



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE HUMANIDADES Y
CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS CON EL
CONSUMO DE ALCOHOL EN RATAS
ROMANAS DE ALTA (RHA-I) Y BAJA (RLA-I)
EVITACIÓN

PRESENTADA POR:
LIDIA MANZO RODRÍGUEZ

DIRIGIDA POR:
DRA. DÑA. CARMEN TORRES BARES
DR. D. JOSÉ E. CALLEJAS AGUILERA

JAÉN, 2 DE NOVIEMBRE DE 2012

ISBN 978-84-8439-694-9



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación
Departamento de Psicología
Área de Psicobiología

**Factores de riesgo asociados con el consumo de alcohol
en ratas Romanas de Alta (RHA-I) y Baja (RLA-I)
Evitación**

TESIS DOCTORAL

Lidia Manzo Rodríguez

Tesis Doctoral dirigida por:

Dra. Carmen Torres Bares y Dr. José E. Callejas Aguilera.

Jaén, 2012

A mis padres M^a Socorro y Miguel,

A mi esposo y mis hijos por su amor y confianza

AGRADECIMIENTOS

Empezaré por agradecer mi estancia en la Universidad de Jaén por permitirme el acceso a sus instalaciones para la realización de este trabajo, y por aprender entre muchas otras cosas que se valoran en la distancia, el valor infinito de la amistad, la bondad y humanidad mostrada hacia mi persona, por ello me permito agradecer el compartir gratos momentos de mi trabajo en este lugar con personas excelentes a quienes nunca olvidaré.

Ante todo quiero agradecer a mis directores de Tesis, a Carmen mujer excepcional y científica inigualable, por su compromiso, constante guía, enseñanza y paciencia en estos años de trabajo. A José Enrique gran profesional e investigador, por su enseñanza y apoyo mostrado en todo momento pero sobre todo por hacer de la ciencia una tarea más llevadera con su buen sentido del humor.

A María José a quién considero una gran amiga, por compartir sus conocimientos conmigo, por su ayuda constante en todo momento en el laboratorio, por enseñarme el valor de la ética en la ciencia y en todo procedimiento derivado de ella, pero más que nada por su cariño y confianza mostrada durante la realización de este trabajo. De igual manera quiero agradecer a Juanma por su genialidad como investigador y catedrático, su buen trato y afecto durante mi estancia en su grupo de investigación.

A Alberto excelente científico y persona de gran calidad humana, a quién debo tanto en la culminación de esta Tesis. De igual manera agradezco a Toni, Gloria y Regina mis tres amigos catalanes con quienes pasé los mejores momentos en el laboratorio de psiquiatría y psicología animal de la UAB, les recordaré siempre. A Ester, Cira y Fina por su amistad y cariño. A sí mismo a Heela y Juan Beauquis compañeros entrañables en todo momento por su enseñanza, cariño y solidaridad mostrada, gracias a todos.

A Marta, Rocío y Pepi, por su ayuda constante en la realización de este trabajo.

Agradezco a las personas más importantes en mi vida, mi familia, en especial a mis padres Ma. Socorro y Miguel por su gran amor y confianza demostrada en todo momento durante mi ausencia. A mi esposo Nemecio, mis hijos Andrea Celeste, Marco Vinicio y Aída Inés por su espera y amor incondicional durante estos años de dolorosa separación en la realización de este trabajo de Tesis.

A mis hermanas Lourdes, Rosita y Ale, por el cuidado de mis padres e hijos en todo este tiempo de espera interminable, y a mis demás hermanos por su solidaridad en todo momento, sin ustedes esto no tendría ningún significado.

De manera muy especial agradezco a Eloísa, por su bondad, ternura y hospitalidad y por hacer de mi estancia en Jaén un bello recuerdo. A María Teresa y Filo por compartir conmigo momentos gratos, a todas les llevaré siempre en mis pensamientos.

A mis queridas amigas Nicaragüenses: Sugei, Jilma y Alba Mara por su cariño y charlas que disfruté en su compañía. A Maru, por su alegría, amor, confianza y ayuda en superar los obstáculos del día a día en tan lejano continente. A Moni, excelente y bella compañera con quién compartí buenos y gratos momentos, a todas ustedes amigas Latinoamericanas, mis mejores recuerdos.

A Aurora, coordinadora del programa de becas PROMEP por el apoyo recibido desde el inicio hasta la terminación de este trabajo de investigación Doctoral en la obtención de los recursos económicos, mil gracias.

Finalmente agradezco de manera general a todos los que me brindaron su apoyo constante, de no ser así jamás hubiera podido concluir esta Tesis.

A las ratas Romanas por sus vidas tan valiosas en esta investigación, por mostrarse a la altura de sus genes y confirmar las hipótesis propuestas en este trabajo de Tesis.

Este trabajo fue financiado por el programa de becas para profesores universitarios, Programa de Mejoramiento para Profesores (PROMEP), por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, (beca número 200 PROMEP). Junta de Andalucía (Grant HUM-642), Ministerio de Ciencia e Innovación (Grants PSI2010-15787 and PSI2009-10532), y Fundació la MARATÓ TV3 (Grant 092630/31). La donación de las ratas Romanas fue realizada por el Dr. Alberto Fernández Teruel de la Universidad Autónoma de Barcelona en colaboración con la Universidad de Jaén.

RESUMEN

La adicción al alcohol es un trastorno conductual complejo que, al igual que otras enfermedades mentales, es el resultado de la interacción entre determinantes genéticos, rasgos de personalidad y experiencias ambientales estresantes, entre otros factores. La prevalencia del consumo de esta sustancia representa un coste sanitario muy importante para la sociedad, y es considerado responsable de favorecer la aparición de enfermedades y de provocar la muerte prematura en seres humanos. Este trastorno se caracteriza por su carácter crónico, compulsivo e incontrolable, acompañándose de fenómenos de tolerancia, dependencia física, deseo compulsivo (*craving*) y recaídas.

En la actualidad existen modelos animales que han resultado ser esenciales para la comprensión de los mecanismos neurobiológicos implicados en los procesos de adicción. Una de las estrategias de investigación consiste en el empleo de animales seleccionados y criados en función de ciertas disposiciones comportamentales vinculadas directa e indirectamente con el consumo de sustancias adictivas. Este es el caso de las ratas Romanas consanguíneas de Alta (RHA-I) y Baja (RLA-I) Evitación, las cuales muestran diferencias fenotípicas relacionadas con su impulsividad (mayor en la cepa RHA-I que en la cepa RLA-I), con su facilidad para autoadministrarse drogas de abuso o consumirlas de forma espontánea (mayor en la cepa RHA-I que en la cepa RLA-I), con su reactividad emocional (mayor en la cepa RLA-I que en la cepa RHA-I), y con su tendencia a mostrar comportamientos relacionados con el rasgo conductual de búsqueda de novedad (mayor en la cepa RHA-I que en la cepa RLA-I), un rasgo repetidamente asociado con la adicción. Esta evidencia sugiere que las ratas Romanas constituyen un modelo animal útil para analizar algunos de los factores de riesgo asociados con el consumo de alcohol, una afirmación que define el objetivo fundamental de la presente Tesis Doctoral. Así, en una primera fase se analizó si existe relación entre el rasgo conductual de búsqueda de novedad y el consumo espontáneo de alcohol en estos animales. Para ello se realizó un experimento dirigido a establecer las condiciones experimentales idóneas para detectar diferencias de cepa en consumo voluntario de etanol (Estudio 1), se procedió a validar las tres pruebas de novedad que se iban a utilizar para evaluar este rasgo comportamental (Estudio 2) y se realizó un estudio final que puso en relación estas conductas (consumo espontáneo de alcohol, búsqueda de novedad) en las ratas Romanas (Estudio 3). La Fase II de esta Tesis Doctoral tuvo como objetivo analizar el impacto de experiencias ambientales negativas relacionadas con pérdida de reforzamiento sobre el consumo voluntario de alcohol, tratando de analizar

en qué medida estas experiencias pueden ser estresantes y precipitar el consumo en las ratas Romanas, y de qué forma dicho impacto puede depender de las características fenotípicas del animal. En el primero de los experimentos (Estudio 4) se establecieron las condiciones experimentales adecuadas para analizar el efecto de la frustración sobre el consumo de etanol, realizando un estudio con ratas Wistar que fueron sometidas a un procedimiento de CSN instrumental apetitivo, e inmediatamente después a una prueba de preferencia agua/alcohol (2%). Los resultados obtenidos en este estudio piloto sirvieron para planificar los experimentos 5 y 6, en los cuales se analizó el efecto de la omisión de una recompensa esperada (extinción) sobre el consumo de alcohol (2%) en ratas RLA-I y RHA-I, tanto en una prueba consumatoria (Estudio 5) como en una tarea instrumental (Estudio 6).

Los resultados obtenidos en la Fase I demostraron la existencia de diferencias de cepa en consumo voluntario de alcohol, unas diferencias que no dependieron del procedimiento experimental utilizado para presentar la droga (con aclimatación o sin aclimatación previa al alcohol). Asimismo, en esta Fase se confirmó la validez de las pruebas de novedad utilizadas y se constató que el programa de cruzamiento selectivo realizado con las ratas Romanas ha producido una selección bidireccional de rasgos que influyen en la propensión de los animales a mostrar conductas vinculadas con trastornos adictivos, tales como el consumo voluntario de etanol y las conductas de búsqueda de novedad, ambos rasgos relacionados y más preponderantes en la cepa RHA-I en comparación con la RLA-I. Por su parte, los resultados obtenidos en la Fase II demostraron que el impacto de una experiencia en omisión de recompensa (extinción instrumental) sobre el consumo voluntario de etanol (2%) en ratas RHA-I vs. RLA-I depende de las características genéticas de los animales, dado que sólo la cepa RLA-I aumentó su consumo de etanol después de dicha experiencia. Este resultado se observó tanto utilizando una tarea consumatoria (Estudio 5) como una prueba instrumental (Estudio 6). Asimismo, se comprobó que, en la prueba instrumental, la exposición de los animales a experiencias repetidas de frustración (reforzamiento parcial) anuló las diferencias de cepa observadas en los grupos sometidos a una fase de extinción tras haber recibido reforzamiento continuo, indicando que el efecto de la frustración sobre el consumo de alcohol depende no sólo de la cepa, sino también de la naturaleza específica de la experiencia frustrante. En su conjunto, estos resultados sugieren que ciertas experiencias ambientales estresantes vinculadas con experiencias de pérdida pueden constituir factores precipitantes en el consumo de sustancias adictivas en individuos genética y temperamentalmente vulnerables, poniendo de manifiesto la complejidad del fenómeno adictivo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aproximación neurobiológica al concepto de adicción.....	1
1.2 Factores de vulnerabilidad en la adicción: genes, rasgos de personalidad y experiencias ambientales	8
1.3 Las ratas romanas de alta y baja evitación: un modelo animal para el estudio de la conducta adictiva	13
OBJETIVOS E HIPOTESIS	23
FASE I: BÚSQUEDA DE NOVEDAD Y CONSUMO DE ALCOHOL.....	26
<i>ESTUDIO 1.</i>	26
<i>ESTUDIO 2.</i>	44
<i>ESTUDIO 3.</i>	56
FASE II: FRUSTRACIÓN Y CONSUMO DE ALCOHOL.....	79
<i>ESTUDIO 4.</i>	91
<i>ESTUDIO 5.</i>	101
<i>ESTUDIO 6.</i>	112
DISCUSIÓN GENERAL.....	131
CONCLUSIONES.....	141
REFERENCIAS.....	143

INTRODUCCIÓN

1.1 APROXIMACIÓN NEUROBIOLÓGICA AL CONCEPTO DE ADICCIÓN

La adicción a sustancias psicoactivas es un trastorno conductual que se caracteriza por su carácter crónico, compulsivo e incontrolable, acompañándose de fenómenos de tolerancia, dependencia física, deseo compulsivo (*craving*) y recaídas (LeMoal y Koob, 2007). Considerada por la opinión pública como reflejo de un carácter débil y falta de autocontrol (Ellenbroek, van der Kam, van der Elst y Cools, 2005), la mayoría de los científicos y clínicos que estudian esta alteración conductual coinciden en considerarla como un trastorno psicopatológico complejo que, al igual que otras enfermedades mentales, es el resultado de una compleja interacción entre predisposición genética y factores ambientales (Kabbaj, Evans, Watson y Akil, 2004), siendo el estudio de esta interacción uno de los campos de investigación más florecientes de la neurociencia actual.

De acuerdo al Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales de la Asociación Psiquiátrica Americana (DSM-IV, 2000), los criterios necesarios para diagnosticar un trastorno por *abuso* de sustancias psicoactivas son los siguientes:

A: Patrón desadaptativo de consumo de sustancias que conlleva un deterioro o malestar clínicamente significativos, expresado por uno (o más) de los siguientes síntomas:

1. Consumo recurrente de sustancias, que da lugar al incumplimiento de obligaciones en el trabajo, la escuela o en casa.
2. Consumo recurrente de la sustancia en situaciones en las que hacerlo es físicamente peligroso (por ejemplo, conduciendo un automóvil o manipulando maquinaria pesada).
3. Problemas legales repetidos relacionados con la sustancia (por ejemplo, arrestos por comportamiento escandaloso debido al consumo de la droga).
4. Consumo continuado de la sustancia a pesar de tener problemas sociales continuos o recurrentes o problemas interpersonales causados o exacerbados por los efectos de la misma.

B: Los síntomas no han cumplido nunca los criterios para la *dependencia* de sustancias.

El *abuso* puede ser considerado como una circunstancia de riesgo evolutivo al siguiente paso que es la *dependencia*, que constituye el cuadro más grave en relación con el consumo de sustancias psicoactivas. Esta fue definida por primera vez por la OMS en 1964

como un estado de intoxicación periódica crónica producida por el consumo repetido de una droga natural o sintética y caracterizado por: (a) deseo dominante de continuar tomando la droga y obtenerla por cualquier medio; (b) tendencia a aumentar la dosis; (c) dependencia física y generalmente psicológica, con síndrome de abstinencia por retirada de la droga; (d) efectos nocivos para el individuo y para la sociedad.

Según el criterio del DSM-IV (Anthony, Warner y Kessler, 1994), la característica esencial de la *dependencia* de sustancias consiste en un grupo de síntomas cognoscitivos, conductuales y fisiológicos que indican que el individuo continúa consumiendo la sustancia, a pesar de la aparición de problemas significativos relacionados con ella, existiendo un patrón de repetida autoadministración que a menudo conduce a tolerancia, a una clínica de abstinencia y a una ingestión compulsiva de la sustancia. Se trata de un patrón desadaptativo de consumo que conlleva un deterioro o malestar clínicamente significativo, expresado por tres o más de los síntomas siguientes en algún momento de un período continuado de 12 meses:

1.- Tolerancia, definida por cualquiera de los siguientes síntomas:

- (a) Una necesidad de cantidades marcadamente crecientes de la sustancia para conseguir la intoxicación o el efecto deseado.
- (b) El efecto de las mismas cantidades de sustancia disminuye claramente con su consumo continuado.

2.- Abstinencia, definida por cualquiera de los siguientes síntomas:

- (a) El síndrome de abstinencia característico para la sustancia.
- (b) Se administra la misma sustancia (u otra muy parecida) para aliviar o evitar los síntomas de abstinencia.

3.- La sustancia es administrada con frecuencia y en cantidades mayores o durante un período de tiempo más largo de lo que inicialmente se pretendía.

4.- Existe un deseo persistente o esfuerzos infructuosos de controlar o interrumpir el consumo de la sustancia.

5.- Se emplea mucho tiempo en actividades relacionadas con la obtención de la sustancia, en el consumo de la misma o en la recuperación de sus efectos.

6.- Reducción de importantes actividades sociales, laborales o recreativas debido al consumo de la sustancia.

7.- Se continúa administrando la sustancia a pesar de tener conciencia de problemas psicológicos o físicos recidivantes o persistentes, que parecen causados o exacerbados por el consumo de la sustancia.

La adicción a las drogas se caracteriza, por tanto, por un uso compulsivo de las mismas, acompañado de intentos repetidos para dejar de consumirlas con alta propensión a la recaída, incluso después de largos períodos de abstinencia (DeJong, 1994; Hyman y Malenka, 2001). *Nature Neuroscience* dedicó una monografía a la adicción a finales de 2005, en un intento por romper el estigma y la falsa idea de sujetos adictos sanados por la sociedad (Dackis y O'Brien, 2005). De acuerdo con las estadísticas de Health-Key Data (2002), en la Unión Europea, la marihuana fue la droga ilícita con más alta prevalencia en los últimos 12 meses (1.9%, variando entre los estados miembros). La prevalencia entre los jóvenes fue aproximadamente el doble de la prevalencia registrada entre los adultos. El uso de otras drogas adictivas fue de alrededor del 1% en la población general de todos los estados miembros, y menos del 5% entre los adultos más jóvenes. En relación con el alcohol, es bien sabido que su consumo es muy común en la sociedad, y que genera importantes costes sociosanitarios. De acuerdo con un informe de la RAND Corporation (Horlings y Scoggins, 2006), el 85% de los europeos adultos mayores de 16 años consumen un poco de alcohol, mientras que un 15% podrían ser considerados como grandes bebedores. Según este mismo informe, el consumo de alcohol entre la población general varía entre los estados: el 51% de los irlandeses son bebedores regulares de alcohol, seguidos por el 44% de los ingleses y el 43% de los daneses. El promedio en la Unión Europea es del 25%, mientras que los italianos tienen la tasa más baja con sólo un 12%. Según datos del último informe del Observatorio Español sobre Drogas (2010), aproximadamente un tercio de los adultos españoles son fumadores, la mayoría de la población (84,4%) consume bebidas alcohólicas esporádica o habitualmente (siendo frecuentes los episodios de intoxicación etílica aguda entre los jóvenes), la prevalencia anual de consumo de cocaína en estudiantes se situó en el 7,2% en 2004, y el consumo habitual (e incluso diario) de cannabis está bastante extendido en la población española. En la Unión Europea el alcohol es el tercer factor de riesgo responsable de contraer enfermedades después del tabaco y la obesidad, y se relaciona con el 11% de los casos de muerte prematura en hombres. En este contexto, establecer los mecanismos que determinan la conducta adictiva constituye un paso crucial en el diseño de nuevas intervenciones preventivas en la comunidad que reduzcan el impacto de este problema social y médico.

A pesar de estos datos epidemiológicos, se sabe que sólo un porcentaje reducido de los individuos que tienen experiencia con sustancias con potencial adictivo desarrollan un trastorno de dependencia de acuerdo con los criterios del DSM-IV previamente comentados (Anthony *et al.*, 1994). En efecto, numerosos estudios ponen de manifiesto, por ejemplo, que el porcentaje de adicción a una droga de abuso, de entre las personas que la han probado alguna vez, aumenta en el orden siguiente: alcohol (12%), cocaína (35%), cannabis (36%), opiáceos (43%) y tabaco (50%), siendo esta última la sustancia con más potencial adictivo (Ellenbroek *et al.*, 2005; LeMoal y Koob, 2007). Estos datos justifican la necesidad de identificar los factores que determinan que ciertos individuos tengan una mayor susceptibilidad o vulnerabilidad a desarrollar un trastorno por abuso de sustancias (Kreek, Nielsen, Butelman y LaForge, 2005). Estos factores han sido analizados con detalle en las últimas décadas desde una perspectiva psicobiológica, que considera que la evolución de esta compleja neuropatología se manifiesta a través de la aparición de síntomas que van modificándose a lo largo del tiempo, y que expresan los cambios adaptativos que acontecen en el sistema nervioso central como consecuencia del consumo continuado de sustancias de abuso (McLellan, Lewis, O'Brien y Kleber, 2000).

Un efecto común a todas las drogas de abuso es su capacidad para producir sentimientos de euforia y bienestar, y para disminuir los estados negativos. Estos efectos se originan en el mesencéfalo y proyectan a la base del prosencéfalo, formando un circuito conocido como sistema de recompensa cerebral. En efecto, aunque las drogas de las que los humanos abusan difieren en su perfil farmacológico, todas ellas aumentan, en cierta medida, los niveles de dopamina en un área del cerebro límbico, el núcleo accumbens (NAc) (Di Chiara y Imperato, 1988; Imperato y Di Chiara, 1986; Wise, 1998). Este sistema está formado por dos grupos de neuronas. Un grupo se encuentra en la sustancia negra compacta que proyecta a través de la vía nigrostriatal en el cuerpo estriado dorsal. El otro grupo de neuronas se encuentra en el área tegmental ventral (ATV) y proyecta a través de las vías mesolímbica y mesocortical. La vía mesolímbica alcanza el NAc y la amígdala, y la vía mesocortical llega a la corteza prefrontal. El NAc se subdivide en dos regiones: la cubierta (*shell*) medial y el núcleo (*core*) lateral. El núcleo *shell* suele incluirse en una división del sistema nervioso conocida como amígdala extendida, que ha sido considerada más recientemente como el sustrato neuroanatómico común sobre el que actúan todas las sustancias adictivas. La amígdala extendida incluye la subregión *shell* del NAc, el núcleo del lecho de la estría terminal, el núcleo central de la amígdala y la sustancia innominada sublenticular, estando conectada con regiones cerebrales que tienen un papel fundamental en

la regulación de procesos emocionales y motivacionales, como el hipocampo, la amígdala, el núcleo dorsomedial del tálamo, el pálido ventral y el hipotálamo lateral (Koob *et al.*, 2004). Una representación esquemática de los principales haces dopaminérgicos se muestra en la Figura 1.

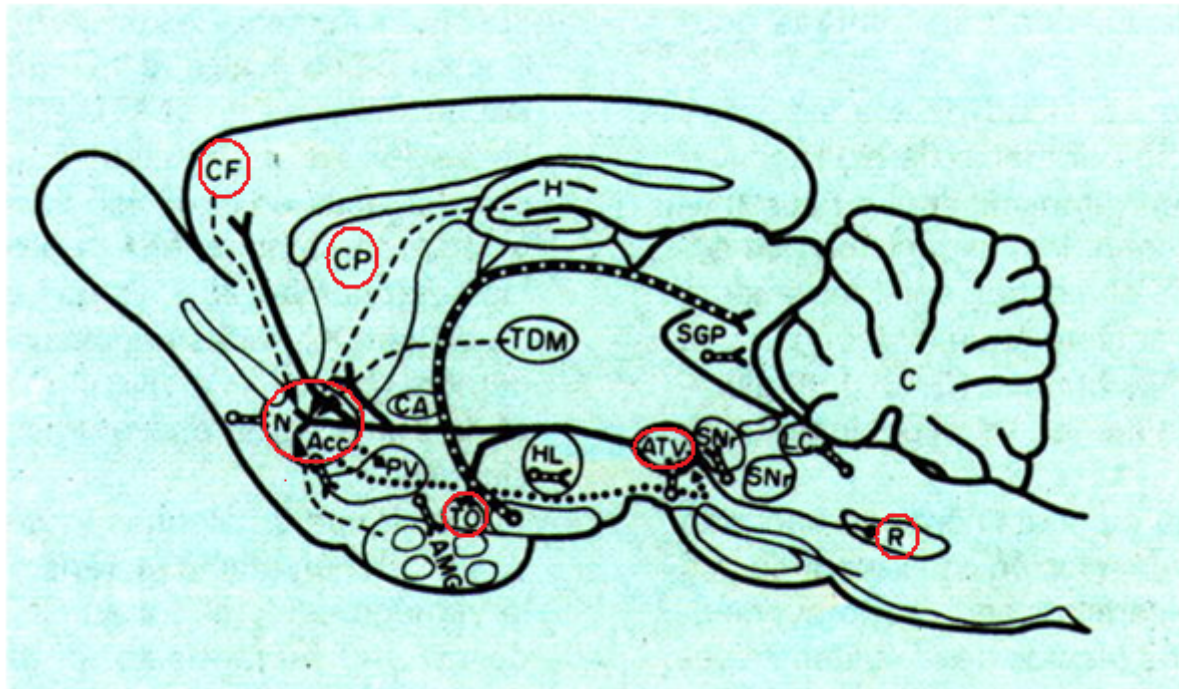


Figura 1. Los sistemas de neurotransmisores implicados en las vías de recompensa y reforzamiento positivo de diversas drogas de abuso. El sistema dopaminérgico mesolímbico se origina en el grupo de células en el área tegmental ventral (ATV) y proyecta hacia el NAcc, el tubérculo olfatorio (TO), la corteza frontal (CF) y la parte ventral del caudado-putamen (CP). Neuronas serotoninérgicas en los núcleos de la sustantia nigra (R) proyectan hacia el ATV. El sistema opioide endógeno incluye circuitos encefalinérgicos locales (segmentos cortos) y el circuito endorfinérgico hipotalámico del cerebro medio (segmento largo) representa las vías aferentes del sistema límbico al NAcc y las vías eferentes del NAcc probablemente implicadas en la recompensa de las drogas de abuso. AMG amígdala, C cerebelo, CA comisura anterior, H hipocampo, HL hipotálamo lateral, LC locus coeruleus, PV pallidum ventral, SGP substantia gris periacueductal, SNr sustantia nigra pars reticulata, TDM tálamo dorsomedial. Modificado de Koob y Volkov (2010).

