (estímulo condicionado; EC; duración de la sesión de ingesta: 30 min) al malestar inducido por CLi (estímulo incondicionado, EI; dosis: 0,0 M, 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M). El cloruro de litio fue administrado vía i.p. inmediatamente después de la finalización de la sesión de ingesta de sacarina. Luego de 24 horas de descanso en que tenían acceso libre a agua y comida, los animales fueron re-expuestos al EC durante 60 min. En este día no se administró cloruro de litio al finalizar la sesión de ingesta (i.e. ensayo de extinción). En los días sucesivos (DPs 32-37) los animales fueron sujetos a ensayos de extinción adicionales, todos ellos de 60 min de duración. Así entonces, las sesiones de condicionamiento y evaluación difirieron en longitud temporal (30 y 60 min, respectivamente). La razón de ello fue evitar posibles efectos de inhibición latente durante el condicionamiento.



**Figura 27.** Procedimientos para entrenamiento y evaluación en aversión adquirida al sabor en adolescentes expuestos gestacionalmente a etanol (PE; 2,0 g/kg), vehículo (PV, 0,0 g/kg) o que no recibían tratamiento durante la gestación (no tratados, PNT). Los animales era condicionados el día postnatal 31 (DP31) y eran evaluados en sesiones de extinción los DPs 33 a 37.

Tanto el día anterior como los días previos a las extinciones, los animales fueron privados al 50% de agua, de manera de favorecer el consumo del EC. Esta privación no

dificultó el normal crecimiento de los animales, quienes continuaron aumentando de peso normalmente, según la comparación con curvas de crecimiento controles de nuestro bioterio. El protocolo y diseños están ilustrados en la Figura 27.

### *Resultados*

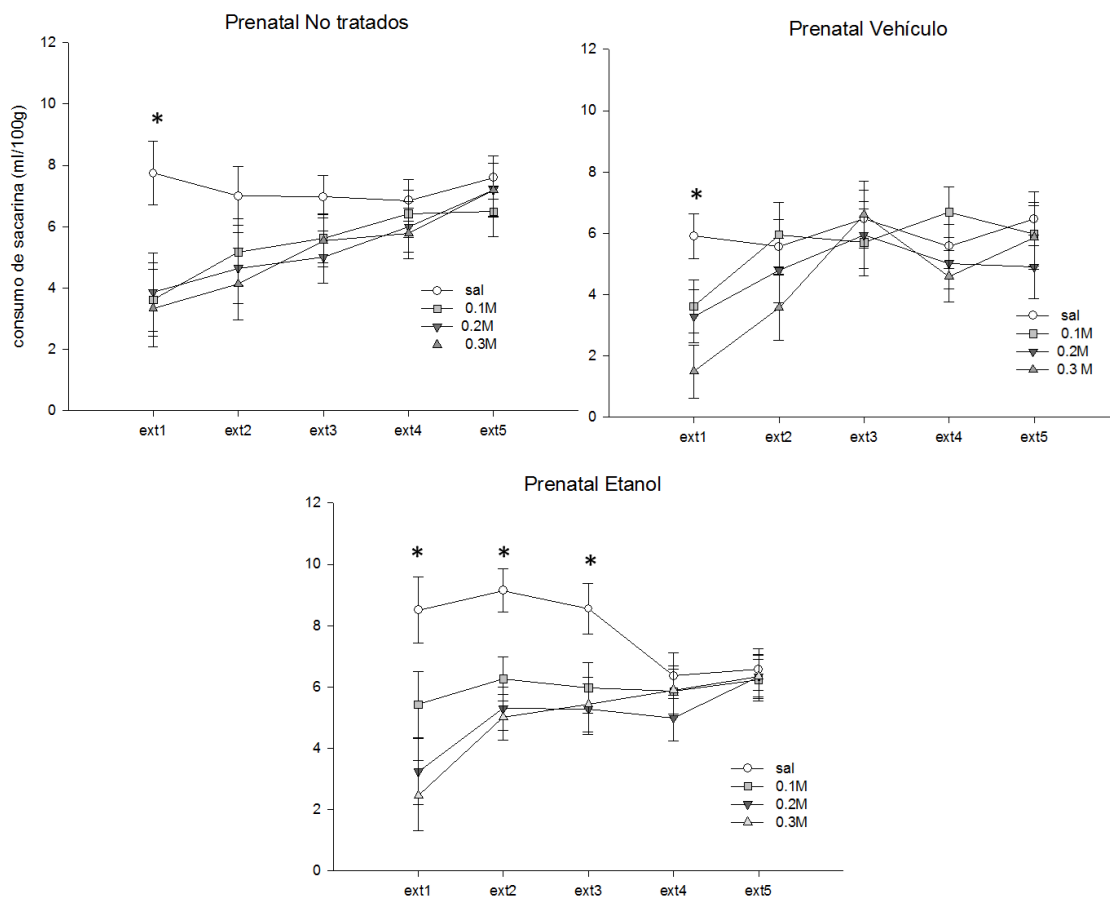
El ANOVA de una vía para el consumo de sacarina [(ml totales consumidos x peso del animal en gramos)/100] durante el condicionamiento no arrojó efectos estadísticamente significativos. Las medias y EEM de los grupos PE, PV y PNT fueron  $6,25 \pm 0,42$ ;  $5,31 \pm 0,40$ ; y  $6,14 \pm 0,40$ , respectivamente.

El consumo de sacarina en las sesiones de extinción fue analizado mediante un ANOVA factorial, que tuvo en cuenta el tratamiento prenatal (PE, PV, PNT) y las dosis de litio utilizadas durante el condicionamiento (0,0 M, 0,1 M, 0,2 M y 0,3 M) como factores independientes; y el consumo de sacarina durante los 5 ensayos de extinción como factor de medidas repetidas (i.e., sesión). Se observaron efectos principales significativos de condicionamiento [ $F_{(3,92)}= 6,53$ ,  $p<0,01$ ] y sesión [ $F_{(4,368)}=15,74$ ,  $p<0,01$ ], así como efectos interactivos significativos entre sesión y tratamiento prenatal [ $F_{(8,368)}= 1,98$ ,  $p<0,05$ ]; y entre sesiones y condicionamiento [ $F_{(12,368)}= 4,61$ ,  $p<0,01$ ]. La interacción entre tratamiento prenatal y sesiones indica que, independientemente del condicionamiento, los grupos definidos por los diferentes tratamientos prenatales exhiben diferencias basales en la aceptación del EC sacarina. Las comparaciones planeadas confirmaron que, durante las dos primeras sesiones de extinción, los animales PE consumieron más sacarina que los PNT o PV. Para minimizar la injerencia de estas diferencias basales, se realizaron ANOVAS separados (condicionamiento x sesión) para cada tratamiento prenatal.

El ANOVA de medidas repetidas para el grupo PE, arrojó efectos principales de condicionamiento [ $F_{(3, 27)}=5,17$ ,  $p<0,01$ ], de sesión [ $F_{(4, 108)}=3,74$ ,  $p<0,01$ ] y un efecto interactivo entre condicionamiento y sesión [ $F_{(12, 108)}=2,73$ ,  $p<0,01$ ]. Los análisis de comparaciones planeadas indicaron, durante las primeras 3 sesiones, un consumo significativamente menor del EC en los grupos que recibieron 0,2 M y 0,3 M, en comparación con el grupo control 0,0 M. Es decir, el grupo PE exhibió aprendizaje aversivo, y esta memoria persistió por tres días (véase panel inferior de Figura 28).

El ANOVA para el grupo PV arrojó un efecto principal de sesión [ $F_{(4, 124)}=9,84$ ,  $p<0,01$ ] y un efecto interactivo de sesión y condición [ $F_{(12, 124)}= 2,02$ ,  $p<0,05$ ]. De acuerdo a las comparaciones planeadas, los grupos 0,2 M y 0,3 M consumieron significativamente menos del EC que el grupo control, pero sólo durante la primera sesión (Figura 28, panel superior derecho).

En cuanto al grupo PNT (Figura 28, panel superior izquierdo), se observó un efecto principal de sesión [ $F_{(4, 128)}=9,21$ ,  $p<0,01$ ], y la interacción entre sesión y condicionamiento indicó una tendencia a la significación estadística [ $F_{(12, 128)}=1,78$ ,  $p=0,06$ ]. Guiados por nuestras hipótesis a priori realizamos comparaciones planeadas, las cuales indicaron un consumo significativamente menor de la solución apareada a CLI en los grupos 0,1 M, 0,2 M y 0,3 M -en relación al grupo control 0,0 M- durante la primer sesión, pero no en las 4 sesiones restantes.



**Figura 28.** Consumo de sacarina (ml/100g) luego de un procedimiento de ACS (5 sesiones de extinción en animales adolescentes, utilizando CLI como EI (i.e. salina, 0,1M, 0,2M y 0,3M). Los animales adolescentes habían sido expuestos a etanol en útero (panel inferior), tratados con vehículo (superior derecho) o no tratados (panel superior izquierdo). Los puntos y las barras representan las medias y EEM. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el grupo control (salina) y los restantes para las sesiones señaladas.

Estos resultados indican que los animales tratados prenatalmente con etanol adquieren adecuadamente un aprendizaje aversivo mediado por cloruro de litio, y perseveran en la expresión de aversión adquirida al EC hasta la sesión 3, inclusive; mientras que en los animales no tratados durante la gestación (i.e. grupo PNT) y los animales tratados con vehículo (i.e. grupo PV) los DGs 17-20 el aprendizaje se extingue luego de la primera sesión. Esto sugiere que los animales que han sido expuestos a dosis moderadas de etanol durante la gestación muestran en su adolescencia una sutil, pero significativa, persistencia en la expresión de aprendizaje aversivo, indicando una alteración en la extinción de memorias asociadas a eventos aversivos (Figura 28).

### **Experimento 7b.** Evaluación de aversión adquirida al sabor Inducida por etanol, en animales expuestos a la droga durante la gestación tardía.

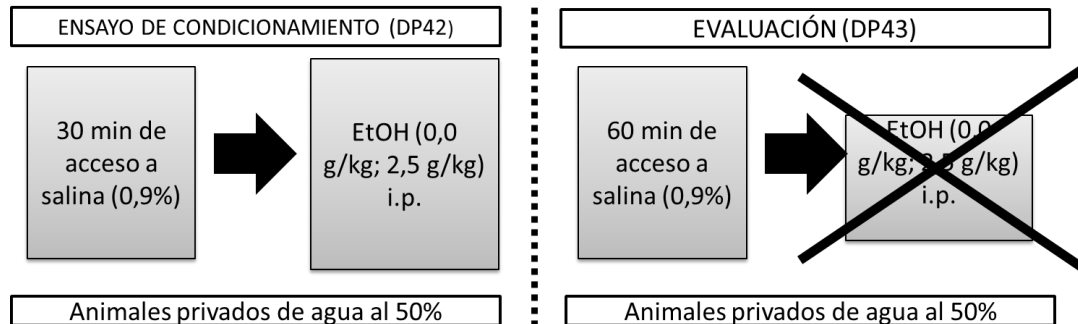
Los datos del experimento 7a indican que la exposición al alcohol prenatal altera la extinción de aprendizaje aversivo, mediado por un agente emético. Sin embargo, resulta de especial interés saber si la exposición prenatal a etanol trae como consecuencia una menor sensibilidad en aprendizajes aversivos relacionados con el alcohol. Esto es importante ya que los efectos aversivos de las drogas de abuso funcionan como barreras naturales para el acercamiento y escalada en el consumo de la droga (Spear & Varlinskaya, 2010). Este experimento tuvo como objetivo analizar la adquisición de aprendizajes aversivos mediado por etanol en animales adolescentes expuestos a alcohol en útero. Basado en trabajos previos (Silveri & Spear, 1998, 2001; Doremus et al, 2003; Ristuccia & Spear, 2004), la hipótesis fue que la exposición prenatal haría a los animales menos sensibles a los efectos aversivos del alcohol.

#### *Materiales y métodos*

Este experimento empleó los animales controles del Experimento anterior 7a, (i.e. aquellos animales, representativos de cada tratamiento prenatal, que solo habían recibido inyecciones de salina durante las sesiones de acceso a sacarina). Al DP 42, los animales fueron alojados individualmente y privados de agua al 50%. Se realizó un ensayo de condicionamiento y 2 ensayos de extinción, los cuales fueron tal como se describió en el



experimento 7a, pero utilizando solución salina (0,9 %) como EC y Etanol (2,5 g/kg i.p. vs salina) como EI (Figura 29).



**Figura 29.** Protocolo experimental para ensayo de condicionamiento de aversión adquirida al sabor (panel izquierdo) y evaluación (panel derecho) en animales adolescentes sometidos previamente a etanol (PE), vehículo (PV) o no tratados (PNT) durante los DGs 17-20

El cambio de EC entre los Experimentos 7a y 7b se realizó porque los animales ya habían tenido experiencia con sacarina en el primer experimento; de esta manera, evitábamos que esta experiencia previa interfiriera con el aprendizaje de aversión adquirida al sabor del etanol. La elección de solución salina como EC se basó en trabajos previos que indican su efectividad en paradigmas de ACS (Risinger y Cunningham, 1992).

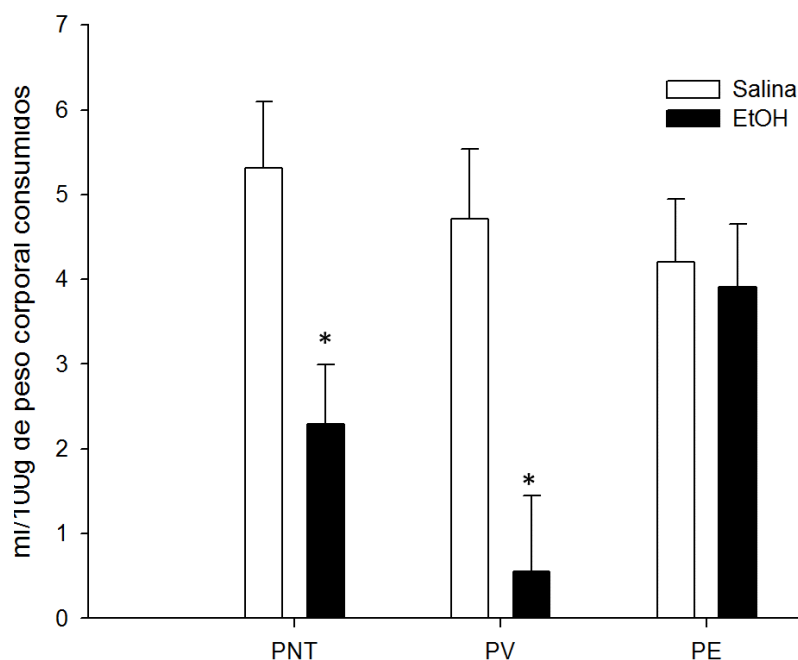
### Resultados

El consumo de salina durante el condicionamiento y durante la única sesión de extinción [(ml totales consumidos x peso del animal) / 100] se analizó mediante ANOVAs factoriales separados, que consideraron como factores independientes el tratamiento prenatal (PE, PV y PNT) y el tratamiento postnatal (i.e., durante el condicionamiento aversivo) con etanol (0,0 o 2,5 g/kg de etanol, i.p.). El consumo de salina no difirió significativamente entre los tratamientos durante el condicionamiento, es decir, no hubo diferencias basales entre los grupos tratados prenatalmente en relación a la aceptación del EC. Las medias y EEM para los grupos PE, PV y PNT fueron  $4,19 \pm 0,47$ ;  $4,16 \pm 0,54$ ; y  $5,05 \pm 0,47$ , respectivamente.

En cuanto a la sesión de evaluación, se observó un efecto principal de tratamiento postnatal [ $F_{(1, 49)}=15,07$ ,  $p<0,01$ ] y una interacción significativa entre tratamiento prenatal y postnatal [ $F_{(2, 49)}=3,20$ ,  $p<0,05$ ] (Figura 30). ANOVAs secuenciales posteriores indicaron efectos principales de tratamiento en los grupos PNT [ $F_{(1, 18)}=7,01$ ,  $p<0,05$ ] y PV [ $F_{(1, 13)}=19,54$ ,  $p<0,01$ ]. Específicamente, en ambos tratamientos prenatales se observaron un

consumo de salina significativamente menor por parte del grupo 2,5 g/kg etanol con respecto al grupo 0,0 g/kg. Estas diferencias, que indican el desarrollo de aversión adquirida al sabor inducida por alcohol, no se observaron en el grupo PE. En este último grupo el ANOVA indicó la ausencia de un efecto significativo de condicionamiento.

Estos resultados confirman la hipótesis, de importantes implicancias epidemiológicas y sanitarias, de que la exposición prenatal a etanol hace a los adolescentes menos sensibles a los efectos aversivos de esta droga



**Figura 30.** Consumo de salina (ml/100g) luego de un procedimiento de CTA por EtOH en animales adolescentes expuestos a etanol en útero (PE), tratados con vehículo (PV) o no tratados (PNT) durante la gestación tardía (DGs 17-20). Al DP42 se condicionó el consumo de salina a una dosis de 2,5 g/kg de etanol (grupo EtOH) o vehículo (grupo salina). Las barras representan las medias y los EEM. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos EtOH y salina .

**Experimento 8.** Evaluación de expresión de receptores opiáceos en animales expuestos a etanol durante la gestación tardía.

Se ha observado en experimentos anteriores que la exposición prenatal a etanol aumenta el consumo de dicha droga durante la adolescencia (Experimentos 1 y 2) y que este tipo de exposición gestacional deteriora la extinción de aprendizajes asociativos (ACS; Experimento 7a), un efecto posiblemente asociado a una activación diferencial de la

corteza infralímbica (Experimentos 3 y 4) o a una desregulación en el sistema dopaminérgico (Experimento 6).

El sistema opioide también se ha visto implicado en el reforzamiento por etanol y el consumo de esta droga. Este sistema cuenta con, al menos, 3 tipos de receptores, a saber, los receptores  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  (véase Gianoulakis, 2001). Estudios en humanos y animales indicaron que los efectos reforzantes del etanol podrían estar asociados a una activación del sistema de opiáceos endógenos. En humanos (King et al., 1997; Conrod et al., 2001) y ratas infantiles (Arias et al., 2009) y adolescentes (Pautassi et al., 2011) la aplicación de antagonistas no selectivos del sistema opiáceo bloquea los efectos estimulantes del etanol durante la curva ascendente de intoxicación, y también el aprendizaje apetitivo mediado por esta droga se ha visto bloqueado luego inhibir este sistema opiáceo (Nizhnikov et al., 2009). La lógica de manipular este sistema de neurotransmisión reside en que la transmisión opioide a nivel del área tegmental ventral participa en el reforzamiento positivo inducido por alcohol (Koob, 2009). Se ha sugerido que el incremento en la actividad de  $\beta$ -endorfinas mediaría el inicio del consumo de alcohol (ver Gianoulakis, 2001). El alcohol induciría, particularmente a dosis bajas, efectos reforzantes opioide-dependientes durante la curva ascendente de alcohol en sangre. Más específicamente la activación, alcohol-dependiente, de receptores opioides  $\mu$  en ATV inhibiría el control que las interneuronas GABAérgicas ejercen sobre neuronas dopaminérgicas, y esta “inhibición de la inhibición” resultaría en liberación de dopamina en este circuito de recompensa (Xiao et al., 2007).

Esta hipótesis es consistente con resultados que indican inhibición de ingesta de alcohol o de reforzamiento inducido por esta droga luego de la administración de antagonistas opiáceos generales o específicos para los receptores  $\mu$  y  $\delta$  (para referencias, véase Nizhnikov et al., 2009). Koob y colaboradores (2004) han sugerido que el bloqueo de receptores  $\mu$  y  $\delta$  mitiga el fenómeno de ingesta luego de un período de receso al inhibir la liberación de dopamina a nivel de núcleo accumbens. Por otro lado, si bloqueamos la actividad de los receptores  $\kappa$ , se podría aumentar el consumo de alcohol debido a que las dinorfinas inhiben el consumo elevado de la droga (Gianoulakis, 2001), al menos en sujetos sin extensa experiencia crónica con la droga. Sin embargo, puede ocurrir también que el antagonismo a nivel de receptor  $\kappa$  genere una inhibición del consumo de

alcohol si nos encontramos frente a un organismo dependiente de la droga que consume para paliar las consecuencias negativas que produce la abstinencia (reforzamiento negativo; Koob et al., 2004; Koob, 2009).

El sistema opioide parece estar involucrado en la formación de memorias asociadas al etanol en útero. Chotro y Arias (2005) observaron que animales que habían sido expuestos a etanol en útero presentaban mayor preferencia a la droga durante la infancia; sin embargo, esta preferencia por etanol se suprimía si los animales recibían etanol sumado a naloxona (antagonista no selectivo del sistema opioide). En línea con estos resultados, Miranda-Morales y colaboradores (2010) evaluaron autoadministración operante por etanol en neonatos (DP1) que habían sido administrados con etanol (o no) durante la gestación tardía; los animales tratados con etanol en útero se auto-administraban mayores cantidades de etanol que los controles vehículos, además, la administración de naloxona 20 min previo a los tratamiento prenatales de etanol suprimía este efecto. Estas aproximaciones farmacológicas permiten dilucidar la participación de los diferentes neurotransmisores opioidérgicos en el establecimiento de la preferencia hacia el etanol.

Cabría pensar, en función de los antecedentes reseñados, que la exposición a etanol durante la gestación tardía altere el sistema opiáceo y que estos cambios favorezcan el consumo de etanol luego en el desarrollo. Al respecto, Nizhnikov y colaboradores (2014) encontraron en ratas infantiles una reducción en la expresión sinaptosomal del receptor kappa en ratas infantiles luego de exposición prenatal a etanol (1,0 g/kg, DGs 17-20) en núcleo accumbens, amígdala e hipocampo. Además, en este estudio, se ha encontrado que los animales infantiles que habían sido expuestos a etanol durante la gestación tardía, fueron insensibles al aumento de consumo de alcohol inducido por nor-BNI (un antagonista kappa). Por estas razones, es posible que alteraciones en el número, densidad o funcionalidad de los receptores opiáceos sean responsables, al menos parcialmente, de las alteraciones comportamentales y neurales que se observan luego de la exposición prenatal a etanol.

El objetivo del presente experimento fue medir, en animales adolescentes expuestos o no a alcohol en útero, la expresión de los genes precursores de los receptores opiáceos en corteza infralímbica, núcleo accumbens y ATV, mediante PCR cuantitativa en

tiempo real (RT-PCR). Se hipotetizó que los animales expuestos a etanol en útero poseerían una menor expresión en los receptores kappa que sus controles y, posiblemente, un patrón de expresión diferencial en receptores mu y delta.

#### *Materiales y Métodos*

El experimento responde a un diseño 2 [tratamiento prenatal (PE, PV)] X 2 [sexo (macho, hembra)]. Se obtuvieron muestras de cerebros de 24 ratas Wistar (N=5 por grupo) provenientes de 12 camadas (N=5 PE; n=5 PV). El tratamiento prenatal se llevó a cabo de manera similar a lo descrito en el apartado de procedimientos generales. Entre los DP35 y 37, se sacrificaron los animales e, inmediatamente, se congelaron los cerebros a -80 °C para su posterior procesamiento, tal como está descrito en el apartado de procedimientos generales.

#### *Resultados*

Se realizaron ANOVAs factoriales separados para cada área en análisis (IL, AcSh y ATV), y para cada gen objeto en particular ( $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ ). Las medias y EEM para cada una de estas áreas y gen problema, se encuentran detalladas en la tabla 3. No se encontraron diferencias significativas entre los animales PE y PV que puedan explicar el mayor consumo etílico observado en los PE con respecto a sus controles (véase Experimento 1 y 2). Las diferencias entre los resultados obtenidos y lo encontrado en el trabajo de Nizhnikov y colaboradores (2014) pueden deberse a diferencias de cepa (Sprague-Dawley en Nizhnikov y colaboradores, vs Wistar en el presente trabajo), o al momento de la medición (infantes en Nizhnikov y colaboradores, vs adolescentes en el presente trabajo). La reducción en receptores opiáceos kappa en infantes puede ser un efecto transicional que en la adolescencia es compensado y, por lo tanto, deja de ser observable. Otra posibilidad, es que las diferencias entre experimentos se deban a las técnicas empleadas (Western Blot contra RT-PCR). Por otro lado, el hecho de no observar diferencias basales en animales tratados con etanol, no quita la posibilidad que las mismas se observen inducidas por esta droga, es decir, frente a un desafío con etanol

	Sexo	MU			DELTA			KAPPA		
		IL	AcbSh	VTA	IL	AcbSh	VTA	IL	AcbSh	VTA
<b>Vehículo prenatal</b>	macho	1,51	1,22	1,96	0,62	0,63	1,40	1,65	0,56	1,40
		±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0,26	0,25	231,78	0,23	0,21	1,83	0,56	0,14	1,83
	hembra	1,24	1,35	0,71	0,66	1,02	7,87	1,01	0,77	7,87
		±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0,26	0,25	231,78	0,23	0,21	1,64	0,56	0,14	1,64
<b>Etanol prenatal</b>	macho	0,92	1,16	1,55	0,69	1,10	3,57	0,96	0,84	3,57
		±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0,29	0,25	231,78	0,23	0,21	1,64	0,56	0,14	1,64
	hembra	1,32	0,81	465,46	0,90	0,94	2,94	1,97	0,65	2,94
		±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0,26	0,25	231,78	0,23	0,21	1,83	0,56	0,14	1,83

**Tabla 3.** Medias y EEM de la expresión relativa de Ct obtenidos para muestras de área infralímbica (IL), Accumbens shell (AcSh) y área tegmental ventral (ATV) provenientes de animales tratados con etanol o vehículo durante la gestación tardía. Para cada área se muestra la cuantificación relativa a GAPDH (gen control) en comparación con los 3 genes problemas: MU, DELTA y KAPPA.