La dopamina es un neurotransmisor modulador que regula la respuesta de las neuronas del glutamato y el GABA, principales neurotransmisores excitatorio e inhibitorio, respectivamente (Nicola y Deadwyler, 2000; West, Floresco, Charara, Rosenkranz y Grace, 2003). En el NAc, la dopamina media la saliencia de los incentivos y el aprendizaje mediado por recompensas (Berke y Hyman, 2000; Berridge y Robinson, 2003). La corteza prefrontal, por su parte, modula procesos cognitivos relacionados con la conducta orientada a metas (Tzschentke, 2001). El impacto hedónico de la recompensa depende no sólo de la dopamina, sino también de otros sistemas neuroquímicos con los que ésta interacciona, entre los que destaca el opioide (Glass, Billington y Levine, 1999; Kelley *et al.*, 2002).

La activación de este circuito a través de una determinada conducta (en nuestro caso, el consumo de una sustancia adictiva) aumenta la probabilidad de que dicha conducta vuelva a emitirse, por lo que las drogas de abuso actúan como potentes reforzadores debido a su capacidad para activar el circuito de la recompensa. Este mecanismo de reforzamiento con base neurobiológica es fundamental para la supervivencia, el aprendizaje y la adaptación, y está implicado en la regulación de conductas motivadas como la ingesta de agua, comida o la respuesta sexual. En este sentido, se ha hipotetizado que nuestro sistema de recompensa cerebral está controlado por algo parecido a un “termostato” que asegura el mantenimiento de un punto de equilibrio en el sistema para garantizar su correcto funcionamiento. El consumo repetido de drogas de abuso podría alterar este mecanismo regulador, de modo que el reforzamiento iría creciendo progresivamente a través del tiempo y el consumo crónico hasta acabar por reducir el repertorio conductual del individuo. En este sentido, algunos autores consideran que las drogas de abuso crearían una señal en el cerebro que indica, falsamente, la llegada de un beneficio adaptativo, una señal que provoca un aumento de la frecuencia del consumo desplazando a otras conductas adaptativas fundamentales para la supervivencia (Koob *et al.*, 2004). En este contexto, existen tres enfoques principales o formas de pensar para tratar de explicar en términos neuronales el desarrollo y mantenimiento de la adicción, una vez que las personas han empezado a consumir drogas. Por lo general se conocen como "sensibilización al incentivo", "alostasis hedónica" y "teorías de formación de hábito". Las dos primeras teorías se basan en los cambios que acontecen en los sistemas motivacionales o afectivos del cerebro inducidos por las drogas. La última se basa principalmente en la automatización del comportamiento que es consecuencia de su consumo crónico. En la Figura 2 está esquematizado el proceso de las adaptaciones que tienen lugar en diferentes sistemas neuronales. Cada teoría explica parcialmente el fenómeno de la adicción y podrían ser vistas, por tanto, como complementarias, tal vez como explicativas de las diferentes etapas que caracterizan el desarrollo de los trastornos adictivos.

La teoría de sensibilización al incentivo postula que, cuando se administran crónicamente drogas de abuso, se induce un aumento de la capacidad de respuesta (o sensibilización) en los mecanismos dopaminérgicos que median el valor de incentivo que tiene bien la propia droga, o bien estímulos relacionados con la misma. Esta respuesta aumentada de la dopamina explicaría el deseo (*craving*) que muestran muchos adictos por repetir la experiencia, su dificultad de mantener la abstinencia y las frecuentes recaídas (Robinson y Berridge, 1993, 2001).

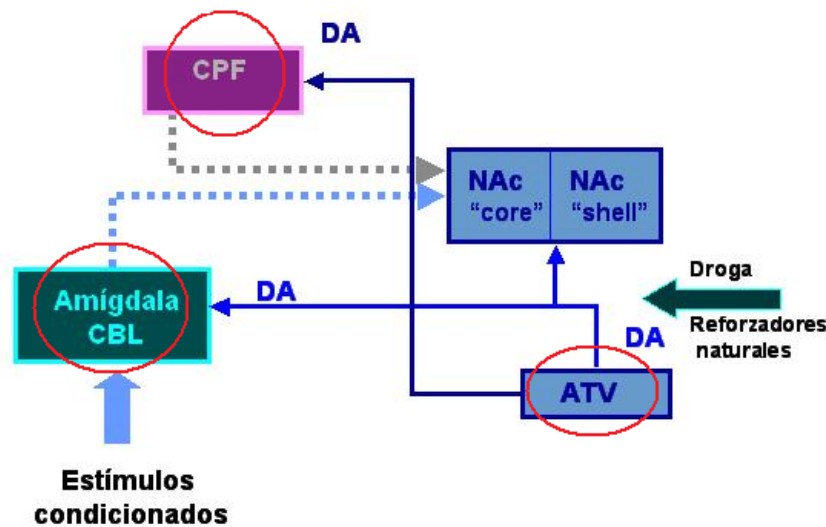


Figura 2. Las regiones cerebrales implicadas con el consumo de sustancias adictivas, son, esencialmente, el córtex prefrontal (CPF), la amígdala y el núcleo accumbens (NAc). Una de las subregiones de esta estructura, el “core”, es el que está conectado con la amígdala y el CPF. Las conexiones entre los dos primeros y el NAc “core” son cruciales en el establecimiento de conexiones estímulo-recompensa. Estas estructuras reciben también proyecciones dopaminérgicas procedentes del Área tegmental ventral (ATV) y, a su vez, se proyecta sobre el NAc, relacionando así un determinado contexto con su valor como reforzador o motivador. En humanos sería el equivalente a desencadenar el deseo de consumo, que es el preámbulo de la búsqueda de la droga y posterior consumo o recaída. Figura adaptada de Roncero, 2012.

Por su parte, los modelos basados en alostasis hedónica postulan que el consumo de drogas de abuso provoca la aparición de los mecanismos de compensación opuestos a los efectos de las mismas, lo que conduce a un estado de alostasis que se caracteriza por un cerebro que es menos sensible a la recompensa. En esta situación, los individuos consumen una y otra vez estas sustancias, en dosis crecientes, en un intento por compensar este estado afectivo negativo (Koob *et al*, 2004; Koob y Le Moal, 1997).

Paralelamente, algunas teorías postulan que la adicción a las drogas puede ser entendida como un trastorno patológico relacionado con mecanismos de aprendizaje y procesos de memoria, unos mecanismos que estarían alterados en los adictos debido al impacto motivacional que para ellos tendrían las sustancias de abuso y sus estímulos asociados. Ello conduciría a la formación de hábitos que determinarían la pérdida de control y el consumo compulsivo de las drogas (Everitt y Robbins, 2005; Robbins y Everitt, 1999; Tiffany, 1990).

En definitiva, la adicción es probablemente el resultado de los cambios bioquímicos y neurobiológicos producidos por estados de excitación extrema provenientes de conductas de estimulación que afectan a diversas vías dopaminérgicas que son claves en el desarrollo de la conducta adictiva. Algunos autores han postulado que las adaptaciones en estos

circuitos dopaminérgicos hacen al adicto más sensible al efecto reforzante de las drogas de abuso, y menos sensible a los aumentos fisiológicos producidos por los reforzadores naturales como la comida y el sexo. Tales adaptaciones tienen lugar tanto en la fisiología celular como morfológico, constituyendo el substrato neurobiológico de los fenómenos adictivos (Volkow y Li, 2004).

1.2.- FACTORES DE VULNERABILIDAD EN LA ADICCION: GENES, RASGOS DE PERSONALIDAD Y EXPERIENCIAS AMBIENTALES

Una de las cuestiones que cobra especial relevancia en el ámbito de la drogadicción hace referencia a por qué, tras consumir una sustancia psicoactiva, ciertas personas se vuelven adictas a la misma y otras no, una afirmación que viene avalada por numerosos datos epidemiológicos (Ellenbroek *et al.*, 2005). El estudio científico de esta cuestión ha encontrado en la investigación animal una herramienta de valor incalculable, permitiendo estudiar sistemáticamente los mecanismos psicobiológicos y determinantes genéticos que subyacen al consumo de sustancias psicoactivas (Driscoll, Fernández-Teruel, Corda, Giorgi y Steimer, 2009) y extrapolar con gran éxito sus resultados al campo de la comprensión, la prevención y el tratamiento de la adicción humana (Carroll, Anker y Perry, 2009). Entre los resultados más relevantes aportados por este y otros enfoques científicos relacionados se destacan a continuación los que tienen una especial relevancia para la presente Tesis Doctoral.

En primer lugar, se sabe desde hace décadas que la adicción es un trastorno hereditario con una clara determinación genética. La mayor parte de la investigación realizada en este campo se ha llevado a cabo en relación con el alcoholismo, centrándose en el estudio de la historia familiar, la comparación entre gemelos monocigóticos vs. dicigóticos o en estudios de adopción, estimándose la heredabilidad para el abuso de drogas en torno a un 45% (Ellenbroek *et al.*, 2005). A pesar de esta evidencia, la identificación de algunos de los genes implicados en la conducta adictiva ha sido una tarea ardua con resultados a menudo inconsistentes. En cualquier caso, muchos de los genes identificados parecen estar relacionados con el funcionamiento de sistemas neurales y vías neuroquímicas íntimamente relacionados con los mecanismos de acción de las drogas de abuso, como dopamina, serotonina, glutamato, opioides o glucocorticoides, entre otros (Ellenbroek *et al.*, 2005; Kabbaj *et al.*, 2004). Con respecto a la dopamina, diversos aspectos de la adicción se han relacionado con diferencias genéticas en la síntesis, recaptación y metabolismo de este

neurotransmisor, así como en la expresión de diversos receptores dopaminérgicos. Destacan en este contexto la asociación hallada entre el alelo Taq1 A1 del receptor D₂ de dopamina y alcoholismo, tabaquismo y adicción a cocaína (Noble, 2000), así como entre polimorfismos en el receptor D₄ y diversos trastornos por abuso de sustancias, incluyendo el consumo de heroína (Comings, *et al.*, 1999; McBride, Murphy, Lumeng y Li, 1990).

En relación con el GABA, se sabe que el alcohol y las benzodiazepinas son capaces de actuar sobre el receptor GABA-A, facilitando el efecto inhibitor de este neurotransmisor a través del aumento en la frecuencia de apertura de los canales de cloro (Fernández-Teruel, 2008). En este contexto, se ha descrito que las variaciones en la respuesta al alcohol en humanos pueden tener un componente genético y estar mediadas por diferencias genéticas en dicho receptor (la región $\alpha 2$ del mismo se ha localizado en el cromosoma 4, mientras que la $\alpha 6$ se ha situado en el cromosoma 5; Goldman, Oroszi y Ducci, 2005).

Otros genes de los que hay datos señalando su posible papel en la génesis de las adicciones son los ligados a factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF). Así, los ratones *knockout* de BDNF muestran una respuesta reducida a opiáceos y cocaína, mientras que los *knockout* de GDNF presentan, por el contrario, una respuesta aumentada. Variaciones genéticas en receptores serotoninérgicos como el receptor de serotonina 5-HT_{1B} y el transportador de serotonina también han sido relacionados con las adicciones en algunos estudios, así como el neuropéptido Y (NPY), el transportador prolinacisteína, y factores de transcripción como Δ FosB y CREB (véase Li *et al.*, 2008, para revisión).

Aunque aún se conocen poco los procesos moleculares que determinan el modo en que estos y otros genes modulan el funcionamiento cerebral y la mayor susceptibilidad de ciertos sujetos al efecto de las drogas de abuso, los estudios más recientes sugieren que estas sustancias pueden alterar de forma permanente el funcionamiento de vías neuronales relacionadas con procesos de señalización intracelular, plasticidad cerebral, crecimiento axonal, neuroprotección y apoptosis (véase Briand y Blendy, 2009; Nestler, 2004; Pollock, 2002, para revisión).

La herencia genética no sólo contribuye a aumentar el riesgo de desarrollar un cuadro adictivo en determinados individuos, sino que también parece determinar ciertos caracteres temperamentales o rasgos de personalidad íntimamente relacionados con esta patología. Estos rasgos se manifiestan como un patrón conductual específico que difiere de un individuo a otro, y que se mantiene estable en un mismo organismo a lo largo del tiempo y a través de las situaciones (Pawlak, Ho y Schwarting, 2008). Los modelos actuales de la

personalidad están definidos por alguno de los vectores básicos o dimensiones del comportamiento que describen la personalidad de un individuo, abarcando la rica complejidad del temperamento humano (Cloninger y Svrakic, 1998; Eysenck y Levey, 1967; Gray y McNaughton, 2000; Zuckerman, 1993). La terminología para abordar las dimensiones de la personalidad y las fronteras entre estas dimensiones varían dependiendo del modelo, si bien todos ellos destacan la búsqueda de novedad -o la búsqueda de sensaciones- como factor relacionado de manera consistente con el inicio, consumo ocasional y uso regular de sustancias de abuso (véase Dawe y Loxton, 2004; Kreek *et al.*, 2005, para revisión). Zuckerman (1994a, 1994b) definió los conceptos de impulsividad y búsqueda de sensaciones y los combinó en un rasgo superior al que denominó *sensation seeking*, caracterizado por la búsqueda de sensaciones variadas, novedosas, complejas e intensas, y por la frecuente aparición de problemas de índole social, legal y financiera debido a la búsqueda y preferencia por tales experiencias. Por su parte, la impulsividad es la tendencia a responder rápidamente a las señales de recompensa potencial sin planificación o deliberación previa, o sin tener en cuenta el castigo potencial o la pérdida de recompensa que puede conllevar esta respuesta inmediata.

Los animales inferiores también parecen mostrar diferencias importantes en su reactividad ante situaciones novedosas, una conducta que se estudia registrando la cantidad de actividad locomotora y exploratoria que muestra un animal cuando es expuesto a un ambiente novedoso (Ballaz, 2009), por lo que este aspecto del temperamento humano y su relación con la conducta adictiva puede ser estudiado sistemáticamente en especies inferiores (Bardo, Donohew y Harrington, 1996; Zuckerman, 1996). Los animales que muestran alta respuesta a la novedad tienden también a la mayor auto-administración de drogas de abuso (Piazza, Deminiere, Le Moal y Simon, 1989) y presentan mayores niveles de dopamina en el NAc, tanto en condiciones basales (Hooks, Colvin, Juncos y Justice, 1992), como en respuesta a situaciones nuevas o estresantes (Rouge-Pont, Piazza, Kharouby, Le Moal y Simon, 1993). De hecho, se ha sugerido que la búsqueda de novedad está influida igualmente por la reactividad del sistema mesolímbico dopaminérgico, compartiendo ambos comportamientos un sustrato neurobiológico común (Bardo *et al.*, 1996; Zuckerman, 1996). Del mismo modo, las diferencias estables que se observan entre cepas puras y entre subespecies en relación con la conducta exploratoria sugieren un control genético de este rasgo (Henderson, 1967), de modo comparable al observado en relación con la conducta adictiva.

Los factores de riesgo descritos hasta el momento constituyen determinantes endógenos o genéticos que describen características heredadas que hacen a los individuos que las poseen más vulnerables a desarrollar conductas adictivas cuando tienen contacto con las drogas de abuso. Sin embargo, no debe olvidarse que a menudo las experiencias ambientales a las que se ve expuesto un individuo a lo largo de su vida también pueden contribuir de forma muy importante al desarrollo de esta patología. Las experiencias de estrés en la edad adulta parecen ser especialmente relevantes en este sentido, definiendo como estrés la respuesta conductual y fisiológica que despliega un organismo para afrontar situaciones que ponen en peligro su equilibrio homeostático (Burchfield, 1979). Se sabe, así, que ciertas personas consumen drogas con el objetivo de mejorar sus estrategias de afrontamiento ante ciertas situaciones amenazantes, y/o para reducir estados emocionales aversivos inducidos por las mismas (LeMoal y Koob, 2007). Entre las experiencias ambientales más estudiadas en el ser humano destacan numerosos acontecimientos vitales estresantes, tales como conflictos familiares, maltrato, fracaso escolar, problemas laborales, cambios en las condiciones de vida, muerte de un ser querido, experiencias traumáticas relacionadas con catástrofes naturales o conflictos bélicos, etc. Muchos de estos acontecimientos parecen contribuir al consumo de sustancias como cannabis, cocaína y alcohol, tal y como sugieren numerosos estudios correlacionales realizados con seres humanos (Clark, Masson, Delucchi, Hall y Sees, 2001; El-Shikh, Fahmy, Michael y Mosehly, 2004; Hayaki, Stein, Lassor Herman y Anderson, 2005; Hyman y Sinha, 2009; Waldrop *et al.*, 2007). En el laboratorio es posible manipular experimentalmente las experiencias estresantes y analizar su impacto en la conducta de consumo de los animales, recurriendo a situaciones como aislamiento impredecible (Núñez *et al.*, 2002), amenaza social (Kabbaj *et al.*, 2004), cambios en las condiciones de iluminación (Ellenbroek *et al.*, 2005), o exposición a estímulos dolorosos (véase Goeders, 2003; Lu, Shepard, Hall y Shaham, 2003, para revisión), entre otras manipulaciones. Los resultados aportados por este tipo de estudios reflejan la importancia que ciertas experiencias ambientales podrían tener como factores precipitantes del consumo en individuos genética y temperamentalmente vulnerables, poniendo de manifiesto la complejidad del fenómeno adictivo.

A pesar de la evidente utilidad que tienen los modelos animales para estudiar sistemáticamente la influencia de factores ambientales sobre el consumo de drogas de abuso, es evidente también que estos modelos presentan limitaciones importantes, dado que la naturaleza de los estímulos estresantes que se utilizan en el laboratorio tiene poco que ver con las experiencias vitales a las que un ser humano debe enfrentarse a lo largo de su vida.

En efecto, muchas de estas experiencias constituyen eventos relacionados de un modo u otro con la pérdida inesperada de fuentes de reforzamiento significativas para el individuo, y constituyen una de las principales fuentes de estrés emocional y de conflicto a las que se enfrenta el ser humano a lo largo de su vida (Cochrane y Robertson, 1973; Papini, Wood, Daniel y Norris, 2006). En efecto, en numerosos estudios clínicos que se interesan por identificar y ordenar la intensidad de los eventos vitales estresantes que afectan a la población general, aparecen con frecuencia sucesos que implican de un modo u otro la pérdida o devaluación de reforzadores significativos para el individuo, tales como la muerte de un ser querido, la enfermedad, el desempleo, o la disminución del salario (Scully, Tosi y Banning, 2000). Estos acontecimientos vitales pueden desencadenar desequilibrios conductuales, fisiológicos y hormonales importantes, siendo el origen de alteraciones psicofisiológicas como el trastorno por estrés postraumático o los trastornos por abuso de sustancias, entre otros (Kamenetzky *et al.*, 2009; Papini *et al.*, 2006).

En animales, por el contrario, suele recurrirse a la presentación de estímulos aversivos a menudo incontrolables y/o dolorosos para analizar en qué medida esta experiencia afecta al consumo de drogas. Sin embargo, el impacto que tienen las experiencias de pérdida sobre dicho consumo no ha sido explorado detalladamente en especies inferiores hasta el momento, y los pocos resultados realizados al respecto arrojan resultados decepcionantes (véase Mustaca y Kamenetzky, 2006, para revisión).

La importancia de esta cuestión se asienta en las numerosas evidencias de laboratorio que indican que la devaluación inesperada en la calidad o cantidad de un reforzador apetitivo desencadena un estado fisiológico, cognitivo y comportamental característico que algunos autores denominan frustración (Amsel, 1992). La frustración, por tanto, se define como un estado emocional aversivo provocado por la omisión o disminución de la cantidad o calidad de un reforzador apetitivo en presencia de una expectativa de recompensas o de reforzadores de mayor magnitud. Este estado involucra mecanismos emocionales semejantes a los inducidos por la presentación de estímulos aversivos, desencadenando respuestas análogas al estrés a través de la activación de circuitos cerebrales vinculados con el miedo y la ansiedad (Gray y McNaughton, 2000; Papini y Dudley, 1997). Esta hipótesis ha sido apoyada por numerosos estudios experimentales, los cuales utilizan paradigmas conocidos como “modelos animales de pérdida de recompensa o de frustración”, que consisten en situaciones experimentales en las que los animales son expuestos a la devaluación súbita e inesperada en la calidad o cantidad de un reforzador apetitivo, en presencia de señales previamente asociadas con un reforzador de mayor magnitud (Amsel, 1992, 1994; Papini,

2006). Se incluyen bajo esta denominación fenómenos de aprendizaje como el CSN y la extinción, así como otros efectos relacionados con la resistencia o persistencia conductual que se observa cuando el sujeto es expuesto a condiciones experimentales en las que se combina la presentación y la omisión del reforzador (reforzamiento parcial; Cuenya, Fosachea, Mustaca y Kamenetzky, 2011).

Estos fenómenos paradójicos del aprendizaje han sido analizados desde diferentes perspectivas teóricas, la mayoría de las cuales defienden su naturaleza emocional (Amsel, 1992, 1994; Flaherty, 1996; Norris, Daniel y Papini, 2008; Papini 2003, 2006, 2009). En este contexto teórico, se asume que la pérdida inesperada de un reforzador constituye un suceso aversivo para el animal capaz de provocar reacciones emocionales negativas que comparten similitudes con las inducidas por otros eventos estresantes, como el castigo o la exposición a una situación novedosa (Dantzer, 1987). Este supuesto ha sido respaldado por una gran variedad de datos experimentales de índole conductual, neuroendocrina, farmacológica, neuroanatómica y psicogenética, que evidencian las relaciones entre la frustración (o dolor psicológico), el dolor físico y la ansiedad (Cuenya *et al.*, 2011; Cuenya, Kamenetzky y Mustaca, 2009). Por todo ello, las experiencias de pérdida podrían constituir en animales una fuente de estrés capaz de influir en el consumo de sustancias de abuso.

1.3.- LAS RATAS ROMANAS DE ALTA Y BAJA EVITACIÓN: UN MODELO ANIMAL PARA EL ESTUDIO DE LA CONDUCTA ADICTIVA

Una de las estrategias de investigación más relevantes en el estudio de las bases psicobiológicas de la conducta adictiva consiste en el empleo de cepas de roedores seleccionadas y criadas en función de ciertas disposiciones comportamentales vinculadas directa o indirectamente con el consumo de sustancias (véase Driscoll *et al.*, 2009; Pawlak *et al.*, 2008, para revisión). Esta aproximación ha permitido desarrollar animales especialmente vulnerables o sensibles a los efectos de las drogas de abuso, explorando así las variables genéticas y neurobiológicas que contribuyen a este fenotipo conductual, así como la interacción entre estas variables y los determinantes ambientales a los que estos individuos son expuestos a lo largo de su ciclo vital.

Un ejemplo de cepas de ratas desarrolladas mediante un procedimiento de selección psicogenética son las ratas Romanas de Alta (RHA) y Baja (RLA) Evitación, ambas derivadas de la cepa Wistar. La primera información sobre estas estirpes apareció en 1965,

cuando ratas Wistar Rattus Norvegicus fueron seleccionadas sobre la base de su alta (RHA) o baja (RLA) capacidad para adquirir la respuesta de evitación activa en dos sentidos (Bignami, 1965). Estas sublíneas se establecieron en Suiza, donde se mantiene la cría selectiva continua desde 1972 de las ratas RHA/Verh y RLA/Verh (Driscoll y Bättig, 1982). En el año 1993 se inició un programa de endogamia en el Animalario de la Unidad de Psicología Médica de la Universidad Autónoma de Barcelona, dando lugar a una colonia consanguínea (ratas RHA-I y RLA-I) que se mantiene en la actualidad (Driscoll *et al.*, 1998; Escorihuela *et al.*, 1999).

Numerosas evidencias experimentales sugieren que la capacidad para adquirir la respuesta de evitación activa en dos sentidos está inversamente relacionada con los niveles de miedo, ansiedad o reactividad emocional de los animales, por lo que se considera que estas cepas muestran diferencias extremas en relación con este rasgo comportamental (Fernández-Teruel *et al.*, 1991), siendo bajo en la cepa RHA y alto en la RLA (Fernández-Teruel y Escorihuela, 1997; Steimer y Driscoll, 2003). Prueba de ello es que las ratas RLA muestran una respuesta de ansiedad más marcada cuando son expuestas a una amplia variedad de pruebas relacionadas con conflicto, novedad o exposición a estímulos que provocan miedo innato. Por ejemplo, se ha observado en las ratas RLA una supresión comportamental en el test de conflicto de Vogel que no aparece en ratas RHA (Ferré *et al.*, 1995). Estas diferencias comportamentales se han encontrado, asimismo, cuando los animales son expuestos a tareas relacionadas con novedad y exploración, como el campo abierto (Fernández-Teruel *et al.*, 1992), el *Hole-Board* (Fernández-Teruel, Escorihuela, Driscoll, Tobena y Bating, 1994), o el test de luz/oscuridad (Steimer y Driscoll, 2003), donde se registra un mayor tiempo de inmovilización (freezing), más defecaciones (Fernández-Teruel y Escorihuela, 1997), y una mayor reactividad neuroendorina en la cepa RLA (Steimer y Driscoll, 2003 Steimer, la Fleur y Schulz, 1997). De la misma manera, las ratas RLA y RHA muestran un patrón comportamental diferente cuando son expuestas a estímulos de miedo incondicionados (López-Aumatell *et al.*, 2009) o condicionados (Aguilar *et al.*, 2003). No obstante, existen resultados contradictorios cuando se emplean otros test de ansiedad, como el laberinto elevado o el test de movilidad (véase Escorihuela *et al.*, 1999, para revisión).

Por el contrario, las ratas RHA muestran un comportamiento más activo que las ratas RLA en estos paradigmas comportamentales, como el campo abierto, el plus-maze, la tabla de agujeros o la caja de actividad (Escorihuela *et al.*, 1999; Fernández-Teruel *et al.*, 1997b; Fernández-Teruel *et al.*, 2002a; Giménez-Llort *et al.*, 2005; Guitart-Massip *et al.*, 2006a).

Asimismo, cuando los animales son expuestos a una fuente de presión en la cola, la cepa RHA muestran intentos más fuertes y duraderos por eliminar activamente la fuente de presión que las ratas RLA (Giorgi, Lecca, Piras, Driscoll y Corda, 2003a).

Las diferencias comportamentales existentes entre estas cepas en relación con su reactividad emocional han sido puestas de manifiesto recientemente en relación con situaciones vinculadas con pérdida de reforzamiento y frustración, lo que tiene una especial relevancia para la presente Tesis Doctoral.

En primer lugar, se ha comprobado que las ratas Romanas hembra RHA-I y RLA-I reaccionan de forma diferente cuando son expuestas a una tarea de evitación en un sólo sentido en la que se induce un efecto de CSN al reducir inesperadamente el tiempo de permanencia en el compartimento de seguridad (asociado con la ausencia de descarga eléctrica), ya que sólo la cepa RLA-I mostró dicho efecto de contraste, que se manifestó mediante el deterioro transitorio en la ejecución de la respuesta de evitación (Torres *et al.*, 2005a).

En segundo lugar, estos animales también muestran diferencias conductuales cuando son expuestos a una tarea de aprendizaje instrumental apetitivo en la que el efecto de contraste se induce mediante la reducción en la magnitud de un reforzador apetitivo esperado (de 12 *pellets* a 2 *pellets*), presentado en el compartimento meta de un laberinto recto. Esta reducción provoca la aparición del efecto de contraste en la cepa RLA-I, el cual no se observa en la cepa RHA-I (Rosas *et al.*, 2007).

En tercer lugar, se ha comprobado que las diferencias que aparecen entre estas cepas en situaciones de contraste instrumental también aparecen tras la omisión completa del reforzador, es decir, en condiciones de extinción. En este sentido, las ratas hembra RHA-I muestran una mayor resistencia a la extinción que las RLA-I, un resultado que también podría explicarse por la aparición de respuestas de frustración más marcadas en esta última, las cuales serían incompatibles con la ejecución de la respuesta previamente aprendida durante la fase de adquisición (Gómez *et al.*, 2009). No obstante, las diferencias de cepa en la tasa de extinción se anulan cuando se utiliza un programa de reforzamiento parcial durante la fase de adquisición, observándose un aumento en la resistencia a la extinción (efecto del reforzamiento parcial en la extinción) sólo en la cepa RLA-I (Gómez *et al.*, 2008). Este fenómeno de persistencia comportamental que se observa tras experiencias de reforzamiento parcial también se manifiesta en situaciones de contraste, dado que dicho fenómeno no fue observado en ratas macho RLA-I sometidas previamente a dicha experiencia de reforzamiento parcial (Cuenya *et al.*, 2012).

Finalmente, las diferencias de cepa descritas en tareas instrumentales también se hacen evidentes en tareas consumatorias, mostrando la cepa RLA-I una tasa de recuperación del contraste consumatorio más lenta en comparación con la RHA-I cuando se utilizan concentraciones de sacarosa del 22% en la fase de precambio y del 4% en la de postcambio (Gómez *et al.*, 2009).

Por su parte, las ratas RHA muestran menores índices de ansiedad ante situaciones novedosas, así como una mayor tendencia a la búsqueda de sensaciones y la impulsividad (Fattore, Piras, Corda y Giorgi, 2009; Giorgi, Piras y Corda, 2007; Steimer y Driscoll, 2003, 2005). Así, durante la adquisición de una respuesta instrumental en condiciones de reforzamiento diferencial de tasas bajas (DRL-20), la cepa RHA muestra una mayor tendencia a la impulsividad, dada su pobre capacidad para inhibir conductas irrelevantes (Zeier, Baetting y Driscoll, 1978). Asimismo, la cepa RHA presenta una amplitud aumentada en el componente P1 de los potenciales evocados visuales que se registran en respuesta a la presentación de flashes de luz de intensidad creciente (Siegel, 1997, Siegel, Sisson y Driscoll, 1993), un resultado comparable al observado en seres humanos con altas puntuaciones en el rasgo de personalidad de búsqueda de sensaciones (Zuckerman, 1974). Más aún, estudios recientes llevados a cabo con la variedad consanguínea indican que cuando estas cepas son expuestas a tareas que miden impulsividad (como la polidipsia inducida por programa, la tarea de descuento por demora o la tarea de tiempo de reacción serial con 5-elecciones), la cepa RHA-I muestra mayores índices de impulsividad que la RLA-I, ingiriendo una mayor cantidad de agua, eligiendo un mayor número de veces la recompensa inmediata en lugar de la demorada y mostrando un control inhibitorio deficiente (Moreno *et al.*, 2010). Por último, las ratas RHA muestran una preferencia mayor por las sustancias gratificantes -como sacarina y etanol- e incluso por aversivas -como quinina- (Driscoll, Cohen, Fackelman y Bättig, 1990; Fernández-Teruel, Driscoll *et al.*, 2002; Razafimanalina, Mormede y Velley, 1996), siendo más proclives a autoadministrarse sustancias de abuso como cocaína, anfetamina y morfina (Gorgi y Corda, 2007).

Los rasgos conductuales divergentes que caracterizan a las ratas RHA y RLA podrían estar relacionados con las diferencias neuroanatómicas y funcionales que se han hallado entre las cepas en estructuras cerebrales relacionadas con emoción y motivación, como la amígdala, el hipocampo, el NAc o la corteza prefrontal, entre otras (Driscoll *et al.*, 2009; Gómez *et al.*, 2009; Meyza, Boguszewski, Nikolaev y Zagrodzka, 2009). Estas diferencias neuroanatómicas se acompañan de diferencias neuroquímicas que afectan a sistemas de neurotransmisión como la dopamina, la serotonina, el glutamato, el GABA y los

neuropéptidos, entre otros (D'Angio, Serrano, Driscoll y Scatton, 1988; Giorgi, Pirás, Lecca y Corda, 2005a; Guitart-Masip, Johansson, Fernández-Teruel, Tobena y Gimenez-Llort, 2008; Lecca, Piras, Driscoll, Giorgi y Corda, 2004). Así, en 1988 D'Angio y colaboradores realizaron un estudio en el que encontraron diferencias dopaminérgicas entre estas cepas que podrían explicar las variaciones en emocionalidad y estilo de afrontamiento de las mismas. En esta ocasión expusieron a los animales a distintas situaciones ambientales estresantes (sonido fuerte, pellizco en la cola, inmovilización y locomoción forzada sobre un rotor) y encontraron que la exposición de ambas cepas a dichas situaciones produjo un incremento de los niveles extracelulares de DA en la corteza prefrontal de las ratas RHA que no apareció en las RLA (D'Angio *et al.*, 1988). Este estudio fue replicado y ampliado posteriormente por Giorgi y colaboradores (2003a), y en él se pudo observar un incremento en los niveles de dopamina en la corteza prefrontal medial de las ratas RHA que no apareció en las RLA en respuesta a la presentación de distintos estímulos aversivos. Al parecer, estas diferencias entre cepas en los niveles del neurotransmisor podrían estar asociadas con un estilo de afrontamiento más activo en las ratas RHA, así como con una baja frecuencia de *inmovilización* y *acicalamiento* en las mismas. Por el contrario, las ratas RLA muestran una mayor liberación de dopamina en el NAc que las ratas RHA bajo condiciones de estrés (Giorgi *et al.*, 2003a). En la misma línea, las ratas RHA muestran una mayor respuesta conductual a la apomorfina (Durcan, Wraight y Fulker, 1984; Giménez-Llort, Canete, Guitart-Masip, Fernández-Teruel y Tobena, 2005) y a la anfetamina (Driscoll, Lieblich y Cohen, 1986), agonistas dopaminérgicos directo e indirecto, respectivamente (Cañete, Guitart-Masip, Fernández-Teruel, Tobeña y Giménez-Llort, 2003). Paralelamente, esta cepa muestra una mayor respuesta conductual y una mayor liberación de dopamina en el NAc en respuesta a la administración de la anfetamina, cocaína, morfina y etanol (Corda, Lecca, Piras, Viola y Giorgi, 2001; Giorgi *et al.*, 1997; Lecca *et al.*, 2004). La respuesta dopaminérgica inducida por estas drogas está más acentuada en el NAc *shell* en comparación con la división *core* en la cepa RHA, mientras que no se hallan diferencias entre las subregiones del NAc en la cepa RLA (Corda, Lecca, Piras, Di Chiara y Giorgi, 1997; Lecca *et al.*, 2004). Como se ha comentado previamente, la liberación de dopamina en el NAc constituye el sustrato neuronal común responsable del efecto reforzante de todas las drogas de abuso (Di Chiara y Imperato, 1988; Imperato y Di Chiara, 1986), estando también implicada en las diferencias individuales en las conductas de búsqueda/preferencia por novedad (Bardo *et al.*, 1996). Por consiguiente, esta mayor capacidad de respuesta del

sistema dopaminérgico mesoaccumbal en las ratas RHA podría ser la base de su perfil comportamental característico y diferenciado de la cepa RLA.

Por otro lado, se han realizado estudios dirigidos a comparar la actividad de este neurotransmisor en relación con el GABA. Los resultados encontrados indican, por un lado, la existencia de un menor efecto de la acción del GABA sobre el canal de Cl^- en la corteza cerebral de las ratas RLA en comparación con las RHA y, por otro lado, una menor densidad de receptores D_1 en el NAc de las ratas RLA frente a las RHA. En este mismo sentido, estudios realizados recientemente han hallado un mayor número de receptores D_1 y D_3 en el NAc de las ratas RHA frente a las RLA, mientras que no se describen diferencias significativas con respecto al receptor D_2 (Guitart-Masip, Johansson *et al.*, 2006).

Con respecto al neurotransmisor serotoninérgico, Giorgi, Piras *et al.*, (2003) observaron que la administración sistémica de clorimipramina y fluoxetina (inhibidores de la recaptación de serotonina) produjo un incremento en los niveles corticales de 5-HT en las ratas RHA que no apareció en las RLA. Igualmente, en las principales regiones cerebrales que reciben proyecciones serotoninérgicas desde el *rafé magnus*, se ha encontrado una mayor densidad de conexiones serotoninérgicas en las ratas RHA frente a las RLA. Estos hallazgos indican, por tanto, que la señal serotoninérgica que viaja desde el *rafé magnus* hasta el *córtex frontoparietal* es mayor en las primeras que en las últimas (Giorgi, Piras *et al.*, 2003).

Asimismo, estudios llevados a cabo en el hipocampo sugieren que las ratas RLA poseen una mayor actividad colinérgica en su sistema hipocampal en comparación con las ratas RHA. Estas diferencias en actividad colinérgica no parecen deberse a diferencias en el número de receptores muscarínicos del hipocampo, sino a una severa deficiencia de fosfolipasa C- β en el hipocampo de las ratas RHA relacionada con una menor expresión de esta enzima (Sallés *et al.*, 2001). Estas divergencias podrían explicar, entre otras, las diferencias observadas entre estas cepas en tareas relacionadas con memoria de trabajo y aprendizaje asociativo, como el condicionamiento clásico de miedo (Escorihuela *et al.*, 1997), la respuesta de sobresalto potenciado por miedo (López-Aumatel *et al.*, 2009), la aversión condicionada al sabor (Martin y Bäckström, 1980), la prueba de emparejamiento a un lugar llevada a cabo en la piscina de Morris (Aguilar *et al.*, 2002), o el aprendizaje en un laberinto hexagonal (Fernández-Teruel *et al.*, 1994).

Por otro lado, en los últimos años se han realizado estudios en los que aparecen diferencias de cepa en neuropéptidos que podrían estar asociadas con una mayor preferencia por ciertas drogas de abuso en las ratas RHA frente a las RLA. Así, por medio de la técnica

de hibridación *in situ*, se han encontrado, por un lado, elevados niveles de dinorfinas en el NAc ventromedial y, por otro, mayores niveles de encefalinas en el córtex cingulado de las ratas RHA frente a las RLA. Sin embargo, estas últimas mostraron altos niveles en la expresión génica de encefalinas en áreas restringidas del cuerpo estriado dorsal. Estas divergencias en la expresión génica de diferentes neuropéptidos podrían estar relacionadas con las diferencias en la preferencia por el consumo de alcohol que muestran estas cepas (Guitart-Masip, Gimenez-Llort *et al.*, 2006). En una línea similar, Guitart-Masip *et al.*, (2008) observaron que la exposición de las ratas Romanas consanguíneas a un programa de administración repetida de amfetamina seguido por una prueba (*challenge*) de administración de la sustancia tuvo efectos locomotores diferentes entre las ratas RHA-I y RLA-I, los cuales se acompañaron de diferencias de cepa: (a) en la expresión del gen de acción inmediata NGFI-A (*zif268*) en el estriado rostral dorsomedial y ventral (en RHA-I) y en la amígdala central (en RLA-I); (b) en los niveles de expresión de proencefalina y prodinorfina en la subdivisión medial del estriado rostral, y (c) en la expresión de los marcadores de actividad sináptica secretogranina y PSD-95 (este último relacionado con la neurotransmisión glutamatérgica mediada por receptores AMPA) en la división *core* del NAc. En opinión de los autores, estas diferencias funcionales podrían ser la base de la vulnerabilidad diferencial de las ratas Romanas a desarrollar sensibilización conductual tras la administración repetida de psicoestimulantes (Guitart-Masip *et al.*, 2008).

Finalmente, el desarrollo de nuevas técnicas genéticas y de análisis multivariado está posibilitando la identificación de otras diferencias genéticas entre las cepas. En este contexto, algunos investigadores han encontrado un *locus* (QTL) en el cromosoma 5 que está asociado con el aumento de la conducta de inmovilización en condicionamiento clásico de miedo, y la disminución de la respuesta de evitación y de la respuesta interensayo en el aprendizaje de evitación activa en dos sentidos (Fernández-Teruel, Escorihuela *et al.*, 2002). Dentro de este QTL se halla un gen (*Mpdz*) que regula la transmisión GABAérgica y que se ha relacionado con la adicción al alcohol, particularmente con la regulación de las respuestas de retirada a esta sustancia de abuso (Fernández-Teruel, Escorihuela *et al.*, 2002; Johannesson *et al.*, 2009).

En esta misma línea, se han realizado estudios recientes de tecnología *microarray* que han permitido identificar, en condiciones basales, 14 genes regulados al alza y 24 regulados a la baja en la cepa RLA-I cuando se compara con la RHA-I. Estos genes están implicados en múltiples procesos biológicos (como desarrollo del sistema nervioso, sinaptogénesis, proliferación celular, metabolismo de las proteínas, comunicación y

transducción celular, etc.), así como en fenómenos conductuales relacionados con aprendizaje, emoción y adicción (Escarabajal *et al.*, 2007). De estos genes se seleccionaron siete para su validación mediante la técnica de transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (*RT-PCR*). Los resultados obtenidos mostraron que seis de los siete genes seleccionados reflejaron la misma tendencia de expresión que los datos obtenidos con la técnica de *microarray*, estando cinco de ellos relacionados con ansiedad y aprendizaje emocional - *CAMKK2*, *EPXH2*, *PRL*, *CRHBP* y *HOMER3* - mientras que el sexto se usó como control de la validación del *microarray* -*RPL6*- (Sabariego *et al.*, 2011). Estos hallazgos han sido ampliados recientemente, encontrándose que la exposición de estos animales a la reducción súbita en la magnitud de una recompensa (de 12 *pellets* a 2 *pellets*) en una tarea instrumental – laberinto recto – induce un efecto de contraste sólo en la cepa más emocional (RLA-I), la cual muestra diferencias significativas con respecto a la cepa menos emocional (RHA-I) en la expresión génica hipocampal de genes vinculados con miedo en otros roedores, y con trastornos de ansiedad y diversas neuropatologías en humanos (Cuenya *et al.*, 2011; Gomez *et al.*, 2012).

En definitiva, el empleo de las ratas Romanas para el estudio científico de la ansiedad, la búsqueda de novedad, la impulsividad y la vulnerabilidad al abuso de drogas ha generado una ingente cantidad de trabajos de muy diversa índole que han permitido caracterizarlas desde una perspectiva comportamental, endocrina, neuroanatómica, neuroquímica, molecular y genética. Teniendo en cuenta las diferencias comportamentales y neurobiológicas descritas en estas páginas, algunos autores han llegado a la conclusión de que los rasgos conductuales asociados con ansiedad e impulsividad (y dentro de esta última la tendencia a la búsqueda y preferencia por la novedad) estarían determinados genéticamente y podrían descansar sobre polos opuestos de un mismo continuo, estando la primera asociada con la combinación de una mayor reactividad emocional y con un estilo de afrontamiento pasivo (propio de la cepa RLA), mientras que la cepa RHA se caracterizaría por una reactividad emocional reducida acompañada de un estilo de afrontamiento más activo, impulsivo, buscador de novedad y vulnerable a la adicción (Driscoll *et al.*, 2009; Fattore *et al.*, 2009; Giorgi *et al.*, 2007; Steimer *et al.*, 1997; Steimer y Driscoll, 2003, 2005). No obstante, otros autores defienden que la emocionalidad y la actividad exploratoria vinculada al rasgo de búsqueda de novedad representan dimensiones independientes, más que extremos de la misma variable, a pesar de que algunos estudios factoriales sugieran que podrían compartir algunos componentes (véase Fernández-Teruel, Driscoll *et al.*, 2002, para revisión). En cualquier caso, el perfil conductual divergente que muestran las ratas Romanas

en pruebas de miedo/ansiedad, búsqueda de novedad y administración de drogas hace de éstas un modelo animal de gran utilidad en la identificación de algunos de los factores de riesgo genéticos y ambientales que podrían estar asociados con la conducta adictiva, una cuestión cuya respuesta constituye el objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral.

OBJETIVOS E HIPOTESIS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral se centra en analizar algunos de los factores de riesgo que contribuyen al consumo de alcohol. En concreto, se pretende estudiar la influencia del rasgo conductual de búsqueda de novedad y de la reactividad emocional ante situaciones de frustración sobre el consumo espontáneo de alcohol, utilizando ratas Romanas consanguíneas de Alta (RHA-I) y Baja Evitación (RLA-I). Este objetivo general se desglosa en los objetivos específicos, hipótesis y predicciones que se detallan a continuación.

En primer lugar, establecer las condiciones experimentales idóneas para detectar diferencias en consumo voluntario de etanol en las ratas Romanas consanguíneas RHA-I y RLA-I. Para ello se analizaron los patrones de consumo espontáneo y de preferencia por el alcohol en estos animales mediante un procedimiento de aclimatación basado en el aumento progresivo de las concentraciones de etanol utilizadas (2, 4, 6, 8 y 10%), comparando dichos patrones de consumo con los observados tras presentar una única dosis de alcohol al 10% (sin aclimatación). Se pretendía explorar si una concentración del 10% de etanol es la óptima para diferenciar fenotípicamente a las ratas RHA-I y RLA-I, y si los resultados podían depender de que los animales hubieran sido sometidos previamente o no a una fase de aclimatación. Asimismo, se intentó identificar el rango de concentraciones de etanol con el cual es posible hallar diferencias en cada cepa en el consumo voluntario de esta sustancia, así como la existencia de dichas diferencias entre las cepas consanguíneas. Sobre la base de estudios previos realizados con estas cepas, así como de la revisión de la literatura especializada, se establecieron las siguientes predicciones: (a) las ratas RHA-I consumirán más alcohol que las RLA-I cuando sean expuestas a una dosis única de alcohol al 10%; (b) la utilización de un procedimiento previo de aclimatación al alcohol facilitará el consumo de la dosis más elevada -10%- un efecto que podría atenuar las diferencias de cepa en comparación con las halladas en los animales no aclimatados; (c) las diferencias de cepa en consumo dependerán de la concentración de etanol utilizada, estando éstas más atenuadas con concentraciones bajas (2, 4, 6%) que con concentraciones altas (8, 10%).

En segundo lugar, validar las pruebas comportamentales utilizadas para analizar el rasgo conductual de búsqueda de novedad, tratando de averiguar si las respuestas registradas en las mismas son estables entre individuos. En concreto, se seleccionó como test de referencia el *Hole-Boad*, comparando la ejecución de los animales en este test basado

en exposición forzada a la novedad con la observada en dos pruebas basadas en elección libre: el laberinto en Y y la prueba de emergencia. Sobre la base de la evidencia empírica indicativa de la existencia de un rasgo comportamental de búsqueda de novedad en roedores, se esperaban obtener correlaciones positivas significativas entre las conductas de búsqueda de novedad que exhiben los animales cuando son expuestos a estas tres pruebas (*head-dipping* y locomoción, exploración del brazo novedoso y latencia de emergencia, respectivamente) lo que permitiría validarlas para analizar dicho rasgo temperamental.

Una vez establecidas las condiciones experimentales idóneas para poner en relación la conducta de consumo de etanol y el rasgo comportamental de búsqueda de novedad, se realizó un tercer experimento que tuvo como objetivo principal analizar el comportamiento de las ratas RHA-I y RLA-I en las pruebas de novedad previamente comentadas (*Hole-Board*, laberinto en Y y test de emergencia) y relacionar su ejecución con los patrones de consumo voluntario de etanol registrados mediante un procedimiento de elección agua/alcohol basado en la presentación de dosis crecientes de esta droga (2, 4, 6, 8 y 10%). Se establecieron las siguientes hipótesis y sus correspondientes predicciones: (a) las ratas RHA-I mostrarán una mayor tendencia a explorar ambientes novedosos en comparación con las RLA-I, y estas diferencias se pondrán de manifiesto en las tres pruebas de novedad utilizadas en el presente estudio; (b) las ratas RHA-I tenderán a consumir más alcohol que las RLA-I, por lo que en la prueba de consumo voluntario estos animales consumirán cantidades más elevadas de esta sustancia en relación con las RLA-I, con independencia de que prefieran agua o alcohol; (c) aquellos animales que sean más propensos a explorar ambientes novedosos serán los que consuman más alcohol, un resultado que permitiría poner en relación directa estos rasgos comportamentales.