## *Conclusiones Generales y Discusión de Capítulo*

Una breve exposición al etanol durante la gestación tardía (2,0 g/kg de etanol; DGs 17-20) aumentó significativamente el consumo de etanol durante la adolescencia, tanto evaluado en pruebas de acceso limitado como en pruebas de acceso libre que se extendieron hasta casi la adultez. Estos resultados concuerdan con el aumento en la preferencia por etanol observada en numerosas ocasiones en infantes (e.g. Chotro et al., 2007; Abate et al., 2008;) y en los pocos trabajos que habían evaluado adolescentes (Arias et al., 2003; Díaz-Cenzano & Chotro, 2010) expuestos prenatalmente al etanol. Lo novedoso de este trabajo es que el incremento en el consumo de etanol persistió por muchas semanas, durante casi todo el transcurso de la adolescencia y se observó en pruebas de acceso libre de varias horas de duración, y sin restricción de fluidos.

Es poco probable que el aumento del consumo de etanol observado en estos experimentos se deba a consecuencias teratológicas severas de la droga, ya que no hubo diferencias de peso entre los diferentes tratamientos prenatales. Además, estudios previos indicaron que la administración prenatal de 2,0 g/kg de etanol durante los días gestacionales 17 a 20, no alteró la morfología cerebral, el peso de los fetos o la placenta, ni el ancho del cerebelo (Domínguez et al., 1998). Dicha exposición prenatal tampoco alteró el número de células de la capa granular del bulbo olfatorio principal (Pueta et al., 2011) ni la capacidad de procesar estímulos sensoriales básicos (Abate et al., 2008; Arias & Chotro, 2006). Sin embargo, sí se han reportado efectos teratogénicos sobre la capacidad de expresión de aprendizaje habitatorio, asociados a la exposición prenatal a altas dosis de etanol en útero (Hofmann et al., 2005).

Las diferencias en consumo, en función del alcohol prenatal, que se observaron en esta serie experimental podrían deberse a un cambio en el metabolismo etílico como producto de la exposición prenatal a la droga. Por ello, en el Experimento 5, se realizó una medición farmacocinética en la cual no se observaron diferencias en el metabolismo de la droga entre los animales adolescentes tratados con etanol en útero y los controles. Una curiosidad es que en este estudio se observó que los adolescentes administrados con 2,5 g/kg i.g. mantuvieron estables los niveles de etanol en sangre a lo largo de la evaluación (30-120 min). Este patrón puede explicarse teniendo en cuenta la vía de administración

utilizada. Cuando se administra vía intragástrica dosis relativamente altas de etanol, los niveles de etanol en sangre demuestran una curva con un pico más persistente que vía intraperitoneal. Además, los resultados observados en el Experimento 5 concuerdan con los reportados por Walker y Ehlers en su trabajo (2009).

Cuando los adolescentes expuestos, o no, a etanol en útero fueron evaluados en términos de patrones de reactividad emocional y respuesta locomotora frente al etanol (Experimento 3), no se observaron diferencias que pudieran explicar el consumo exacerbado, expresado por los adolescentes del grupo PE. La reactividad emocional se midió en términos de la emisión de vocalizaciones ultrasónicas tanto apetitivas como aversivas; la locomoción inducida por etanol se seleccionó en base a estudios previos que indicaron una superposición parcial entre los sistemas neurobiológicos que median la estimulación conductual inducida por reforzamiento con drogas (Tzschentke & Schmidt, 1999). Sí se observó, sin embargo que el etanol exacerbó la producción de vocalizaciones, tanto de las apetitivas como de las aversivas, si bien el efecto fue mayor en estas últimas. Se podría postular que el etanol, administrado durante la adolescencia, potencia estados emocionales en curso, si bien esto es sólo una hipótesis que requiere de evaluación experimental. Tal como se observó en el trabajo de Pautassi y colaboradores (2006), esta dosis de etanol parece ejercer efectos ansiogénicos, sumados al estrés leve de la prueba. Sin embargo, este efecto no se vio afectado por el tratamiento prenatal con la droga. Cabe la posibilidad, entonces, que el efecto de la exposición prenatal se haya visto enmascarada por la dosis utilizada y que, probablemente, pueda observarse si se utilizaran otras dosis, quizá más bajas.

Si bien existe evidencia que indica que los animales adultos expuestos a etanol en útero, bajo regímenes más prolongados o con dosis mayores a las empleadas en esta tesis, presentan hiperactividad locomotora (e.g. Dursoun et al. 2006; Kim et al, 2013; Brys et al., 2014; véase introducción del capítulo), en el Experimento 3 no observamos este fenómeno en los adolescentes PE. Probablemente, la hiperactividad observada en estos modelos de exposición prenatal a etanol esté relacionada a la dosis y a la cantidad de exposiciones que reciben los animales en útero. Por ejemplo, en el trabajo de Brys y colaboradores, la dieta líquida ocasionaba consecuencias teratológicas, incluyendo diferencias de peso y



mortalidad de las crías; mientras que la exposición moderada usada en este trabajo, no genera diferencias de peso, ni mortalidad de las crías.

La activación de genes de expresión temprana, como c-Fos, indica actividad neuronal en respuesta a diversos estímulos, entre ellos, la exposición a novedad. Por ejemplo, ratas expuestas a una recámara novedosa, exhibieron un aumento sustancial en la expresión de c-Fos en diferentes áreas del cerebro, comparados con sus controles (Ryabinin et al., 1997). En este trabajo, se observó un efecto similar cuando se compara la actividad neuronal general de los animales del Experimento 3 –cuya actividad fue medida luego de las pruebas de actividad locomotora y emisión de USVs- con los animales del Experimento 5, en el que los animales no fueron expuestos a estímulos novedosos. Sin embargo, la información de mayor interés en ambos experimentos, fue la reducción significativa de actividad en corteza infralímbica que ejerció la exposición prenatal a etanol. La corteza infralímbica ejerce un papel importante en la extinción de asociaciones inducidas por reforzadores convencionales como las drogas de abuso (véase Millan et al, 2011). Se ha observado, por ejemplo, que la estimulación eléctrica de neuronas en IL reduce el condicionamiento de miedo (Vidal-Gonzalez et al., 2006). Además, la activación farmacológica de IL mediante micro-inyecciones de antagonistas D1 y D2, previnieron la recaída a cocaína (Sun & Rebec, 2005), mientras que la activación del sistema GABAérgico en IL mediante muscimol y baclofen facilitó la recaída inducida por cocaína (Peters et al., 2008). De manera similar, la infusión de antagonistas del receptor de N-metil-D-aspartato, hizo a los sujetos más resistentes a la extinción de miedo condicionado (Burgos-Robles et al., 2007), sin ejercer efectos sobre la adquisición de dicho aprendizaje. Adicionalmente, la expresión de la extinción ha sido asociada a la síntesis de proteínas (Santini et al., 2004) y a un aumento en la expresión de células marcadas para c-Fos en IL (Knapska & Maren, 2009). La reducción observada en IL como producto de la exposición prenatal observada en los Experimentos 3 y 5, sugiere que la exposición prenatal a etanol podría resultar en déficits en extinción de aprendizajes adquiridos durante la adolescencia. En la presente serie experimental, se pudo observar que, de hecho, los adolescentes expuestos a etanol en útero presentan déficits en la extinción pero no en la adquisición de aprendizajes aversivos (Experimento 7a). Sin embargo, cuando el reforzador utilizado es etanol, los

animales expuestos a etanol en útero no son capaces de adquirir aprendizajes aversivos asociados a esta droga.

Los resultados obtenidos sugieren, en conjunto con evidencia previa, que los adolescentes que han sido expuestos a etanol en útero poseen ciertas características que los hacen más vulnerables a consumir etanol. Por un lado, se ha sugerido que la exposición prenatal a etanol podría inducir un aprendizaje asociativo entre las propiedades orosensoriales de la droga (olor, sabor) y sus efectos apetitivos (véase Spear & Molina, 2005), aprendizaje que regularía postnatalmente la búsqueda y consumo de alcohol. Nuestros resultados se complementan muy convenientemente con esta teoría. Si la misma es correcta, nuestros resultados sugieren que los animales no podrían extinguir esta memoria prenatal. Como observáramos, los animales expuestos a etanol in-útero exhiben alteraciones prefrontales en áreas ligadas a la extinción de memorias asociativas, que se asociaron a la persistencia de una aversión adquirida al sabor inducida por cloruro de litio (véase Experimento 7a). Por otro lado, los adolescentes expuestos a etanol en útero fueron insensibles a las propiedades aversivas del etanol, las cuales servirían para frenar el consumo de esta droga (experimento 7b).

En el Experimento 6 se midió actividad de c-Fos en AcSh, inducida por inyecciones de etanol (0,0 g/kg, 1,25 g/kg, 2,5 g/kg o 3,25 g/kg). Además, se realizó una doble tinción contra c-Fos y TH (tiroxina hidroxilasa, enzima que participa en la síntesis de dopamina) en ATV, lo cual nos permitió observar posibles diferencias entre tratamientos prenatales a nivel de transmisión dopaminérgica. Los resultados fueron muy interesantes: los adolescentes expuestos a etanol en útero mostraron mayor actividad dopaminérgica en ATV como producto de la administración postnatal de etanol. Estos resultados podrían interpretarse como un correlato neurobiológico de una mayor sensibilidad a los efectos reforzantes del etanol como resultado de la exposición prenatal a la droga. En ese sentido, no sólo los animales expuestos a dosis moderadas de etanol durante la gestación tardía serían menos sensibles a las propiedades aversivas de esta droga (Experimento 7b), sino que también serían más sensibles a las propiedades reforzantes del alcohol (Dietz et al, 2009).

El etanol a dosis de 1,25 g/kg indujo actividad de c-Fos en el núcleo accumbens Shell, en animales no tratados prenatalmente (i.e. grupo PNT) Interesantemente, los animales PE necesitaron una dosis mayor de etanol (2,5 g/kg) que los PNT para exhibir un aumento similar en actividad neural inducida por etanol; mientras que los PV fueron insensibles a etanol. Si se tiene en cuenta que la inhibición farmacológica de AcSh aumenta la conducta de búsqueda y consumo de reforzadores gustativos (Arias-Carrión et al., 2014), el hecho de necesitar una dosis mayor de etanol para activar esta área podría explicar el consumo exacerbado de etanol en adolescentes PE. Tal como destacamos en la discusión del Experimento 6, los resultados obtenidos para ATV y AcSh sugieren que el etanol prenatal modifica a largo plazo la actividad del sistema mesocorticolímbico frente al etanol (Leyton & Vezina, 2014).

Otro resultado interesante del Experimento 6 indica que los animales que son sólo manipulados durante la gestación (i.e. grupo PV) exhiben alteraciones en ATV y AcSh. Específicamente, observamos significativamente menor activación basal catecolaminérgica en el grupo PV con respecto a PNT en ATV; y una menor activación neuronal de ambos grupos manipulados prenatalmente (PV y PE) con respecto al control no tratado (PNT) en AcSh. Estos efectos pueden explicarse por similitudes entre las manipulaciones prenatales de nuestros experimentos con tratamientos de estrés prenatal y, por lo tanto, ser interpretados como efectos de estrés durante la gestación. El estrés prenatal, por ejemplo a partir de la inmovilización materna, genera incrementos significativos en la respuesta del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA) en animales adolescentes, aumento de corticosterona, así como conductas de tipo ansioso en prueba de campo abierto y laberinto elevado en cruz (Xu et al., 2014). Sin embargo, en este estudio los tratamientos de estrés duraron prácticamente toda la gestación (DGs 8-20) y tenían una intensidad considerable (2 sesiones diarias de 30 min); a diferencia de la manipulación que han recibido las hembras preñadas en nuestro estudio (i.e. aproximadamente 30 seg de sujeción, necesarios para administrar etanol o vehículo durante los DGs 17-20).

De manera similar, Green y colaboradores (2011), encontraron que animales adultos que habían sido expuestos a estrés prenatal (60 min de inmovilización diaria durante la última semana de gestación) fueron más vulnerables al estrés y presentaron desregulación noradrenérgica y del eje HHA. Nuevamente, 1 h de estrés por inmovilización

no parece ser comparable con la sujeción que han tenido los animales en nuestro trabajo. Un estresor prenatal, quizás más leve, fue empleado por Abe y colaboradores (2007). Las hembras preñadas fueron sometidas a estrés psicológico mediante una “caja de comunicación”, esto es, los animales observaban a un congénere que era sometido a estrés por shock eléctrico, 60 min diarios durante la última semana gestacional. Los investigadores observaron que los animales adultos presentaron conductas ansiogénicas y una disregulación en eje HHA como producto de este tratamiento prenatal. Aun así, la comparación entre estos trabajos y nuestro experimento resulta conflictiva, ya que la duración del estresor en Abe y colaboradores (2007) fue considerablemente más larga y, quizás, de más intensidad que la utilizada aquí. Sugerimos, entonces, que futuros estudios empleen controles para escindir el factor de estrés de la administración de etanol (e.g. otras vías de administración prenatal como la inhalación, o agregar un grupo control de estrés prenatal explícitamente expuesto a shock o inmovilización).

En el presente capítulo también se analizaron los efectos de la exposición prenatal a etanol sobre la sensibilidad a los efectos aversivos de la droga. La lógica que subyace a este objetivo radica en que la exposición prenatal a etanol podría hacer a los adolescentes menos sensibles a los efectos aversivos de esta droga, los cuales son útiles a la hora de frenar el consumo de la misma. Para ello, en el experimento 7b, llevamos a cabo un condicionamiento de aversión al sabor, apareando solución salina a una dosis de etanol moderada/alta (i.e. 2,5 g/kg i.p.) en animales expuestos a etanol en útero y sus controles (i.e. grupo PV y grupo PNT). Los animales expuestos a etanol en útero no desarrollaron aversión condicionada a la salina apareada a etanol, tal como sí hicieron los controles tratados con vehículo (PV) o no tratados (PNT). Este fenómeno es consistente con lo observado previamente en ratas infantiles (Pautassi et al., 2012), y sugiere que la exposición prenatal a estas dosis moderadas de etanol (2,0 g/kg), ejerce efectos significativos a largo plazo, haciendo a los adolescentes menos sensibles a los efectos aversivos de la droga.

Contraria a nuestra hipótesis de que los animales expuestos a etanol en útero poseerían diferencias en la expresión de receptores opiáceos, sobre todo una menor activación de receptores kappa; en el Experimento 8 no se observaron diferencias en la expresión de ARNm de receptores mu, delta y kappa en áreas del sistema mesocorticolímbico como producto de la exposición prenatal a etanol. Si bien, en otro

estudio, se ha encontrado una menor activación de receptores kappa en infantes expuestos a etanol en útero (Nizhnikov et al., 2014), la misma no parece persistir hasta la adolescencia. Por lo tanto, bajo estos parámetros, no puede afirmarse que alteraciones del sistema opiáceo estén involucradas en el consumo exacerbado de etanol observado en los Experimentos 1 y 2.

En resumen, la exposición a dosis moderadas de etanol durante la gestación tardía aumenta el consumo de etanol durante la adolescencia. Además, la exposición a etanol mediante el consumo materno en útero parece tener consecuencias a largo plazo en lo que a extinción de aprendizajes se refiere, fenómeno asociado a cambios en la actividad neural de áreas de la corteza prefrontal. Estos resultados son relevantes cuando se considera que la búsqueda de etanol comienza comúnmente durante la adolescencia y que el consumo exacerbado de etanol durante esta etapa es un factor de riesgo para el desarrollo de problemas de uso y abuso con la droga (e.g. DeWit et al., 2000).

### Capítulo 3

#### Estrés Como Factor De Vulnerabilidad Que Promueve El Consumo De Etanol En La Adolescencia

Uno de los objetivos del presente trabajo consiste en indagar acerca de factores moduladores del fenómeno de iniciación temprana. En tal sentido, una exagerada respuesta al estrés podría ser un rasgo que exacerba el riesgo de iniciarse tempranamente al consumo de alcohol (véase Becker et al, 2011) y los efectos facilitadores de esta iniciación temprana sobre el consumo posterior de alcohol (Lee et al., 2012). El alcohol ejerce potentes efectos reductores del estrés, los cuales pueden aumentar la búsqueda y consumo de la droga. Al respecto, estudios recientes indican que las ratas adolescentes son sensibles a estos efectos anti-ansiedad (i.e., ansiolíticos) del alcohol (Acevedo et al, 2014) y, quizás, en mayor medida que las adultas (Varlinskaya & Spear 2012). Adicionalmente, existe evidencia que sugiere que los adolescentes podrían ser más sensibles al estrés que los adultos (Stone & Quartermain, 1997). Por ejemplo, se ha visto que, si bien los adolescentes tienen mayor activación autonómica (e.g., balance simpático-vagal alterado) luego de la administración de etanol que los adultos, el estrés parece atenuar estos efectos únicamente en adolescentes (Saalfeld & Spear, 2014). Sin embargo, se sabe relativamente poco acerca de las diferencias ontogenéticas en el consumo de etanol inducido por el estrés. Es importante mencionar también que el etanol, por un lado, es considerado un ansiolítico, por sus acciones en el sistema GABAérgico; pero por otro lado, algunos autores consideran que el etanol es en sí mismo un estresor, ya que ejerce activación en el eje HHA, particularmente, eleva los niveles de corticosterona (véase Becker et al, 2011).

Las interacciones sociales cobran particular relevancia durante la adolescencia (véase Spear & Varlinskaya, 2012) y la carencia de las mismas (i.e., aislamiento social) puede ser una importante fuente de estrés que facilitaría la búsqueda y el consumo de etanol. El aislamiento social durante el período post-destete (pre-adolescencia y adolescencia temprana) provoca cambios en el comportamiento social (Vanderschuren et al., 1995; Varlinskaya, Spear, & Spear, 1999; Lugo et al., 2003) y, además, produce déficits a nivel comportamental (e.g., incrementos en actividad locomotora y patrones de

ansiedad) y neural (i.e. disminución de grosor cortical; Hellemans et al., 2004). El aislamiento social crónico también aumenta el consumo de etanol cuando ocurre durante el período adolescente, pero no cuando se experimenta durante la adultez (Lopez et al., 2011). En otro estudio (Pisu et al., 2011), se observó que 30 días de aislamiento social no afectaron el consumo voluntario de etanol; sin embargo, este último atenuó los efectos ansiogénicos del aislamiento social en pruebas de laberinto elevado en cruz. Butler y colaboradores (2014) observaron aumento de corticosterona y mayor actividad en eje HHA en animales aislados durante 6 semanas, en comparación con controles no aislados; más interesante aún, estos animales aislados mostraron un aumento en la preferencia por etanol, la cual correlacionó con estas alteraciones en eje HHA. Estos resultados sugieren que el aislamiento social es un estresor capaz de causar alteraciones a largo plazo y modificar los patrones de ingesta de etanol. Sin embargo, en estos modelos, los animales -casi siempre adultos- son expuestos a prolongados períodos de aislamiento social que, difícilmente, sean relevantes a la hora de modelar situaciones de estrés social en humanos. En el presente Capítulo, se analizará el consumo de etanol en adolescentes sujetos a un breve período de aislamiento social (4 días) antes y/o durante la evaluación de ingesta de alcohol (Experimento 1 de este capítulo).

La cantidad de experiencias adversas durante la infancia parece estar asociada, en humanos, a la edad de inicio de consumo de etanol: esto es, a mayor estrés en la infancia más rápido será el acercamiento a la droga (Rothman et al., 2008; Enoch, 2012). Los efectos del estrés temprano sobre la reactividad hacia el etanol pueden analizarse en ratas a través del modelo de separación materna (Plotsky & Meaney, 1993; Zimmerberg et al, 2003; Plotsky et al., 2005 Francis et al., 2008; Spivey et al., 2008). En este paradigma, las ratas son separadas de la madre durante 180 o 360 min todos los días durante las dos o tres primeras semanas de vida (Champagne et al., 2003). Los animales que sufren separación materna, cuando son evaluados de adultos, muestran mayor consumo de etanol y una mayor respuesta hormonal y comportamental hacia el estrés (Huot et al., 2001) que los animales criados bajo condiciones normales de alojamiento. Un trabajo más reciente confirmó que la separación materna exagera la autoadministración operante de etanol en ratones adultos (Cruz et al., 2008). Pocos estudios, en tanto, evaluaron los efectos de la separación materna en edades más tempranas del desarrollo (i.e. infancia, adolescencia). Entre ellos,

Arnold y Sivi (2002) observaron alteraciones en locomoción en campo abierto y conductas de juego en animales adolescentes sometidos a separación materna. Más recientemente, se ha observado que la separación materna altera el aprendizaje motivacional (Pautassi et al, 2012) y la activación motora inducida por etanol (Fernández et al., 2014). Sin embargo, hasta el momento, no se han analizado los efectos de la separación materna diaria durante las dos primeras semanas de vida sobre el consumo de alcohol durante la adolescencia, tal es el objetivo propuesto para el Experimento 2.

Otros estresores, como la estimulación nociceptiva crónica, también influyen en el consumo de etanol durante la adolescencia. Por ejemplo, Siegmund y colaboradores (2005) encontraron que el estrés por estimulación nociceptiva (5 sesiones diarias de footshock) aumentó el consumo de etanol en adolescentes pero no en adultos. Por el contrario, Brunell y Spear (2005) encontraron que 8 sesiones diarias de 15min de estrés nociceptivo suprimen el consumo de etanol en ratas adolescentes. De manera similar, se ha observado que la inmovilización aumentó el consumo de la droga en ratas adultas Sprague-Dawley (Gomez et al., 2012). Sin embargo, el efecto de este estresor en el consumo adolescente de alcohol ha sido escasamente estudiado. Por lo tanto, uno de los objetivos del Experimento 3 es comparar el consumo voluntario de etanol entre adolescentes y adultos que han recibido estrés crónico por inmovilización.

Otro objetivo del Experimento 3 consistió en analizar si el estrés por inmovilización afecta de manera diferencial la sensibilidad al efecto estimulante motor del etanol en adolescentes y adultos. Los efectos de este estresor sobre la sensibilidad al etanol son contradictorios. En un estudio, por ejemplo, se observó que la exposición a 90 min de estrés por inmovilización no alteró la locomoción inducida por etanol ni la sedación inducida por la droga en ratas adultas y adolescentes (Acevedo et al., 2013). En otro estudio, la inmovilización crónica exacerbó las diferencias entre adolescentes tempranos y tardíos (Varlinskaya et al, 2013). Varlinskaya y colaboradores observaron que 5 sesiones de inmovilización aumentaron la preferencia social y la ansiólisis inducida por etanol en las ratas mayores; en cambio, el estresor suprimió el efecto facilitador social y ansiolítico de etanol en los adolescentes tempranos (DPs 24-28) machos, disminuyéndolo en hembras. Los resultados de Varlinskaya y colaboradores (2013) sugieren que los adolescentes tardíos (DP38-42) son más sensibles a los efectos ansiolíticos de etanol en el contexto social,



mientras que los adolescentes tempranos serían menos sensibles a esta propiedad apetitiva de la droga. Willey y colaboradores (2013) encontraron que el estrés por inmovilización aumenta la frecuencia de emisión de vocalizaciones apetitivas (50 kHz) inducidas por etanol en adolescentes, pero no en adultos.