Finalmente, analizar si el impacto de experiencias ambientales negativas sobre el consumo de sustancias de abuso está modulado por influencias genéticas. En concreto, se estudió si la exposición de los animales a situaciones de pérdida/frustración puede constituir una experiencia estresante que aumente el consumo de alcohol y, sobre todo, si este efecto depende de las diferencias en reactividad emocional que muestran las ratas RHA-I y RLA-I. Para ello se realizaron tres experimentos. En el Estudio 4 se trató de averiguar si el paradigma de CSN implementado con una tarea instrumental apetitiva puede ser adecuado como experiencia frustrante capaz de influir en el consumo voluntario de etanol, para lo que realizamos un estudio piloto con ratas Wistar expuestas a la reducción inesperada en la magnitud de la recompensa presentada (de 12 *pellets* a 2 *pellets*). En el Estudio 5, los animales fueron expuestos a una situación frustrante de extinción consumatoria (en la que

recibieron soluciones de agua tras haber recibido previamente soluciones de sacarosa al 22%), teniendo acceso después a alcohol en una prueba de preferencia. Por último, en el Estudio 6 las ratas RHA-I y RLA-I fueron expuestas a una tarea instrumental en la que se omitió el reforzador -12 *pellets*- (extinción), después de haber sido presentado de forma continua o parcial (ERPE), presentándoles alcohol inmediatamente después de esta experiencia. Sobre la base de las diferencias de cepa halladas en relación con su reactividad conductual en respuesta a experiencias de pérdida de recompensa, así como del carácter aversivo y estresante de este tipo de experiencias, se esperaba encontrar que los animales expuestos a la reducción (contraste) u omisión (extinción) en la magnitud de una recompensa esperada (12 *pellets*, solución de sacarosa al 22%) mostrarán un deterioro en la ejecución de la respuesta correspondiente (latencia de respuesta en los experimentos 4 y 6, cantidad de solución consumida en el experimento 5), aumentando al mismo tiempo su consumo de etanol en la prueba de preferencia. Se esperaba encontrar este resultado en la cepa más reactiva emocionalmente (RLA-I) y en las ratas Wistar, mientras que en la cepa menos reactiva (RHA-I) no se esperaban hallar efectos de frustración relevantes, ni tampoco un impacto significativo de esta experiencia sobre su consumo de alcohol. Además, en el experimento 6 se estableció como predicción que la experiencia en reforzamiento parcial durante la fase de adquisición aumentaría la tolerancia a la frustración y la resistencia a la extinción en las ratas RLA-I, pero no en las RHA-I, reduciendo en las primeras el consumo de alcohol en relación con un grupo expuesto a reforzamiento continuo. Los resultados aportados en estos estudios nos permitirán analizar la importancia que ciertas experiencias ambientales podrían tener como factores precipitantes en el consumo de sustancias adictivas en individuos genética y temperamentalmente vulnerables, poniendo de manifiesto la complejidad del fenómeno adictivo.

FASE I: BÚSQUEDA DE NOVEDAD Y CONSUMO DE ALCOHOL

ESTUDIO 1.

El consumo voluntario de alcohol es un fenómeno que se observa con relativa frecuencia en roedores y otros mamíferos en su ambiente natural, dado que éstos consumen frutas y otros alimentos fermentados que contienen concentraciones variables de alcohol, y muestran patrones conductuales indicativos de intoxicación etílica. Se trata, así, de un fenómeno que puede considerarse como parte del repertorio conductual normal de muchos animales, de ahí la importancia del establecimiento de un modelo animal del comportamiento humano relativo a la conducta de consumo de alcohol y de los efectos de esta droga con potencial de abuso en humanos (Spanagel, 2000, 2003). Esta afirmación se apoya, además, en la evidencia experimental que demuestra que el alcohol posee propiedades reforzantes que dependen de su acción sobre estructuras subcorticales que se han conservado a lo largo de la evolución, lo que permite estudiar en especies inferiores los procesos neurobiológicos que subyacen a los efectos adictivos del alcohol (Kamenetzky y Mustaca, 2005).

Se suele afirmar que un modelo animal de alcoholismo debe cumplir una serie de criterios conductuales y farmacológicos que demuestren su validez. Así, por ejemplo, los sujetos deben ser capaces de autoadministrarse oralmente el etanol, es decir, consumirlo de forma voluntaria. Asimismo, el consumo de etanol debe estar condicionado por sus efectos farmacológicos, y no estrictamente por su sabor o por su valor calórico. De hecho, el modelo debe ser capaz de demostrar las propiedades reforzantes del alcohol, las cuales se pueden inferir, por ejemplo, a través del esfuerzo que es capaz de realizar el animal para conseguir la droga. Además, el consumo crónico debe dar lugar a la aparición de comportamientos y fenómenos similares a los observados en seres humanos, incluyendo tolerancia, deseo compulsivo (*craving*), pérdida de control, recaídas, etc., dado que tales fenómenos constituyen el núcleo central que define la adicción humana (Spanagel, 2003). A pesar de su incuestionable utilidad, es evidente que muchos de los modelos animales de alcoholismo cumplen estos criterios sólo parcialmente (Green y Grahame, 2008; Li *et al.*, 1979).

Las pruebas conductuales diseñadas para estudiar la adicción al alcohol pueden clasificarse en función de que la exposición al alcohol esté controlada bien por el experimentador (administración forzada), o bien por el propio animal (autoadministración,

véase Kamenetzky y Mustaca, 2005, para revisión). En el primer caso los animales suelen recibir administraciones intraperitoneales o intragástricas de alcohol, y los efectos de estas sustancias se asocian con estímulos neutros (p. ej. un lugar, un sabor) a través de procedimientos de condicionamiento clásico. Posteriormente se comprueba si el animal da indicios de preferencia o aversión por tales estímulos, una prueba de los efectos apetitivos o aversivos de esta droga de abuso (Green y Grahame, 2008).

Por su parte, las pruebas de autoadministración suelen presentar dos modalidades. Por un lado, en algunos procedimientos la oportunidad de acceder al alcohol requiere de la emisión por parte del animal de una respuesta instrumental, vinculada con el comportamiento voluntario o de búsqueda de la droga (Meisch y Thompson, 1972; Mello y Mendelson, 1964). Estas pruebas de condicionamiento operante permiten al experimentador manipular las condiciones requeridas para la obtención de reforzador, el esfuerzo que se impone al animal para conseguirlo (*break point* o punto de corte), o los estímulos ambientales que pueden desencadenar la reaparición de la conducta de búsqueda. Así, por ejemplo, el modelo de reinstauración (*reinstatement*) se basa en entrenar a un animal a conseguir una droga mediante la emisión de una respuesta operante (usualmente presión de palanca), sometiéndolo después a una fase de extinción. Una vez extinguida la respuesta instrumental, se presentan varios estímulos con el objetivo de comprobar cuál de ellos es capaz de reinstaurar la conducta de búsqueda de la droga (por ejemplo, la inyección de una pequeña dosis de la sustancia, la exposición a experiencias estresantes, la presentación de estímulos condicionados previamente asociados con la droga, etc.; véase Spanagel, 2003, para revisión). En otras ocasiones, por el contrario, se trabaja con la conducta consumatoria que el animal despliega cuando tiene acceso al etanol, la cual determina la cantidad que se ingiere en un intervalo de tiempo determinado. En este contexto, numerosos modelos animales utilizan una prueba de preferencia o elección en la que los animales tienen disponible en sus jaulas hogar soluciones de agua y alcohol en diferentes concentraciones (Ritz, George y Meich, 1989). El animal tiene la opción de consumir una u otra solución, bien de forma permanente (24 horas) o bien durante períodos limitados de tiempo. Se registra el volumen consumido de cada botella, y se calcula el índice de preferencia por el alcohol, basado en la proporción de alcohol ingerida en relación con el volumen total de líquido consumido. La preferencia por el alcohol aparece cuando, del volumen total de fluido ingerido, más del 50% corresponde a la solución de alcohol (Spanagel, 2003). En ocasiones se opta por presentar inicialmente el alcohol como única solución disponible para beber, una condición de consumo forzado que puede influir en los procesos de elección

agua-alcohol posteriores. Esta modalidad experimental permite al investigador analizar de qué modo el patrón de consumo voluntario de etanol se modifica a lo largo del tiempo, qué factores determinan que el sujeto evolucione desde un patrón de consumo controlado hacia una pérdida de control o punto de “no retorno”, qué condiciones experimentales pueden desencadenar una recaída, etc. (Lovinger y Crabbe, 2005). Así, por ejemplo, se ha comprobado que cuando el animal tiene acceso ilimitado al alcohol con fases repetidas de privación, muestra un aumento transitorio del consumo y preferencia por el alcohol que recuerda en gran medida a los patrones de consumo en personas alcohólicas (Spanagel y Höltner, 1999). Asimismo, cuando el acceso al alcohol se prolonga más allá de los seis meses y se introducen periodos largos de abstinencia, es habitual observar un cambio gradual en el comportamiento de los sujetos, que muestran un consumo acentuado (irreversible e independiente de manipulaciones ambientales) que persiste a lo largo del tiempo y que simula la pérdida de control o “punto de no retorno” que manifiestan muchos sujetos adictos (Wolffgramm y Heyne, 1995).

Existen evidencias de que los roedores son cautos cuando consumen sustancias con sabores novedosos, un fenómeno denominado neofobia que genera con frecuencia aversión al consumo de alcohol. Más aún, con frecuencia se comprueba que para los animales el consumo de dosis moderadas o altas de esta droga es aversivo (Li *et al.*, 1979; Ritz *et al.*, 1989). Esta aversión natural puede contrarrestarse utilizando diferentes procedimientos de aclimatación al alcohol que aceleren el proceso de consumo. Uno de los más utilizados consiste en introducir una botella de agua y otra de alcohol a concentraciones bajas, e ir aumentando dicha concentración a lo largo de los días (p. ej. Aragón, Sternklar y Amit, 1985; Lankford, Roscoe, Pennington y Myers, 1991; Rockman, Hall, Markert, Glavin y Pare 1987). También se opta por dar la opción de beber diferentes concentraciones de etanol de forma simultánea, o bien por mezclar la solución alcohólica con alguna sustancia altamente palatable (como sacarosa o sacarina), aumentando gradualmente la dosis de etanol a medida que se reduce la concentración de dicha solución apetitiva (Samson, 1986; Waller y Lorch, 1978).

A pesar de que las pruebas basadas en el registro de los índices de preferencia por el alcohol en condiciones de consumo voluntario constituyen uno de los procedimientos más utilizados como modelo animal de alcoholismo, se ha comprobado en repetidas ocasiones que existe una gran variabilidad entre los individuos en sus tasas de preferencia por el alcohol, y que estas diferencias pueden determinar la susceptibilidad de los sujetos a desarrollar patrones anormales de consumo (Crabbe, Belknap y Buck, 1994; Lovinger y

Crabbe, 2005). Esta observación ha permitido desarrollar, mediante un procedimiento de selección psicogenética, pares de cepas de animales caracterizados por diferencias extremas en sus niveles de consumo voluntario de etanol. Ejemplos de estas cepas son las ratas Alko AA (alcohol-accepting) vs. ANA (alcohol nonaccepting; Erikson, 1968), las líneas P (alcohol-preferring) vs. NP (nonpreferring; Li, Lumeng, McBride y Waller, 1981), las Sardinian alcohol-preferring sP; (Colombo, 1977), o las cepas UChB vs.UChA (Mardones y Segovia-Riquelme, 1983). En ratones es la cepa C57BL (frente a otras como la DBA o la BABL), o las sublíneas de alta y baja preferencia (HAP vs. LAP) las más utilizadas como modelos animales de conducta alcohólica (Elmer, Meisch y George, 1987). Estos modelos animales han sido de enorme utilidad para la caracterización conductual, neuroquímica y molecular del alcoholismo, así como para explorar sus bases genéticas (Spanagel, 2003). En este sentido, se ha comprobado que además de diferir en su conducta de consumo de alcohol, estas cepas muestran también diferencias importantes en otras medidas conductuales relacionadas, como su preferencia por soluciones dulces o su aversión por amargas, su activación locomotora en situaciones novedosas o tras el consumo de bajas dosis de etanol, etc. (Badia-Elder y Kiefer, 1999; Murphy, Chiu, Harrison, Uddin y Singh, 2002; Päivärinta y Korpi, 1993). Tales divergencias comportamentales podrían explicarse sobre la base de las diferencias neuroquímicas que (determinadas genéticamente) condicionan el funcionamiento del sistema nervioso central, unas diferencias que se han hallado en sistemas de neurotransmisión como el dopaminérgico, el GABAérgico, el serotoninérgico o el opioide, entre otros (de Waele, Kiiianmaa y Gianoulakis, 1995; Katner y Weiss, 2001; Murphy *et al.*, 2002; Oswald, Mathena y Wand, 2004).

Si bien existen similitudes importantes entre estos modelos animales en relación con la conducta de consumo voluntario de etanol, en ocasiones se comprueba que los patrones específicos de ingestión de esta droga difieren en función de las condiciones experimentales utilizadas, con especial énfasis en la dosis de etanol que se presenta durante la prueba de preferencia. Así, por ejemplo, algunas cepas prefieren etanol frente a agua cuando las concentraciones de esta droga son bajas (inferiores al 6%; Ellenbroek *et al.*, 2005; Myers y Tytell, 1972; Ritcher y Campbell, 1940). En otros casos, por el contrario, ciertas cepas muestran altas tasas de preferencia con concentraciones más elevadas (del 14% o superiores; Lobina *et al.*, 1997; Wood, 1976.). En cualquier caso, la dosis estándar que se suele presentar en este tipo de estudios suele ser del 10%, una dosis que permite identificar con relativa facilidad diferencias en consumo voluntario entre las cepas, tanto en pruebas de preferencia como en tareas operantes (Erikson, 1974; Mardones y Segovia-Riquelme, 1983;

Rodgers y McClearn, 1962). No obstante, el empleo de una única concentración de alcohol ha sido objeto de numerosas críticas, dado que la elección arbitraria de una dosis específica contraviene principios básicos de farmacología basados en el análisis de la curva dosis-respuesta, un análisis que permite establecer patrones de preferencia o aversión por diferentes concentraciones de alcohol mucho más informativos (Lankford *et al.*, 1991).

Un ejemplo de cepas de ratas desarrolladas mediante un procedimiento de selección psicogenética son las ratas Romanas de Alta (RHA) y Baja (RLA) Evitación. Aunque inicialmente seleccionadas sobre la base de sus diferencias extremas en la ejecución de la respuesta de evitación de dos sentidos –relacionada con ansiedad y reactividad emocional– (más acentuada en la cepa RLA en comparación con la RHA), numerosas evidencias experimentales indican que este proceso de cruzamiento selectivo ha conducido a la diferenciación de otros rasgos conductuales relevantes, relacionados con su respuesta a estímulos naturales apetitivos y aversivos, su tendencia a explorar ambientes novedosos y a mostrar respuestas impulsivas, o su facilidad para autoadministrarse sustancias de abuso (véase Driscoll *et al.*, 2009; Giorgi *et al.*, 2007, para revisión). En relación con este último aspecto, se ha comprobado que, en comparación con las ratas RLA, las ratas RHA muestran una mayor respuesta conductual ante sustancias tales como apomorfina, anfetamina, cocaína y morfina (Corda *et al.*, 2001; Driscoll *et al.*, 1986; Durcan *et al.*, 1984; Giménez-Llort *et al.*, 2005; Giorgi *et al.*, 1997; Lecca *et al.*, 2004). Asimismo, las ratas RHA muestran sensibilización en su respuesta locomotora cuando son tratadas crónicamente con morfina, anfetamina y cocaína, un fenómeno comportamental íntimamente relacionado con la adicción que no se observa en las ratas RLA (Corda *et al.*, 2005; Giorgi, Piras, Lecca y Corda, 2005b; Giorgi *et al.*, 2007; Piras, Lecca, Corda y Giorgi, 2003). Estos hallazgos comportamentales parecen estar íntimamente relacionados con diferencias de cepa en la liberación de dopamina en el Nacc *shell* en respuesta a la administración de estas sustancias, una liberación que parece ser más acentuada en la cepa RHA en comparación con la RLA (Giorgi *et al.*, 2007; Lecca *et al.*, 2004). Esta mayor capacidad de respuesta del sistema dopaminérgico mesoaccumbal en ratas RHA puede ser la base de su preferencia mayor por el alcohol y otras sustancias gratificantes (Fernández-Teruel, Driscoll *et al.*, 2002; Razafimanalina *et al.*, 1996).

A pesar de la evidencia experimental indicativa de que las ratas RHA muestran una mayor tendencia al consumo de sustancias de abuso que las RLA, lo cierto es que los trabajos más recientes dirigidos a estudiar el consumo voluntario de alcohol en estas cepas no son muy numerosos, y presentan como limitación que en la mayoría de ellos se ha

utilizado una única dosis de alcohol al 10%, con las limitaciones que este procedimiento de dosis única conlleva (comentadas más arriba). Así, en estos estudios se observó que las ratas RHA/Verh consumen cantidades de etanol y presentan tasas de preferencia por esta sustancia significativamente superiores a las mostradas por las ratas RLA-I/Verh (Fernández-Teruel, Driscoll *et al.*, 2002), si bien en algunos de estos trabajos se constata que en ambas cepas el consumo de agua es superior al consumo de etanol, un hallazgo que sugiere que esta dosis puede ser aversiva para todos los animales (Razafimanalina *et al.*, 1996). En otras ocasiones, sin embargo, se ha recurrido a procedimientos de aclimatación que implican el empleo de dosis de alcohol progresivamente crecientes. Así, por ejemplo, Giorgi *et al.*, (1997) utilizaron un procedimiento que consistió en la presentación de soluciones de etanol en días alternos, comenzando con una dosis al 2% y haciendo incrementos del 1% cada segundo día, hasta alcanzar una concentración final al 10%. De nuevo se comprobó que la cepa RHA/Verh consumió más cantidad de alcohol y mostró índices de preferencia por la droga más elevados que la cepa RLA-/Verh. Además, cuando los animales fueron expuestos a un programa de acceso restringido a la dosis del 2%, se comprobó, mediante microdiálisis, que el consumo de la droga provocó un aumento en la liberación de dopamina en el NAc sólo en la cepa RHA-/Verh, sin que tal aumento fuera observado en condiciones de consumo voluntario de agua.

Si bien es cierto que los resultados hallados en estos y otros trabajos muestran diferencias claras entre las cepas RHA y RLA en relación con su consumo voluntario de alcohol, no menos cierto es la presencia de dos limitaciones importantes. En primer lugar, el procedimiento utilizado en la mayoría de las ocasiones se ha basado en la presentación de una dosis única de alcohol al 10%, lo que podría condicionar la autoingestión de esta sustancia debido a las importantes propiedades aversivas que pueden tener las dosis elevadas (Chester, Risinger y Cunningham, 1998; Tzschentke, 1998). Estas propiedades aversivas podrían ser comparativamente diferentes para cada cepa, influyendo en los resultados obtenidos en estos trabajos y en las conclusiones extraídas de los mismos (p. ej. Beaugé, Kerfriden, Menez, Aufrere y Le Bourhis, 1994; Drewek y Broadhurst, 1979; Driscoll *et al.*, 1990; Satinder, 1975). Por otro lado, en todos los estudios realizados hasta la fecha se ha trabajado con la variedad de ratas Romanas no consanguíneas, por lo que se desconoce por el momento si estas diferencias en consumo voluntario de etanol estarían también presentes en las cepas consanguíneas RHA-I y RLA-I.

Por todo ello, el objetivo del presente experimento fue explorar, en las cepas de ratas RHA-I y RLA-I, los patrones de consumo espontáneo y de preferencia por el alcohol

mediante un procedimiento de aclimatación basado en el aumento progresivo de las concentraciones de etanol utilizadas, comparando dichos patrones de consumo con los observados tras presentar una única dosis de alcohol al 10% (sin aclimatación). En concreto, se pretende establecer si una concentración del 10% de etanol es la óptima para diferenciar fenotípicamente a las ratas RHA-I y RLA-I, y si los resultados pueden depender de que los animales hayan sido sometidos previamente o no a una fase de aclimatación. Asimismo, se persigue identificar el rango de concentraciones de etanol en el que es posible hallar diferencias en el consumo voluntario de esta sustancia en las cepas consanguíneas. Sobre la base de estudios previos realizados con estas cepas, así como de la revisión de la literatura especializada, se podrían establecer las siguientes predicciones: (a) las ratas RHA-I consumirán más alcohol que las RLA-I cuando sean expuestas a una dosis única de alcohol al 10%; (b) la utilización de un procedimiento previo de aclimatación al alcohol facilitará el consumo de la dosis más elevada -10%- un efecto que podría atenuar las diferencias de cepa en comparación con las halladas en los animales no aclimatados; (c) las diferencias de cepa en consumo dependerán de la dosis de etanol utilizada, estando éstas más atenuadas con concentraciones de etanol bajas (2, 4, 6%) que con concentraciones más altas (8, 10%).

Método

Sujetos

Se utilizaron 32 ratas macho (16 RHA-I y 16 RLA-I) procedentes de la Universidad Autónoma de Barcelona. Las ratas tenían 4 meses de edad y un peso medio aproximado de 400 gramos al inicio del experimento. Los animales fueron colocados individualmente en su jaula hogar y tuvieron libre acceso a agua y comida. La temperatura del estabulario se mantuvo constante (22 °C, aproximadamente). Los ciclos de luz y oscuridad fueron de 12 horas, dando comienzo el período de luz a las 8:00 horas. La exposición al alcohol se realizó en sesiones de 24 horas, y el registro de las variables dependientes se llevó a cabo entre las 9.00 y las 12.00 horas.

Aparatos

Los animales fueron sometidos a la prueba de preferencia por el alcohol en su jaula hogar, construida con plexiglás, y con unas dimensiones de 32 cm de largo, 15 cm de alto y 30 cm de ancho. El suelo de cada caja estuvo cubierto con serrín, y como techo se dispuso

una rejilla metálica. En la parte superior de cada jaula, sobre el techo, se colocaron de manera contrabalanceada (izquierda y derecha) a través de los días dos botellas de 150 ml que contenían una el agua y la otra la concentración de etanol (véase la Figura 3). Para medir el consumo de líquidos se utilizó una báscula digital de precisión (Cobos JT-300C), y para controlar el peso de los animales una báscula modelo Baxtran BS3. En la elaboración de las concentraciones de alcohol se utilizaron probetas, pipetas, embudos, vasos de precipitado y galones de plástico estándar. Para la elaboración de las concentraciones se utilizó etanol al 96% (Panreac, Castellar del Vallés, España).



Figura 3. Jaula hogar

Procedimiento

Desde su llegada a nuestro laboratorio y durante toda su estancia en el mismo los animales tuvieron libre acceso a agua y comida en sus jaulas hogar. Durante los días previos al experimento se retiró de cada jaula la botella de agua (500 ml) y fue remplazada por dos botellas más pequeñas con agua (150 ml). Esta fase que duró 4 días tuvo como objetivo preexponer a los animales a las condiciones físicas (dos botellas en lugar de una, y de menor tamaño, con canaleta de acero inoxidable y esfera giratoria) que se mantendrían constantes durante la fase experimental.

Una vez concluida esta fase, los animales de cada cepa fueron asignados aleatoriamente a uno de dos grupos: uno sometido a un procedimiento de aclimatación al alcohol (AA), y otro no sometido a dicho procedimiento (NA) (véase Tabla 1).

Tabla 1.
Diseño del Experimento 1

GRUPO	PROCEDIMIENTO				
RHA-I AA	2%	4%	6%	8%	10%
RLA-I AA					
RHA-I NA	Agua	Agua	Agua	Agua	10%
RLA-I NA					

Nota: Las ratas en los grupos de aclimatación al alcohol (AA) estuvieron expuestas a cada una de las concentraciones de etanol al 2%, 4%, 6%, y 8% durante dos días consecutivos. Durante este periodo los animales en los grupos de no aclimatación (NA) fueron expuestos sólo a agua. Por último, los animales en todos los grupos fueron expuestos a concentraciones de etanol al 10% durante seis días consecutivos.

En la condición AA los animales fueron expuestos al alcohol en concentraciones gradualmente crecientes. Las concentraciones de alcohol se prepararon cada día mezclando la solución de etanol correspondiente con agua corriente. Se utilizaron cinco concentraciones, correspondientes al 2%, 4%, 6%, 8% y 10% v/v. Cada una de estas soluciones fue presentada al animal durante dos días consecutivos, a excepción de la solución del 10%, a la que los animales tuvieron acceso durante 6 días consecutivos. La colocación de las botellas de agua y alcohol en la jaula se cambió diariamente de posición para evitar una posible preferencia por el lugar, y sus volúmenes fueron pesados cada 24 horas.

Los animales asignados a la condición de NA fueron expuestos a dos botellas con agua durante 12 días consecutivos (4 días de habituación, más los días en los que el grupo aclimatado recibió las dosis del 2%, 4%, 6% y 8% de alcohol). A partir del día 13 los animales tuvieron acceso en una botella a la concentración de alcohol al 10% y en la otra a agua. Esta solución se presentó durante 6 días consecutivos. El resto de condiciones fueron idénticas a las detalladas en la condición AA. Cada día, en horario de 9.00 a 12.00, se registró el peso del animal, de la comida, de la botella de agua y de la botella de etanol. Cada dos días se procedió a la limpieza de la jaula hogar y al cambio de serrín.

Variables dependientes

Las medidas registradas en este experimento fueron el peso del animal, la ingesta de comida, el consumo de agua y el consumo de alcohol. A partir de las dos últimas medidas se calcularon dos índices más: por un lado el consumo total de líquidos (consumo de agua + consumo de alcohol), y por otro lado la preferencia por el alcohol (consumo de alcohol – consumo esperado; siendo el consumo esperado el consumo total de líquidos/2).

Análisis estadísticos

Para cada variable dependiente se realizó un análisis de varianza incluyendo como factores la cepa (RHA-I vs. RLA-I), la modalidad de exposición al alcohol (AA vs. NA) y el día. Dado que no se hallaron diferencias significativas en ninguna de las medidas registradas entre los días en que los animales consumieron la misma dosis de alcohol, estos valores fueron colapsados en bloques de dos días en la condición AA (para los días en que se emplearon dosis de 2%, 4%, 6% y 8%), o de 6 días para la dosis del 10% en ambas condiciones. Entre los animales que recibieron aclimatación al alcohol se realizó un ANOVA atendiendo a los factores cepa (RHA-I vs. RLA-I) y concentración de alcohol (2%, 4%, 6%, 8%, y 10%). Asimismo se realizó un segundo análisis tomando como medida sólo los consumos referentes a la concentración del 10% de alcohol y como factores la cepa (RHA vs. RLA) y la modalidad de exposición al alcohol (AA vs. NA). Para todos los análisis estadísticos se tomó un valor de significación estadística de $p < 0.05$.

Resultados

Peso. La Figura 4 muestra el peso promedio de los animales en cada grupo tomado en bloques de dos días a partir del primer día después de la fase de habituación. Como se puede observar no parecen existir diferencias en cuanto al peso corporal entre los distintos grupos de animales. El ANOVA cepa (RHA-I vs RLA-I) x modalidad de exposición (AA vs. NA) x bloques (7) confirmó estas primeras impresiones. Sólo el efecto principal de bloques resultó estadísticamente significativo, $F(6, 168) = p < 0,0001$. Ningún otro efecto principal ni interacción resultó ser significativo, lo que sugiere que los animales fueron gradualmente aumentando su peso a lo largo de la sesiones del experimento.

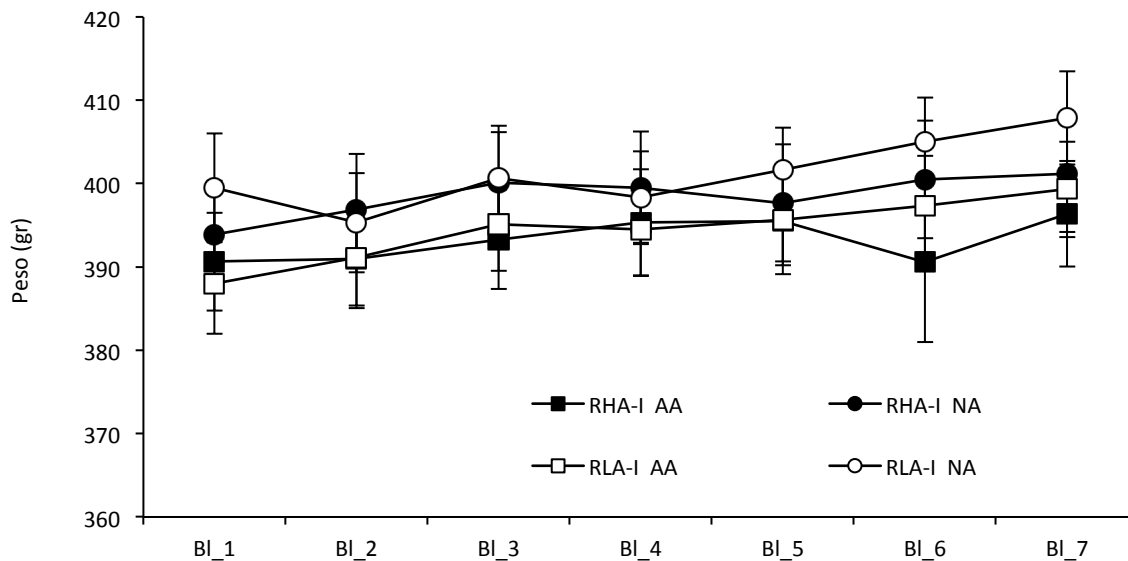


Figura 4. Peso promedio en gramos (gr) de las ratas en los distintos grupos. BI_: bloque de dos días cada uno. AA: se refiere a los grupos de ratas en los que se procedió a la aclimatación para el consumo de etanol. NA: se refiere a los grupos de ratas expuestos a valores de concentración de etanol del 10% sin aclimatación previa al etanol. Los bloques del 1 al 4 corresponden a los días en los que las ratas de los grupos AA tuvieron acceso al etanol con valores de concentración del 2%, 4%, 6% y 8%, respectivamente. Los bloques 5, 6 y 7 corresponden a los días en los que todas las ratas tuvieron acceso al etanol con un valor de concentración del 10%.

Consumo de comida. La Figura 5 muestra el consumo medio de comida para los diferentes grupos tomado en bloques de dos días a partir del primer día después de la fase de habituación. El ANOVA cepa (RHA vs. RLA) x modalidad de exposición (AA vs. NA) x bloques (7) arrojó un efecto principal de la variable cepa, $F(1, 28) = 5,767$, $p < 0,023$, así como de la interacción modalidad de exposición x bloques, $F(6,168) = 2,485$, $p < 0,025$. El análisis de esta interacción indicó que bajo la modalidad AA las ratas consumieron menos comida que en la condición NA sólo en el bloque 3 [cuando el primero tenía acceso a una solución de alcohol al 6%, $F(1, 28) = 8,837$, $p < 0,006$].

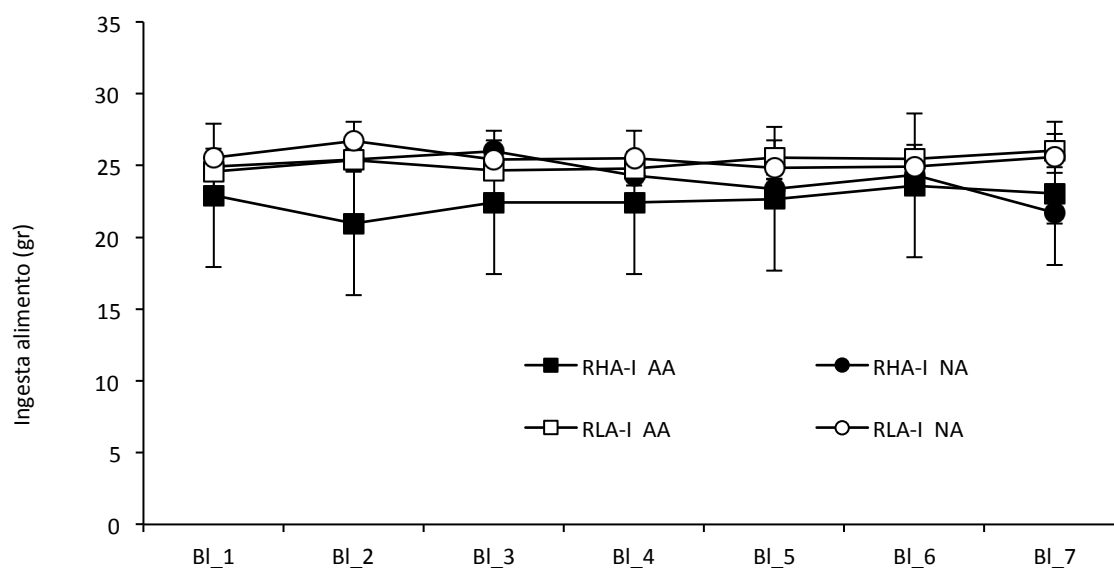


Figura 5. Cantidad de comida en gramos (gr) ingerida por las ratas en los distintos grupos. BI_: bloque de dos días cada uno. AA: se refiere a los grupos de ratas en los que se procedió a la aclimatación para el consumo de etanol. NA: se refiere a los grupos de ratas expuestos a valores de concentración de etanol del 10% sin aclimatación previa al etanol. Los bloques del 1 al 4 corresponden a los días en los que las ratas de los grupos AA tuvieron acceso al etanol con valores de concentración del 2%, 4%, 6% y 8%, respectivamente. Los bloques 5, 6 y 7 corresponden a los días en los que todas las ratas tuvieron acceso al etanol con un valor de concentración del 10%.

Consumo de agua. La Figura 6 representa el consumo medio de agua mostrado por los diferentes grupos, agrupado en bloques de dos días, observándose un mayor consumo de agua en los grupos NA, sobre todo en los días en que los animales recibieron las dosis más bajas de etanol. Estas diferencias parecen más marcadas en la cepa RHA-I, comparada con la RLA-I. Para confirmar estas observaciones se realizó un ANOVA cepa (RHA vs. RLA) x modalidad de exposición (AA vs. NA) x bloques (7), que arrojó efectos significativos de las variables bloques, $F(6, 168) = 24,342$, $p < 0,0001$, modalidad de exposición, $F(1, 28) = 39,998$, $p < 0,0001$ y cepa, $F(1, 28) = 12,244$, $p < 0,0002$, así como de las interacciones modalidad de exposición x cepa, $F(1,28) = 5,927$, $p < 0,022$ y modalidad de exposición x bloques, $F(6, 168) = 24,342$, $p < 0,0001$.

El análisis de la interacción modalidad de exposición x cepa indicó que las diferencias de consumo entre las cepas RHA-I y RLA-I aparecieron sólo en la modalidad de exposición AA, $F(1, 14) = 18,809$, $p < 0,001$, mostrando la cepa RLA-I un mayor consumo de agua con respecto a la cepa RHA-I. Por el contrario, en la modalidad de exposición NA tales diferencias no fueron estadísticamente significativas, $F(1, 14) = 0,533$, n.s.

Con respecto a la interacción modalidad de exposición x bloques, su análisis indicó que las diferencias entre las condiciones AA y NA aparecieron en los bloques 1, 2, 3 y 4

[valor menor de $F(1, 30) = 12,992$, $p < 0,001$], pero no en los bloques 5, 6 y 7 (en los cuales los animales fueron expuestos a una solución al 10% de etanol).

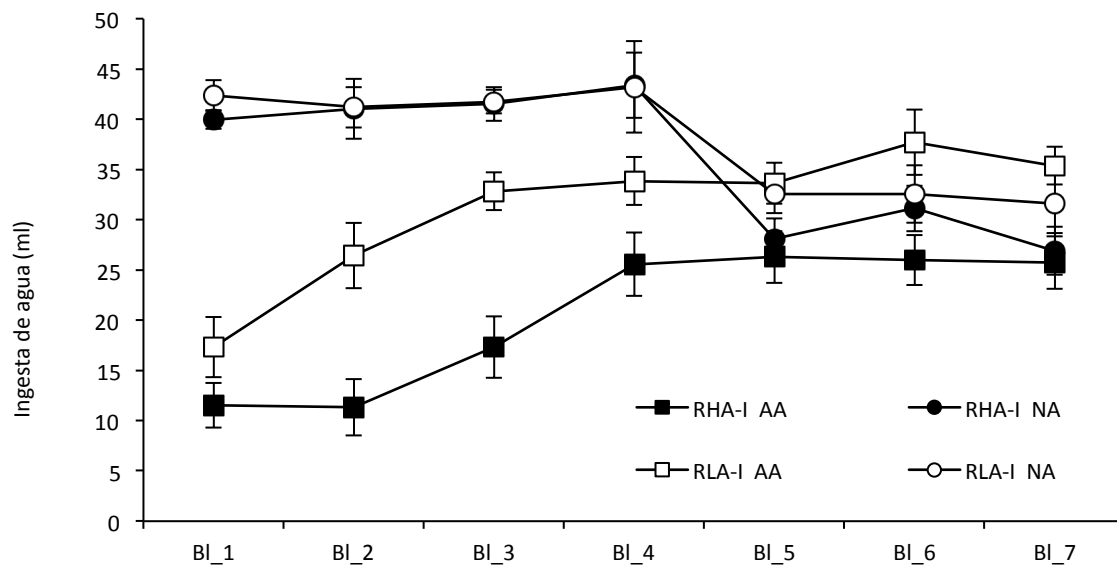


Figura 6. Cantidad de agua en mililitros (ml) ingerida por las ratas en los distintos grupos. BI_: bloque de dos días cada uno. AA: se refiere a los grupos de ratas en los que se procedió a la aclimatación para el consumo de etanol. NA: se refiere a los grupos de ratas expuestos a valores de concentración de etanol del 10% sin aclimatación previa al etanol. Los bloques del 1 al 4 corresponden a los días en los que las ratas de los grupos AA tuvieron acceso al etanol con valores de concentración del 2%, 4%, 6% y 8%, respectivamente. Los bloques 5, 6 y 7 corresponden a los días en los que todas las ratas tuvieron acceso al etanol con un valor de concentración del 10%.

Consumo total de líquidos. La Figura 7 muestra el volumen total de líquido consumido por los diferentes grupos tomado en bloques de dos días. Como se puede observar en la misma, los grupos no parecen mostrar diferencias apreciables en la cantidad de líquido total consumido, observación ésta confirmada por los análisis estadísticos oportunos, que pusieron de manifiesto que ni el efecto principal de los factores, ni el de la interacción entre cualesquiera de ellos, resultaron estadísticamente significativos.

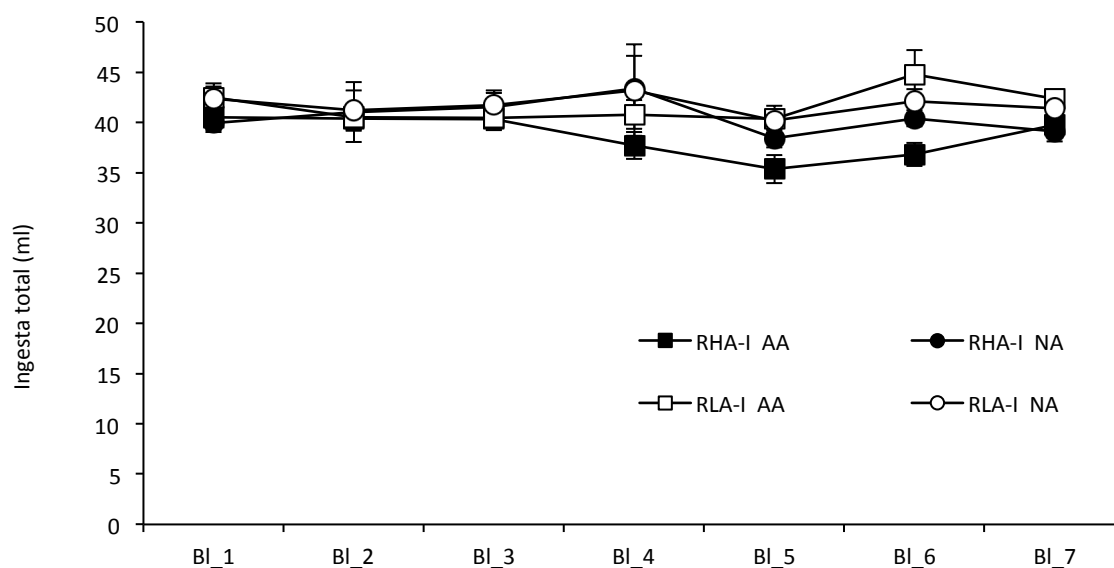


Figura 7. Cantidad total de líquido ingerido (agua + etanol) en mililitros (ml) ingerida por las ratas en los distintos grupos. BI_: bloque de dos días cada uno. AA: se refiere a los grupos de ratas en los que se procedió a la aclimatación para el consumo de etanol. NA: se refiere a los grupos de ratas expuestos a valores de concentración de etanol del 10% sin aclimatación previa al etanol. Los bloques del 1 al 4 corresponden a los días en los que las ratas de los grupos AA tuvieron acceso al etanol con valores de concentración del 2%, 4%, 6% y 8%, respectivamente. Los bloques 5, 6 y 7 corresponden a los días en los que todas las ratas tuvieron acceso al etanol con un valor de concentración del 10%.

Consumo de alcohol. La Figura 8 muestra la cantidad de alcohol ingerida por las cepas RHA-I y RLA-I bajo la condición AA, agrupada en bloques de 2 días, y que corresponden a las concentraciones de etanol al 2%, 4%, 6% y 8%. En la misma figura se presentan en barras los valores de consumo referentes a la solución de etanol al 10% correspondiente a cada cepa en las condiciones AA y NA. Como se puede observar en la figura el patrón de ingesta es diferente entre las cepas para concentraciones intermedias (4% y 6%), pero no para concentraciones extremas (2% y 10%). Además, la modalidad de exposición al alcohol no pareció afectar la ingesta de ninguna de las cepas para concentraciones del 10%, comparado con la ingesta de los grupos no aclimatados.

El ANOVA cepa (RHA vs. RLA) x dosis (2, 4, 6 y 8%) realizado en la condición AA mostró un efecto significativo de las variables cepa, $F(1,13) = 17,959$, $p < 0,001$ y dosis, $F(3,39) = 26,091$, $p < 0,0001$, así como de la interacción entre ambas, $F(3,39) = 4,340$, $p < 0,010$. El análisis detenido de la interacción indicó que las diferencias entre las cepas en consumo de alcohol aparecieron con las dosis del 4%, $F(1,13) = 21,913$, $p < 0,0001$, y del 6% , $F(1,13) = 14,529$, $p < 0,002$.

El ANOVA cepa (RHA vs. RLA) x modalidad de exposición (AA vs. NA) sobre el consumo de etanol al 10%, no mostró efectos estadísticamente significativos ni de los

factores individuales ni de la interacción entre ambos factores, lo que sugiere que ambas cepas consumieron por igual la dosis del 10% de etanol, y que estos patrones de consumo no estuvieron influidos por el procedimiento utilizado (AA vs. NA).

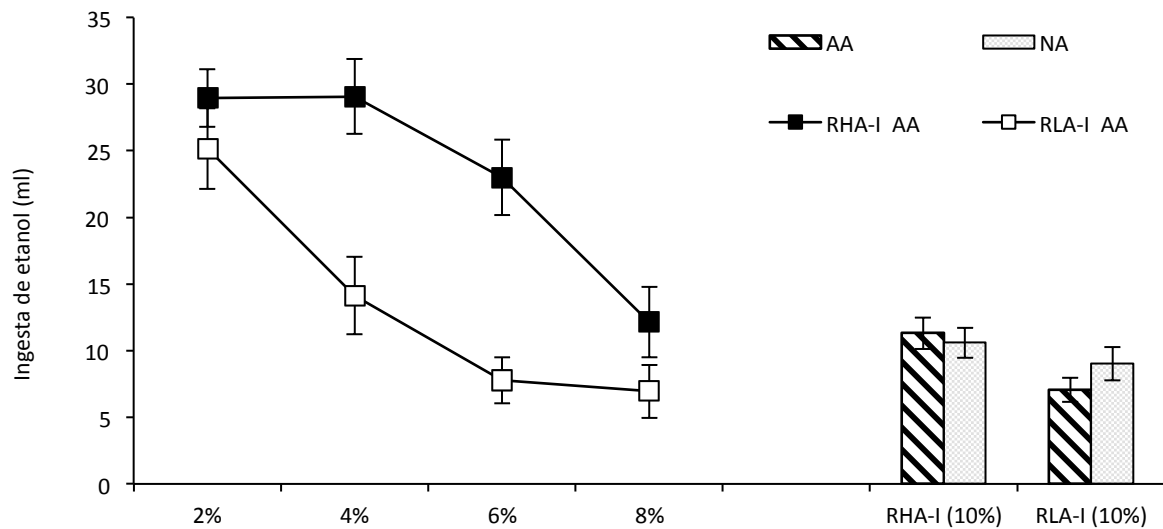


Figura 8. Cantidad de concentración de etanol en agua en mililitros (ml) ingerida por las ratas en los distintos grupos. AA: se refiere a los grupos de ratas en los que se procedió a la aclimatación para el consumo de etanol. Los valores 2%, 4%, 6%, 8% y 10% se refieren al valor de la concentración de etanol en agua. NA: se refiere a los grupos de ratas expuestos a valores de concentración de etanol del 10% sin aclimatación previa al etanol.

Preferencia por alcohol. La Figura 9 muestra los valores medios correspondientes a la preferencia por el alcohol que mostraron las cepas RHA-I y RLA-I en la condición AA, agrupados en bloques de 2 días (correspondientes a las concentraciones de 2, 4, 6 y 8% de alcohol). En la misma figura se presentan en barras los índices de preferencia por la solución de etanol al 10% correspondiente a las condiciones AA y NA, incluyendo un solo bloque con los datos registrados durante los 6 días en los que se presentó esta concentración. En esta figura el valor 0 en el eje de ordenadas indica que los animales no muestran preferencia por el etanol, comparado con el consumo de agua. Valores por encima de 0 indican un mayor consumo de etanol que de agua. Por último, valores por debajo de 0 muestran un mayor consumo de agua que de etanol. Como se puede observar en esa figura las ratas RHA-I y RLA-I muestran índices de preferencia por el alcohol que varían dependiendo de la concentración de droga suministrada. Con concentraciones bajas (2%) ambas cepas prefieren alcohol a agua, si bien esta preferencia parece más acusada en la cepa RHA-I. Cuando la concentración se eleva al 4% esta cepa continúa mostrando preferencia por el

alcohol, mientras que la primera muestra aversión (prefieren agua a alcohol). A partir de la dosis del 8% ambas cepas presentan valores negativos, lo que sugiere que estas concentraciones fueron aversivas para los sujetos, si bien dicha aversión parece más acusada en la cepa RLA-I en comparación con la RHA-I.

El ANOVA cepa (RHA vs. RLA) x dosis (2, 4, 6 y 8%) en la condición AA arrojó un efecto estadísticamente significativo de las variables dosis, $F(3, 39) = 20,285$, $p < 0,0001$ y cepa, $F(1, 13) = 21,738$, $p < 0,0001$, así como de la interacción entre ambas, $F(3, 39) = 2,883$, $p < 0,048$. El análisis detallado de la interacción mostró que las diferencias en preferencia por el alcohol entre las cepas RHA-I y RLA-I aparecieron con todas las dosis de etanol, a excepción de la dosis del 8% [valor menor de $F(1, 14) = 5,379$, $p < 0,036$].

El ANOVA cepa (RHA vs. RLA) x modalidad de exposición (AA vs. NA) correspondiente a la dosis del 10% de alcohol, mostró que sólo el efecto principal de la variable cepa resultó estadísticamente significativo, $F(1, 27) = 4,727$, $p < 0,039$, siendo los valores de preferencia para la cepa RLA-I más negativos que para la cepa RHA-I.

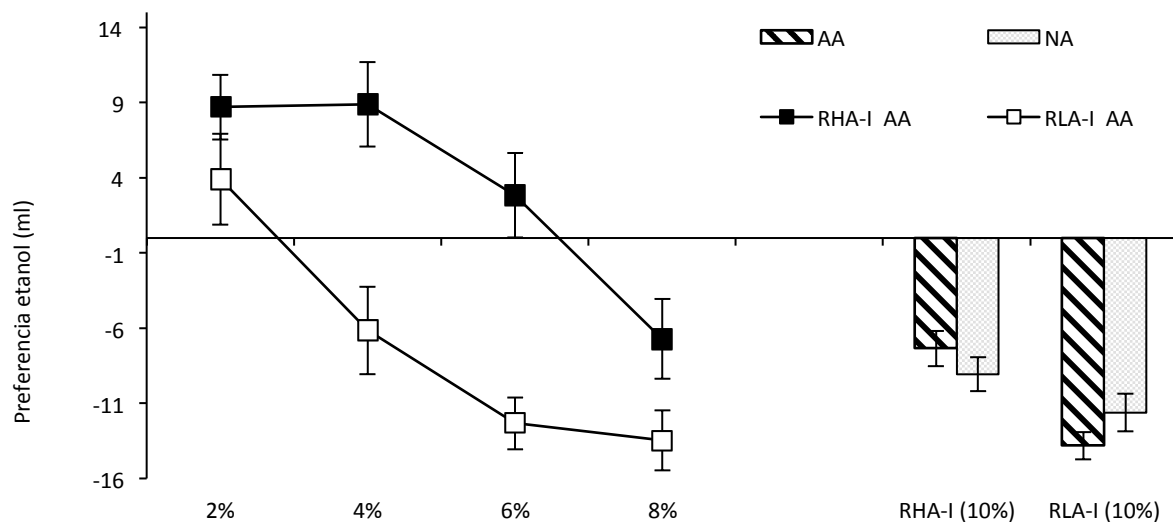


Figura 9. Preferencia en cada cepa de ratas por el etanol medido como el consumo real de etanol menos el consumo esperado de etanol. El consumo esperado se calcula a partir de la cantidad total de etanol más la cantidad total de agua ingerida por cada animal dividido entre dos. Los valores 2%, 4%, 6%, 8% y 10% se refieren al valor de la concentración de etanol en agua. AA: se refiere a los grupos de ratas en los que se procedió a la aclimatación para el consumo de etanol. NA: se refiere a los grupos de ratas expuestos a valores de concentración de etanol del 10% sin aclimatación previa al etanol.