## *Materiales y Procedimientos Generales*

### *Sujetos*

En el presente capítulo se utilizaron ratas Wistar en todos los experimentos. Los animales nacieron y se criaron en el bioterio del INIMEC-CONICET bajo condiciones estándares de laboratorio hasta el momento de su utilización. El bioterio cuenta con condiciones controladas de temperatura (22-24 °C) y luz artificial (ciclo luz-oscuridad 12:12 h con luces encendiéndose a las 08:00h). Los nacimientos fueron examinados diariamente, considerándose el día de parto como día postnatal 0 (DP 0). Se realizó el raleo de las camadas al día postnatal (DP)1 y el destete al DP21. Luego del destete, los animales se alojaron en grupos de a cuatro por sexo, hasta el comienzo de los experimentos, en los que fueron alojados de a pares de acuerdo con su condición experimental y sexo.

Los tratamientos de estrés por aislamiento social (a partir del DP21), separación materna (MS) y estrés por inmovilización, serán descritos en los apartados correspondientes a cada experimento.

### *Administración de etanol (Experimentos 2 y 3)*

Para la administración de etanol o vehículo, los animales fueron intubados vía intragástrica (administración i.g.) mediante una cánula de polietileno (clay Adams) por la cavidad oral hasta el estómago del animal (aprox. 7 cm). La cánula se encontraba adosada a una jeringa de 3 ml con aguja 23 G que contenía una solución de 21% (dosis 2,5 g/kg); 10,5% (dosis 1,25 g/kg) o 4,2% (dosis 0,5 g/kg) de etanol (Porta Hnos., Argentina; o vehículo). En el experimento 2, los animales fueron administrados con las respectivas dosis de etanol al DP 33, previa a la evaluación de conductas de ansiedad mediante la prueba de luz/oscuridad (véase descripción del experimento para mayor detalle de este procedimiento).

En el experimento 3, los animales fueron administrados con una dosis de 2,5 g/kg o vehículo, previa a la evaluación de locomoción en campo abierto, luego de la última sesión de estrés por inmovilización (véase apartado Experimento 3).

### *Prueba de luz oscuridad (Experimento 2)*

5 min luego de la administración de etanol o vehículo al DP 33, se realizó la prueba de luz/oscuridad, bajo condiciones similares las del Capítulo 1.

*Prueba de Locomoción (Experimento 3)*

Tal como se detalló en el Capítulo 1, los animales fueron evaluados en una caja de medición de actividad, equipada con sensores que permiten medir la distancia recorrida (cm) durante 5 min (ITCOMM, Córdoba). El animal era colocado en el centro de la recámara y la distancia recorrida era registrada en una pc conectada al equipo. La evaluación tuvo lugar 5 min luego de la administración de etanol o vehículo, 4 h luego de los tratamientos de estrés.

*Prueba de Ingesta de doble botella intermitente (Experimento 2)*

La evaluación de ingesta fue similar a la descrita para el Capítulo 1. Brevemente, consistió en una prueba de consumo de doble botella con sesiones de 24 h. Las botellas contenían agua vs etanol 5,6% en una solución de 1% sacarosa y fueron cambiadas diariamente de posición para evitar preferencias de lateralidad. Se utilizó un esquema intermitente de presentación de las soluciones etílicas y vehículo (Simms et al., 2008), la cual consistió en 3 sesiones separadas día de por medio (las botellas se colocaban los lunes, miércoles y viernes). Este procedimiento de intermitencia es similar al descrito en el capítulo 2, apartado de procedimientos generales. La evaluación de ingesta tuvo lugar 48 h posterior a la evaluación de luz/oscuridad.

*Prueba de Ingesta de doble vía de 2 horas por sesión (Experimento 1 y 3)*

La prueba de ingesta de 2 h por sesión, se realizó en condiciones similares a las descritas anteriormente (Capítulo 2). Las particularidades de cada experimento serán descritas oportunamente en la sección de materiales y métodos correspondiente. El Experimento 1 contó con 2 sesiones de ingesta (3% etanol vs agua y 4% etanol vs. agua, en las sesiones 1 y 2 respectivamente), en tanto que 4 sesiones fueron ejecutadas en el Experimento 3 (3% etanol vs agua en la primera sesión, incrementándose la concentración de etanol 1% en cada sesión hasta alcanzar 6% en la cuarta sesión).

A diferencia de experimentos anteriores y del Experimento 3 de este capítulo, los animales del Experimento 1 fueron sujetos a 2 sesiones de ingesta, únicamente. En la primer sesión el tubo de etanol contenía una solución de 3% v/v, en la segunda sesión, el tubo de etanol contenía 4% v/v.

## *Diseños Experimentales y Análisis de Datos*

*Experimento 1:* El objetivo del Experimento 1 consistió en analizar los efectos del aislamiento social sobre el consumo de etanol, cuando el estresor se produce antes de la evaluación de ingesta y/o durante la misma. Para esto, se realizó un diseño experimental tomando como variables independientes 4 condiciones de alojamiento: a) Aislado antes de la prueba de ingesta de alcohol + Aislado durante la prueba de ingesta de alcohol (AA); b) Aislado antes de la prueba de ingesta de alcohol + No aislado durante la prueba de ingesta de alcohol (AN); c) No aislado antes de la prueba de ingesta de alcohol + Aislado durante la prueba (NA) de ingesta de alcohol; No aislado durante la prueba de ingesta de alcohol + No aislado durante la prueba de ingesta de alcohol (NN). Se realizaron diferentes ANOVAs de medidas tomando como variable independiente el factor Condición de alojamiento y como variables dependientes g/kg de etanol consumidos, porcentaje de preferencia de etanol y consumo de vehículo (ml/100g); como factor intrasujeto, se consideraron las sesiones de ingesta.

*Experimento 2:* Tuvo como objetivo analizar los efectos del estrés temprano (i.e. separación materna durante las primeras 2 semanas de vida) sobre conductas de ansiedad y el consumo de etanol, en la adolescencia. Se llevó a cabo un diseño factorial 3 [separación materna (separados 180 min diarios [MS180], separados 15 min diarios [MS15] o no separados [control]) x 4 [tratamientos en la adolescencia (NT, 0,0 g/kg; 1,25 g/kg; o 2,5 g/kg i.g. etanol)] x 2 [sexo (machos o hembras)]. Para analizar los resultados de la prueba de luz/oscuridad, se realizaron ANOVAs factoriales separados para las variables dependientes analizadas (i.e. latencia a cruzar al compartimento blanco, cruces al compartimento blanco, tiempo pasado en el compartimento blanco), tomando como variables independientes la separación materna, tratamientos en adolescencia y sexo. Para la prueba de ingesta, se llevaron a cabo ANOVAs de medidas repetidas para cada variable dependiente en análisis (g/kg de etanol consumidos, porcentaje de preferencia y consumo de vehículo), tomando como medidas intrasujeto las 3 sesiones de ingesta.

*Experimento 3:* En el Experimento 3, se analizó la incidencia del estrés por inmovilización sobre la actividad locomotora inducida por etanol y sobre el consumo de posterior de esta droga, comparando adolescentes y adultos. El diseño de este

experimento responde a un factorial 2 [edad (adolescentes o adultos)] X 2 [estrés (inmovilización o control)] X 2 [dosis de etanol recibida previa a la prueba de actividad motora (2,5 g/kg, vehículo)]. Para la prueba de actividad locomotora, se realizó un ANOVA tomando como variables independientes la edad, el estrés y las dosis; como variable dependiente, se tomó la distancia recorrida (cm). Dado que para la prueba de locomoción el ANOVA ómnibus, que tuvo en cuenta todos los factores independientes (i.e. edad, estrés y dosis), reveló diferencias basales para cada edad en análisis [ $F_{(1, 83)}=24,75$ ,  $p<0,01$ ], se realizaron ANOVAs separados para cada etapa (i.e. adolescencia, adultos), tomando como variables independientes la dosis y el estrés; y como variable dependiente, la distancia recorrida (cm). Para la prueba de ingesta se realizó un ANOVA de medidas repetidas para cada variable dependiente (g/kg consumidos, porcentaje de preferencia y consumo total de fluidos), tomando como variables independientes la edad, tratamiento de estrés y dosis recibida durante la prueba de actividad motora; y como variables intrasujeto, las sesiones de ingesta. De manera similar a lo observado para actividad motora, este ANOVA ómnibus indicó diferencias estadísticamente significativas entre adolescentes y adultos para g/kg [ $F_{(1, 83)}=13,77$ ,  $p<0,01$ ], en el sentido que los adultos toman basalmente menos cantidad de etanol que los adolescentes. Así entonces, se realizaron ANOVAS de medidas repetidas por separado para cada edad y cada una de las variables dependientes (g/kg, porcentaje de preferencia y consumo total de fluidos).

Tal como se explicó en el Capítulo 1, se realizaron análisis post-hoc de Tukey para efectos significativos principales de factores entre sujetos e intrasujetos; y comparaciones planeadas para efectos significativos que involucren interacciones de factores intrasujeto y entre sujetos.

### **Experimento 1:** Evaluación de ingesta en animales aislados antes y durante la prueba.

Tal como se describió en la introducción del capítulo, una exagerada respuesta al estrés podría ser un rasgo que exacerbaría el riesgo de consumir alcohol en la adolescencia (Pohorecky, 1981; Füllgrabe, Vengeliene, & Spanagel, 2007; Schramm-Sapyta et al., 2008). El estrés social provocado por las condiciones de alojamiento (i.e. aislamiento social) provoca cambios en las interacciones sociales social (Vanderschuren et al., 1995; Varlinskaya, Spear, & Spear, 1999; Lugo et al., 2003) y, además, produce déficits a nivel comportamental, ansiedad y déficits neurales (Hellemans et al., 2004). Sin embargo, la mayoría de estos modelos utilizan paradigmas de aislamiento social en que los adolescentes son alojados individualmente por semanas e, incluso meses; y evalúan los efectos de estos tratamientos sólo en la adultez. Por otro lado, los efectos de este estresor social sobre la ingesta de alcohol ha sido poco caracterizados y contradictorios (Thorsell et al, 2005; Pohorecky, 2008; Becker et al, 2011). En el presente experimento se analizaron los efectos de 4 días de aislamiento social sobre el consumo de etanol. En un experimento piloto, se corroboró que 4 días de aislamiento es suficiente para generar modificaciones en el comportamiento social de animales adolescentes (datos no mostrados), en comparación con controles de la misma edad no aislados. Es decir, este experimento piloto dio evidencia que el tratamiento de aislamiento no era inocuo, sino que alteraba importantes componentes del repertorio social de los adolescentes. Para evaluar la incidencia del aislamiento social sobre el consumo de etanol, se evaluaron animales que permanecían aislados antes de la evaluación, durante la evaluación o en ambas fases. De esta manera, pudo determinarse si los efectos de este estresor permanecían luego de su exposición.

#### Materiales y Métodos

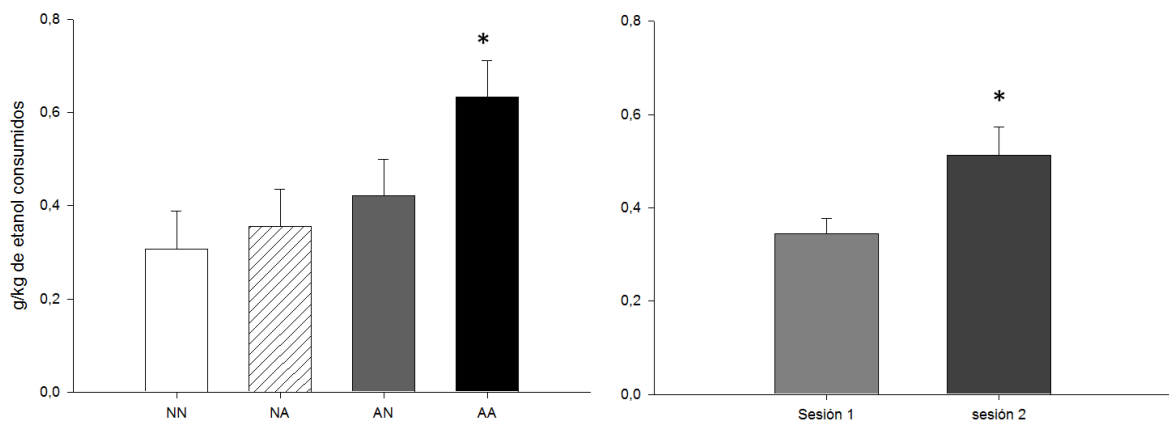
Se utilizaron 58 ratas Wistar machos, DP 32 al comienzo del experimento. El experimento constó de dos fases: 1) Fase de alojamiento (DP32-36): los animales fueron alojados individualmente (A) o en grupos de 4 (N); 2) Fase de ingesta: los animales fueron alojados individualmente (A) o grupalmente (N) durante el protocolo de ingesta. De acuerdo con las condiciones de alojamiento en cada fase, los grupos finales fueron: AA (n=15), AN (n=15), NA (n=14) y AA (n=14). De esta manera, se pudo observar el efecto del

aislamiento previo a y durante la ingesta, así como los efectos de cambiar las condiciones de alojamiento el día anterior a la evaluación de consumo (véase apartado de análisis de datos). Al DP 37, los animales fueron evaluados en una prueba de doble vía con concentraciones de etanol (3% v/v y 4% v/v en la segunda sesión) vs agua durante 2 h (Véase procedimientos generales, Capítulo 1). Luego de la sesión de 2 h de ingesta, los animales pasaron a ser alojados de acuerdo con su condición experimental, esto es, los grupos AA y NA fueron alojados individualmente, y los grupos AN y NN fueron alojados de a pares.

#### *Resultados*

El ANOVA de medidas repetidas para g/kg de etanol consumidos arrojó un efecto principal de Condición [ $F_{(3, 54)}=3,33$ ,  $p<0,05$ ] y de sesión [ $F_{(1, 54)}=8,51$ ,  $p<0,01$ ]. Según análisis post-hoc de Tukey, los grupos AA consumieron mayores cantidades de etanol que los controles (NN); los demás grupos no difirieron entre sí (Figura 31, panel izquierdo) y el consumo fue significativamente mayor en la segunda que en la primer sesión (Figura 31, panel derecho).

El ANOVA de medidas repetidas para porcentaje de preferencia arrojó sólo un efecto significativo de sesión [ $F_{(1, 54)}=5,74$ ,  $p<0,05$ ], siendo las medias de la Sesión 1  $21,46 \pm 2,09$  y para la Sesión 2  $29,22 \pm 3,07$ . Análisis post-hoc de Tukey indican mayor preferencia por etanol en la segunda sesión. En cuanto al consumo de agua (ml/100g), no se observaron diferencias significativas.



**Figura 31. PANEL IZQUIERDO:** Consumo de etanol (g/kg) en animales adolescentes macho aislados antes (4 días) y durante las dos sesiones de ingesta (grupo AA); animales aislados 4 días antes de la primer evaluación (grupo AN); animales aislados a partir de la primer evaluación de ingesta (grupo NA) y animales controles (NA). **PANEL DERECHO:** consumo de etanol (g/kg) para todos los grupos, discriminado por sesión. Cada sesión duró 2 h. En ambos paneles, se muestran las medias y EEM. El asterisco (\*) del panel derecho indica diferencias significativas entre el grupo AA y los restantes; en el panel izquierdo, el asterisco indica diferencia significativa en la segunda sesión.

Los resultados sugieren que el aislamiento social es un estresor efectivo para promover el consumo de etanol durante la adolescencia. Debe recalarse que la magnitud del aislamiento fue mucho menor que en trabajos previos y que el experimento sugiere que, para tener efecto sobre el consumo de alcohol, el aislamiento debe ser experimentado antes y durante el acceso a la droga. Esto es, el efecto facilitador del estrés desaparece si los animales reciben 24 h de alojamiento normal previo a la evaluación. Esto es coincidente con trabajos previos. En un modelo de aislamiento social de 6 semanas donde los animales fueron evaluados a largo plazo, el efecto del aislamiento social sobre el aumento de consumo de alcohol se disipó con el tiempo (Butler et al., 2014). En función de estos resultados, y dado que uno de los objetivos de esta tesis consiste en analizar el estrés como un factor modulador del consumo de etanol con consecuencias a mediano/largo plazo, resultó necesario elegir otro estresor que cumpliera con estas condiciones, como se verá en el experimento que sigue.

## Experimento 2: Estrés temprano como promotor de consumo de etanol en adolescencia



El estrés temprano producto de la separación materna crónica e intermitente-180 o 360 min por día, todos los días entre el nacimiento y la segunda o tercera semana de vida (Meaney et al., 2002) induce modificaciones comportamentales (Gustafsson et al, 2006; Huot et al, 2001) y neurales en la progenie (Caldji et al., 2000; Meaney et al., 2002; Michaels & Holtzman, 2008), que permanecen en el tiempo. Además, se ha observado que los animales que sufrieron separación materna tienen una mayor vulnerabilidad al consumo de alcohol luego en la adultez (Huot et al., 2001). Hay pocos estudios que, en lugar de imponer una larga demora hasta la evaluación en adultez, han analizado los efectos la separación materna crónica durante la adolescencia (Spivey et al., 2008) y en nuestro conocimiento ninguno ha evaluado los efectos del estrés temprano mediado por separación materna sobre el consumo de alcohol durante la adolescencia.

Dado que el aislamiento social, como promotor del consumo de etanol, tuvo en el experimento anterior consecuencias a corto plazo (esto es, el aumento del consumo de etanol como producto del aislamiento social desapareció inmediatamente una vez que los animales fueron alojados de a pares), nos propusimos utilizar un estresor que tenga consecuencias más duraderas. Por lo tanto, el objetivo del experimento consistió en analizar si la separación materna diaria durante las dos primeras semanas de vida altera el consumo de alcohol durante la adolescencia y si estos cambios están asociados a cambios en los niveles de ansiedad (medidos mediante una prueba de luz/oscuridad) basales, o en los que se observan luego de la administración de alcohol.

En función de la literatura previa (e.g., Moffet et al., 2007), la hipótesis fue que los animales separados durante 180 min diarios presentarían una mayor reactividad en la prueba de ansiedad, así como mayor ingesta de etanol durante la adolescencia; y que la separación materna corta (15 min) funcionaría como protector frente al estresor que es la prueba. Se esperaba, además, que los efectos ansiogénicos de la separación materna de 180 min promuevan el consumo de etanol, mientras que la separación de 15 min disminuya el consumo de etanol con respecto a los controles, es decir, que ejerza un efecto protector.

#### *Materiales y métodos*

El presente experimento responde a un diseño factorial 3 [separación materna (control, MS15 o MS180; no separados, separados durante 15 min diarios o separados

durante 180 min diarios, respectivamente)] x 4 [tratamientos de etanol en adolescencia (NT, 0,0, 0,5 g/kg o 1,25 g/kg)] x 2 [sexo (machos o hembras)]. Se ralearon las camadas al DP 0, dejando 4 animales macho y 4 animales hembra. A partir del DP 1 al DP 14 inclusive, los animales fueron separados de su madre diariamente durante 15 min (grupo MS15) o 180 min (grupo MS180). La separación consistió en remover a la camada entera de la caja de alojamiento y colocarla en una caja limpia dividida a la mitad por un separador y sobre una almohadilla térmica a fines de controlar la temperatura; las cajas de separación eran limpiadas diariamente. El grupo control no fue manipulado, salvo por 2 cambios de caja semanales (grupo control bajo condiciones estándar de mantenimiento).

Una vez finalizado el tratamiento de estrés temprano (DP 14), los animales fueron tratados bajo condiciones estándar de alojamiento. El DP 28 se alojaron de a pares de acuerdo al sexo, su tratamiento de estrés temprano (animales de la misma camada) y en función de la dosis de alcohol que recibían el día de la evaluación de ansiedad.

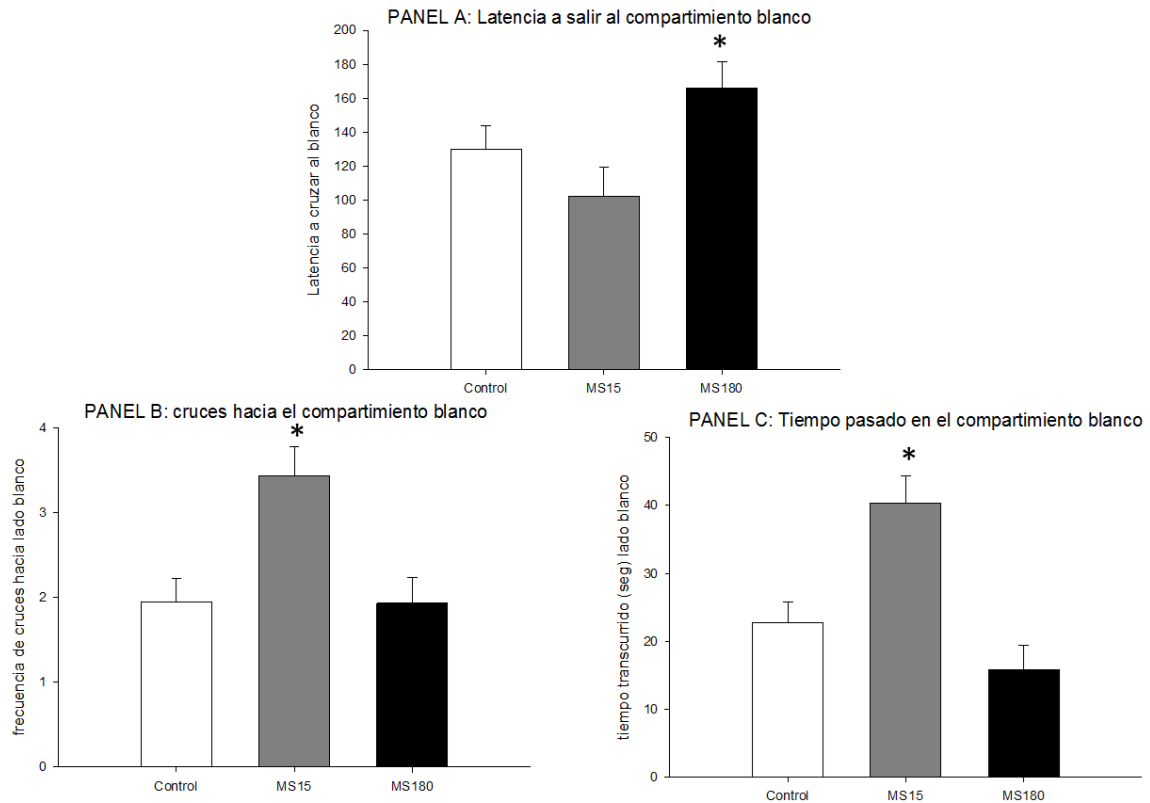
Al DP 33 los animales fueron administrados con 0,0, 0,5 o 1,25 g/kg de etanol; el grupo no tratado (NT) no fue manipulado. A los 5 min post-administración se colocó al animal en una caja de luz/oscuridad durante 5 min (véase sección de procedimientos generales). Cada animal fue colocado en el centro del compartimento oscuro al comenzar la evaluación. Se midieron tanto la latencia en pasar al compartimento blanco, como el tiempo en que permaneció en dicho compartimento, así como también, los cruces que realizaba hacia el lado blanco. El propósito de esta prueba, que se insertó entre el tratamiento de estrés y las pruebas de ingesta de alcohol, fue indagar la posibilidad que los animales MS180 hayan desarrollado ansiedad. Asimismo, la administración de alcohol previa a la prueba permitió evaluar sensibilidad a los efectos ansiolíticos del etanol, en todas las condiciones.

Para la evaluación de ingesta de alcohol se utilizó un esquema de ingesta intermitente. Siguiendo los parámetros utilizados en experimentos anteriores (Maldonado et al., 2008), los animales tuvieron acceso a una botella de 5.6% de etanol en una solución de 1% sacarosa vs agua los DPs 37, 39 y 41, durante 24 horas.

### *Resultados*

Contrariamente a nuestra expectativa, el etanol no indujo efectos ansiolíticos en la prueba de luz/oscuridad. No se observaron efectos significativos de la dosis de etanol, ni interacciones significativas entre ese factor y los restantes. El ANOVA factorial para la variable latencia en cruzar al compartimento blanco, arrojó un efecto principal de separación materna [ $F_{(2, 172)}=3,94, p<0,05$ ] (Figura 32, panel A). Análisis post-hoc indicaron que el grupo de separación de 180 min exhibía significativamente mayor latencia en cruzar hacia el compartimento blanco que el resto de los grupos. Este efecto indica que la separación materna prolongada induce alteraciones en el comportamiento que sugieren un fenotipo ansioso.

Un efecto principal de separación materna también se observó para las variables cruces hacia compartimento blanco [ $F_{(2, 174)}=7,18, p<0,01$ ] (Figura 32, panel B) y tiempo transcurrido en compartimento blanco [ $F_{(2, 174)}=11,47, p<0,01$ ] (Figura 32, panel C). En este caso, los análisis Post-hoc de Tukey indican que el grupo que experimentó 15 min de separación materna pasó significativamente más tiempo en el compartimento blanco e hizo más cruces entre compartimentos que el resto de los grupos. Esto concuerda con trabajos previos (e.g., Huot et al, 2001; Moffet et al, 2007), en los cuales se observa un efecto protector del tratamiento de separación materna de 15 min diarios, es decir, que los animales sometidos a este tratamiento suelen presentar menos indicios de ansiedad que los animales controles (véase Becker et al., 2011). Tampoco se observaron para esta variable, efectos de dosis de etanol, ni interacciones significativas entre ese factor y los restantes.



**Figura 32.** Valores medios y EEM de latencia (seg) a salir al compartimiento blanco (PANEL A), frecuencia de cruces (PANEL B) y tiempo transcurrido (PANEL C) en compartimiento blanco de animales adolescentes con separación materna prolongada (MS180), acotada (MS15) o que no sufrieron separación materna (DP 0-14). Los animales recibieron 0,0, 1,25 g/kg o fueron no tratados 5 min antes del test. Sin embargo, en este gráfico, se colapsaron los datos de los grupos mencionados, por no alcanzar significancia estadística. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre el grupo señalado y los restantes.

Los resultados de la prueba de ingesta se observan en la Figura 33. El ANOVA de medidas repetidas para la variable g/kg consumidos de etanol arrojó un efecto principal de separación materna [ $F_{(2, 165)}=3,47, p<0,05$ ] y un efecto principal de sesión [ $F_{(2, 330)}=3,03, p<0,05$ ] (Figura 24, panel A). Según indicó el análisis Post-Hoc de Tukey, el grupo que experimentó 180 min de separación materna diaria durante la infancia exhibió un consumo exacerbado de etanol, en relación al grupo control. En relación al porcentaje de preferencia, se observó un efecto principal de separación materna [ $F_{(2, 164)}=3,96, p<0,05$ ], y una interacción significativa entre este factor y sesión de ingesta [ $F_{(4, 328)}=3,04, p<0,05$ ] (figura 33, panel B). Según indican los análisis post-hoc de Tukey y comparaciones planeadas, el grupo MS180 exhibió mayor consumo de etanol que el control durante las Sesiones 1 y 2, pero no en la 3. Interessantemente, el grupo MS15 también consumió más etanol que el control no separado, pero durante las sesiones 2 y 3.

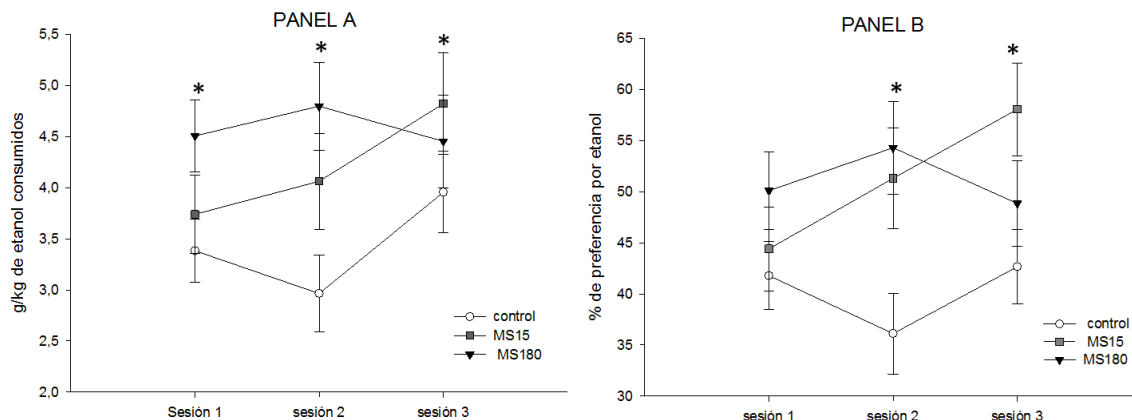
En cuanto al consumo de agua, se observó un efecto principal significativo de Sesión [ $F_{(2, 370)} = 3,15, p < 0,05$ ]. Sin embargo, el análisis post-hoc de Tukey no revela diferencias significativas entre las sesiones. Además, se observó una interacción significativa entre sesión y separación materna [ $F_{(4, 370)} = 4,32, p < 0,01$ ]. Mediante comparaciones planeadas, se observó que el grupo MS180 consumió menos agua que el control en la Sesión 2, mientras que el grupo MS15 consumió menos agua que el control y MS180 en la Sesión 3. Las medias y EEM de consumo de vehículo para el grupo MS180 son  $9,94 \pm 0,73$ ,  $8,18 \pm 0,83$  y  $10,26 \pm 0,81$ ; para el grupo MS15 las medias y EEM son  $10,28 \pm 0,78$ ,  $8,59 \pm 0,89$  y  $7,26 \pm 0,87$ ; y para el grupo control son  $10,20 \pm 0,63$ ,  $10,66 \pm 0,72$  y  $10,05 \pm 0,71$ . Los resultados en cuanto al consumo de agua durante las sesiones de ingesta, parecen reflejar lo sucedido para el consumo de etanol, donde los grupos que más consumieron etanol son quienes consumen menos agua. Esto implica que los resultados observados en este experimento no pueden explicarse por un efecto de polidipsia.

Trabajos previos (e.g. Huot et al, 2001; Daoura et al, 2011; Romano-López et al, 2012) han reportado un menor peso en animales expuestos a separación materna que en controles. En el presente trabajo se realizó un ANOVA de medidas repetidas para la variable peso durante las 3 sesiones de ingesta (variable independiente separación materna). El mismo arrojó efectos significativos de sesión [ $F_{(2, 386)} = 583,71, p < 0,01$ ] y un efecto interactivo entre sesión y separación materna [ $F_{(4, 386)} = 2,90, p < 0,05$ ]. Las comparaciones a posteriori indicaron un aumento progresivo del peso corporal a lo largo de las 3 sesiones (las tres sesiones difieren significativamente entre sí), pero los grupos separados no difieren del control en ninguna de las sesiones, según el análisis de comparaciones planeadas.

El hallazgo más importante del presente experimento es que tres horas diarias de separación materna durante las dos primeras semanas de vida promovieron el consumo de etanol durante la adolescencia. Esto concuerda con el trabajo de Huot y colaboradores (2001), en el cual animales adultos sometidos a separación materna durante las dos semanas de vida mostraron mayor consumo de etanol. En un trabajo más reciente, Romano-López y colaboradores (2012) observaron que animales sujetos a 3 h de separación materna durante las dos primeras semanas de vida y sometidos a un régimen de consumo forzado y, luego, voluntario de etanol durante la adultez mostraron mayor

consumo de esta droga en ambas fases. En otro trabajo, quizás más relevante, se reportó mayor consumo de etanol tanto en adolescencia como adultez en animales sometidos a separación materna durante 360 min las dos primeras semanas de vida (Daoura et al, 2011). Este aumento del consumo de etanol como producto de separación materna prolongada también se ha observado en ratones (Cruz et al, 2008).

Si bien se ha reportado que la separación materna de 15 min diarios durante las dos primeras semanas de vida ejerce efectos protectores en relación al consumo de etanol (Huot et al, 2001; Ploj et al., 2003), en este trabajo ambos tratamientos de separación materna (15 o 180 min) aumentaron el consumo de etanol. No obstante, resultados similares a los nuestros también han sido reportados (Daoura et al., 2011), donde tanto 6 h como 15 min aumentaron el consumo de etanol en adolescentes y adultos. Gustafsson y colaboradores (2006), también observaron un incremento en la preferencia por el etanol a lo largo del tiempo en animales sujetos a separación prolongada (360 min) como a separación acotada (15 min).



**Figura 33.** Consumo de etanol en términos absolutos (PANEL A) y porcentaje de preferencia (PANEL B) en animales adolescentes que fueron sujetos a separación materna durante las dos primeras semanas de vida, ya sea 15 min diarios (MS15), 3h (MS180) o controles y que habían recibido 0,0, 1,25 g/kg o no fueron tratados con el DP33. Los grupos administrados, o no, con etanol fueron colapsados en este gráfico por falta de significancia estadística para ese factor. Los puntos representan las medias y las barras los EEM. Los asteriscos indican efectos significativos (véase experimento 3 para más detalles).

El efecto protector de la separación materna por períodos cortos (i.e. MS15) pudo observarse, en cambio, en relación a las conductas de ansiedad evaluadas en la prueba luz/oscuridad. Estos animales pasan más tiempo en el compartimento blanco, así como

también despliegan mayor cantidad de cruces hacia este compartimento y una menor latencia en explorarlo, aún que los controles. Lo opuesto se observa en el grupo de animales sujeto a separación materna prolongada (180min).

En definitiva, hemos observado en este experimento que la separación materna durante el período infantil genera fenotipos comportamentales menos (efecto protector de 15 min diarios de separación) o más ansiosos (efecto ansiogénico de 180 min diarios de separación). Sin embargo, es interesante notar que ambos estresores promovieron el consumo de etanol durante la adolescencia. En otras palabras, una implicancia importante de este experimento es la disociación entre patrones de ansiedad y preferencia por la droga. Es probable que diferentes mecanismos sean los responsables por la inducción de consumo en los animales MS180 y MS15.

### **Experimento 3: El estrés por inmovilización promueve el consumo de etanol en adolescentes y no en adultos**

En los experimentos anteriores, se ha observado que el estrés social generado a partir de la imposibilidad de acceder a la interacción con un congénere o por la separación materna durante la infancia promueve el consumo de etanol durante la adolescencia. En esta ocasión, se realizó una comparación ontogenética (i.e., adultos vs. adolescentes) en relación a vulnerabilidad al estrés, empleando un estresor más potente e inescapable, tal es la inmovilización.

Existe evidencia que el estrés por inmovilización aumenta el consumo de etanol en ratas Wistar adultas (e.g., Lynch & Carroll., 1999; Ploj et al., 2003; Roman et al., 2004; Gomez et al., 2012). En cuanto a las diferencias ontogenéticas, se ha observado que una inyección i.p. de etanol es capaz de revertir la ansiedad social producida por la exposición a 90 min en adolescentes pero no en adultos (Varlinskaya & Spear, 2012). Este estresor (90 min de estrés por inmovilización), sin embargo, no alteró la locomoción inducida por etanol ni la sedación inducida por la droga en adolescentes o adultos (Acevedo et al., 2013). En cambio, la inmovilización repetida exacerba diferencias en respuesta al alcohol entre edades (Varlinskaya et al, 2013).

El objetivo del presente experimento consistió en indagar si este estresor predispone al consumo de alcohol de manera diferencial en adolescentes y adultos. Otro objetivo adicional fue indagar si el estresor también afectaba la sensibilidad, y si lo hacía de forma diferencial en adultos y adolescentes, a los efectos estimulantes motores del etanol, los cuales se consideran como un indicador de los efectos motivacionales reforzantes del etanol.

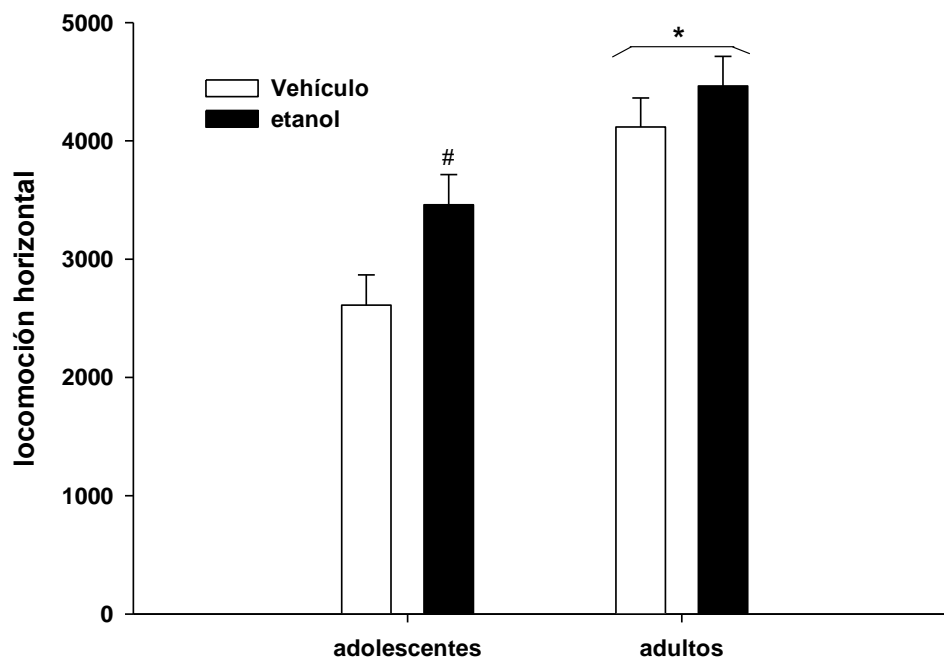
#### Materiales y Métodos

Se llevó a cabo un diseño factorial 2 [edad (adolescentes o adultos)] x 2 [estrés (inmovilización o control)] x 2 [dosis de etanol (0,0 o 2,5 g/kg)]. Se utilizaron 46 ratas Wistar adolescentes (DP 30) y 44 adultos (DP 70) machos provenientes del bioterio del INIMEC-CONICET. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de alojamiento hasta el inicio del experimento. A partir del DP 28 (adolescentes) o 73 (adultos) los animales fueron sometidos a un estresor físico (restricción del movimiento): 5 sesiones diarias de 90 min donde el animal era inmovilizado en un tubo de PVC acorde con su tamaño. Cuatro horas después de la última inmovilización, los animales recibieron una dosis de 2,5 g/kg i.g. de etanol (grupo etanol), vehículo (grupo agua). A los 5 min post-administración, fueron evaluados en una caja de medición de actividad, equipada con sensores que permiten medir la distancia recorrida (cm) durante 10 min (ITCOMM, Córdoba). El objetivo de este test fue evaluar sensibilidad al efecto psicomotor del etanol. Setenta y dos horas después del último episodio de inmovilización, y de manera diaria durante 4 días, los animales fueron evaluados en una prueba de ingesta de doble botella. Durante cada sesión diaria de 2 horas, los adolescentes tuvieron acceso simultáneo a agua y una solución de etanol (3% en la primera sesión, incrementándose en 1% por día hasta alcanzar 6%; véase Capítulo 1 y 2; Experimento 1 de Capítulo 2).

#### Resultados



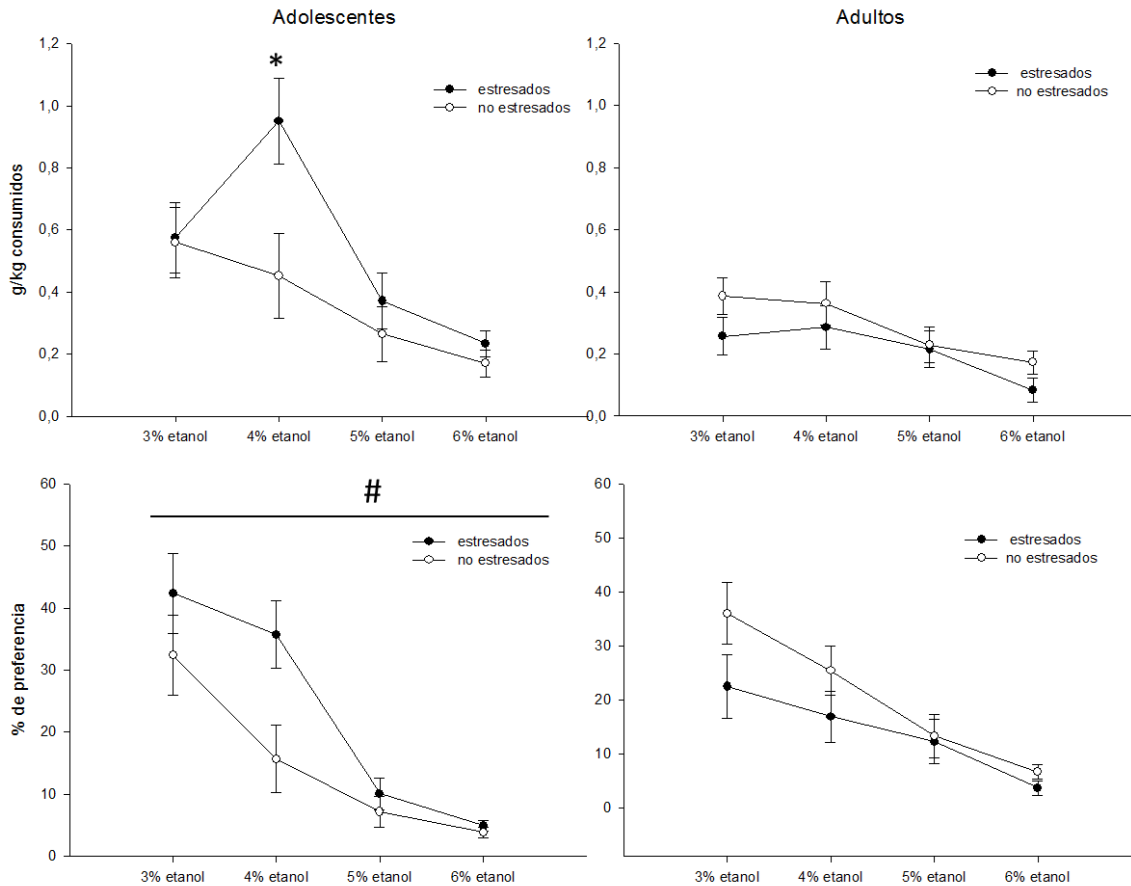
Para la prueba de actividad locomotora, se realizó un ANOVA factorial tomando como variables independientes la edad, el estrés y las dosis; como variable dependiente, se tomó la distancia recorrida (cm). Se observó que los animales adultos demostraron mayor actividad locomotora que los adolescentes, independientemente de la dosis de etanol recibida y del estrés [ $F_{(1, 83)}=24,75$ ,  $p<0,01$ ]. Dada esta diferencia basal entre adolescentes y adultos, se decidió analizar los resultados de cada edad por separado. Teniendo en cuenta esta estrategia de análisis, se observa que el incremento en la actividad locomotora inducida por etanol ocurre sólo en los adolescentes [ $F_{(1, 40)}=9,39$ ,  $p<0,01$  (adultos:  $F_{(1, 43)}=5,86$ ,  $p> 0,05$ ; Figura 34)].



**Figura 34.** Actividad locomotora (cm) de adolescentes (izquierda) y adultos (derecha) luego de una dosis de 2,5 g/kg (i.g.) o vehículo. Las barras representan las medias y EEM. El asterisco (\*) indica un efecto principal de edad, en el sentido de que los adultos presentan un incremento significativo en la actividad locomotora con respecto a los adolescentes. El numeral (#) indica diferencias significativas entre adolescentes administrados con etanol y sus controles.

Para la prueba de ingesta se realizó un ANOVA de medidas repetidas para cada variable dependiente (g/kg consumidos, porcentaje de preferencia y consumo total de fluidos), tomando como variables independientes la edad, tratamiento de estrés y dosis recibida durante la prueba de actividad motora; y como variables intrasujeto, las sesiones de ingesta. De manera similar a lo observado para actividad motora, este ANOVA ómnibus indicó diferencias estadísticamente significativas entre adolescentes y adultos para g/kg [ $F$

(1, 83)=13,77,  $p<0,01$ ], en el sentido que los adultos toman basalmente menos cantidad de etanol que los adolescentes. Así entonces, se realizaron ANOVAS de medidas repetidas por separado para cada edad y cada una de las variables dependientes (g/kg, porcentaje de preferencia y consumo total de fluidos).



**Figura 35.** Consumo de etanol de animales adolescentes (Panel izquierdo) y adultos (panel derecho) sometidos a 5 sesiones de 90 min de estrés por inmovilización (grupo estresados) o fueron manipulados normalmente (grupo no estresados). En este gráfico se encuentran colapsadas las medias de los grupos administrados con etanol o vehículo durante la prueba de actividad locomotora, ya que este factor no ejerció efectos significativos sobre la ingesta. En la sección superior se observa el consumo de etanol en términos de gramos por kilogramos (g/kg) consumidos y en el panel inferior, en términos de porcentaje de preferencia por el etanol. Los animales fueron evaluados en una prueba de doble botella durante 4 sesiones (2h x sesión) donde (véase métodos). Los puntos denotan las medias y las barras los EEM. El asterisco (\*) indica diferencia significativa entre los adolescentes estresados y los no estresados en la sesión 2. El numeral (#) indica un efecto principal de estrés para % de preferencia.

El ANOVA para g/kg consumidos de etanol para los adolescentes, reveló un efecto principal significativo de sesión [ $F_{(3,120)} = 13,58$ ,  $p<0,05$ ] y una interacción significativa entre sesión y estrés [ $F_{(3,120)} = 3,21$ ,  $p <0,05$ ]. Como se observa en la Figura 35 (panel superior izquierdo) y lo confirman los análisis de comparaciones planeadas, los adolescentes estresados consumieron significativamente más etanol absoluto que sus controles no estresados en el segundo día de evaluación. El análisis para porcentaje de preferencia

(Figura 35, panel inferior izquierdo) indicó efectos principal de sesión [ $F_{(3,120)}= 28,93$ ,  $p<0,01$ ] y de estrés [ $F_{(1,40)}= 4,74$ ,  $p <0,05$ ]. Análisis post-hoc indicaron que los adolescentes estresados prefirieron más el etanol que los no estresados y que, para todos los grupos, la preferencia decrecía a medida que la concentración de etanol aumentaba. La administración de etanol previa a la prueba de actividad motora no ejerció un efecto significativo principal sobre el consumo de alcohol en adolescentes, ni participó de ninguna interacción significativa. El consumo total de fluidos no presentó diferencias estadísticamente significativas en relación al estrés ni a la administración de etanol o vehículo. Se observó un efecto principal de sesión [ $F_{(3, 90)}=11,98$ ,  $p<0,01$ ], que indicó un menor consumo de fluidos en la primer sesión con respecto a las subsiguientes (análisis post-hoc de Tukey,  $p<0,05$ ).

Los resultados para el consumo de etanol en animales adultos difirieron notablemente de lo observado en adolescentes (Figura 35, panel derecho). Específicamente, el estrés no ejerció efectos significativos principales sobre el consumo de etanol, ni participó de ninguna interacción significativa. El ANOVA de medidas repetidas para g/kg indicó un efecto principal significativo de sesión [ $F_{(3,129)}=5,99$ ,  $p<0,01$ ] y un efecto interactivo de sesión x dosis de etanol [ $F_{(3,129)}= 3,64$ ,  $p<0,01$ ]. Análisis de comparaciones planeadas indicaron que los animales tratados con 2,5 g/kg de etanol durante la evaluación de actividad locomotora consumieron menos etanol que los controles. Las medias y EEM para el consumo de etanol a lo largo de las sesiones fueron  $0,29 \pm 0,06$ ,  $0,43 \pm 0,09$ ,  $0,15 \pm 0,05$  y  $0,17 \pm 0,05$  para los animales que recibieron vehículo; y  $0,35 \pm 0,06$ ,  $0,22 \pm 0,04$ ,  $0,28 \pm 0,07$  y  $0,09 \pm 0,02$  para animales que recibieron alcohol (2,5 g/kg) durante la sesión de actividad locomotora. Se observó un efecto cercano a la significación estadística entre el factor sesión y estrés para porcentaje de preferencia [ $F_{(1,43)}=3,34$ ,  $p=0,075$ ], que sugería una menor preferencia de 3 y 4% de alcohol en los adultos estresados. El ANOVA para consumo total de fluidos indicó un efecto significativo de sesión [ $F_{(3, 108)}=3,09$ ,  $p<0,05$ ]. Los análisis post-hoc indicaron un mayor consumo en la sesión 4.

En este experimento se pudo observar que los adolescentes son más sensibles a los efectos activadores de etanol, si bien los adultos parecen tener una mayor tasa de actividad locomotora basal. Además, los adolescentes consumen mayor cantidad de etanol que los adultos y, quizás el resultado más importante del experimento, son más propensos a

consumir etanol cuando son expuestos a situaciones estresantes. Estos resultados son consistentes con trabajos previos que indican interacciones estrés x alcohol, específicas para adolescentes. Por ejemplo, Varlinskaya y colaboradores (2010) han indicado que los efectos en la interacción social producto del estrés inducido por inmovilización son revertidos en adolescentes pero no en adultos cuando son expuestos a etanol.

## *Conclusiones Generales y Discusión del Capítulo*

En el presente capítulo se han mostrado resultados que indican que diferentes estresores –sociales y físicos- promueven el consumo de etanol en la adolescencia. Más interesantemente, las consecuencias de, al menos algunos de estos estresores, sobre el consumo de alcohol parecen ser más importantes durante la adolescencia que en la adultez (véase Experimento 3).