Discusión

El objetivo principal de este experimento fue explorar la posible diferencia en consumo espontáneo de etanol entre las ratas RHA-I y RLA-I, tratando de averiguar si dichas diferencias dependen del procedimiento experimental utilizado (AA vs. NA), si varían dependiendo de la dosis, y por tanto, en qué medida nuestros datos se asemejan a los resultados informados en estudios previos realizados con ratas no consanguíneas. Los resultados obtenidos en este experimento indican la existencia de diferencias de cepa en consumo voluntario de alcohol que dependen de la dosis y de la variable dependiente utilizada, pero no de la presencia o ausencia del procedimiento de aclimatación, dado que cuando se presentó la dosis más elevada (10%), los patrones de consumo y preferencia no se vieron influidos por dicho procedimiento (AA vs. NA). Estos hallazgos amplían la caracterización fenotípica de estos animales en relación con el consumo de alcohol y ponen de manifiesto su utilidad como modelo animal en el estudio de las bases psicogenéticas de la conducta adictiva.

En primer lugar, los resultados encontrados en el presente trabajo son comparables a los hallados en estudios previos realizados con cepas no consanguíneas y dosis elevadas de etanol (10%). Se constata, así, que tanto la cepa RHA-/Verh como la RHA-I muestran valores de consumo y preferencia por alcohol superiores a los registrados en las cepas RLA/Verh y RLA-I, respectivamente (véase Fernández-Teruel, Driscoll *et al.*, 2002). Además, esta dosis parece ser aversiva para todos los animales utilizados, dado que éstos consumieron más agua que alcohol (véase Razafimanalina *et al.*, 1996).

Por otro lado, la comparación de los resultados obtenidos en este estudio con los obtenidos en trabajos previos que utilizan procedimientos de aclimatación al alcohol ofrece un panorama algo diferente. Así, mientras que Giorgi *et al.* (1997) observaron que las diferencias de cepa en consumo y preferencia por alcohol no dependían de la dosis ni de la variable dependiente utilizada (consumo vs. preferencia), en nuestro caso sí parecen estar influidas por estos factores. En concreto, nuestros resultados indican que, con respecto al consumo de alcohol, las diferencias de cepa aparecieron con las dosis del 4% y el 6%, pero no con las del 2%, 8% y 10%, mientras que en relación con los valores de preferencia tales diferencias se hallaron con las dosis del 2%, 4%, 6% y 10%, pero no con la del 8%. Si bien estas diferencias podrían sugerir que en las cepas Romanas consanguíneas las diferencias en consumo voluntario de etanol podrían estar atenuadas en comparación con la variedad no consanguínea, dada la escasez de trabajos realizados sobre el tema no es posible llegar a una conclusión definitiva a este respecto hasta que estos y otros resultados puedan replicarse.

En cualquier caso, el presente estudio ha permitido constatar por primera vez la existencia de diferencias en consumo espontáneo de alcohol entre las ratas Romanas consanguíneas RHA-I y RLA-I, analizando este patrón de consumo de manera más precisa que en estudios anteriores basados en el empleo de una dosis única de la droga. Se demuestra, además, que la experiencia previa con dosis menores de alcohol no influye en el consumo posterior de la dosis más elevada. Finalmente, la utilización de un rango de dosis extenso como el empleado en este experimento permite conocer mejor el perfil comportamental de estos animales, y puede posibilitar una caracterización más detallada de las relaciones entre dicho perfil y otros rasgos conductuales que se relacionan con el consumo de sustancias de abuso, tales como la tendencia a la búsqueda de novedad, un tema que se aborda en el siguiente estudio de esta Tesis Doctoral.

ESTUDIO 2.

La utilización de modelos animales para el estudio de la conducta de consumo de sustancias adictivas constituye un recurso muy valioso para el científico interesado en la exploración de los determinantes genéticos, biológicos y ambientales de esta conducta. En este sentido, la producción y desarrollo de cepas endocriadas sobre la base de un rasgo comportamental de interés ha permitido establecer relaciones precisas entre dicho rasgo y la tendencia de los sujetos a administrarse sustancias de abuso, permitiendo identificar qué factores de personalidad pueden hacer a un organismo más vulnerable a desarrollar un trastorno adictivo. Estos rasgos comportamentales se definen y manifiestan como un patrón conductual específico que difiere de un individuo a otro, y que se mantiene estable en un mismo organismo a lo largo del tiempo y a través de las situaciones (Pawlak *et al.*, 2008).

Algunas de las dimensiones de comportamiento estudiadas en animales inferiores son la actividad, la búsqueda de novedad, la agresión, la sociabilidad, y la temerosidad o ansiedad (Gosling, 2001; Lansade, Bouissou y Erhard, 2008), siendo el rasgo de búsqueda de novedad (*novelty seeking*) el que más se ha relacionado con la conducta de consumo de sustancias de abuso. Este rasgo se corresponde en seres humanos con el perfil de personalidad conocido como búsqueda de sensaciones (*sensation seeking*). Los buscadores de sensaciones son individuos caracterizados por mostrar un intenso deseo de experimentar experiencias novedosas, y por una tendencia a asumir riesgos para lograr este tipo de estimulación, lo que se traduce en una alta excitabilidad conductual en respuesta a la novedad, impulsividad en la toma de decisiones, ejecución de conductas de riesgo en situaciones variadas y tendencia a perder el control y enojarse (Driscoll *et al.*, 2009; Gallinat *et al.*, 2007). Los animales inferiores también parecen mostrar diferencias importantes en su reactividad ante situaciones novedosas, una conducta que se estudia registrando la cantidad de actividad locomotora y exploratoria que muestra un animal cuando es expuesto a un ambiente novedoso (Ballaz, 2009). Es importante distinguir entre actividad y *exploración o conductas exploratorias*, ya que algunos autores lo utilizan de forma distinta. Crusio (2001) define a la exploración como las conductas provocadas por estímulos novedosos, que consisten en acciones y posturas que le permiten al animal recolectar información sobre nuevos objetos y aspectos no familiares de su ambiente. El valor adaptativo o significación biológica de la exploración sería incrementar las oportunidades de encontrar recursos para la supervivencia (refugio, comida, apareamiento, etc.), pero simultáneamente conllevan el

riesgo de ser más vulnerables a los predadores y peligros del ambiente. De esta definición queda establecido que si bien la exploración es un tipo de actividad e involucra frecuentemente un grado de locomoción, no es una respuesta inespecífica, sino que se encuentra dirigida hacia la novedad o estímulos no familiares.

Las pruebas utilizadas con el objetivo de estudiar la conducta exploratoria en situaciones novedosas han sido diversas, destacando la Placa Perforada, también denominada Tabla de Agujeros o *Hole Board* (HB). Su versión original consistía en una plataforma cuadrada de 40 cm cada lado, con 16 hoyos equidistantes de 3 cm de diámetro cada uno (Boissier y Simon, 1962; citado en File, 2001). File y Wardill (1975a) modificaron y validaron la prueba utilizando una plataforma con 4 hoyos en lugar de 16, observando a los animales durante 10 minutos y registrando la cantidad de hundimientos de cabeza (*head dipping*) y su duración, tanto en ratas como en ratones. Boissier y Simon (1962) sostuvieron que la conducta de hundimiento de cabeza en los hoyos era una medida fiable que podía distinguir entre la actividad locomotora y la exploración, definiendo esta última como aquellos comportamientos por los cuales el animal adquiere información de un ambiente novedoso (File y Wardill, 1975b).

A pesar de su evidente utilidad, esta y otras pruebas similares no han estado exentas de problemas interpretativos en cuanto a la dimensión conductual que evalúan. En efecto, la novedad parece activar dos reacciones innatas opuestas: el miedo a la novedad (neofobia) y la curiosidad o necesidad de exploración (neofilia), por lo que estas pruebas podrían estar evaluando también, o alternativamente, la ansiedad de los sujetos. En este sentido, un número considerable de estudios indica que la administración de sustancias ansiolíticas aumentan la frecuencia de aparición de conductas exploratorias en diversas pruebas basadas en la exposición a ambientes nuevos, lo que sugiere que los modelos de búsqueda de novedad podrían ser modelos válidos de ansiedad basados en el conflicto que genera la tendencia natural de los animales a explorar los espacios novedosos y la evitación de los mismos por los riesgos que esto podría implicar para su integridad y seguridad (Dantzer, 1987).

Aunque la existencia de un rasgo comportamental referido a la tendencia a la exploración de la novedad, independiente de la ansiedad, es aún una cuestión no completamente dilucidada en la literatura, algunos estudios factoriales basados en la utilización de una amplia batería de pruebas conductuales han obtenido un factor independiente de los niveles de ansiedad o actividad, que podría denominarse “exploración”, “neofilia” o “búsqueda de novedad” (Ibáñez, Ávila, Ruipérez, Moro y Ortet, 2008). Este

comportamiento es bastante estable a través de las diferentes pruebas, lo que sugiere que las variaciones individuales en estas respuestas conforman un rasgo temperamental determinado biológicamente (Dellu, Mayo, Cherkaoui, Le Moal y Simon, 1992; Piazza *et al.*, 1989). No obstante, la cuestión de si las pruebas conductuales utilizadas en este contexto miden un rasgo particular, varios a la vez, o diferentes en cada prueba, es una cuestión que permanece abierta en el momento actual.

Dada la importancia que tiene el estudio sistemático del rasgo de búsqueda de novedad para la presente Tesis Doctoral, el trabajo que se presenta a continuación se realizó con el objetivo de analizar la idoneidad de varias pruebas conductuales para analizar este rasgo comportamental, tratando de averiguar si las respuestas registradas en las mismas son estables entre individuos y nos pueden aportar información sobre su validez. En concreto, se seleccionó como prueba de referencia el HB en la que los animales son expuestos de manera forzada a la novedad, y se comparó con dos pruebas de elección libre (Prueba de Emergencia y Laberinto en Y; véase Dellu, Mayo, Piazza, Le Moal y Simon, 1993) Sobre la base de la evidencia empírica indicativa de la existencia de un rasgo comportamental de búsqueda de novedad en roedores (Dellu, Piazza, Mayo, Le Moa y Simon, 1996; Pawlak *et al.*, 2008), esperábamos encontrar correlaciones altas entre las conductas de búsqueda de novedad que exhiben los animales cuando son expuestos a estas tres pruebas, lo que permitiría validarlas para analizar dicho rasgo temperamental que puede estar íntimamente relacionado con la conducta de consumo de sustancias de abuso.

Método

Sujetos.

En este experimento se emplearon un total de 30 ratas Wistar hembra, de aproximadamente 5 meses de edad con un peso medio de 248 gramos, que previamente habían sido expuestas a un procedimiento de aversión condicionada al sabor. Las ratas tuvieron acceso libre a la comida y bebida durante la duración del experimento y desde un mes antes del comienzo del mismo. Las ratas estaban alojadas en cajas de plexiglás independientes dentro de una habitación en la que se mantuvo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, con inicio de la luz a las 8 am. Las sesiones experimentales comenzaron a las 9:30 am.

Aparatos.

Laberinto en Y. Se trata de un laberinto de plexiglás compuesto de tres brazos idénticos de 50 x 16 x 32 cm (largo x ancho x alto), con el suelo oscuro y las paredes transparentes (véase apartado *a* en la Figura 10).

Prueba de Emergencia. Consiste en una caja de plexiglás dividida en dos compartimentos idénticos de 27 x 25 x 28 cm (largo x ancho x alto), uno negro (con una tapa cubriendo su parte superior) y otro blanco sin dicha tapa. Los compartimentos están separados por una pared de 0.5 cm de grosor que contiene una puerta permanentemente abierta de 9 x 9 cm que permite la comunicación entre ambos compartimentos. El compartimento blanco estuvo iluminado con un flexo equipado con una bombilla de 60 watos colocada a unos 100 cm por encima del aparato (véase apartado *ben* la Figura 10).

Hole-Board. Consiste en una caja de madera blanca de 66 x 66 x 47 cm (largo x ancho x alto), que tiene 4 agujeros en el suelo de 3.7 cm de diámetro, y que se encuentran equidistantes entre ellos. Justo debajo de éstos se colocaron contenedores de plástico que contenían pequeños objetos metálicos o bolas de cristal parcialmente ocultos en arena o serrín. El suelo de la caja se encontraba dividido en 16 cuadrados iguales dibujados con líneas rojas, que definían dos espacios distintos, uno periférico compuesto por los doce cuadrados que pegaban con las paredes de la caja, y el otro central, compuesto por los cuatro cuadrados centrales (véase apartado *c* en la Figura 10).

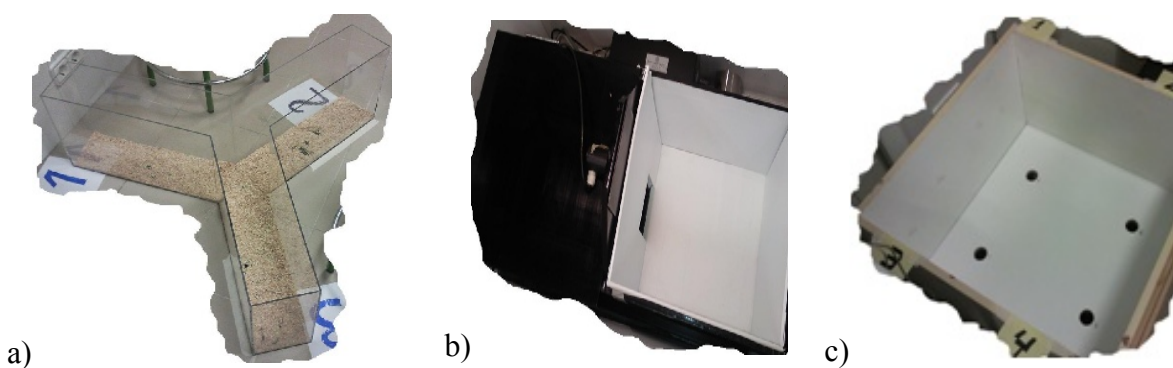


Figura 10. Las imágenes indicadas como a), b), y c), corresponden a las pruebas Laberinto en Y, Prueba de Emergencia y *Hole-Board*, respectivamente.

Procedimiento.

Cada una de las ratas pasó por las tres pruebas correspondientes a los aparatos descritos en el apartado anterior. El orden de exposición a los distintos aparatos estuvo contrabalanceado a través de los sujetos. Las distintas pruebas se realizaron en la misma sala experimental. Las condiciones estímulares de la sala (sonido, iluminación y claves visuales) fueron mantenidas constantes durante todo el estudio. Entre la realización de una prueba y la siguiente transcurrieron siete días para cada una de las ratas.

El entrenamiento en el Laberinto en Y consistió en dos ensayos de cinco minutos cada uno con un intervalo entre ensayos (ITI) de 2 minutos. En el ensayo 1, uno de los tres brazos se encontraba bloqueado (de manera contrabalanceada), y por tanto era inaccesible para el animal. Al comienzo del primer ensayo el animal fue introducido en la parte central del Laberinto en Y, con la cabeza situada justo de espaldas a la compuerta que bloqueaba el acceso a uno de los brazos. Una vez finalizado el primer ensayo el animal era retirado del laberinto e introducido en su caja hogar durante el tiempo establecido como ITI. Asimismo la compuerta era retirada permitiendo al animal la exploración del nuevo brazo junto a la de los brazos que estuvieron abiertos durante el primer ensayo. Transcurridos los dos minutos dio lugar el segundo ensayo, de duración 5 minutos, en el que el animal fue introducido en la misma posición que la descrita en el ensayo 1. Al final del ensayo el animal fue devuelto a su caja hogar, y se procedía a la limpieza del laberinto (se extraían las defecaciones y se removía el serrín). Las medidas que se tomaron en esta prueba fueron: a) latencia de acicalamiento (*grooming*) en cada uno de los brazos, definido como el tiempo que transcurría desde que el animal se introducía en el Laberinto en Y hasta que aparecía por primera vez la conducta de acicalamiento; b) latencia de aparición de la conducta de elevación en las dos patas delanteras (*rearing*) en cada uno de los brazos, definido como tiempo que transcurre desde que el animal se introduce en el Laberinto en Y hasta que aparece por primera vez la conducta de *rearing*. En concreto se registró el tiempo que transcurrió hasta que se observó esta conducta en cada uno de los brazos, de manera que se obtuvieron dos medidas en el ensayo 1 y tres medidas en el ensayo 2; c) número de cruces entre los brazos cada minuto, indicando el brazo visitado y el tiempo de permanencia en cada uno de los brazos; d) número de *groomings*, contabilizados cada minuto, teniendo en cuenta el brazo en el que ocurre; e) número de *rearings*, contabilizados cada minuto, teniendo en cuenta el brazo en el que ocurre, y; f) número total de defecaciones.

En la prueba de *Hole-Board* (HB) los animales fueron probados en una ocasión. Al comienzo del ensayo se introdujo el animal en una esquina del HB (la esquina más cercana a la puerta del laboratorio) con la cabeza situada hacia el centro de la caja. Al final del ensayo el animal fue devuelto a su caja hogar, y se procedió a la limpieza de la caja con alcohol al 70%. La duración del ensayo fue de 5 minutos. Las medidas que se tomaron en esta prueba fueron: a) latencia de aparición de la conducta de hundimiento de la cabeza en los agujeros (*head-dipping*) definida como el tiempo que transcurre desde que el animal comienza la prueba en el HB hasta que introduce por primera vez la cabeza en alguno de los agujeros; b) latencia de *grooming*; c) latencia de *rearing*; d) número de cuadrados cruzados; e) número de *head-dippings*, y tiempo empleado en cada uno de ellos, contabilizados cada minuto, y teniendo en cuenta el número del agujero en el que ocurre; f) número de *groomings*, contabilizados cada minuto, y teniendo en cuenta la posición del cuadrado en el que ocurre (central o periférica); g) número de *rearings*, contabilizados cada minuto y teniendo en cuenta la posición del cuadrado en el que ocurre (central o periférica) y; h) número total de defecaciones.

En la Prueba de Emergencia los animales fueron expuestos a este aparato en un único ensayo de 10 minutos, permitiéndose la exploración libre de los dos compartimentos. Al comienzo de cada ensayo se introdujo el animal en el compartimento de luz, con la cara lo más cercana posible a la pared opuesta a donde se encontraba situada la puerta que comunicaba con el otro compartimento. Al final del ensayo el animal fue devuelto a su caja hogar, y se procedió a la limpieza de los dos compartimentos de la caja con alcohol al 70%. Las medidas que se tomaron en esta prueba fueron: a) latencia de emergencia, definida como el tiempo que transcurre desde que el animal ha entrado con las cuatro patas en el compartimento de oscuridad hasta que el animal sale con las cuatro patas al compartimento iluminado; b) latencia de *grooming*; c) latencia de *rearing*; d) número de veces cada minuto que el animal se encuentra en el compartimento de luz, así como el tiempo que permanece en él en cada ocasión, e) número de ocasiones en las que aparece la conducta de *grooming*, contabilizados cada minuto en el compartimento de luz; f) número de ocasiones en las que aparece la conducta de *rearing*, contabilizados cada minuto en el compartimento de luz; y g) número total de defecaciones en compartimento de luz.

Análisis de los datos.

Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para establecer relaciones lineales entre las conductas registradas en las distintas tareas por las que pasaron los animales. Con objeto de facilitar la comprensión y presentación de los mismos sólo se informan de las medidas entre aparatos en las que se encontraron correlaciones estadísticamente significativas. Además, se realizaron ANOVAS sobre las conductas cuyas correlaciones entre aparatos fueron estadísticamente significativas con objeto de evaluar si se produce decaimiento de la conducta exploratoria conforme transcurre el tiempo en cada uno de los aparatos. El nivel de significación elegido fue de $p < 0.05$.

Resultados

De las distintas medidas observadas en cada uno de los aparatos encontramos que existían valores de correlación de Pearson estadísticamente significativos entre la conducta de *head-dipping* en el HB y el número de entradas en el brazo novedoso del Laberinto en Y (ensayo 2). Los valores en ambas conductas fueron computados minuto a minuto de manera que se obtuvieron 5 medidas de *head-dipping* a partir del registro acumulado minuto a minuto. De igual manera se obtuvieron 5 medidas relativas a la conducta de entrada en el brazo novedoso. Como se puede observar en la Tabla 2, de los 25 valores de correlación posibles al combinar los registros entre ambas conductas, 18 de ellos resultaron estadísticamente significativos. Sólo el valor de *head-dipping* registrado durante el primer minuto no correlacionó con ninguno de los valores de entrada en el brazo novedoso. Por otro lado, no se declararon correlaciones significativas entre las medidas de *head-dipping* y la entrada a los brazos que durante el primer ensayo estuvieron abiertos (sólo 3 de 50 posibles). Por último, se observó que la correlación de Pearson entre las medidas latencia de emergencia registrada en la Prueba de Emergencia y el número de *head-dippings* acumulados en los cuatro primeros minutos resultó estadísticamente significativa.

Tabla 2

Coefficientes de Correlación de Pearson entre las Pruebas de Búsqueda de Novedad

	Lab Y 2	Lab Y 3	Lab Y 4	Lab Y 5	HB 1	HB 2	HB 3	HB 4	HB 5	Emergencia
Lab Y 1	,836(**)	,703(**)	,573(**)	,515(**)	,015	,352	,491(**)	,487(**)	,508(**)	-,125
Lab Y 2	1	,913(**)	,846(**)	,807(**)	,174	,468(**)	,632(**)	,532(**)	,545(**)	-,223
Lab Y 3		1	,935(**)	,855(**)	,073	,350	,555(**)	,486(**)	,503(**)	-,137
Lab Y 4			1	,931(**)	,171	,364(*)	,552(**)	,482(**)	,487(**)	-,177
Lab Y 5				1	,292	,435(*)	,575(**)	,458(*)	,449(*)	-,180
HB 1					1	,685(**)	,593(**)	,428(*)	,357	-,128
HB 2						1	,807(**)	,715(**)	,632(**)	-,297
HB 3							1	,845(**)	,804(**)	-,191
HB 4								1	,943(**)	-,395(*)
HB 5									1	-,308
Emergencia										1

Nota: Lab Y 1 hasta Lab Y 5 se refiere al número de entradas acumuladas desde el minuto 1 hasta el minuto 5, respectivamente, en el brazo novedoso del laberinto en Y durante el ensayo 2. HB 1 hasta HB 5 se refiere al número de head-dipping acumuladas desde el minuto 1 hasta el minuto 5, respectivamente, en el *Hole-Board*. Emergencia se refiere a la latencia transcurrida desde que la rata se introduce por primera vez en el compartimento oscuro hasta que sale con las cuatro patas al compartimento de luz. ** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Con el objetivo de evaluar si los animales realizaron un mayor número de visitas al brazo novedoso que a los brazos abiertos se registró el número de entradas en cada uno de ellos cada minuto durante el ensayo 2. Como se puede observar en la Figura 11 durante los primeros minutos el número de entradas en el brazo novedoso (BN) fue mayor que el número de entradas en cada uno de los brazos abiertos (BA1 y BA2).

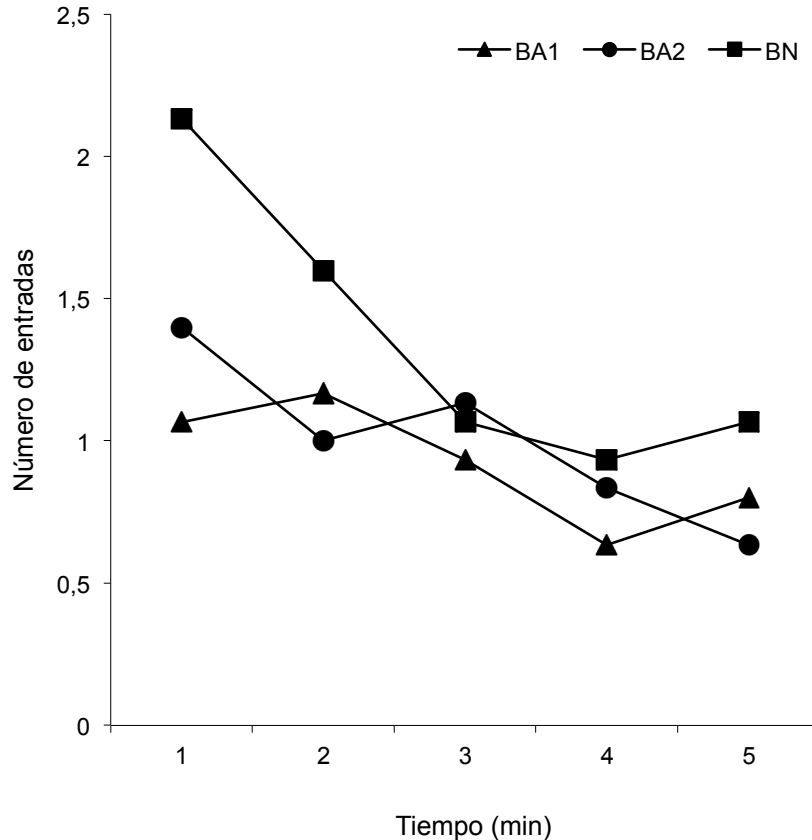


Figura 11. Número de entradas promedio en los brazos abiertos uno, dos y en el brazo novedoso (BA1, BA2 y BN; respectivamente) registradas en cada uno de los cinco minutos durante el segundo ensayo en el Laberinto en Y.