En el primer experimento se observó que un breve período de aislamiento social es suficiente para promover el consumo de etanol en adolescentes. La relevancia de estos resultados radica en que la mayoría de los estudios que observaron el efecto del aislamiento social sobre el consumo de etanol utilizaron exposiciones prolongadas a este estresor, llegando a mantener en aislamiento a los animales desde el período de destete hasta la temprana adultez (e.g. Lopez et al., 2011; Pisu et al., 2011; Butler et al., 2014) lo que, por otro lado, implica que la evaluación de los efectos de este estresor se realizó durante la adultez. Además, los animales suelen ser evaluados en pruebas de doble botella con sesiones de 24 h, donde los animales permanecen aislados durante toda la evaluación (que suele durar varios días). Por lo tanto, en esos trabajos se analizan los efectos de aislamiento prolongado antes y durante el consumo de etanol, no pudiéndose discriminar los efectos agudos y crónicos de este estresor. Hemos observado en el Experimento 1 que, una vez que se deja de experimentar el aislamiento social, este estresor no es suficiente para promover el consumo de etanol en adolescentes, y que el efecto del aislamiento crónico no es equiparable al del efecto agudo. Se conoce que las consecuencias del aislamiento social sobre el comportamiento social (Lugo et al., 2003; Vanderschuren et al., 1995; Varlinskaya, Spear, & Spear, 1999), y el eje HHA (e.g. Hellemans et al., 2004; Butler et al., 2014) perduran a largo plazo. En el estudio de Butler et al. (2014), por ejemplo, los animales fueron sujetos a 6 semanas de aislamiento social; por lo tanto, quizás sea necesario que los animales adolescentes sean expuestos a más días de aislamiento social para que se observen los efectos de este estresor sobre el consumo étílico, una vez que ha dejado de experimentarse.

Debido a la relativa debilidad y poca persistencia del efecto facilitador del aislamiento sobre el consumo, en el experimento subsiguiente modificamos la naturaleza

del estresor, si bien continuamos aplicando estresores de naturaleza social. La separación materna por 180 min diarios durante las dos primeras semanas de vida ejerció efectos ansiogénicos a nivel comportamental y, más importante aún, aumentó el consumo de etanol durante la adolescencia. Tal como se discutió en el Experimento 2 de este capítulo, nuestros resultados concuerdan con antecedentes de mayor consumo producto de la separación materna en ratas (e.g. Huot et al., 2001; Daoura et al., 2011) y ratones (Cruz et al, 2008). Sin embargo, este estresor es muy sensible a cambios procedimentales (e.g. manipulación de las crías, condiciones de alojamiento), y cada modelo de separación materna puede generar resultados algo diferentes entre sí (Nylander & Roman, 2013).

Dadas las dificultades encontradas con los estresores sociales a la hora de establecer un efecto robusto de los mismos sobre el consumo de etanol, se decidió optar por un estresor físico inescapable, como es el estrés por inmovilización. En concordancia con otros estudios en animales adultos, (e.g. Siegmund et al., 2005; Gómez et al, 2012), se observó que 5 sesiones de estrés por inmovilización aumentó el consumo de etanol en adolescentes. Un dato muy importante fue que este efecto facilitador del estrés no se observó en los adultos. También observamos que el adolescente, pero no el adulto, parece ser sensible al efecto estimulante motor del etanol, y que esta consecuencia de la droga no se afecta en ninguna de las edades por la exposición al estrés por inmovilización. Nuestros resultados están en línea con otras investigaciones acerca de las diferencias ontogenéticas entre adolescentes y adultos en relación a los efectos del estrés y la sensibilidad al etanol (Véase Spear & Varlinskaya, 2010).

En resumen, en este capítulo observamos que el adolescente es sensible al efecto facilitador de diversos estresores, tanto estresores sociales como el estrés por inmovilización, sobre el consumo de alcohol. Los resultados del último experimento indican que esta sensibilidad puede ser específica del adolescente, no del adulto.

## *Discusión General*

A lo largo del presente trabajo, hemos observado que la adolescencia es un período donde la exposición a alcohol o estrés aumenta la vulnerabilidad a desarrollar consumo elevado de alcohol, en mayor medida que cuando estos eventos ocurren en la adultez, y que la exposición al alcohol en útero aumenta aún más esta predisposición, aparentemente debido a alteraciones en áreas cerebrales ligadas a la extinción de aprendizajes asociativos y al procesamiento motivacional del alcohol.

Como observáramos en el Capítulo 1, la iniciación al etanol –entendida como exposición pasiva a dosis tipo “binge”- durante la temprana adolescencia aumentó el consumo de etanol, evaluado este aún durante la adolescencia y luego de un período de privación de acceso a la droga. El mismo tipo de tratamiento, pero aplicado en la adultez, fue totalmente ineficaz para alterar el consumo de etanol. De hecho, en el Experimento 3 del Capítulo 3 observamos que la administración i.g. de etanol a adultos indujo un consumo significativamente menor de alcohol en pruebas de doble botella, en comparación con pares de la misma edad tratados con vehículo. Estos resultados resaltan las diferencias en la sensibilidad al etanol entre adolescentes y adultos consistentes con trabajos previos (véase Pautassi et al., 2009; Spear & Varlinskaya, 2010). Este patrón de respuesta pondría a los adolescentes a riesgo de escalar en consumo problemático de alcohol y cimientan la noción que debe retrasarse el inicio al consumo de alcohol en menores, lo máximo posible.

Propusimos varias explicaciones para este efecto. El mismo puede deberse a que la exposición temprana a la droga altera el patrón normal de desarrollo de ciertos sistemas de neurotransmisión, generando disrupciones cognitivo-comportamentales que predispondrían a consumir más etanol. Algunos estudios apoyan esta posibilidad. Se ha observado que la exposición crónica-intermitente (i.e. 10 administraciones día de por medio) durante la adolescencia altera el nivel basal de dopamina en el núcleo accumbens e induce una desregulación hacia abajo de los receptores dopaminérgicos y glutamatérgicos en corteza prefrontal, un indicador de menor actividad en dicha área (Pascual et al., 2009). Los receptores dopaminérgicos, que modulan el aprendizaje apetitivo inducido por etanol, alcanzan su pico al DP28 y, luego, comienzan a declinar

significativamente (Tarazzi & Baldessarini, 2000). Es también posible que la percepción del olor y sabor del alcohol, excretado no metabólicamente luego de la administración en sudor y orina, haya aumentado el consumo simplemente por mecanismos de familiaridad (véase Molina & Chotro, 1989; Abate et al 2008). Es importante mencionar que si bien se han encontrado evidencias en los dos primeros experimentos (Capítulo 1) de que el consumo de etanol aumenta luego de una breve exposición en la adolescencia, no se ha podido contestar si la iniciación al etanol durante la adolescencia genera efectos que perduren a largo plazo. Al respecto, se necesitaría realizar evaluaciones de ingesta más extensas para observar si el efecto perdura hasta la adultez, por ejemplo, hasta el día 120 de vida de la rata.

Por otro lado, sería necesario profundizar algunos mecanismos subyacentes a este fenómeno, como por ejemplo, la actividad neural en áreas del circuito de recompensa mesocorticolímbico en adolescentes expuestos a etanol. Al respecto, se sabe que la exposición crónica a drogas de abuso regula cambios neurobiológicos en factores de transcripción, acumulación de delta Fos B y cambios en el ciclo de CREB, entre otros (Nestler et al., 2013). Nestler y colaboradores postulan que estos cambios a nivel celular/molecular como producto de la exposición a las drogas son los responsables, al menos en parte, de que se genere adicción. Al respecto, se ha observado una hipoactivación neural como producto de la exposición crónica a cocaína en núcleo accumbens (Heller et al., 2014). Además, existen antecedentes que sugieren cambios epigenéticos como producto de la administración de etanol durante la adolescencia. Sakharkar y colaboradores (2014) observaron que, con sólo 2 administraciones de 2,0 o 2,5 g/kg de etanol durante la adolescencia, se encontró una inhibición en la actividad de histona deacetilasas y metiltransferasas de ADN en el núcleo de la estría terminalis de la amígdala; esta inhibición correlaciona, a su vez con mayor ansiólisis en estos animales como producto de la administración de etanol. Los autores interpretan esta inhibición de la actividad de estas enzimas como un correlato epigenético de la sensibilidad a los efectos ansiolíticos de etanol. En un estudio más relacionado a la temática de esta tesis, se encontró que 7 administraciones intermitentes (i.e. cada 48 horas) durante la adolescencia generaron no sólo una regulación hacia abajo de ARNm de receptores dopaminérgicos y glutamatérgicos, sino que además, este tratamiento generó cambios en la acetilación de



histonas H3 y H4 en corteza prefrontal, núcleo accumbens y estriado (Pascual et al., 2009). Estos estudios sugieren que la exposición a etanol durante la adolescencia genera cambios epigenéticos y neurofisiológicos que predispondrían al adolescente a consumir más etanol y desarrollar problemas con la droga. Por lo tanto, sería de interés analizar mecanismos de plasticidad subyacentes a la administración intermitente crónica y acotada que en el presente trabajo resultó efectiva para aumentar el consumo posterior (i.e. 2 o 5 administraciones de etanol cada 48 h; véase Capítulo 1), así como la acumulación de  $\Delta$ -Fos-B en estos animales.  $\Delta$ -Fos-B es un gen de expresión temprana, que se acumula como producto de la administración repetida de drogas estimulantes y opiáceas, y es un correlato de la sensibilización o tolerancia frente a estas drogas (Nestler et al., 2013). Más específicamente, en tanto que c-Fos se desestabiliza rápidamente, su forma truncada  $\Delta$ -Fos-B se acumula en función de la exposición repetida a drogas y persiste durante semanas (Nestler, 2008). Es aún desconocida la inducción de  $\Delta$ -Fos-B por ingesta crónica de alcohol durante la adolescencia. Otra posible aproximación, sería analizar posibles mecanismos epigenéticos en los adolescentes iniciados al alcohol, como por ejemplo, metilación de ADN o análisis de regulación de AMPcíclico en núcleo accumbens.

No sólo hemos observado que la iniciación pasiva al alcohol durante la adolescencia promueve el consumo de etanol, sino que exposiciones aún más tempranas en el desarrollo promovieron la ingesta de etanol en la adolescencia y generaron cambios duraderos y significativos en el circuito mesocorticolímbico. En el Capítulo 2 se analizó cómo la exposición al etanol durante la gestación tardía promueve el consumo de etanol en la adolescencia. Una breve exposición al etanol durante los días gestacionales 17 a 20 (2,0 g/kg de etanol diarios) aumentó significativamente el consumo de etanol durante toda la adolescencia. Estos resultados concuerdan con el aumento en la preferencia por etanol observada en infantes que habían sido expuestos a la droga de manera similar a la aquí utilizada (e.g., Abate et al., 2008; Chotro et al., 2007). También existe evidencia de que la exposición prenatal promueve el consumo de etanol en ratas adolescentes (Arias et al., 2003; Díaz-Cenzano & Chotro, 2010), pero en ninguno de estos trabajos se ha analizado, como es el caso en esta tesis doctoral, el consumo y preferencia por alcohol durante toda la etapa adolescente y hasta casi la adultez temprana.

Si bien cabe la posibilidad de que la exposición a dosis altas de etanol en útero ejerzan efectos teratológicos; es poco probable que la dosis utilizada en el presente trabajo (2,0 g/kg) genere consecuencias teratológicas severas. No hubo diferencias de peso entre los diferentes tratamientos prenatales en ninguno de los experimentos realizados y, además, como ya se ha reseñado en la discusión del Capítulo 2, estudios previos indicaron que la administración prenatal de 2,0 g/kg de etanol durante los días gestacionales 17 a 20, no generó alteraciones teratológicas severas (e.g. Domínguez et al, 1996; Abate et al, 2000, Pueta et al., 2011). Tampoco se ha observado que la exposición prenatal aquí utilizada genere cambios en el metabolismo de la droga (Experimento 5, Capítulo 2). Por lo tanto, la predisposición al consumo de etanol observada en los adolescentes que habían sido expuestos a etanol en útero no parece ser producto de consecuencias teratológicas graves de la droga. Más importante aún, estas dosis moderadas son suficientes para promover el consumo exacerbado de esta droga en una etapa en la cual –como se ha discutido- el organismo es más vulnerable a desarrollar problemas de uso y abuso de etanol (véase Introducción general).

Cuando los adolescentes expuestos, o no, a etanol en útero fueron evaluados en términos de patrones de reactividad emocional y respuesta de locomoción frente a etanol (Capítulo 2, Experimento 3), no se observaron diferencias en dichas variables, que pudieran explicar el consumo exacerbado, expresado por los adolescentes expuestos a etanol durante la gestación tardía. Si bien existe evidencia de que la exposición prenatal a etanol aumenta la locomoción basal en adultos (Kim et al., 2013; Brys et al., 2014; Carneiro et al, 2005) e infantes (Arias et al, 2008), en los adolescentes no encontramos este efecto. Quizás la hiperactividad propia del adolescente (Doremus et al., 2012) puede haber oscurecido las diferencias ligadas a la exposición prenatal.

La exposición prenatal a etanol parece ejercer efectos a largo plazo en el sistema mesocorticolímbico, los cuales podrían contribuir a explicar los efectos que, a nivel de aprendizaje y consumo de etanol, hemos observado en nuestras ratas adolescentes a lo largo del Capítulo 2. Los cuerpos de las neuronas dopaminérgicas del circuito de recompensa (i.e. circuito mesocorticolímbico) se encuentran en el área tegmental ventral, proyectando a núcleo accumbens y, de allí a corteza prefrontal (véase Nestler et al., 2013). Asimismo, muchos autores, entre ellos Rinaldi (2014) han postulado que la activación

dopaminérgica en ATV cumple un papel crucial en el establecimiento de conductas de búsqueda de reforzadores. Rinaldi (2014) propone que un estímulo condicionado se establece como tal gracias a que activa neuronas dopaminérgicas en esta área. El área tegmental ventral, por lo tanto, es clave en el circuito de recompensa y la estimulación en esta área puede ser considerada como reforzante (véase Arias-Carrión et al, 2014). Se ha observado que el etanol, a dosis de 2,0 g/kg i.p., produjo un disparo de neuronas dopaminérgicas en ratones adultos despiertos (técnica de electrofisiología en vivo); más aún, no sólo el etanol aumentó la actividad de neuronas dopaminérgicas en ATV, sino que además disminuyó la actividad de neuronas GABAérgicas inhibitorias en Nacc (Burkhardt & Adermark, 2014). En ese sentido, cuando se potenció la inhibición dopaminérgica de GABA mediante una inyección intra-ATV de muscimol –agonista GABAérgico- se redujo la autoadministración de cocaína (Lee et al., 2007), lo que sugiere que la desinhibición dopaminérgica por parte de GABA participa en el reforzamiento mediado por drogas de abuso. En ese sentido, que el etanol disminuya el tono GABAérgico en ATV y, a su vez, dispare la actividad dopaminérgica podría ser uno de los mecanismos neurobiológicos que median la capacidad reforzante de esta droga.

La literatura previa, discutida en el párrafo anterior, cobra valor cuando consideramos que la exposición prenatal a etanol -por tratarse de un período sensible del desarrollo de SNC- podría alterar la actividad basal en esta área, así como también la reactividad dopaminérgica en ATV frente a etanol. Los resultados del Experimento 6 (Capítulo 2) van en línea con este razonamiento. Los animales expuestos a 2,0 g/kg de etanol durante los DGs 17-20 presentaron mayor activación dopaminérgica inducida por etanol que los controles no expuestos. Este hallazgo, podría explicar la elevada preferencia por la droga de estos animales observada en los Experimentos 1 y 2 (capítulo 2). Dado que el alcohol produce una mayor activación en ATV en adolescentes expuestos a etanol, es posible que éstos exhiban mayor sensibilidad al efecto reforzante de la droga y que por ello consuman mayores cantidades de alcohol. A diferencia de otros estudios que encontraron hipoactivación dopaminérgica basal en adultos expuestos a etanol prenatal (e.g. Sobrian et al., 2005; Naseer et al., 2014; Choong et al., 2004; Carneiro et al., 2005), nuestros adolescentes expuestos a etanol durante la gestación no presentaron diferencias basales en activación dopaminérgica con respecto a los controles no tratados. De todas maneras,

nuestros resultados concuerdan con el modelo propuesto por Leyton y Vezina (2014), quienes postulan que la activación dopaminérgica en sujetos que han experimentado con cierta droga dependería de la presencia o ausencia de estímulos asociados a dicha droga. Es decir, los animales con una historia de exposición a alcohol exhibirían mayor activación dopaminérgica sólo en presencia de un estímulo asociado al alcohol; en ausencia de etanol, podrían exhibir hipoactivación dopaminérgica. En cuanto a los resultados que observamos, los animales PE no poseían hipoactivación dopaminérgica en ATV en ausencia de etanol, pero en cambio exhibían una hiperactivación en presencia de la droga, la cual obviamente trae aparejada la exposición a estímulos asociados a la intoxicación, como el olor del alcohol excretado no metabólicamente o el contexto interno característico de la transición de sobrio a intoxicado (Fernández-Vidal et al., 2003). Cabe destacar, sin embargo, que el modelo propuesto por Leyton y Vezina alude a organismos adictos, que no es el caso de nuestro trabajo.

Los adolescentes expuestos a vehículo durante la gestación tardía exhibieron una menor activación dopaminérgica basal en ATV que sus pares no tratados. Estos resultados sugieren que la manipulación prenatal (e.g., sujeción) sufrida por estos animales durante las administraciones i.g. pueden ser un evento estresante, que afecte la actividad dopaminérgica en ATV. Los resultados observados en el Experimento 6 tienen algunas similitudes con los derivados de un modelo de estrés prenatal por inmovilización (i.e. 45 min 3 veces al día durante la última semana de gestación). La progenie de estas madres estresadas exhibió, una vez adultos, menor activación dopaminérgica espontánea en ATV, la cuál era revertida por la administración de anfetamina (Hausknecht et al., 2013). Posiblemente, estas alteraciones basales que observamos en ATV estén en línea con estos hallazgos. En ese sentido, tal como se discutiera en el Capítulo 2, se ha observado que el estrés prenatal genera alteraciones a largo plazo en el eje HHA (e.g. Abe et al., 2007; Green et al., 2011; Xu et al., 2014). Futuros experimentos utilizando controles no tratados podrían explorar diferencias en eje HHA, así como niveles de corticosterona en adolescentes expuestos a etanol en útero.

Otro resultado importante fue el observado tras medir activación de c-Fos en AcSh: el etanol prenatal indujo un corrimiento hacia la derecha de la curva dosis-respuesta, en términos de actividad inducida por etanol. Los animales PE necesitaron una dosis mayor de

etanol que los PNT (2,5 vs 1,25 g/kg etanol, respectivamente) para exhibir actividad neural inducida por etanol. Los PV, en tanto, fueron insensibles a los efectos del etanol, otro resultado que sugiere que las manipulaciones necesarias para administrar etanol prenatalmente no son inocuas, sino que alteran el patrón normal de respuesta –en este caso neural– a la droga. Es interesante correlacionar lo observado en el Experimento 6, a nivel de activación neural, con el estudio de Pautassi y colaboradores (2012). En este último se midió condicionamiento de preferencia al lugar inducido por etanol (0,5, 1,0 o 2,0 g/kg) en animales no tratados prenatalmente o en animales expuestos a etanol en útero (PE, 2,0 g/kg, DGs 17-20). Los animales controles exhibieron condicionamiento de preferencia al lugar tras recibir 0,5 g/kg, pero no tras recibir 1,0 o 2,0 g/kg, etanol. Contrariamente, los animales PE exhibieron condicionamiento de preferencia al lugar luego de recibir 1,0 o 2,0 g/kg, pero no después de recibir 0,5 g/kg, etanol. Es decir, se observan respuestas similares inducidas por el etanol prenatal, tanto a nivel neural como comportamental: el corrimiento de la curva dosis-respuesta frente al desafío postnatal con alcohol. Esto puede tener importantes implicancias. Por ejemplo, puede postularse que quizás los animales PE necesiten consumir mayores cantidades de etanol para sentir los mismos efectos reforzantes que los animales no expuestos a etanol en útero. Esta idea se basa en que la inhibición farmacológica de AcSh aumenta la conducta de búsqueda y consumo de estímulos gustativos (Arias-Carrión et al, 2014). Además, el agonismo GABAérgico en AcSh rostral (i.e., Bregma 2,08 a 1,07 mm) genera preferencia condicionada a lugar, mayor ingesta de comida y aumenta la palatabilidad de sustancias gustativas (Reynolds & Berridge, 2002). Siendo que en el Experimento 6 se analizó la actividad de AcSh rostral (i.e., del Bregma 1,56 a 1,08 mm), sería de interés analizar si la mayor activación de c-Fos inducida por etanol en los grupos PE corresponde a neuronas GABAérgicas. Para ello, futuros experimentos podrían analizar la activación de este sistema en animales PE, por ejemplo, mediante el análisis de ARNm de receptores GABAérgicos en la región, por PCR cuantitativa o mediante inmunohistoquímica.

Observamos también que la exposición prenatal a etanol afectó otra área importante del circuito de recompensa: encontramos una reducción significativa de actividad en corteza infralímbica, como producto de la exposición prenatal a etanol. La corteza infralímbica ejerce un papel importante en la extinción de asociaciones inducidas

por reforzadores convencionales como las drogas de abuso (véase Millan et al, 2011). Se ha observado, por ejemplo, que la estimulación eléctrica de neuronas en IL reduce el condicionamiento de miedo (Vidal-Gonzalez et al., 2006). Además, la activación farmacológica de IL mediante micro-inyecciones de antagonistas D1 y D2, previnieron la recaída a cocaína (Sun & Rebec, 2005), mientras que la activación GABAérgica en de IL mediante muscimol y baclofen facilitó la recaída inducida por cocaína (Peters et al., 2008). De manera similar, la infusión de antagonistas del receptor de N-metil-D-aspartato hizo a los sujetos más resistentes a la extinción de miedo condicionado (Burgos-Robles et al., 2013), sin ejercer efectos sobre la adquisición de dicho aprendizaje. Adicionalmente, la expresión de la extinción ha sido asociada a la síntesis de proteínas (Santini et al., 2004) y a un aumento en la expresión de células marcadas para c-Fos en IL (Knapska & Maren, 2009). Así entonces, la reducción observada en IL como producto de la exposición prenatal observada en los Experimentos 3 y 4 del Capítulo 2, sugiere que la exposición prenatal a etanol podría resultar en déficits en la extinción de aprendizajes adquiridos durante la adolescencia. Esta suposición recibió confirmación en el Experimento 7a del Capítulo 2. En dicho experimento los adolescentes expuestos a etanol en útero presentaron déficits en la extinción, pero no en la adquisición, de aprendizaje de aversión condicionada al sabor inducido por CLi. Específicamente, los animales PE, pero no los PV o PNT, persistieron en exhibir rechazo a un EC aversivo, que había sido previamente apareado a cloruro de litio.

El etanol también posee efectos aversivos, que pueden fácilmente proveer valor condicionado a olores o sabores (Pautassi et al., 2012). Se podría llegar a pensar entonces que la persistencia en el aprendizaje aversivo podría servir como un factor de protección en los animales PE, ya que los mismos no extinguirían los aprendizajes inducidos por los efectos displacenteros del alcohol. Sin embargo, en el Experimento 7b del Capítulo 2 observamos que los adolescentes PE no adquieren aversión condicionada al sabor inducida por una dosis relativamente alta de etanol. Estos resultados cobran relevancia si se toma esta incapacidad de adquirir un aprendizaje de tipo aversivo frente al etanol como evidencia de insensibilidad a los efectos aversivos de la droga y, por lo tanto, de una alteración en el balance hedónico hacia la droga que puede predisponer a consumo.

En resumen, hemos hallado varios elementos mecanísticos que aportan a nuestro entendimiento de porqué el etanol prenatal exacerba el consumo adolescente de alcohol.

Los animales expuestos a etanol en útero son menos sensibles a las propiedades aversivas del etanol (Experimento 7b) y son más sensibles a la activación dopaminérgica inducida por etanol en ATV, lo que en conjunto con trabajos previos (Pautassi et al., 2012) sugiere una mayor sensibilidad a las propiedades reforzantes apetitivas de etanol (Experimento 6). La exposición prenatal a cantidades moderadas de etanol parece, por lo tanto, elevar la sensibilidad del circuito mesocorticolímbico a los efectos del etanol y, además, genera menor actividad neural en una estructura asociada al control de la búsqueda de drogas (i.e. corteza infralímbica). La sensibilización del sistema mesocorticolímbico podría estar explicando el mayor acercamiento y consumo de etanol en los adolescentes (véase Experimento 1 y 2 de Capítulo 2) (Leyton & Vezina, 2014).

En el experimento 8 del Capítulo 2 no se observaron diferencias en la expresión de ARNm de receptores mu, delta y kappa, en el sistema mesocorticolímbico, luego de la exposición prenatal a etanol. Este resultado fue contrario a la hipótesis, basada en resultados observados en infantes (Nizhnikov et al., 2014), de que los animales expuestos a etanol en útero poseerían diferencias en la expresión de receptores opiáceos, sobre todo una menor expresión de receptores kappa. Esta hipótesis, que reiteramos no recibió corroboración experimental en esta tesis, forma parte de una teoría más amplia sobre los mecanismos subyacentes al efecto facilitador de la exposición prenatal al alcohol sobre el consumo posterior de la droga. La misma, que fuera sugerida por Nizhnikov y colaboradores (Nizhnikov et al., 2014) parte de la observación que delta-Fos-B se acumula en neuronas espinosas del núcleo accumbens, ricas en dinorfina (el ligando endógeno de los receptores kappa) y los animales que sobre-expresan delta-Fos-B exhiben -al igual a los tratados prenatalmente con alcohol- una respuesta exacerbada a los efectos apetitivos de drogas y una respuesta disminuida a los efectos aversivos de la activación kappa y del estrés. Basados en estos antecedentes, Nizhnikov y colaboradores (2014; también comunicación personal) han propuesto la teoría que la exposición gestacional al alcohol causaría la acumulación de delta-Fos-B en accumbens y que esto a su vez sería la causa de las alteraciones en el sistema receptor kappa y del consumo exacerbado de alcohol. Sería de interés, entonces, profundizar aún más en los mecanismos neurobiológicos subyacentes a este fenómeno. Por ejemplo, sería interesante realizar mediciones de delta Fos B en animales expuestos a etanol en útero y compararlo con lo observado en relación a c-Fos en

los cerebros de estos adolescentes, ya que en estudios en relación a drogas opiáceas, se ha observado que la acumulación de delta Fos B en accumbens correlaciona con reducción de c-Fos en dicha área, mecanismo que suele ir acompañado de tolerancia frente a la droga (véase Nestler et al, 2013). Sería esperable encontrar, entonces, mayores niveles de Delta Fos B en IL en nuestros adolescentes PE y, posiblemente, diferencias a nivel de accumbens y ATV. Se podría ir ahondando, de esa manera, en las consecuencias que tiene la exposición a dosis moderadas de etanol en útero sobre el circuito de recompensa durante la adolescencia. El resultado negativo del Experimento 8 no necesariamente refuta teoría indicada en el párrafo previo. Es posible que una menor activación de receptores kappa en infantes expuestos a etanol en útero no persista hasta la adolescencia.

Puede ser posible, también, que la menor activación en corteza infralímbica esté asociada a diferencias en el sistema de transmisión glutamatérgico (Burgos-Robles et al., 2007). Por lo tanto, sería de interés analizar este sistema de neurotransmisión en futuros experimentos.

En resumen, la exposición a dosis moderadas de etanol durante la gestación tardía aumenta el consumo de etanol durante la adolescencia y genera alteraciones en el cerebro fetal, que perduran hasta la adolescencia. Estos cambios generan, a su vez, persistencia en la extinción de aprendizajes (Experimento 7a) y una resistencia a adquirir aprendizajes aversivos relacionados con etanol, lo cual aumentaría aún más la vulnerabilidad hacia esta droga durante la adolescencia (Experimento 7b). Por lo tanto, la exposición prenatal a etanol sería una suerte de “generador de alcoholismo” (Miller & Spear, 2006) que promueve el consumo de esta droga durante una etapa que, de por sí, es un factor de riesgo para el desarrollo de problemas de uso y abuso de alcohol (e.g. deWitt et al, 2000).

El estrés puede ser considerado un factor promotor del consumo de etanol durante la adolescencia, y hay evidencia – si bien no concluyente – que en esta etapa los sujetos serían más vulnerables a los efectos del estrés que más tarde en la vida (véase Spear et al, 2000). En el Capítulo 3 observamos que diferentes estresores –sociales y físicos– promueven el consumo de etanol en la adolescencia. Más interesantemente, el estrés inducido por inmovilización facilitó el consumo de alcohol durante la adolescencia pero no durante la adultez (Capítulo 3, Experimento 3). Los adultos, incluso, exhibieron una



tendencia a disminuir su preferencia por la droga luego del estresor. Esto que acabamos de describir es una importante diferencia ontogenética entre adolescentes y adultos, que podría estar explicando la vulnerabilidad adolescente hacia el etanol. Hemos observado, además, que un breve período de aislamiento social es suficiente para promover el consumo de etanol en adolescentes. Este dato es relevante, dado que los estresores sociales poseen alta relevancia biológica para un animal gregario como la rata (Miczek et al., 2008).

No sólo el estrés durante la adolescencia, sino que también estresores ocurridos temprano en el desarrollo, durante la infancia, aumentaron el consumo de etanol. En el Experimento 2 del Capítulo 3, observamos que la separación materna por 180 min diarios durante las dos primeras semanas de vida ejerció efectos ansiogénicos a nivel comportamental y, más importante aún, aumentó el consumo de etanol durante la adolescencia; si bien no alteró la respuesta a los efectos ansiolíticos del etanol que, en general, se mostraron elusivos en dicho experimento. Estos resultados concuerdan con lo observado en el estudio de Huot y colaboradores (2001), donde animales adultos que habían sido expuestos a 360 min de separación materna durante las 2 primeras semanas de vida, consumieron más etanol que los controles. Más recientemente, Cruz y colaboradores (2008) también observaron un aumento en el consumo de etanol auto-administrado mediante condicionamiento operante en animales que habían sufrido separación materna en el desarrollo temprano. Es interesante mencionar que otro estresor temprano generó cambios a nivel de ATV en nuestros animales adolescentes; nos referimos a la manipulación prenatal como producto de las administraciones intragástricas a las que fueron sujetas las madres gestantes tratadas con vehículo. Tal como hemos mencionado en párrafos anteriores, los adolescentes derivados de estas madres presentaron una hipoactivación basal dopaminérgica en ATV.

Un resultado novedoso del Experimento 2 del Capítulo 3, fue que la separación materna diaria durante 15 min también incrementó el consumo de etanol, si bien de manera diferente (i.e., con una latencia de aparición más demorada, hacia las últimas sesiones) al tratamiento de separación diaria de 180 min. Nuestra hipótesis es que, si bien ambos tratamientos tuvieron el mismo efecto, quizás lo hicieron mediante diferentes mecanismos. En tanto que el tratamiento de separación aumentó los niveles de ansiedad,

según indican las pruebas de luz-oscuridad, es probable que el tratamiento de 15 min haya hecho a los animales más propensos a explorar ambientes o estímulos nuevos, como el etanol.

A pesar de haber trabajado con estresores sociales durante la adolescencia (i.e. aislamiento social) y estresores tempranos (i.e. manipulación prenatal, separación materna), en la mayoría de los experimentos de ese capítulo no se realizó una comparación ontogenética entre adolescentes y adultos, para analizar si los adolescentes poseen sensibilidad diferencial al estrés, como postulan ciertas teorías (véase Spear et al, 2000; Varlinskaya & Spear 2010). Esta limitación se salvó en el Experimento 3 del Capítulo 3, donde se comparó la reactividad a los efectos estimulantes motores y el consumo de etanol luego de recibir estrés por inmovilización, en adolescentes y adultos. El estrés no afectó los efectos estimulantes del etanol (que, interesantemente, se observaron en adolescentes pero no en adultos), pero exacerbó significativamente el consumo y la preferencia por etanol únicamente en adolescentes. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Siegmund y colaboradores (2005), quienes reportaron un mayor consumo de etanol luego de estrés por footshock en animales que comenzaron a consumir de adolescentes, pero no de adultos. Brunell y Spear (2005) compararon el consumo de etanol en animales adolescentes y adultos estresados mediante aislamiento social; encontraron que el estrés suprime el consumo de etanol en adolescentes, pero no en adultos.

En resumen, tanto estresores sociales como el estrés por inmovilización promovieron el consumo de alcohol durante la adolescencia. Los mecanismos por los que este factor ejerce su influencia sobre el consumo de etanol aún no han sido plenamente dilucidados. Por un lado, los animales estresados podrían estar acercándose al etanol por sus propiedades ansiolíticas; pero por otro lado, el alcohol también es considerado por algunos autores como un estresor, ya que activa el eje HHA y eleva los niveles de corticosterona (véase Becker et al, 2011). Sin embargo, si bien el aumento de corticosterona y la activación del eje HHA son considerados indicadores de la presencia de estrés en un individuo, es necesario corroborar comportamentalmente –mediante pruebas que evalúen conductas de tipo ansioso– que ciertas dosis de etanol que activan dicho eje generan comportamientos ansioso.

Por otro lado, trabajos epidemiológicos han indicado (véase Dawson et al, 2003, 2007) que el estrés podría estar interactuando con la edad de inicio de consumo de etanol; promoviendo el consumo de esta droga. Por lo tanto, sería interesante combinar los dos modelos o preparaciones utilizados en los Experimentos 1 del Capítulo 1 y Experimento 3 Capítulo 2 de esta tesis, es decir, analizar el consumo de etanol en adolescentes iniciados a la droga durante la adolescencia temprana y, luego, sometidos a estrés por inmovilización. Además, de observar las consecuencias de estos factores en evaluaciones de ingesta más prolongadas. Es probable que la exposición a etanol durante la adolescencia, haga más sensible aún al adolescente al estrés y, por lo tanto, magnifique el consumo de etanol inducido por estrés. Existe evidencia a favor de que la exposición a etanol durante la adolescencia genera cambios a largo plazo en el eje HHA. Por ejemplo, la autoadministración de etanol durante la adolescencia conlleva una menor activación de CRF en adolescentes (Karanikas et al, 2013), un péptido asociado a la activación del eje HHA debido al estrés. Estos efectos sobre CRF, a su vez, perduran hasta la adultez. En un estudio se observó una atenuación de la activación de CRF en núcleo paraventricular del hipotálamo, en animales adultos que habían sido expuestos a etanol durante la adolescencia (Logrip et al., 2013). Estos datos sugieren que la exposición al etanol durante la adolescencia hace al organismo más sensible a consumir etanol, dado que se sensibiliza el eje HHA.

En conclusión, a lo largo del presente trabajo se han aportado evidencias que sugieren que debe retrasarse lo más posible el inicio del consumo de alcohol, y minimizar o evitar exposiciones previas que favorezcan interacciones entre historia familiar o prenatal de consumo e inicio temprano en la adolescencia, así como interrelaciones entre la exposición al estrés y el consumo de etanol. Como hemos visto, la exposición aún más temprana a etanol (i.e. gestación) tiene consecuencias a largo plazo; no sólo promueve la ingesta de etanol durante la adolescencia, sino que también genera modificaciones a nivel de actividad neural y catecolaminérgica en estructuras del sistema de recompensa que podrían exacerbar aún más los efectos del etanol sobre el cerebro adolescente, opción que debiera ser investigada en mayor profundidad. Los adolescentes, además, son propensos a consumir alcohol cuando han sido sujetos a diferentes situaciones estresantes, exacerbando su vulnerabilidad frente al consumo de alcohol.

## Bibliografía

- Abate, P., Pueta, M., Spear, N. E., & Molina, J. C. (2008). Fetal learning about ethanol and later ethanol responsiveness: evidence against “safe” amounts of prenatal exposure. *Exp Biol Med (Maywood)*, *233*(2), 139–154. doi:10.3181/0703-MR-69
- Abe, H., Hidaka, N., Kawagoe, C., Odagiri, K., Watanabe, Y., Ikeda, T., ... Ishida, Y. (2007). Prenatal psychological stress causes higher emotionality, depression-like behavior, and elevated activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience Research*, *59*(2), 145–51. doi:10.1016/j.neures.2007.06.1465
- Abel, E. L., Bush, R., & Dintcheff, B. A. (1981). Exposure of rats to alcohol in utero alters drug sensitivity in adulthood. *Science (New York, N.Y.)*, *212*(4502), 1531–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7233243>
- Acevedo, M. B., Molina, J. C., Nizhnikov, M. E., Spear, N. E., & Pautassi, R. M. (2010). High ethanol dose during early adolescence induces locomotor activation and increases subsequent ethanol intake during late adolescence. *Developmental Psychobiology*, *52*(5), 424–40. doi:10.1002/dev.20444
- Acevedo, M. B., Nizhnikov, M. E., Molina, J. C., & Pautassi, R. M. (2014). Relationship between ethanol-induced activity and anxiety in the open field, elevated plus maze, light-dark box, and ethanol intake in adolescent rats. *Behavioural Brain Research*, *265*, 203–15. doi:10.1016/j.bbr.2014.02.032
- Acevedo, M. B., Nizhnikov, M. E., Spear, N. E., Molina, J. C., & Pautassi, R. M. (2013). Ethanol-induced locomotor activity in adolescent rats and the relationship with ethanol-induced conditioned place preference and conditioned taste aversion. *Developmental Psychobiology*, *55*(4), 429–42. doi:10.1002/dev.21048
- Alati, R., Clavarino, A., Najman, J. M., Callaghan, M. O., Bor, W., Al, A., & Williams, G. M. (2008). The developmental origin of adolescent alcohol use : Findings from the Mater University Study of Pregnancy and its outcomes. *Drug and Alcohol Dependence*, *98*, 136–143. doi:10.1016/j.drugalcdep.2008.05.011

- Alderete, E., Kaplan, C. P., Nah, G., & Perez-Stable, E. J. (2008). [Problems related to alcohol drinking among youth in Jujuy, Argentina]. *Salud Publica Mex*, *50*, 300–307. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18670721>
- Andersen, S. L., Dumont, N. L., & Teicher, M. H. (1997). Developmental differences in dopamine synthesis inhibition by (+/-)-7-OH-DPAT. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *356*(2), 173–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9272722>
- Anthony, J. C., & Petronis, K. R. (1995). Early-onset drug use and risk of later drug problems. *Drug and Alcohol Dependence*, *40*(1), 9–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8746919>
- Arias, C., & Gabriela Chotro, M. (2006). Interactions between prenatal ethanol exposure and postnatal learning about ethanol in rat pups. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, *40*(1), 51–9. doi:10.1016/j.alcohol.2006.10.002
- Arias, C., Mlewski, E. C., Molina, J. C., & Spear, N. E. (2009). Ethanol induces locomotor activating effects in preweanling Sprague-Dawley rats. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, *43*(1), 13–23. doi:10.1016/j.alcohol.2008.09.002
- Arias, C., Molina, J. C., Mlewski, E. C., Pautassi, R. M., & Spear, N. (2008). Acute sensitivity and acute tolerance to ethanol in preweanling rats with or without prenatal experience with the drug. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *89*(4), 608–22. doi:10.1016/j.pbb.2008.02.017
- Arias-Carrión, O., Caraza-Santiago, X., Salgado-Licona, S., Salama, M., Machado, S., Nardi, A. E., ... Murillo-Rodríguez, E. (2014). Orquestic regulation of neurotransmitters on reward-seeking behavior. *International Archives of Medicine*, *7*, 29. doi:10.1186/1755-7682-7-29
- Arnold, J. L., & Siviy, S. M. (2002). Effects of neonatal handling and maternal separation on rough-and-tumble play in the rat. *Developmental Psychobiology*, *41*(3), 205–15. doi:10.1002/dev.10069

- Baer, J. S., Sampson, P. D., Barr, H. M., Connor, P. D., & Streissguth, A. P. (2003). A 21-year longitudinal analysis of the effects of prenatal alcohol exposure on young adult drinking. *Archives of General Psychiatry*, *60*(4), 377–85. doi:10.1001/archpsyc.60.4.377
- Barrot, M., Sesack, S. R., Georges, F., Pistis, M., Hong, S., & Jhou, T. C. (2012). Braking dopamine systems: a new GABA master structure for mesolimbic and nigrostriatal functions. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *32*(41), 14094–101. doi:10.1523/JNEUROSCI.3370-12.2012
- Becker, H. C., Lopez, M. F., & Doremus-Fitzwater, T. L. (2011). Effects of stress on alcohol drinking: a review of animal studies. *Psychopharmacology*, *218*(1), 131–56. doi:10.1007/s00213-011-2443-9
- Becker, H. C., Weathersby, R. T., & Hale, R. L. (1995). Prenatal ethanol exposure alters sensitivity to the effects of apomorphine given alone and in combination with ethanol on locomotor activity in adult male mouse offspring. *Neurotoxicology and Teratology*, *17*(1), 57–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7708020>
- Behrendt, S., Wittchen, H.-U., Höfler, M., Lieb, R., Low, N. C. P., Rehm, J., & Beesdo, K. (2008). Risk and speed of transitions to first alcohol dependence symptoms in adolescents: a 10-year longitudinal community study in Germany. *Addiction (Abingdon, England)*, *103*(10), 1638–47. doi:10.1111/j.1360-0443.2008.02324.x
- Belin, D., Mar, A. C., Dalley, J. W., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2008). High impulsivity predicts the switch to compulsive cocaine-taking. *Science (New York, N.Y.)*, *320*(5881), 1352–5. doi:10.1126/science.1158136
- Bell, R. L., Rodd, Z. A., Schultz, J. A., Peper, C. L., Lumeng, L., Murphy, J. M., & McBride, W. J. (2008). Effects of short deprivation and re-exposure intervals on the ethanol drinking behavior of selectively bred high alcohol-consuming rats. *Alcohol*, *42*(5), 407–416. doi:10.1016/j.alcohol.2008.03.130
- Bernheim, A., Halfon, O., & Boutrel, B. (2013). Controversies about the enhanced vulnerability of the adolescent brain to develop addiction. *Frontiers in Pharmacology*, *4*(November), 118. doi:10.3389/fphar.2013.00118

- Bisaga, A., & Kostowski, W. (1993). Individual behavioral differences and ethanol consumption in Wistar rats. *Physiology & Behavior*, *54*(6), 1125–1131. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TOP-482R3F7-1N/2/4af9ba1718dfec9102f8bb4c66b8c29c>
- Blumberg, M. S., Efimova, I. V., & Alberts, J. R. (1992). Ultrasonic vocalizations by rat pups: the primary importance of ambient temperature and the thermal significance of contact comfort. *Developmental Psychobiology*, *25*(4), 229–50. doi:10.1002/dev.420250402
- Bourin, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*, *463*(1-3), 55–65. doi:10.1016/S0014-2999(03)01274-3
- Bourin, M., Petit-Demoulière, B., Dhonnchadha, B. N., & Hascöet, M. (2007). Animal models of anxiety in mice. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, *21*(6), 567–74. doi:10.1111/j.1472-8206.2007.00526.x
- Brasser, S. M., & Spear, N. E. (2004). Contextual conditioning in infants, but not older animals, is facilitated by CS conditioning. *Neurobiol Learn Mem*, *81*, 46–59.
- Bratek, A., Beil, J., Jarzabek, K., Banach, M., Krysta, K., & Krupka-Matuszczyk, I. (2013). Association of early drinking onset with subsequent alcohol abuse. *Psychiatria Danubina*, *25* Suppl 2, S99–101. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23995154>
- Broadwater, M., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2011). Chronic intermittent ethanol exposure in early adolescent and adult male rats: effects on tolerance, social behavior, and ethanol intake. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *35*(8), 1392–403. doi:10.1111/j.1530-0277.2011.01474.x
- Broadwater, M., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2012). Effects of Voluntary Access to Sweetened Ethanol During Adolescence on Intake in Adulthood. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 1–8. doi:10.1111/acer.12049

- Brunell, S. C., & Spear, L. P. (2005). Effect of Stress on the Voluntary Intake of a Sweetened Ethanol Solution in Pair-Housed Adolescent and Adult Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 29(9), 1641–1653. doi:10.1097/01.alc.0000179382.64752.13
- Brys, I., Pupe, S., & Bizarro, L. (2014). Attention, locomotor activity and developmental milestones in rats prenatally exposed to ethanol. *International Journal of Developmental Neuroscience : The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 38C, 161–168. doi:10.1016/j.ijdevneu.2014.08.007
- Buchmann, A. F., Schmid, B., Blomeyer, D., Becker, K., Treutlein, J., Zimmermann, U. S., ... 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. *Journal of Psychiatric Research*, 43(15), 1205–12. doi:10.1016/j.jpsychires.2009.02.006
- Burkhardt, J. M., & Adermark, L. (2014). Locus of onset and subpopulation specificity of in vivo ethanol effect in the reciprocal ventral tegmental area-nucleus accumbens circuit. *Neurochemistry International*, 76, 122–30. doi:10.1016/j.neuint.2014.07.006
- Burgos-Robles, A., Bravo-Rivera, H., & Quirk, G. J. (2013). Prelimbic and infralimbic neurons signal distinct aspects of appetitive instrumental behavior. *PloS One*, 8(2), e57575. doi:10.1371/journal.pone.0057575
- Butler, T. R., Ariwodola, O. J., & Weiner, J. L. (2014). The impact of social isolation on HHA axis function, anxiety-like behaviors, and ethanol drinking. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7, 102. doi:10.3389/fnint.2013.00102
- Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9), 5335–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9560276>
- Carneiro, L. M. V, Diógenes, J. P. L., Vasconcelos, S. M. M., Aragão, G. F., Noronha, E. C., Gomes, P. B., & Viana, G. S. B. (2005). Behavioral and neurochemical effects on rat



offspring after prenatal exposure to ethanol. *Neurotoxicology and Teratology*, 27(4), 585–92. doi:10.1016/j.ntt.2005.06.006

Champagne, F. A., Francis, D. D., Mar, A., & Meaney, M. J. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiology & Behavior*, 79(3), 359–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12954431>

Charles Lawrence, R., Cale Bonner, H., Newsom, R. J., & Kelly, S. J. (2008). Effects of alcohol exposure during development on play behavior and c-Fos expression in response to play behavior. *Behavioural Brain Research*, 188(1), 209–18. doi:10.1016/j.bbr.2007.10.028

Chartier, K. G., Hesselbrock, M. N., & Hesselbrock, V. M. (2011). Alcohol problems in young adults transitioning from adolescence to adulthood: The association with race and gender. *Addictive Behaviors*, 36(3), 167–74. doi:10.1016/j.addbeh.2010.10.007

Chen, C.-Y., Storr, C. L., & Anthony, J. C. (2009). Early-onset drug use and risk for drug dependence problems. *Addictive Behaviors*, 34(3), 319–22. doi:10.1016/j.addbeh.2008.10.021

Chen, Y.-C., Prescott, C. a, Walsh, D., Patterson, D. G., Riley, B. P., Kendler, K. S., & Kuo, P.-H. (2011). Different phenotypic and genotypic presentations in alcohol dependence: age at onset matters. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs*, 72(5), 752–62. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3174022&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Chester, J. A., Lumeng, L., Li, T., & Grahame, N. J. (2003). High- and Low-Alcohol-Preferring Mice Show Differences in Conditioned Taste Aversion to Alcohol. *Alcohol*, 27(1), 12–18. doi:10.1097/01.ALC.0000046340.06154.9F

Choong, K., & Shen, R. (2004). Prenatal ethanol exposure alters the postnatal development of the spontaneous electrical activity of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Neuroscience*, 126(4), 1083–91. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.04.041

- Chorlian, D. B., Rangaswamy, M., Manz, N., Wang, J.-C., Dick, D., Almasy, L., ... Porjesz, B. (2013). Genetic and neurophysiological correlates of the age of onset of alcohol use disorders in adolescents and young adults. *Behavior Genetics*, *43*(5), 386–401. doi:10.1007/s10519-013-9604-z
- Chotro, G., & Arias, C. (2003a). Ontogenetic difference in ethanol reinforcing properties: the role of the opioid system. *Behavioural Pharmacology*, *12*, 661–666.
- Chotro, M. G., & Arias, C. (2003b). Prenatal exposure to ethanol increases ethanol consumption: a conditioned response? *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, *30*(1), 19–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12878271>
- Chotro, M. G., Arias, C., & Laviola, G. (2007). Increased ethanol intake after prenatal ethanol exposure: Studies with animals. *Biobehavioral Reviews*, *31*, 181–191. doi:10.1016/j.neubiorev.2006.06.021
- Chotro, M. G., Cordoba, N. E., & Molina, J. C. (1991). Acute Prenatal Experience with Alcohol in the Amniotic-Fluid - Interactions with Aversive and Appetitive Alcohol Orosensory Learning in the Rat Pup. *Developmental Psychobiology*, *24*, 431–451. Retrieved from ISI:A1991GT17100004
- Conrod, P., Peterson, J., & Pihl, R. (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. doi:10.1007/s002130100741
- Courtney, K. E., & Polich, J. (2009). Binge drinking in young adults: Data, definitions, and determinants. *Psychological Bulletin*, *135*(1), 142–56. doi:10.1037/a0014414
- Crews, F., He, J., & Hodge, C. (2007). Adolescent cortical development : A critical period of vulnerability for addiction. *Adolescence*, *86*, 189 – 199. doi:10.1016/j.pbb.2006.12.001
- Crews, F. T., & Boettiger, C. A. (2009). Impulsivity, frontal lobes and risk for addiction. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *93*(3), 237–47. doi:10.1016/j.pbb.2009.04.018

- Crews, F. T., & Vetreno, R. P. (2011). Addiction, adolescence, and innate immune gene induction. *Frontiers in Psychiatry / Frontiers Research Foundation*, 2(April), 19. doi:10.3389/fpsyt.2011.00019
- Cruz, F. C., Quadros, I. M., Planeta, C. da S., & Miczek, K. A. (2008). Maternal separation stress in male mice: long-term increases in alcohol intake. *Psychopharmacology (Berl.)*, 201(3), 459–468. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18766329>
- Daoura, L., Haaker, J., & Nylander, I. (2011). Early environmental factors differentially affect voluntary ethanol consumption in adolescent and adult male rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 35(3), 506–15. doi:10.1111/j.1530-0277.2010.01367.x
- Dawson, D. A., Goldstein, R. B., Chou, S. P., Ruan, W. J., & Grant, B. F. (2008). Age at first drink and the first incidence of adult-onset DSM-IV alcohol use disorders. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 32(12), 2149–60. doi:10.1111/j.1530-0277.2008.00806.x
- Dawson, D. A., Grant, B. F., & Li, T.-K. (2007). Impact of age at first drink on stress-reactive drinking. *Alcohol Clin Exp Res*, 31(1), 69–77. doi:10.1111/j.1530-0277.2006.00265.x
- De Olmos, S., Bender, C., de Olmos, J. S., & Lorenzo, A. (2009). Neurodegeneration and prolonged immediate early gene expression throughout cortical areas of the rat brain following acute administration of dizocilpine. *Neuroscience*, 164(3), 1347–59. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.09.022
- Deutsch, A. R., Slutske, W. S., Richmond-Rakerd, L. S., Chernyavskiy, P., Heath, A. C., & Martin, N. G. (2013). Causal influence of age at first drink on alcohol involvement in adulthood and its moderation by familial context. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs*, 74(5), 703–13. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3749313&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- DeWit, D. J., Adlaf, E. M., Offord, D. R., & Ogborne, a C. (2000). Age at first alcohol use: a risk factor for the development of alcohol disorders. *The American Journal of*

*Psychiatry*, 157(5), 745–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10784467>

Díaz, M. R., Jotty, K., Locke, J. L., Jones, S. R., & Valenzuela, C. F. (2014). Moderate Alcohol Exposure during the Rat Equivalent to the Third Trimester of Human Pregnancy Alters Regulation of GABAA Receptor-Mediated Synaptic Transmission by Dopamine in the Basolateral Amygdala. *Frontiers in Pediatrics*, 2, 46. doi:10.3389/fped.2014.00046

Díaz-Cenzano, E., Gaztañaga, M., & Gabriela Chotro, M. (2013). Exposure to ethanol on prenatal days 19-20 increases ethanol intake and palatability in the infant rat: Involvement of kappa and mu opioid receptors. *Developmental Psychobiology*. doi:10.1002/dev.21162

Dietz, D. M., Dietz, K. C., Nestler, E. J., & Russo, S. J. (2009). Molecular mechanisms of psychostimulant-induced structural plasticity. *Pharmacopsychiatry*, 42 Suppl 1, S69–78. doi:10.1055/s-0029-1202847

Dominguez, H. D., Lopez, M. F., & Molina, J. C. (1998). Neonatal responsiveness to alcohol odor and infant alcohol intake as a function of alcohol experience during late gestation. *Alcohol*, 16(2), 109–117.