Esta primera impresión se vio confirmada por el análisis estadístico correspondiente. El ANOVA 3 (brazo del laberinto) x 5 (minutos) mostró que los efectos principales de los factores brazo y minuto resultaron estadísticamente significativos [$F(2, 58) = 29.77$, $p < 0.0001$ y $F(4, 116) = 21.95$, $p < 0.0001$; respectivamente]. Más importante para el objetivo de este estudio, la interacción brazo x minuto también resultó estadísticamente significativa; $F(8, 232) = 3.31$, $p = 0.0013$. El análisis de la interacción minuto a minuto arrojó valores estadísticamente significativos en los minutos uno, dos y cinco [$F(2, 58) = 3.70$, $p = 0.031$; para el contraste significativo menos favorable], debidos en todos los casos al mayor número de entradas en el brazo novedoso que en los brazos abiertos. Entre los brazos abiertos no existieron diferencias estadísticamente significativas en ningún minuto.

Por último, evaluamos el posible decaimiento de la conducta de *head-dipping* en el HB a lo largo de la sesión. Como se puede observar en la Figura 12 se produjo una reducción de esta conducta en el último minuto.

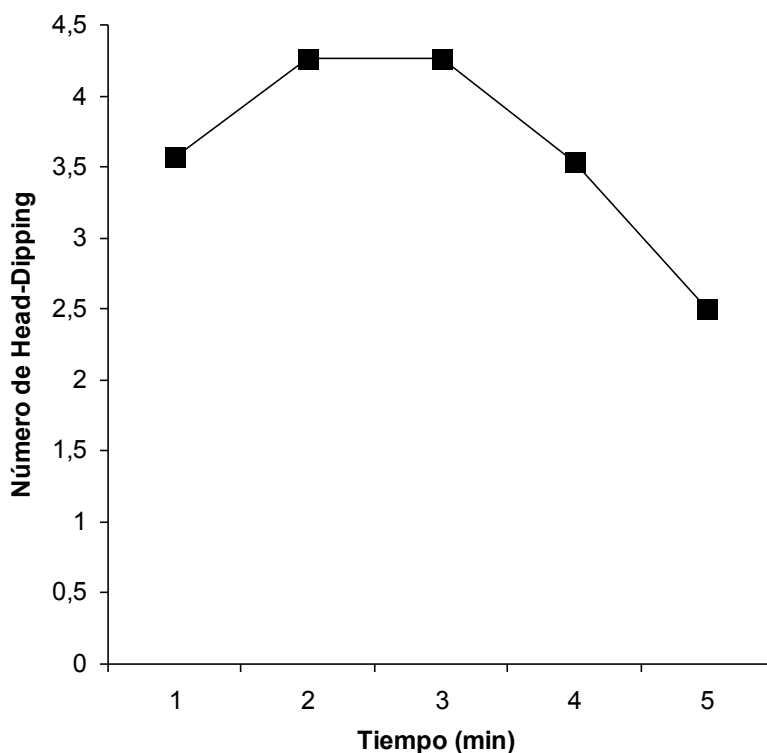


Figura 12. Número de Head-Dipping promedio registrado en cada uno de los cinco minutos en el *Hole-Board*.

Esta impresión se vio confirmada con el análisis estadístico correspondiente. El ANOVA 5 (minutos) sobre la conducta de Head-Dipping resultó estadísticamente significativo, $F(4, 116) = 4.13$, $p = 0.0036$. El análisis detallado mostró que el número de head-dipping se redujo drásticamente en el último minuto, difiriendo con cada uno de los cuatro primeros minutos de manera estadísticamente significativa [$t(29) = 2.17$, $p = 0.038$, para el contraste significativo menos favorable]. Ninguna de las comparaciones entre los primeros cuatro minutos arrojó diferencias sensibles.

Discusion

El Estudio 2 fue realizado con el objetivo de validar las pruebas comportamentales utilizadas para analizar el rasgo conductual de búsqueda de novedad. Con este objetivo se analizaron y compararon conductas relacionadas con el perfil temperamental de búsqueda de novedad en tres pruebas comportamentales: el HB, la Prueba de Emergencia y el Laberinto en Y, tratando de analizar si dicho perfil constituye un rasgo del comportamiento animal que permanece estable a través de las pruebas comentadas y con independencia de que éstas se

basen en situaciones de elección libre (Prueba de Emergencia, laberinto en Y) o de elección forzada (HB).

Los resultados obtenidos indicaron que los animales que mostraron más conductas exploratorias relacionadas con novedad en el HB (i.e., *head dipping*) fueron aquellos que visitaron con más frecuencia el brazo novedoso del laberinto en Y, así como los que mostraron una mayor tendencia a visitar el compartimento iluminado en la Prueba de Emergencia. Asimismo, se comprobó que, en el laberinto en Y, los sujetos prefirieron visitar el brazo novedoso en comparación con los brazos conocidos, y que en el HB la tendencia a explorar los agujeros decayó en el último minuto. Estos resultados ponen de manifiesto la utilidad de las pruebas comportamentales empleadas en este estudio para analizar experimentalmente el rasgo conductual de búsqueda de novedad.

Las diferencias individuales que muestran los animales en su preferencia por situaciones novedosas tienen su correspondencia en el ser humano con el rasgo de personalidad conocido como “búsqueda de sensaciones”. Los buscadores de sensaciones son individuos caracterizados por mostrar un intenso deseo de experimentar experiencias novedosas, y por una tendencia a asumir riesgos para lograr este tipo de estimulación (Driscoll *et al.*, 2009). La evaluación de estos sujetos mediante la Escala de Búsqueda de Sensaciones de Zuckerman ha permitido proponer la existencia de cuatro factores relacionados con este perfil de personalidad (Zuckerman, 1979): (a) búsqueda de emociones y aventura (i.e., deseo de realizar actividades físicas de riesgo); (b) búsqueda de experiencia (i.e., tendencia a buscar nuevas experiencias que estimulen los sentidos, como las drogas de abuso), mostrando un estilo de vida inconformista; (c) desinhibición (i.e., orientación social-hedonística); y (d) susceptibilidad al aburrimiento (i.e., aversión a las actividades rutinarias, agitación ante la ausencia de estimulación variada).

Los estudios realizados en otras especies también sugieren que los animales inferiores muestran diferencias importantes en su reactividad ante situaciones novedosas, una conducta que se estudia registrando la cantidad de actividad locomotora y exploratoria que muestra un animal cuando es expuesto a un ambiente novedoso (Ballaz, 2009). Para tal fin se emplean pruebas conductuales como el campo abierto (Open field), el Hole Board, el corredor circular, o bien pruebas basadas en preferencia por un lugar novedoso vs. familiar (Dellu *et al.*, 1996), procedimientos experimentales que permiten dividir a los animales en sujetos muy reactivos o poco reactivos ante este tipo de estimulación. A pesar de su utilidad, estas pruebas no suelen ser comparadas entre sí para poner a prueba su validez, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo constituyen una aproximación novedosa al estudio

de este rasgo temperamental, al comparar las respuestas de los animales ante situaciones novedosas que difieren en su carácter forzado (Hole Board) vs. libre (Prueba de Emergencia, laberinto en Y), y poner de manifiesto que la mayoría de las respuestas relevantes y vinculadas con este rasgo correlacionaron entre sí a través de las pruebas.

Por otro lado, los animales altamente reactivos a la novedad muestran de forma muy consistente una mayor tendencia a consumir sustancias de abuso, una tendencia que se manifiesta, por ejemplo, en mayores tasas de consumo espontáneo de etanol y de autoadministración de psicoestimulantes, entre otras drogas (Blanchard, Mendelsohn y Stamp, 2009). Esta conexión entre búsqueda de sensaciones y consumo de sustancias parece depender de la mayor sensibilidad a la recompensa que muestran estos individuos, vinculada a su vez con ciertas características funcionales de sus circuitos de recompensa (Bardo *et al.*, 1996). Tales características, determinadas genéticamente y moduladas por influencias ambientales, les harían especialmente vulnerables a desarrollar conductas propias de los cuadros adictivos. Por consiguiente, el estudio del rasgo de búsqueda de novedad en animales constituye en la actualidad una aproximación de gran relevancia y utilidad para explorar las bases psicobiológicas de conductas de gran interés científico, como la conducta adictiva.

ESTUDIO 3.

Una de las áreas más florecientes de la neurociencia conductual actual se centra en el estudio de las diferencias individuales a través del empleo de modelos animales, los cuales nos permiten investigar en qué medida las causas y consecuencias de estas diferencias individuales determinan el ajuste, la capacidad adaptativa y la vulnerabilidad a la enfermedad de los individuos. La individualidad se define como un conjunto de rasgos conductuales y/o fisiológicos estables que distinguen a unos individuos de otros dentro de una misma especie estando relacionada con la personalidad en los seres humanos. En animales inferiores los rasgos más estudiados han sido la ansiedad, la actividad y la conducta exploratoria (Gosling, 2001). Estos rasgos pueden estudiarse sistemáticamente mediante varias aproximaciones metodológicas (véase Pawlak *et al.*, 2008, para revisión). Por ejemplo, se puede recurrir a correlacionar los valores obtenidos en cada individuo con respecto a una o varias dimensiones conductuales o fisiológicas, tratando de estimar el grado de relación entre los mismos. De igual modo, una cohorte de animales puede ser expuesta a una prueba conductual, dividiendo después a los sujetos de acuerdo con su conducta para conformar grupos extremos en una población dada. Estos grupos son estudiados posteriormente en otras dimensiones comportamentales o biológicas. Es posible también llevar a cabo un procedimiento de crianza selectiva (*breeding*) basado en el cruzamiento de aquellos individuos que muestran diferencias extremas en un rasgo o conducta particular, usualmente relacionada con capacidades de aprendizaje y memoria, activación psicomotora, adicción o emocionalidad. Finalmente, otra aproximación consiste en comparar la conducta de animales genéticamente diferentes (por ejemplo diversas cepas consanguíneas, cepas consanguíneas vs. no consanguíneas, o animales genéticamente manipulados).

Con independencia de la aproximación elegida, el estudio de los rasgos comportamentales que caracterizan a los individuos de una especie dada nos permite estudiar de forma precisa las relaciones sistemáticas entre diferentes conductas, y también entre conductas y funciones biológicas, al mismo tiempo que posibilita analizar el grado en que un comportamiento, con características de rasgo o estado, se relaciona con la susceptibilidad a desarrollar una enfermedad dada (Gosling, 2001; Pawlak *et al.*, 2008). En relación con este último aspecto, son numerosas las evidencias que indican que los animales que muestran el rasgo de búsqueda de novedad más acentuado son más sensibles a los efectos de las sustancias de abuso tales como alcohol, estimulantes y morfina, lo que sugiere que dicho rasgo puede constituir un factor de vulnerabilidad en los trastornos adictivos

(Bardo et al., 1996; Conway, Kane, Ball, Poling y Rounsaville, 2003; Fernández-Teruel, Driscoll *et al.*, 2002; Pelloux, Costentin y Duterte-Boucher, 2006). Esta relación también ha sido identificada en el ser humano con relación a la dimensión de personalidad conocida como búsqueda de sensaciones (Cloninger, Sigvardsson, Przybeck y Svrakic, 1995; Cloninger y Svrakic, 1998), lo que pone de manifiesto la utilidad de los modelos animales en este ámbito de la investigación neurocientífica (Blanchard *et al.*, 2009; Carroll *et al.*, 2009).

Piazza y su grupo de investigación demostraron en 1989 que las ratas Sprague-Dawley muestran diferencias importantes en su reactividad o conducta exploratoria cuando son expuestas a una situación de exposición forzada a la novedad, y que estas diferencias se relacionan con su capacidad para autoadministrarse anfetamina. Utilizando un corredor circular y exponiendo a los sujetos al mismo durante 2 horas, categorizaron a los animales en “*high responder (HR)*” o en “*low responder (LR)*”, sometiéndolos después al test de autoadministración intravenosa del psicoestimulante. En este estudio se comprobó que sólo el grupo de HR logró desarrollar la conducta instrumental asociada con la autoadministración de anfetamina (Piazza *et al.*, 1989, 1990). De modo similar, se halló una relación positiva entre la magnitud de la respuesta exploratoria a la novedad y la reactividad a la inyección sistémica de cocaína y nicotina, así como entre la primera de las medidas y el condicionamiento de preferencia por el lugar inducido por anfetamina (Klebaur y Bardo, 1999; Nadal, Armario y Janak, 2002; Suto, Austin y Vezina, 2001). Estos hallazgos han llevado a concluir que la propensión de un individuo a autoadministrarse anfetamina puede ser predicha por su reactividad a un ambiente novedoso (Ellenbroek *et al.*, 2005; Kabbaj et al., 2004; Piazza, Deroche-Gamonet, Rouge-Pont y Le Moal, 2000). Las ratas HR y LR también han sido sometidas a pruebas de novedad basadas en elección libre, tales como el laberinto en Y, el test de emergencia y el laberinto radial de 16 brazos. En concreto, Deltu *et al.* (1993) observaron que el grupo HR visitaba el brazo novedoso de un laberinto en Y con más frecuencia que el grupo LR, a pesar de que el número total de visitas a los tres brazos era mayor en este último grupo. Del mismo modo, las ratas HR mostraron una latencia de emergencia menor en comparación con las ratas LR, visitando antes el compartimento iluminado en una caja de luz/oscuridad y mostrando, así, menos conductas ansiosas y de evitación de los ambientes novedosos. Finalmente, los animales del grupo HR realizaron más visitas de menor tiempo en el laberinto radial de 16 brazos, visitando más los brazos novedosos que el grupo LR. Estos hallazgos comportamentales reflejan la expresión de un

rasgo que, en opinión de los autores, es comparable al rasgo de búsqueda de sensaciones en el ser humano (Dellu *et al.*, 1996).

Las diferencias comportamentales halladas en estos animales en relación con la conducta exploratoria ante la novedad, las respuestas de ansiedad y la tendencia a autoadministrarse sustancias de abuso se acompañan de diferencias basales e inducidas por estrés social en la expresión de genes vinculados con los circuitos cerebrales que regulan la conducta emocional y las respuestas de estrés, tales como el gen de los receptores de glucocorticoides y el de la CAM-KIIb en el hipocampo, o el gen del factor liberador de la adrenocorticotropa en la amígdala, que aparecen expresados en mayor grado en el grupo LR en comparación con el HR (Kabbaj, Devine, Savage y Akil, 2000; Kabbaj *et al.*, 2004).

Otro modelo animal utilizado en este ámbito se basa en las diferencias que muestran las ratas Wistar en sus conductas de *rearing* cuando son expuestas a la prueba de campo abierto (*open field*). Los grupos extremos que se obtienen con esta aproximación experimental son los llamados *high rearing activity* (HRA) y *low rearing activity* (LRA), respectivamente (Thiel, Muller, Huston y Schwarting, 1999), los cuales muestran también diferencias en sus conductas de *rearing* cuando son sometidos al test de reconocimiento de objetos novedosos (Pawlak y Schwarting, 2002). Estos animales, además, presentan diferencias significativas en su reactividad conductual a la administración de sustancias de acción colinérgica como la escopolamina o la nicotina, así como en su actividad dopaminérgica estriada, lo que sugiere la existencia de diferencias neuroquímicas que podrían explicar sus rasgos conductuales divergentes (Pawlak y Schwarting, 2005; Thiel *et al.*, 1999).

Por su parte, Harro y su grupo de investigación han desarrollado un modelo que distingue entre animales (ratas Wistar y Sprague-Dawley) con baja exploración (*low exploratory*, LE) y con alta exploración (*high exploratory*, HE) utilizando una prueba de novedad basada en la presentación de tres objetos novedosos y un alimento familiar. Como índice de exploración se utilizan diversas medidas conductuales, tales como la actividad horizontal y vertical y la exploración de los objetos novedosos, diferenciando entre la exploración global del ambiente vs. la de elementos particulares del mismo (Harro, Oreland, Vasar y Bradwejn, 1995). Las diferencias comportamentales halladas entre estos grupos parecen estar relacionadas con su actividad monoaminérgica, habiéndose encontrado niveles extracelulares de dopamina en el estriado más elevados en el grupo HE en comparación con el grupo LE, tanto en condiciones basales como en respuesta a la administración de amfetamina (Alittoa, Eller, Herm, Rincken y Harro, 2007).

Es posible también seleccionar a los animales en función de su respuesta ante la administración de un compuesto farmacológico relacionado con las vías neuroquímicas que determinan la conducta exploratoria y adictiva. Un ejemplo de esta aproximación lo constituyen las ratas denominadas “susceptibles a la apomorfina” (APO-SUS) vs. “no susceptibles a la apomorfina” (APO-UNSUS), las cuales (derivadas de las ratas Wistar) se seleccionan en función de la persistencia que muestran en su respuesta de estereotipia (>500/45 minutos) ante la administración de este agonista dopaminérgico D1/D2 en dosis de 1-5 mg/kg (Cools, Brachten, Heeren, Willemen y Ellenbroek, 1990; Ellenbroek *et al.*, 2000). Las ratas APO-SUS tienen un perfil comportamental comparable a las ratas HR en la prueba de campo abierto, muestran una respuesta de sobresalto más acentuada y de inhibición de prepulso más inhibida en relación con las APO-UNSUS, mientras que estas últimas presentan una mejor ejecución en la tarea de evitación activa en dos sentidos y bajos niveles basales de actividad locomotora (Ellenbroek *et al.*, 2005). En años recientes se ha investigado si estas cepas de animales difieren también en la autoadministración de sustancias de abuso, comprobándose que, en comparación con la cepa APO-SUS, la cepa APO-UNSUS: a) consume más alcohol en procedimientos de elección agua/alcohol, siempre que la dosis utilizada oscile entre el 4 y el 10% (Sluyter, Hof, Ellenbroek, Degen y Cools, 2000); y b) se autoadministra más cocaína en pruebas de autoadministración intravenosa convencionales (van der Kam, Coolen, Ellenbroek y Cools, 2005). Estas diferencias comportamentales se acompañan de importantes divergencias en el sistema nervioso central y periférico, y en el sistema endocrino e inmunológico (véase Pawlak *et al.*, 2008, para revisión), mostrando además diferencias importantes en la expresión de genes tales como el *Aph-1b*, un gen que podría regular la velocidad de desarrollo cuya relación con la conducta adictiva se desconoce en la actualidad (Ellenbroek *et al.*, 2005, para revisión).

Por otro lado, algunos grupos de investigación han desarrollado cepas de animales con diferencias extremas en conducta exploratoria ante la novedad mediante procedimientos de cruzamiento selectivo. Así, por ejemplo, el grupo de Akil ha iniciado recientemente un protocolo de *breeding* utilizando a los animales HR y LR a partir de una colonia de ratas Sprague-Dawley (denominados HR-bred y LR-bred). Los sujetos fueron diferenciados sumando la actividad locomotora horizontal y las conductas de *rearing* registradas en una caja de actividad novedosa durante 60 minutos. Los resultados indican que el fenotipo es heredable, dado que las medidas de búsqueda de novedad y otras conductas emocionales y de reactividad a estímulos reforzantes permanecen estables y diferenciadas en cada cepa

(tanto en machos como en hembras), lo que indica que estos rasgos comportamentales están en gran parte determinados genéticamente (Ballaz, 2009; Davis, Clinton, Akil y Becker, 2008; Stead *et al.*, 2006; Turner, Flagel, Clinton, Akil y Watson, 2008).

Aunque las ratas RHA y RLA fueron inicialmente seleccionadas en función de sus diferencias extremas en conducta emocional (estimada por su capacidad para adquirir la respuesta de evitación activa de dos sentidos), son numerosas las evidencias que indican que este cruzamiento selectivo ha provocado la segregación de otros rasgos comportamentales relevantes, tanto en la variedad no consanguínea como en la consanguínea. Estos rasgos se relacionan con impulsividad, estilo de afrontamiento ante ambientes novedosos y vulnerabilidad a la adicción. En concreto, estudios recientes han encontrado que cuando las cepas consanguíneas son expuestas a tareas de impulsividad como la polidipsia inducida por programa, la tarea de descuento por demora y la tarea de tiempo de reacción serial con 5-elecciones, la cepa RHA-I muestra mayores índices de impulsividad que la RLA-I, ingiriendo una mayor cantidad de agua, eligiendo un menor número de veces la recompensa demorada y mostrando un pobre control inhibitorio (Moreno *et al.*, 2010). En relación con la variedad no consanguínea, los resultados parecen equivalentes. Así, durante la adquisición una respuesta instrumental bajo condiciones de reforzamiento diferencial de tasas bajas (DRL-20), la cepa RHA muestra una mayor tendencia a la impulsividad, dada su pobre capacidad para inhibir conductas irrelevantes (Zeier *et al.*, 1978). Asimismo, de un modo similar a lo observado en los seres humanos que presentan altas puntuaciones en el rasgo de personalidad de búsqueda de sensaciones, la cepa RHA presenta una amplitud aumentada en el componente P1 de los potenciales evocados visuales que se registran en respuesta a la presentación de flashes de luz de intensidades crecientes (Siegel *et al.*, 1993). Estos resultados referentes a la impulsividad podrían tener gran relevancia en relación con el consumo de sustancias de abuso, dado que se ha comprobado que aquellos animales que muestran más impulsividad en la tarea de descuento por demora se autoadministran más etanol, cocaína y nicotina, siendo además más proclives a las recaídas (véase Carrol *et al.*, 2009, para revisión).

Por otro lado, la cepa RLA muestra un estilo de afrontamiento más pasivo cuando es expuesta a situaciones amenazantes relacionadas con novedad, mientras que la cepa RHA despliega en las mismas situaciones una gran variedad de conductas dirigidas a explorar activamente su ambiente, lo que sugiere que esta cepa constituye un modelo animal de gran utilidad para investigar el rasgo de búsqueda de novedad desde una perspectiva psicobiológica. En concreto, estos animales (tanto la variedad consanguínea como la no

consanguínea) muestran más conductas exploratorias en el HB, especialmente cuando debajo de los agujeros se colocan objetos novedosos y se registra el número de *head dips* (Escorihuela *et al.*, 1999; Fernández-Teruel *et al.*, 1992; 2002, Steimer, Escorihuela, Fernández-Teruel y Driscoll, 1998). En una línea similar, la exposición de las cepas no consanguíneas a una versión de la prueba de campo abierto realizada sin iluminación ambiental (teóricamente menos estresante que los procedimientos convencionales) mostró la existencia de diferencias significativas en deambulación (más frecuente en la cepa RHA/Verh en relación con la RLA/Verh), pero no en el número de defecaciones, una medida más relacionada con reactividad emocional que con búsqueda de novedad (Fernández-Teruel *et al.*, 1992). Asimismo, la exposición de las cepas a una prueba de hiponeofagia indicó que, durante el registro de las medidas de línea base (que requería desplazar levemente la jaula hogar y la presencia del experimentador) la cepa RLA-I tardó más tiempo en comenzar a comer y permaneció menos tiempo ingiriendo que la RHA-I (Escorihuela *et al.*, 1999). Pisula (2003), por su parte, utilizó un procedimiento para reducir el componente de estrés que con frecuencia acompaña a las situaciones novedosas. En concreto, expuso repetidamente a ratas RHA/Verh y RLA/Verh machos y hembras a una caja experimental dividida en tres secciones. Una vez habituadas a este procedimiento, introdujo un componente novedoso en dos de las tres secciones del aparato (basado en la reorganización espacial y visual de la disposición de los objetos presentes en las mismas), midiendo actividades conductuales tales como andar, oler el suelo, contacto directo con los objetos, tiempo de estancia en cada sección, etc. La introducción de novedad aumentó la frecuencia de conductas dirigidas a explorarla en todos los animales, si bien este aumento fue significativamente mayor en la cepa RHA/Verh en comparación con la RLA/Verh, sobre todo en los machos. Dicho aumento fue observado específicamente en relación con la novedad inducida por cambios en la disposición espacial de los objetos, más que con modificaciones visuales en los mismos. Estos resultados fueron interpretados por el autor como reflejo de las diferencias que muestran estas cepas en el rasgo de búsqueda de novedad, y no por su reactividad emocional divergente (Pisula, 2003).