Doremus-Fitzwater, T. L., Barreto, M., & Spear, L. P. (2012). Age-related differences in impulsivity among adolescent and adult Sprague-Dawley rats. *Behavioral Neuroscience*, 126(5), 735–41. doi:10.1037/a0029697

Doremus, T. L., Brunell, S. C., Rajendran, P., & Spear, L. P. (2005). Factors influencing elevated ethanol consumption in adolescent relative to adult rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 29, 1796–1808.

Doremus, T. L., Brunell, S. C., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2003). Anxiogenic effects during withdrawal from acute ethanol in adolescent and adult rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 75(2), 411–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12873633>

Dursun, I., Jakubowska-Doğru, E., & Uzbay, T. (2006). Effects of prenatal exposure to alcohol on activity, anxiety, motor coordination, and memory in young adult Wistar

rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 85(2), 345–55.  
doi:10.1016/j.pbb.2006.09.001

Eade, A. M., Sheehe, P. R., & Youngentob, S. L. (2010). Ontogeny of the enhanced fetal-ethanol-induced behavioral and neurophysiologic olfactory response to ethanol odor. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 34(2), 206–13.  
doi:10.1111/j.1530-0277.2009.01083.x

Enoch, M.A. (2012). The influence of gene-environment interactions on the development of alcoholism and drug dependence. *Current Psychiatry Reports*, 14(2), 150–8.  
doi:10.1007/s11920-011-0252-9

Esmorís-Arranz, F. J., Méndez, C., & Spear, N. E. (2008). Contextual fear conditioning differs for infant, adolescent, and adult rats. *Behavioural Processes*, 78(3), 340–50.  
doi:10.1016/j.beproc.2008.01.010

Estanislau, C., & Morato, S. (2006). Behavior ontogeny in the elevated plus-maze: prenatal stress effects. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 24(4), 255–62.  
doi:10.1016/j.ijdevneu.2006.03.001

Faria, R. R., Lima Rueda, A. V., Sayuri, C., Soares, S. L., Malta, M. B., Carrara-Nascimento, P. F., ... 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*, —. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18789904>

Fernández, M., Fabio, M. C., Nizhnikov, M. E., Spear, N. E., Abate, P., & Pautassi, R. M. (2014). Maternal isolation during the first two postnatal weeks affects novelty-induced responses and sensitivity to ethanol-induced locomotor activity during infancy. *Developmental Psychobiology*, 56(5), 1070–82. doi:10.1002/dev.21192

Fernández-Vidal JM, Spear NE, Molina JC. (2003). Adolescent rats discriminate a mild state of ethanol intoxication likely to act as an appetitive unconditioned stimulus. *Alcohol*. (1):45-60

- Francis, D. D., & Kuhar, M. J. (2008). Frequency of maternal licking and grooming correlates negatively with vulnerability to cocaine and alcohol use in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *90*(3), 497–500. doi:10.1016/j.pbb.2008.04.012
- Fuentes-Almendras, M., Mora-Ripoll, R., Dijk, A., Domínguez-García, A., & Salleras-Sanmartí, L. (1999). Alcohol consumption among high school students in Barcelona, Spain. *Journal of Studies on Alcohol*, *60*(2), 228–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10091961>
- Füllgrabe, M. W., Vengeliene, V., & Spanagel, R. (2007). Influence of age at drinking onset on the alcohol deprivation effect and stress-induced drinking in female rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *86*(2), 320–6. doi:10.1016/j.pbb.2006.10.004
- García-Burgos, D., González, F., Manrique, T., & Gallo, M. (2009). Patterns of ethanol intake in preadolescent, adolescent, and adult Wistar rats under acquisition, maintenance, and relapse-like conditions. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *33*(4), 722–8. doi:10.1111/j.1530-0277.2008.00889.x
- Gautam, P., Nuñez, S. C., Narr, K. L., Kan, E. C., & Sowell, E. R. (2014). Effects of prenatal alcohol exposure on the development of white matter volume and change in executive function. *NeuroImage. Clinical*, *5*, 19–27. doi:10.1016/j.nicl.2014.05.010
- Geels, L. M., Vink, J. M., van Beijsterveldt, C. E. M., Bartels, M., & Boomsma, D. I. (2012). Developmental Prediction Model for Early Alcohol Initiation in Dutch Adolescents. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs*, *74*(1), 59. Retrieved from [http://www.jsad.com/jsad/article/Developmental\\_Prediction\\_Model\\_for\\_Early\\_Alcohol\\_Initiation\\_in\\_Dutch\\_Adoles/4774.html](http://www.jsad.com/jsad/article/Developmental_Prediction_Model_for_Early_Alcohol_Initiation_in_Dutch_Adoles/4774.html)
- Gianoulakis, C. (2001). Influence of the endogenous opioid system on high alcohol consumption and genetic predisposition to alcoholism. *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN*, *26*(4), 304–18.
- Gilpin, N. W., Karanikas, C. a, & Richardson, H. N. (2012). Adolescent binge drinking leads to changes in alcohol drinking, anxiety, and amygdalar corticotropin releasing factor

cells in adulthood in male rats. *PloS One*, 7(2), e31466.  
doi:10.1371/journal.pone.0031466

Gomez, J. L., Lewis, M. J., & Luine, V. N. (2012). The interaction of chronic restraint stress and voluntary alcohol intake: effects on spatial memory in male rats. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 46(5), 499–504. doi:10.1016/j.alcohol.2011.12.005

Green, M. K., Rani, C. S. S., Joshi, A., Soto-Piña, A. E., Martinez, P. A., Frazer, A., ... Morilak, D. A. (2011). Prenatal stress induces long term stress vulnerability, compromising stress response systems in the brain and impairing extinction of conditioned fear after adult stress. *Neuroscience*, 192, 438–51.  
doi:10.1016/j.neuroscience.2011.06.041

Gullo, M. J., & Dawe, S. (2008). Impulsivity and adolescent substance use: rashly dismissed as “all-bad”? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32(8), 1507–18.  
doi:10.1016/j.neubiorev.2008.06.003

Gustafsson, L., & Nylander, I. (2006). Time-dependent alterations in ethanol intake in male wistar rats exposed to short and prolonged daily maternal separation in a 4-bottle free-choice paradigm. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 30(12), 2008–16. doi:10.1111/j.1530-0277.2006.00247.x

Gustafsson, L., Zhou, Q., & Nylander, I. (2007). Ethanol-induced effects on opioid peptides in adult male Wistar rats are dependent on early environmental factors. *Neuroscience*, 146(3), 1137–49. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.02.037

Guttmanova, K., Bailey, J. a, Hill, K. G., Lee, J. O., Hawkins, J. D., Woods, M. L., & Catalano, R. F. (2011). Sensitive periods for adolescent alcohol use initiation: predicting the lifetime occurrence and chronicity of alcohol problems in adulthood. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs*, 72(2), 221–31. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3052892&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Guttmanova, K., Hill, K. G., Bailey, J. A., Lee, J. O., Hartigan, L. A., Hawkins, J. D., & Catalano, R. F. (2012). Examining explanatory mechanisms of the effects of early alcohol use on young adult alcohol dependence. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs*, 73(3), 379–

90. Retrieved from  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3316713&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Hamilton, D. a, Akers, K. G., Rice, J. P., Johnson, T. E., Candelaria-Cook, F. T., Maes, L. I., ... Savage, D. D. (2010). Prenatal exposure to moderate levels of ethanol alters social behavior in adult rats: relationship to structural plasticity and immediate early gene expression in frontal cortex. *Behavioural Brain Research*, 207(2), 290–304. doi:10.1016/j.bbr.2009.10.012

Hamilton, K. R., Felton, J. W., Risco, C. M., Lejuez, C. W., & MacPherson, L. (2014). Brief report: The interaction of impulsivity with risk-taking is associated with early alcohol use initiation. *Journal of Adolescence*, 37(8), 1253–1256. doi:10.1016/j.adolescence.2014.08.013

Hargreaves, G. a, Wang, E. Y. J., Lawrence, A. J., & McGregor, I. S. (2011). Beer promotes high levels of alcohol intake in adolescent and adult alcohol-preferring rats. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 45(5), 485–98. doi:10.1016/j.alcohol.2010.12.007

Hausknecht, K., Haj-Dahmane, S., & Shen, R.-Y. (2013). Prenatal stress exposure increases the excitation of dopamine neurons in the ventral tegmental area and alters their responses to psychostimulants. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(2), 293–301. doi:10.1038/npp.2012.168

Heitzeg, M. M., Nigg, J. T., Yau, W.-Y. W., Zubieta, J.-K., & Zucker, R. A. (2008). Affective circuitry and risk for alcoholism in late adolescence: differences in frontostriatal responses between vulnerable and resilient children of alcoholic parents. *Alcohol Clin Exp Res*, 32, 414–426. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18302724>

Hellems, K. G. C., Bengel, L. C., & Olmstead, M. C. (2004). Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 150(2), 103–115. doi:10.1016/j.devbrainres.2004.03.003



- Hingson, R. W., Heeren, T., & Winter, M. R. (2006). Age of alcohol-dependence onset: associations with severity of dependence and seeking treatment. *Pediatrics*, *118*(3), e755–63. doi:10.1542/peds.2006-0223
- Hoffman, P., & Tabakoff, B. (2005). Gene expression in animals with different acute responses to ethanol. *Addiction Biology*, *10*(1), 63–9. doi:10.1080/13556210412331308985
- Hoshaw, B. A., & Lewis, M. J. (2001). Behavioral sensitization to ethanol in rats: evidence from the Sprague–Dawley strain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *68*(4), 685–690. doi:10.1016/S0091-3057(01)00489-0
- Hunt, T., & Amit, Z. (1987). Conditioned taste aversion induced by self-administered drugs: paradox revisited. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *11*(1), 107–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3554039>
- Hunt, W. A., & Lands, W. E. M. (1992). A role for behavioral sensitization in uncontrolled ethanol intake. *Alcohol*, *9*(4), 327–328. doi:10.1016/0741-8329(92)90075-L
- Huot, R. L., Thirivikraman, K. V, Meaney, M. J., & Plotsky, P. M. (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*, *158*(4), 366–73. doi:10.1007/s002130100701
- Hussong, A., Bauer, D., & Chassin, L. (2008). Telescoped trajectories from alcohol initiation to disorder in children of alcoholic parents. *Journal of Abnormal Psychology*, *117*(1), 63–78. doi:10.1037/0021-843X.117.1.63
- Jang, M.-H., Jung, S.-B., Lee, M.-H., Kim, H., Lee, S.-J., Sim, Y.-J., ... Kim, E.-H. (2005). Influence of maternal alcohol administration on c-Fos expression in the hippocampus of infant rats. *Neuroscience Letters*, *378*(1), 44–8. doi:10.1016/j.neulet.2004.12.009
- Johnston, L. D., Delva, J., & Malley, P. M. O. (2007). Soft Drink Availability, Contracts, and Revenues in American Secondary Schools. *American Journal of Preventive Medicine*, *33*, 209–225. doi:10.1016/j.amepre.2007.07.006

- Karanikas, C. A., Lu, Y.-L., & Richardson, H. N. (2013). Adolescent drinking targets corticotropin-releasing factor peptide-labeled cells in the central amygdala of male and female rats. *Neuroscience*, *249*, 98–105. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.04.024
- Kasanetz, F., & Manzoni, O. J. (2009). Maturation of excitatory synaptic transmission of the rat nucleus accumbens from juvenile to adult. *Journal of Neurophysiology*, *101*(5), 2516–27. doi:10.1152/jn.91039.2008
- Kim, P., Park, J. H., Choi, C. S., Choi, I., Joo, S. H., Kim, M. K., ... Shin, C. Y. (2013). Effects of ethanol exposure during early pregnancy in hyperactive, inattentive and impulsive behaviors and MeCP2 expression in rodent offspring. *Neurochemical Research*, *38*(3), 620–31. doi:10.1007/s11064-012-0960-5
- King, A. C., Volpicelli, J. R., Frazer, A., & O'Brien, C. P. (1997). Effect of naltrexone on subjective alcohol response in subjects at high and low risk for future alcohol dependence. *Psychopharmacology (Berl)*, *129*, 15–22.
- Knapska, E., & Maren, S. (2009). Reciprocal patterns of c-Fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala after extinction and renewal of conditioned fear. *Learning & Memory*, *16*(8), 486–493. doi:10.1101/lm.1463909
- Koob, G. F., Ahmed, S. H., Boutrel, B., Chen, S. A., Kenny, P. J., Markou, A., ... Sanna, P. P. (2004). Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. *Biobehavioral Reviews*, *27*, 739–749. doi:10.1016/j.neubiorev.2003.11.007
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2009). Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*, --. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2009.110>
- Kovács, K. J. (2008). Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *Journal of Neuroendocrinology*, *20*(6), 665–72. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01734.x

- Kraebel, K. S., Brassler, S. M., Campbell, J. O., Spear, L. P., & Spear, N. E. (2002). Developmental differences in temporal patterns and Potentiation of isolation-induced ultrasonic vocalizations: Influence of temperature variables. *Developmental Psychobiology*, *40*, 147–159. Retrieved from ISI:000174312800006
- Lee, D. Y., Guttilla, M., Fung, K. D., McFeron, S., Yan, J., & Ranaldi, R. (2007). Rostral-caudal differences in the effects of intra-ATV muscimol on cocaine self-administration. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *86*(3), 542–9. doi:10.1016/j.pbb.2007.01.017
- Lee, L. O., Young-Wolff, K. C., Wolff, K. C. Y., Kendler, K. S., & Prescott, C. A. (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. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *36*(4), 693–704. doi:10.1111/j.1530-0277.2011.01630.x
- Leyton, M., & Vezina, P. (2014). Dopamine ups and downs in vulnerability to addictions: a neurodevelopmental model. *Trends in Pharmacological Sciences*, *35*(6), 268–76. doi:10.1016/j.tips.2014.04.002
- Logrip, M. L., Rivier, C., Lau, C., Im, S., Vaughan, J., & Lee, S. (2013). Adolescent alcohol exposure alters the rat adult hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness in a sex-specific manner. *Neuroscience*, *235*, 174–86. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.12.069
- Lopez, M. F., Doremus-Fitzwater, T. L., & Becker, H. C. (2011). Chronic social isolation and chronic variable stress during early development induce later elevated ethanol intake in adult C57BL/6J mice. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, *45*(4), 355–64. doi:10.1016/j.alcohol.2010.08.017
- Lugo Jr, J. N. L., Marino M. D., Cronise, K., & Kelly, S. J. (2003). Effects of alcohol exposure during development on social behavior in rats. *Group*, *78*, 185 – 194.
- Lynch, W. J., & Carroll, M. E. (1999). Sex differences in the acquisition of intravenously self-administered cocaine and heroin in rats. *Psychopharmacology*, *144*(1), 77–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10379627>

- Lynn, D. A., & Brown, G. R. (2010). The ontogeny of anxiety-like behavior in rats from adolescence to adulthood. *Developmental Psychobiology*, 52(8), 731–9. doi:10.1002/dev.20468
- Maimaris, W., & McCambridge, J. (2014). Age of first drinking and adult alcohol problems: systematic review of prospective cohort studies. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 68(3), 268–74. doi:10.1136/jech-2013-203402
- Maldonado, A. M., Finkbeiner, L. M., Alipour, K. K., & Kirstein, C. L. (2008). Voluntary ethanol consumption differs in adolescent and adult male rats using a modified sucrose-fading paradigm. *Alcohol Clin Exp Res*, 32, 1574–1582. doi:10.1111/j.1530-0277.2008.00733.x
- Maldonado-Devincci, A. M., Badanich, K. A., & Kirstein, C. L. (2010). Alcohol during adolescence selectively alters immediate and long-term behavior and neurochemistry. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 44(1), 57–66. doi:10.1016/j.alcohol.2009.09.035
- Maroun, M., Kavushansky, A., Holmes, A., Wellman, C., & Motanis, H. (2012). Enhanced extinction of aversive memories by high-frequency stimulation of the rat infralimbic cortex. *PloS One*, 7(5), e35853. doi:10.1371/journal.pone.0035853.
- Mason, W. A., Toumbourou, J. W., Herrenkohl, T. I., Hemphill, S. A., Catalano, R. F., & Patton, G. C. (2011). Early age alcohol use and later alcohol problems in adolescents: individual and peer mediators in a bi-national study. *Psychology of Addictive Behaviors : Journal of the Society of Psychologists in Addictive Behaviors*, 25(4), 625–33. doi:10.1037/a0023320
- McCormick, C. M., Hodges, T. E., & Simone, J. J. (2014). Peer pressures: Social instability stress in adolescence and social deficits in adulthood in a rodent model. *Developmental Cognitive Neuroscience*. doi:10.1016/j.dcn.2014.04.002
- Meaney, M. J., Brake, W., & Gratton, A. (2002). Environmental regulation of the development of mesolimbic dopamine systems: a neurobiological mechanism for vulnerability to drug abuse? *Psychoneuroendocrinology*, 27(1-2), 127–138. doi:10.1016/S0306-4530(01)00040-3

- Michaels, C. C., & Holtzman, S. G. (2008). Early postnatal stress alters place conditioning to both mu- and kappa-opioid agonists. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *325*(1), 313–8. doi:10.1124/jpet.107.129908
- Middleton, F. A., Carrierfenster, K., Mooney, S. M., & Youngentob, S. L. (2009). Gestational ethanol exposure alters the behavioral response to ethanol odor and the expression of neurotransmission genes in the olfactory bulb of adolescent rats. *Brain Research*, *1252*, 105–16. doi:10.1016/j.brainres.2008.11.023
- Millan, E. Z., Marchant, N. J., & McNally, G. P. (2011). Extinction of drug seeking. *Behavioural Brain Research*, *217*(2), 454–62. doi:10.1016/j.bbr.2010.10.037
- Miller, M. W., & Spear, L. P. (2006). The alcoholism generator. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, *30*, 1466–1469. Retrieved from ISI:000239939500002
- Miranda-Morales, R. S., Nizhnikov, M. E., & Spear, N. E. (2014). Prenatal exposure to ethanol during late gestation facilitates operant self-administration of the drug in 5-day-old rats. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, *48*(1), 19–23. doi:10.1016/j.alcohol.2013.11.001
- Miranda-Morales, R. S., Spear, N. E., Nizhnikov, M. E., Molina, J. C., & Abate, P. (2012). Role of mu, delta and kappa opioid receptors in ethanol-reinforced operant responding in infant rats. *Behavioural Brain Research*, *234*(2), 267–77. doi:10.1016/j.bbr.2012.07.002
- Miranda-Morales, R. S., Molina, J. C., Spear, N. E., & 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. *Physiology & Behavior*, *101*(1), 153–60. doi:10.1016/j.physbeh.2010.04.033
- Moffett, M. C., Vicentic, a, Kozel, M., Plotsky, P., Francis, D. D., & Kuhar, M. J. (2007). Maternal separation alters drug intake patterns in adulthood in rats. *Biochemical Pharmacology*, *73*(3), 321–30. doi:10.1016/j.bcp.2006.08.003

- Molina, J. C., & Chotro, M. G. (1989). Acute Alcohol-Intoxication Paired with Appetitive Reinforcement - Effects Upon Ethanol Intake in Infant Rats. *Behavioral and Neural Biology*, 51, 326–345. Retrieved from ISI:A1989U338700003
- Morean, M. E., Corbin, W. R., & Fromme, K. (2012). Age of First Use and Delay to First Intoxication in Relation to Trajectories of Heavy Drinking and Alcohol-Related Problems During Emerging Adulthood. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. doi:10.1111/j.1530-0277.2012.01812.x
- Mulassi, A. H., Hadid, C., Borracci, R. A., Labruna, M. C., Picarel, A. E., Robilotte, A. N., ... Masoli, O. (2010). [Eating habits, physical activity, smoking and alcohol consumption in adolescents attending school in the province of Buenos Aires]. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 108(1), 45–54. doi:10.1590/S0325-00752010000100009
- Naseer, M. I., Ullah, I., Rasool, M., Ansari, S. A., Sheikh, I. A., Bibi, F., ... Al-Qahtani, M. H. (2014). Downregulation of dopamine D1 receptors and increased neuronal apoptosis upon ethanol and PTZ exposure in prenatal rat cortical and hippocampal neurons. *Neurological Sciences : Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. doi:10.1007/s10072-014-1812-7
- Nash, S. M., Weaver, M. S., Cowen, C. L., Davis, S. F., & Tramill, J. L. (1984). Taste preference of the adult rat as a function of prenatal exposure to ethanol. *The Journal of General Psychology*, 110(1st Half), 129–35. doi:10.1080/00221309.1984.9709956
- Nestler, E. J. (2008). Review. Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 363(1507), 3245–55. doi:10.1098/rstb.2008.0067
- Nestler, E. J. (2013). Cellular basis of memory for addiction. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 15(4), 431–43. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3898681&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Nizhnikov, M. E., Pautassi, R. M., Carter, J. M., Landin, J. D., Varlinskaya, E. I., Bordner, K. A., ... Spear, N. E. (2014). Brief Prenatal Ethanol Exposure Alters Behavioral Sensitivity to the Kappa Opioid Receptor Agonist (U62,066E) and Antagonist (Nor-BNI) and Reduces Kappa Opioid Receptor Expression. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research, 103*(3), 622–630. doi:10.1111/acer.12416
- Nizhnikov, M. E., Pautassi, R. M., Truxell, E., & Spear, N. E. (2009). Opioid antagonists block the acquisition of ethanol-mediated conditioned tactile preference in infant rats. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.), 43*(5), 347–58. doi:10.1016/j.alcohol.2009.06.001
- Nizhnikov, M. E., Varlinskaya, E. I., & Spear, N. E. (2006). Reinforcing Effects of Central Ethanol Injections in Newborn Rat Pups. *Alcohol, 30*(12), 2089–2096. doi:10.1111/j.1530-0277.2006.00253.x
- Norström, T., & Pape, H. (2012). Associations between adolescent heavy drinking and problem drinking in early adulthood: implications for prevention. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs, 73*(4), 542–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22630792>
- Nylander, I., & Roman, E. (2013). Is the rodent maternal separation model a valid and effective model for studies on the early-life impact on ethanol consumption? *Psychopharmacology, 229*(4), 555–69. doi:10.1007/s00213-013-3217-3
- Oades, R. D., & Halliday, G. M. (1987). Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Research, 434*(2), 117–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3107759>
- Panksepp, J., & Burgdorf, J. (2003). “Laughing” rats and the evolutionary antecedents of human joy? *Physiology & Behavior, 79*, 533 – 547. doi:10.1016/S0031-9384(03)00159-8
- Parker, L. A. (2014). Conditioned flavor avoidance and conditioned gaping: rat models of conditioned nausea. *European Journal of Pharmacology, 722*, 122–33. doi:10.1016/j.ejphar.2013.09.070

- Pascual, M., Blanco, A. M., Cauli, O., Minarro, J., & Guerri, C. (2007). Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *European Journal of Neuroscience*, *25*, 541–550. Retrieved from ISI:000244783000024
- 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. *Journal of Neurochemistry*, *108*(4), 920–31. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05835.x
- Pautassi, R. M., Arias, C., Molina, J. C., & Spear, N. (2008). Domperidone interferes with conditioned disgust reactions but not taste avoidance evoked by a LiCl-paired taste in infant rats. *Dev Psychobiol*, *50*(4), 343–352. doi:10.1002/dev.20288
- Pautassi, R. M., Camarini, R., Quadros, I. M., Miczek, K. a, & Israel, Y. (2010). Genetic and Environmental Influences on Ethanol Consumption: Perspectives From Preclinical Research. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *34*(6). doi:10.1111/j.1530-0277.2010.01172.x
- Pautassi, R. M., Nizhnikov, M. E., Acevedo, M. B., & Spear, N. E. (2012). Early role of the  $\kappa$  opioid receptor in ethanol-induced reinforcement. *Physiology & Behavior*, *105*(5), 1231–41. doi:10.1016/j.physbeh.2012.01.003
- Pautassi, R. M., Nizhnikov, M. E., Fabio, M. C., & Spear, N. E. (2011). An acetaldehyde-sequestering agent inhibits appetitive reinforcement and behavioral stimulation induced by ethanol in preweanling rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *97*(3), 462–9. doi:10.1016/j.pbb.2010.10.005
- Pautassi, R. M., Nizhnikov, M. E., Fabio, M. C., & Spear, N. E. (2012). Early maternal separation affects ethanol-induced conditioning in a nor-BNI insensitive manner, but does not alter ethanol-induced locomotor activity. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *100*(3), 630–8. doi:10.1016/j.pbb.2011.11.005
- Pautassi, R. M., Nizhnikov, M. E., & Spear, N. E. (2009). Assessing appetitive, aversive, and negative ethanol-mediated reinforcement through an immature rat model.



*Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33(6), 953–74.  
doi:10.1016/j.neubiorev.2009.03.008

- Pautassi, R. M., Nizhnikov, M. E., Spear, N. E., & Molina, J. C. (2012). Prenatal ethanol exposure leads to greater ethanol-induced appetitive reinforcement. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 46(6), 585–93. doi:10.1016/j.alcohol.2012.05.004
- Pautassi, R. M., Sanders, S., Miller, S., Spear, N., & Molina, J. C. (2006). Early ethanol's anxiolytic effects assessed through an unconditional stimulus revaluation procedure. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 30(3), 448–59. doi:10.1111/j.1530-0277.2006.00049.x
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. The new coronal set. 5th Edition. Amsterdam: Elsevier; 2007
- Pepino, M. Y., Abate, P., Spear, N. E., & Molina, J. C. (2004). Heightened Ethanol Intake in Infant and Adolescent Rats After Nursing Experiences With an Ethanol- Intoxicated Dam. *Control*, 28(6), 895–905. doi:10.1097/01.ALC.0000128223.95184.C9
- Peters, J., LaLumiere, R. T., & Kalivas, P. W. (2008). Infralimbic prefrontal cortex is responsible for inhibiting cocaine seeking in extinguished rats. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(23), 6046–53. doi:10.1523/JNEUROSCI.1045-08.2008
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.
- Pilatti, A., Caneto, F., Garimaldi, J. A., Vera, B. D. V., & Pautassi, R. M. (2014). Contribution of time of drinking onset and family history of alcohol problems in alcohol and drug use behaviors in Argentinean college students. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 49(2), 128–37. doi:10.1093/alcalc/agt176
- Pilatti, A., Godoy, J. C., Brussino, S., & Pautassi, R. M. (2013). Underage drinking: prevalence and risk factors associated with drinking experiences among Argentinean children. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 47(4), 323–31. doi:10.1016/j.alcohol.2013.02.001

- Pisu, M. G., Mostallino, M. C., Dore, R., Maciocco, E., Secci, P. P., & Serra, M. (2011). Effects of voluntary ethanol consumption on emotional state and stress responsiveness in socially isolated rats. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 21(5), 414–25. doi:10.1016/j.euroneuro.2010.07.006
- Pitkänen, T., Lyyra, A.-L., & 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 (Abingdon, England)*, 100(5), 652–61. doi:10.1111/j.1360-0443.2005.01053.x
- Ploj, K. (2003). Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male wistar rats. *Neuroscience*, 121(3), 787–799. doi:10.1016/S0306-4522(03)00499-8
- Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 18(3), 195–200. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8497182>
- Plotsky, P. M., Thirivikraman, K. V, Nemeroff, C. B., Caldji, C., Sharma, S., & Meaney, M. J. (2005). Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 30(12), 2192–204. doi:10.1038/sj.npp.1300769
- Pohorecky, L. A. (1981). The interaction of alcohol and stress. A review. *Neurosci Biobehav.Rev.*, 5, 209–229. Retrieved from PM:6115346
- Pohorecky, L. A. (2008). Psychosocial stress and chronic ethanol ingestion in male rats: effects on elevated plus maze behavior and ultrasonic vocalizations. *Physiology & Behavior*, 94(3), 432–47. doi:10.1016/j.physbeh.2008.02.010
- Ponce, L. F., Pautassi, R. M., Spear, N. E., & Molina, J. C. (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, 1039–1050.

- Ponce, L. F., Pautassi, R. M., Spear, N. E., & Molina, J. C. (2008). Ethanol-mediated operant learning in the infant rat leads to increased ethanol intake during adolescence. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *90*(4), 640–50. doi:10.1016/j.pbb.2008.05.007
- Pueta, M., Rovasio, R. A., Abate, P., Spear, N. E., & Molina, J. C. (2011). Prenatal and postnatal ethanol experiences modulate consumption of the drug in rat pups, without impairment in the granular cell layer of the main olfactory bulb. *Physiology & Behavior*, *102*(1), 63–75. doi:10.1016/j.physbeh.2010.10.009
- Randall, C. L., Hughes, S. S., Williams, C. K., & Anton, R. F. (1983). Effect of prenatal alcohol exposure on consumption of alcohol and alcohol-induced sleep time in mice. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *18 Suppl 1*, 325–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6685299>
- Randall, S., & Hannigan, J. . (1999). In Utero Alcohol and Postnatal Methylphenidate. *Neurotoxicology and Teratology*, *21*(5), 587–593. doi:10.1016/S0892-0362(99)00017-3
- Reyes, E., Garcia, K. D., & Jones, B. C. (1985). Effects of the maternal consumption of alcohol on alcohol selection in rats. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, *2*(2), 323–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4015853>
- Reynolds, S. M., & Berridge, K. C. (2002). Positive and Negative Motivation in Nucleus Accumbens Shell: Bivalent Rostrocaudal Gradients for GABA-Elicited Eating, Taste “Liking”/“Disliking” Reactions, Place Preference/Avoidance, and Fear. *J. Neurosci.*, *22*(16), 7308–7320. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/22/16/7308.long>
- Riley, A. L. (2011). The paradox of drug taking: the role of the aversive effects of drugs. *Physiology & Behavior*, *103*(1), 69–78. doi:10.1016/j.physbeh.2010.11.021
- Risinger, F. O., & Cunningham, C. L. (1992). Genetic differences in ethanol-induced hyperglycemia and conditioned taste aversion. *Life Sci*, *50*, L113–L118. Retrieved from PM:1552827

- Ristuccia, R. C., & Spear, L. P. (2004). Adolescent ethanol sensitivity: Hypothermia and acute tolerance. *Adolescent Brain Development: Vulnerabilities and Opportunities*, 1021, 445–447. Retrieved from ISI:000222980100058
- Ristuccia, R. C., & Spear, L. P. (2005). Sensitivity and tolerance to autonomic effects of ethanol in adolescent and adult rats during repeated vapor inhalation sessions. *Alcohol Clin Exp Res*, 29(10), 1809–1820.
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 18(3), 247–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8401595>
- Robison, A. J., & Nestler, E. J. (2011). Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nature Reviews. Neuroscience*, 12(11), 623–37. doi:10.1038/nrn3111
- Roman, E., Ploj, K., & Nylander, I. (2004). Maternal separation has no effect on voluntary ethanol intake in female Wistar rats. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 33(1), 31–9. doi:10.1016/j.alcohol.2004.04.002
- Romano-López, A., Méndez-Díaz, M., Ruiz-Contreras, A. E., Carrisoza, R., & Prospéro-García, O. (2012). Maternal separation and proclivity for ethanol intake: a potential role of the endocannabinoid system in rats. *Neuroscience*, 223, 296–304. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.07.071
- Rothman, E. F., Edwards, E. M., Heeren, T., & Hingson, R. W. (2008). Adverse childhood experiences predict earlier age of drinking onset: results from a representative US sample of current or former drinkers. *Pediatrics*, 122(2), e298–304. doi:10.1542/peds.2007-3412
- Ruginsk, S. G., Uchoa, E. T., Elias, L. L. K., & Antunes-Rodrigues, J. (2010). CB(1) modulation of hormone secretion, neuronal activation and mRNA expression following extracellular volume expansion. *Experimental Neurology*, 224(1), 114–22. doi:10.1016/j.expneurol.2010.03.001

- Ryabinin, A. E. (1998). Role of hippocampus in alcohol-induced memory impairment: implications from behavioral and immediate early gene studies. *Psychopharmacology*, *139*, 34–43. Retrieved from ISI:000075912400004
- Saalfeld, J., & Spear, L. (2014). Developmental differences in the effects of alcohol and stress on heart rate variability. *Physiology & Behavior*, *135*, 72–80. doi:10.1016/j.physbeh.2014.05.037
- Sakharkar, A. J., Tang, L., Zhang, H., Chen, Y., Grayson, D. R., & Pandey, S. C. (2014). Effects of acute ethanol exposure on anxiety measures and epigenetic modifiers in the extended amygdala of adolescent rats. *The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, *17*(12), 2057–67. doi:10.1017/S1461145714001047
- Santini, E., Quirk, G. J., & Porter, J. T. (2008). Fear conditioning and extinction differentially modify the intrinsic excitability of infralimbic neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(15), 4028–36. doi:10.1523/JNEUROSCI.2623-07.2008
- Sartor, C. E., Agrawal, A., Lynskey, M. T., Bucholz, K. K., Madden, P. A. F., & Heath, A. C. (2009). Drug and Alcohol Dependence. *Drug and Alcohol Dependence*, *102*, 49–55. doi:10.1016/j.drugalcdep.2008.12.013
- Sartor, C. E., Lynskey, M. T., Bucholz, K. K., Madden, P. A. F., Martin, N. G., & Heath, A. C. (2009). Timing of first alcohol use and alcohol dependence: evidence of common genetic influences. *Addiction (Abingdon, England)*, *104*(9), 1512–8. doi:10.1111/j.1360-0443.2009.02648.x
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–82. doi:10.1038/nmeth.2019
- Schramm-Sapyta, N. L., Cha, Y. M., Chaudhry, S., Wilson, W. A., Swartzwelder, H. S., & Kuhn, C. M. (2007). Differential anxiogenic, aversive, and locomotor effects of THC in

adolescent and adult rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 191(4), 867–877. doi:10.1007/s00213-006-0676-9

Schramm-Sapyta, N. L., DiFeliceantonio, A. G., Foscue, E., Glowacz, S., Haseeb, N., Wang, N., ... Kuhn, C. M. (2010). Aversive effects of ethanol in adolescent versus adult rats: potential causes and implication for future drinking. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 34(12), 2061–9. doi:10.1111/j.1530-0277.2010.01302.x

Schramm-Sapyta, N. L., Kingsley, M. A., Rezvani, A. H., Propst, K., Swartzwelder, H. S., & Kuhn, C. M. (2008). Early ethanol consumption predicts relapse-like behavior in adolescent male rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res*, 32, 754–762.

SED RONAR. Encuesta Nacional sobre consumo de sustancias psicoactivas en estudiantes del Nivel Medio. Buenos Aires: Secretaría de Programación para la Prevención de la Drogadicción y la Lucha contra el Narcotráfico; 2011

Semenova, S. (2012). Attention, impulsivity, and cognitive flexibility in adult male rats exposed to ethanol binge during adolescence as measured in the five-choice serial reaction time task: the effects of task and ethanol challenges. *Psychopharmacology*, 219(2), 433–42. doi:10.1007/s00213-011-2458-2

Sickmann, H. M., Patten, A. R., Morch, K., Sawchuk, S., Zhang, C., Parton, R., ... Christie, B. R. (2014). Prenatal ethanol exposure has sex-specific effects on hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus*, 24(1), 54–64. doi:10.1002/hipo.22203

Siegmund, S., Vengeliene, V., Singer, M. V., & Spanagel, R. (2005). Influence of Age at Drinking Onset on Long-Term Ethanol Self-Administration With Deprivation and Stress Phases. *Alcohol*, 29(7), 1139–1145. doi:10.1097/01.ALC.0000171928.40418.46

Silveri, M. M., & Spear, L. P. (1998). Decreased sensitivity to the hypnotic effects of ethanol early in ontogeny. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 22(3), 670–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9622449>

Silveri, M. M., & Spear, L. P. (1999). Ontogeny of Rapid Tolerance to the Hypnotic Effects of Ethanol, 23(7), 1180–1184.

- Silveri, M. M., & Spear, L. P. (2000). Ontogeny of ethanol elimination and ethanol-induced hypothermia. *Alcohol*, *20*, 45–53.
- Simms, J. A., Steensland, P., Medina, B., Abernathy, K. E., Chandler, L. J., Wise, R., & Bartlett, S. E. (2008). Intermittent access to 20% ethanol induces high ethanol consumption in Long-Evans and Wistar rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *32*(10), 1816–23. doi:10.1111/j.1530-0277.2008.00753.x
- Sobrian, S. K., Jones, B. L., James, H., Kamara, F. N., & Holson, R. R. (2005). Prenatal ethanol preferentially enhances reactivity of the dopamine D1 but not D2 or D3 receptors in offspring. *Neurotoxicology and Teratology*, *27*(1), 73–93. doi:10.1016/j.ntt.2004.09.002
- Spanagel, R. (2000). Recent animal models of alcoholism. *Alcohol Research & Health : The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, *24*(2), 124–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11199279>
- Spanagel, R., & Holter, S. M. (1999). Long-term alcohol self-administration with repeated alcohol deprivation phases: an animal model of alcoholism? *Alcohol and Alcoholism*, *34*(2), 231–243. doi:10.1093/alcalc/34.2.231
- Spanagel, R., Noori, H. R., & Heilig, M. (2014). Stress and alcohol interactions: animal studies and clinical significance. *Trends in Neurosciences*, *37*(4), 219–27. doi:10.1016/j.tins.2014.02.006
- Spear, L. P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *24*(4), 417–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10817843>
- Spear, L. P., & Varlinskaya, E. I. (2005). Adolescence. Alcohol sensitivity, tolerance, and intake. *Recent Developments in Alcoholism : An Official Publication of the American Medical Society on Alcoholism, the Research Society on Alcoholism, and the National Council on Alcoholism*, *17*, 143–59. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15789864>

- Spear, L. P., & Varlinskaya, E. I. (2010). Sensitivity to ethanol and other hedonic stimuli in an animal model of adolescence: implications for prevention science? *Developmental Psychobiology*, *52*(3), 236–43. doi:10.1002/dev.20457
- Spear, N. E., & Molina, J. C. (2005). Fetal or infantile exposure to ethanol promotes ethanol ingestion in adolescence and adulthood: a theoretical review. *Alcohol Clin Exp Res*, *29*, 909–929.
- Spivey, J., Barrett, D., Padilla, E., & Gonzalez-Lima, F. (2008). Mother-infant separation leads to hypoactive behavior in adolescent Holtzman rats. *Behavioural Processes*, *79*(1), 59–65. doi:10.1016/j.beproc.2008.05.002
- Steinberg, L. (2004). Risk Taking in Adolescence: What Changes, and Why? *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1021*, 51–58. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1308.005>
- Stolle, M., Sack, P.-M., & Thomasius, R. (2009). Binge drinking in childhood and adolescence: epidemiology, consequences, and interventions. *Deutsches Ärzteblatt International*, *106*(19), 323–8. doi:10.3238/arztebl.2009.0323
- Stone, E. A., & Quartermain, D. (1997). Greater behavioral effects of stress in immature as compared to mature male mice. *Physiology & Behavior*, *63*(1), 143–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9402627>
- Sun, W., & Rebec, G. V. (2006). Repeated cocaine self-administration alters processing of cocaine-related information in rat prefrontal cortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(30), 8004–8. doi:10.1523/JNEUROSCI.1413-06.2006
- Tarazi, F. I., & Baldessarini, R. J. (2000). Comparative postnatal development of dopamine D(1), D(2) and D(4) receptors in rat forebrain. *Int. J. Dev. Neurosci*, *18*(1), 29–37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10708903>
- Thorsell, A., Slawecki, C. J., Khoury, A., Mathe, A. A., & Ehlers, C. L. (2005). Effect of social isolation on ethanol consumption and substance P / neurokinin expression in Wistar rats. *Analysis*, *36*, 91–97. doi:10.1016/j.alcohol.2005.07.003



- Truxell, E. M., Molina, J. C., & Spear, N. E. (2007). Ethanol intake in the juvenile, adolescent, and adult rat: effects of age and prior exposure to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*, *31*(5), 755–765. doi:10.1111/j.1530-0277.2007.00358.x
- Tzschentke, & Schmidt. (1999). Tzschentke and schmidt reply. *Trends Pharmacol Sci*, *20*, 189–190.
- Van den Wildenberg, E., Beckers, M., van Lambaart, F., Conrod, P. J., & Wiers, R. W. (2006). Is the strength of implicit alcohol associations correlated with alcohol-induced heart-rate acceleration? *Alcohol Clin Exp Res*, *30*(8), 1336–1348. doi:10.1111/j.1530-0277.2006.00161.x
- Vanderschuren, L. J., Stein, E. A., Wiegant, V. M., & Van Ree, J. M. (1995). Social isolation and social interaction alter regional brain opioid receptor binding in rats. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, *5*(2), 119–27. doi:10.1016/0924-977X(95)00010-M
- Varlinskaya, E. I., Doremus-Fitzwater, T. L., & Spear, L. P. (2010). Repeated restraint stress alters sensitivity to the social consequences of ethanol in adolescent and adult rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *96*(2), 228–35. doi:10.1016/j.pbb.2010.05.011
- Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2012). Increases in anxiety-like behavior induced by acute stress are reversed by ethanol in adolescent but not adult rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *100*(3), 440–50. doi:10.1016/j.pbb.2011.10.010
- Varlinskaya, E. I., Spear, L. P., & Spear, N. E. (1999). Social behavior and social motivation in adolescent rats: role of housing conditions and partner's activity. *Physiol Behav*, *67*, 475–482.
- Varlinskaya, E. I., Truxell, E. M., & Spear, L. P. (2013). Repeated restraint stress alters sensitivity to the social consequences of ethanol differentially in early and late adolescent rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *113*, 38–45. doi:10.1016/j.pbb.2013.10.016

- Vazquez, V., Penit-Soria, J., Durand, C., Besson, M. J., Giros, B., & Dauge, V. (2006). Brief early handling increases morphine dependence in adult rats. *Behav Brain Res*, *170*, 211–218. Retrieved from PM:16567006
- Vetter, C. S., Doremus-Fitzwater, T. L., & Spear, L. P. (2007). Time course of elevated ethanol intake in adolescent relative to adult rats under continuous, voluntary-access conditions. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *31*(7), 1159–68. doi:10.1111/j.1530-0277.2007.00417.x
- Vidal-Gonzalez, I., Vidal-Gonzalez, B., Rauch, S. L., & Quirk, G. J. (2006). Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *13*(6), 728–33. doi:10.1101/lm.306106
- Vilpoux, C., Warnault, V., Pierrefiche, O., Daoust, M., & Naassila, M. (2009). Ethanol-sensitive brain regions in rat and mouse: a cartographic review, using immediate early gene expression. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *33*(6), 945–69. doi:10.1111/j.1530-0277.2009.00916.x
- Volman, S. F., Lammel, S., Margolis, E. B., Kim, Y., Richard, J. M., Roitman, M. F., & Lobo, M. K. (2013). New insights into the specificity and plasticity of reward and aversion encoding in the mesolimbic system. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(45), 17569–76. doi:10.1523/JNEUROSCI.3250-13.2013
- Walker, B. M., & Ehlers, C. L. (2009). Age-related differences in the blood alcohol levels of Wistar rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *91*(4), 560–5. doi:10.1016/j.pbb.2008.09.017
- Willey, A. R., & Spear, L. P. (2013). Effects of acute ethanol administration and chronic stress exposure on social investigation and 50kHz ultrasonic vocalizations in adolescent and adult male Sprague-Dawley rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *105*, 17–25. doi:10.1016/j.pbb.2013.01.012

- Windle, M., & Windle, R. C. (2012). Early onset problem behaviors and alcohol, tobacco, and other substance use disorders in young adulthood. *Drug and Alcohol Dependence*, *121*(1-2), 152–8. doi:10.1016/j.drugalcdep.2011.08.024
- Winer BJ (1991). *Statistical principles in experimental design*, 2nd edition. New York: McGraw–Hill.
- 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
- Xu, L., Sun, Y., Gao, L., Cai, Y.-Y., & Shi, S.-X. (2014). Prenatal restraint stress is associated with demethylation of corticotrophin releasing hormone (CRH) promoter and enhances CRH transcriptional responses to stress in adolescent rats. *Neurochemical Research*, *39*(7), 1193–8. doi:10.1007/s11064-014-1296-0
- Yates, W. R., Cadoret, R. J., Troughton, E. P., Stewart, M., & Giunta, T. S. (1998). Effect of fetal alcohol exposure on adult symptoms of nicotine, alcohol, and drug dependence. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *22*(4), 914–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660322>
- Young-Wolff, K. C., Kendler, K. S., & Prescott, C. A. (2012). Shared genetic contributions to early-onset drinking and drinking to cope motives. *Addictive Behaviors*, *37*(10), 1176–80. doi:10.1016/j.addbeh.2012.05.009
- Yu, Z.-Y., Wang, W., Fritschy, J.-M., Witte, O. W., & Redecker, C. (2006). Changes in neocortical and hippocampal GABAA receptor subunit distribution during brain maturation and aging. *Brain Research*, *1099*(1), 73–81. doi:10.1016/j.brainres.2006.04.118
- Zhang, S., & Cranney, J. (2008). The Role of GABA and Anxiety in the Reconsolidation of Conditioned Fear. *Behavioral Neuroscience*, *122*(6), 1295–1305. doi:10.1037/a0013273
- Zhou, R., Wang, S., & Zhu, X. (2012). Prenatal ethanol exposure alters synaptic plasticity in the dorsolateral striatum of rat offspring via changing the reactivity of dopamine receptor. *PloS One*, *7*(8), e42443. doi:10.1371/journal.pone.0042443

Zimmerberg, B., Kim, J. H., Davidson, A. N., & Rosenthal, A. J. (2003). Early deprivation alters the vocalization behavior of neonates directing maternal attention in a rat model of child neglect. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1008, 308–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14998903>