Finalmente, las ratas Romanas muestran también diferencias importantes en su sensibilidad y reactividad a las sustancias de abuso, así como en su tendencia a autoadministrarse dichas sustancias (véase Giorgi *et al.*, 2007, para revisión). Como ya se ha comentado en esta Tesis Doctoral, las ratas RHA manifiestan una mayor respuesta conductual ante sustancias tales como apomorfina, Anfetamina, cocaína y morfina (Corda *et al.*, 2001; Driscoll *et al.*, 1986; Durcan *et al.*, 1984; Giménez-Llort *et al.*, 2005; Giorgi *et al.*,

1997; Lecca *et al.*, 2004), desarrollando una sensibilización en su respuesta locomotora cuando son tratadas crónicamente con psicoestimulantes y opiáceos que no se observa en las RLA (Corda *et al.*, 2005; Giorgi *et al.*, 2005b; Giorgi *et al.*, 2007; Piras *et al.*, 2003). Asimismo, las ratas RHA/Verh consumen cantidades de etanol y presentan tasas de preferencia por esta sustancia significativamente superiores a las mostradas por las ratas RLA-I/Verh (Fernández-Teruel, Driscoll *et al.*, 2002; Giorgi *et al.*, 1997), un hallazgo que ha sido también observado en esta Tesis Doctoral con respecto a las cepas consanguíneas (véase experimento 1).

Si bien estos resultados sugieren que las ratas RHA y RLA constituyen un modelo animal de gran utilidad en el estudio del rasgo de búsqueda de novedad y la vulnerabilidad al abuso de drogas, en el momento actual no existen estudios que hayan puesto en relación directa estos dos aspectos en las cepas Romanas consanguíneas. Fernández-Teruel, Driscoll *et al.* (2002) hallaron, en las cepas no consanguíneas, correlaciones significativas entre el número y tiempo de *head dipping* registrado en el HB y el consumo total acumulado de etanol, registrado en una prueba de elección agua/alcohol (10%) de cuatro días de duración.

Por otro lado, son muy escasos los estudios dirigidos a analizar la relación existente entre las conductas de preferencia por novedad en situaciones de elección libre y los patrones de consumo de sustancias de abuso. En este sentido, la preferencia por novedad correlaciona con el consumo oral de soluciones de anfetamina y de morfina, así como con la preferencia por un lugar asociado con dichas sustancias, pero no muestra relación alguna con los efectos psicomotores inducidos por la inyección de anfetamina, ni tampoco con los patrones de autoadministración de la misma (véase Pelloux *et al.*, 2006, para revisión).

Por todo ello, sería relevante comprobar en qué medida la reactividad de las ratas RHA-I y RLA-I a ambientes novedosos (en condiciones tanto de elección libre como forzada) se relaciona con las conductas de consumo voluntario de etanol. Esta cuestión se aborda en el experimento que se presenta a continuación, que tuvo como objetivo principal analizar el comportamiento de las ratas RHA-I y RLA-I en tres pruebas de novedad (HB, laberinto en Y y test de emergencia) y relacionar su ejecución con los patrones de consumo voluntario de etanol registrados mediante un procedimiento de elección agua/alcohol basado en la presentación de dosis crecientes de esta droga (2, 4, 6, 8 y 10%). Sobre la base de los resultados revisados en las líneas anteriores, así como de los datos obtenidos en nuestro laboratorio, se podrían establecer las siguientes hipótesis y sus correspondientes predicciones: (a) las ratas RHA-I muestran una mayor tendencia a explorar ambientes novedosos en comparación con las RLA-I, y estas diferencias se pondrán de manifiesto en

las tres pruebas de novedad utilizadas en el presente estudio; (b) las ratas RHA-I tienden a consumir más alcohol que las RLA-I, por lo que en la prueba de consumo voluntario estos animales consumirán cantidades más elevadas de esta sustancia en relación con las RLA-I, con independencia de que prefieran agua o alcohol; (c) aquellos animales que sean más propensos a explorar ambientes novedosos serán los que consuman más alcohol, un resultado que nos permitirá poner en relación directa estos rasgos comportamentales.

Método

Sujetos

Se utilizaron 48 ratas macho (24 RHA-I y 24 RLA-I) procedentes de la Universidad Autónoma de Barcelona. Las ratas tenían 4 meses de edad y un peso medio aproximado de 380 gramos al inicio del experimento. Los animales fueron colocados individualmente en su jaula hogar y tuvieron libre acceso a agua y comida. La temperatura del estabulario se mantuvo constante (entre 22 y 23 °C). Los ciclos de luz y oscuridad fueron de 12 horas y el inicio del período de la luz tuvo lugar a las 8:00 horas. Las pruebas de novedad se realizaron durante el ciclo de luz, entre las 9:30 y las 13:30 horas. La exposición al alcohol se realizó en sesiones de 24 horas, y el registro de las variables dependientes se llevó a cabo entre las 9.00 y las 12.00 horas.

Aparatos y procedimiento

Para la realización de este experimento se utilizaron los mismos aparatos, y con las mismas características, que los empleados en los Experimentos 1 y 2 sobre consumo de etanol y búsqueda de novedad, respectivamente. Cada una de las ratas pasó por las tres pruebas correspondientes de búsqueda de novedad de manera contrabalanceada, y una vez finalizada esta primera parte los animales fueron sometidos a la prueba de preferencia por el alcohol. Todos los aparatos (a excepción de la prueba de preferencia por el alcohol) estuvieron situados en la misma sala experimental. Las condiciones estimulares (sonido, iluminación y claves visuales) fueron mantenidas constantes durante todo el experimento. Entre la realización de una prueba y la siguiente transcurrieron siete días.

El procedimiento seguido en cada una de las pruebas de búsqueda de novedad fue idéntico al desarrollado en el Experimento 2, salvo en lo que se refiere a la duración de cada uno de los ensayos en el laberinto en Y, que pasó de cinco minutos en el Experimento 2 a

seis minutos en el Experimento 3. Asimismo, la duración de la prueba en el HB se modificó de cinco a seis minutos.

El procedimiento para medir el consumo de etanol fue idéntico al empleado con los grupos de aclimatación al alcohol en el Experimento 1, con la salvedad de que la concentración de alcohol al 10% estuvo disponible sólo 4 días.

Variables dependientes y análisis estadísticos

Las medidas registradas en cada una de las pruebas fueron las mismas que las recogidas en cada una de las tareas de los Experimentos 1 y 2. Cada una de las variables registradas en las pruebas de búsqueda de novedad se analizó a partir de contrastes de medias para muestras independientes. Asimismo, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) con los datos registrados en la prueba de preferencia por etanol, en la que se consideró tanto la variable cepa como las diferentes concentraciones de etanol. Por último, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para establecer relaciones lineales entre las puntuaciones obtenidas en las distintas tareas de búsqueda de novedad y los valores de consumo de alcohol. Con objeto de no distraer la atención del lector con datos irrelevantes, sólo se han informado los resultados de las conductas que resultaron estadísticamente significativos. Del mismo modo, sólo se informa de las correlaciones entre las medidas que resultaron estadísticamente significativas en las pruebas de novedad y los distintos valores de preferencia por el etanol. El nivel de significación estadística se estableció en $p < 0.05$.

Resultados

Hole-Board

Como se puede observar en la parte superior de la Figura 13, las ratas RHA-I mostraron un mayor número de *head-dippings* en comparación con la cepa RLA-I, invirtiéndose este patrón cuando la conducta registrada se refiere a la frecuencia de *groomings* (apartados a y b, respectivamente). En la parte inferior de la Figura 13 aparece representada la duración promedio de las conductas de *head-dipping* y *rearing* en cada una de las cepas (apartados c y d, respectivamente). Como se puede observar, el patrón de resultados encontrados se invierte, siendo la cepa de ratas RHA-I la que muestra una mayor duración de *head-dipping*, y las ratas de la cepa RLA-I las que muestran una mayor duración de *rearings*. Estas primeras observaciones se vieron confirmadas por los análisis estadísticos

oportunos. Así, los contrastes de medias para muestras independientes realizados de manera independiente para las conductas frecuencia de *head-dipping*, frecuencia de *grooming*, duración de *head-dipping* y duración de *rearing* mostró que el efecto de la variable cepa fue estadísticamente significativo para cada una de estas medidas [$t(46)=3.08$, $p=0.003$; $t(46)=2.89$, $p=0.006$; $t(46)=2.67$, $p=0.01$; $t(46)=2.52$, $p=0.015$; respectivamente].

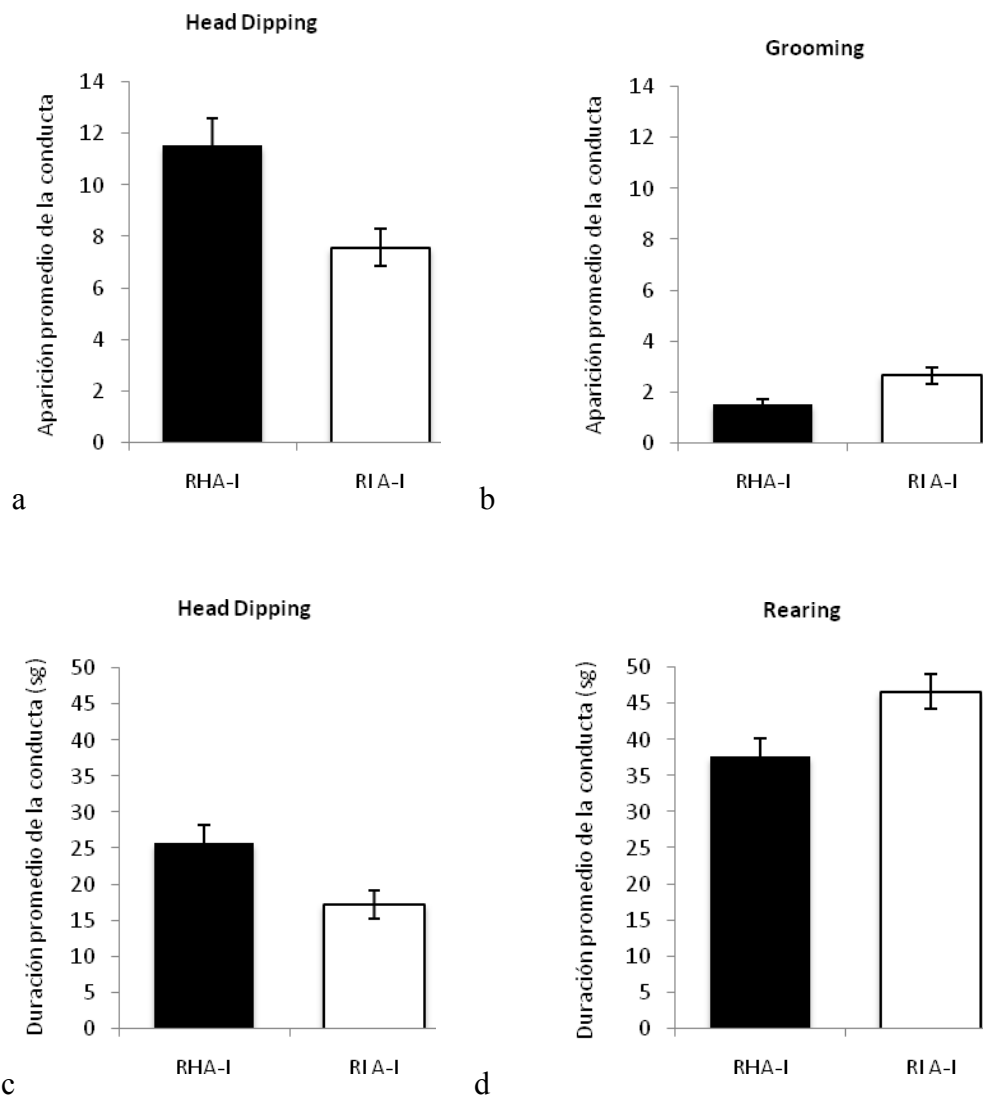


Figura 13. Distintas medidas de búsqueda de novedad registradas en el *Hole-Board*. En la parte superior se muestra para cada cepa de ratas el n° promedio de conductas de *head-dipping* y de *grooming* (apartados a y b, respectivamente). En la parte inferior se muestra para cada cepa la duración de las conductas de *head-dipping* y de *rearings* (apartados c y d, respectivamente).

La Figura 14 muestra la actividad promedio de cada una de las cepas medida a partir del número de cruces realizados por cada rata entre los 16 cuadrantes en los que fue dividido el suelo del HB. Como se puede observar, la actividad de la cepa RHA-I fue aproximadamente el doble de la mostrada por la cepa RLA-I. El contraste de medias para muestras independientes realizado para esta medida así lo confirmó, $t(46)=5.48$, $p<0.0001$.

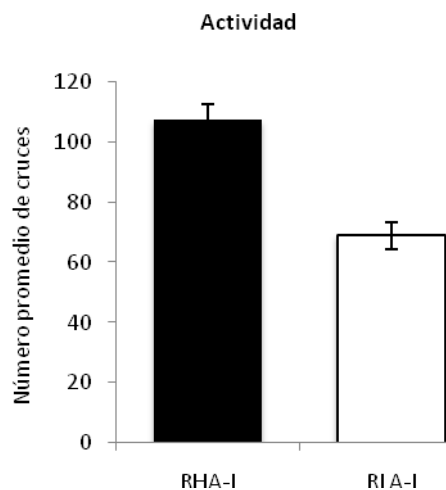


Figura 14. Actividad registrada en el *Hole-Board* en cada una de las cepas de ratas a partir del cruce entre los cuadrantes en los que fue dividido el suelo de este aparato.

Laberinto en Y

Durante el primer ensayo, en el que uno de los tres brazos del laberinto se encontraba cerrado, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas en las distintas medidas registradas. Fue en el segundo ensayo en el que las cepas exhibieron una conducta diferente en esta prueba. Como se puede observar en la Figura 15, tanto el número medio de entradas en el brazo novedoso como el tiempo invertido en el mismo fue superior en la cepa de ratas RHA-I en comparación con las ratas RLA-I (partes *a* y *b* de la Figura 15, respectivamente). El contraste de medias para muestras independientes realizado de manera independiente para las conductas frecuencia de entrada en el brazo novedoso y tiempo de permanencia en dicho brazo mostró que el efecto de la variable cepa fue estadísticamente significativo para la medida tiempo de permanencia [$t(46)=2.41$, $p=0.02$], así como para el factor frecuencia de entrada registradas durante el primer minuto [$t(46)=3.38$, $p=0.001$].

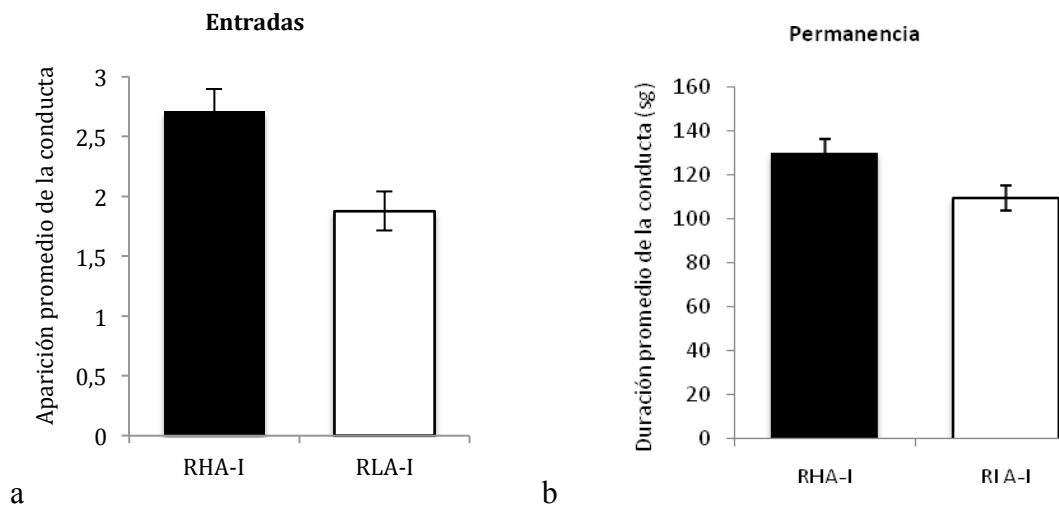


Figura 15. Distintas medidas de búsqueda de novedad registradas en el laberinto en Y. En la parte izquierda se muestra para cada cepa de ratas el n° promedio de entradas registradas durante el primer minuto en el brazo novedoso en el segundo ensayo en este aparato. En la parte de la derecha se muestra para cada cepa el tiempo medio de estancia total en el brazo novedoso durante el segundo ensayo.

Consumo voluntario de etanol

Como indicamos en el Estudio 1, la medida de preferencia ofrece la ventaja de aportar información relativa a en qué medida las concentraciones de etanol resultan apetitivas, al mismo tiempo que evita determinadas interpretaciones alternativas que requerirían de nuevos análisis para ser descartadas (i.e., que una cepa consuma mayor cantidad de líquido que la otra, independientemente del líquido que se trate). Estas razones, así como un patrón de resultados similar al obtenido con la medida de ingesta de alcohol (salvo lo que se indique más adelante) nos llevó a informar sólo de la variable preferencia. Como se puede observar en la Figura 16, las ratas parecen mostrar preferencia por el alcohol hasta concentraciones del 4%. Concentraciones de etanol por encima del 4% llevan a una preferencia por el agua en comparación con el consumo de alcohol en los dos grupos. Asimismo, se observa una mayor preferencia por el etanol en la cepa de ratas RHA-I en cada uno de los valores de concentración manipulados en este estudio.

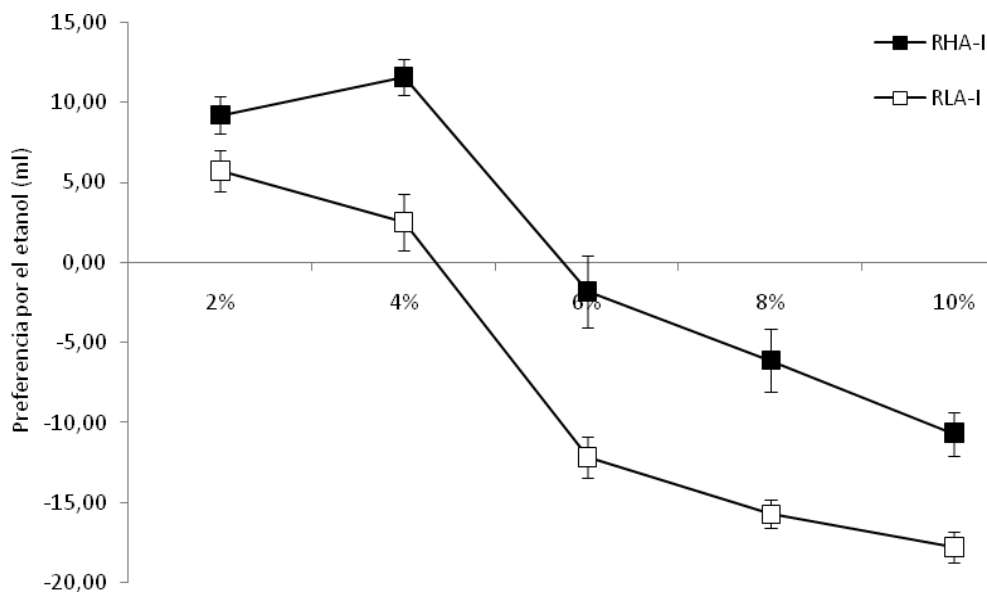


Figura 16. Preferencia en cada cepa de ratas por el etanol medido como el consumo real de etanol menos el consumo esperado de etanol. El consumo esperado se calcula a partir de la cantidad total de etanol más la cantidad total de agua ingerida por cada animal dividido entre dos. Los valores 2%, 4%, 6%, 8% y 10% se refieren al valor de la concentración de etanol en agua.

Estas impresiones se vieron confirmadas por los análisis estadísticos realizados. En efecto, el ANOVA grupo (RHA-I vs. RLA-I) x valores de concentración de etanol (2%, 4%, 6%, 8% y 10%) mostró que el efecto principal de las variables Grupo y Valores de concentración de etanol resultaron estadísticamente significativos [$F(1, 46)=44.45$, $p<0.0001$; $F(4, 43)=94.42$, $p<0.0001$, respectivamente]¹. La interacción grupo x valores de concentración de etanol también resultó estadísticamente significativa, $F(4, 43)=2.74$, $p=0.041$. El análisis detallado de la interacción mostró que las diferencias en preferencia entre las cepas fue marginalmente significativo para el valor de la concentración 2% [$t(46)=2.002$, $p=0.051$] y estadísticamente significativas para el resto de los valores de concentración de etanol [$t(46)=3.95$, $p<0.0003$, para el contraste entre cepas que presenta un valor de p más alto]. En lo que se refiere a los datos encontrados con la medida consumo total de alcohol, los resultados fueron similares, con la salvedad de que para la concentración de etanol del 2% el contraste entre cepas fue menor [$t(46)=0.49$, $p=0.63$]

¹ Los valores de F informados corresponde a Lambda de Wilks al incumplir el factor Valores de concentración la prueba de esfericidad de Mauchly.

Correlaciones búsqueda novedad/consumo alcohol

Con el objetivo de evaluar en qué medida el rasgo comportamental de búsqueda de novedad se relaciona con el consumo espontáneo de alcohol, se realizó un análisis con el coeficiente de correlación de Pearson, en el que se introdujeron sólo las medidas de búsqueda de novedad entre las que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas de ratas Romanas, así como los diferentes valores de preferencia por las concentraciones de etanol presentadas.

Como se puede observar en la Tabla 3, los valores de correlación que resultaron estadísticamente significativos se encuentran todos en la dirección propuesta en nuestras hipótesis. Se registraron valores positivos de correlación entre el número de *head-dippings* y los datos de preferencia por la concentración al 10%. Asimismo, fueron positivos los valores de correlación obtenidos entre el número de cruces en el HB y las preferencias por las concentraciones al 6%, 8% y 10%. En lo que se refiere al laberinto en Y, también se registraron valores positivos en las correlaciones obtenidas en cada una de las medidas registradas (número de entradas al brazo novedoso y permanencia en el brazo novedoso) en relación con los valores de concentración al 6% y al 8%. Estas correlaciones positivas ponen de manifiesto la existencia de una relación lineal directa que sugiere que los animales que desplegaron más conductas exploratorias en las pruebas de novedad también mostraron una mayor preferencia por el etanol. Del mismo modo, los valores negativos obtenidos para las correlaciones entre las variables número de *groomings* en el HB y la preferencia por la concentración al 4%, así como entre la duración de la conducta de *rearings* y esa misma concentración, van en la dirección apuntada en nuestras hipótesis, dado que los animales que exhiben un mayor número de conductas incompatibles con la búsqueda de sensaciones y más relacionadas con ansiedad (en este caso *grooming* y exploración/estancia *-rearing-* de la zona externa del HB) muestran una menor preferencia por el etanol.

Tabla 3*Coefficientes de Correlación de Pearson entre las Pruebas de Búsqueda de Novedad*

Valores de la concentración de etanol en agua				
<i>HOLE-BOARD</i>				
	4%	6%	8%	10%
N° de conductas				
<i>Head-dipping</i>				0,339(*)
<i>Grooming</i>	-0,287(*)			
<i>Cruces</i>		0,592(**)	0,479(**)	0,502(**)
Duración				
Head-dipping				
Rearing	-0,305(*)			
LABERINTO EN Y				
N° de entradas				
<i>Brazo novedoso</i>		0,441(**)	0,314(**)	
Permanencia				
<i>Brazo novedoso</i>		0,420(**)	0,415(**)	

Nota: ** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Discusión

El presente experimento tuvo como objetivo fundamental analizar el comportamiento de las ratas RHA-I y RLA-I en tres pruebas de novedad (*Hole-Board*, laberinto en Y, test de emergencia) y relacionar su ejecución con los patrones de consumo voluntario de etanol registrados mediante un procedimiento de elección agua/alcohol basado en la presentación de dosis crecientes de esta droga (2, 4, 6, 8 y 10%). Esperábamos encontrar una relación positiva entre estos dos rasgos comportamentales, en una línea similar a lo observado en las cepas Romanas no consanguíneas (Fernández-Teruel, Driscoll *et al.*, 2002), así como en otras cepas de animales genéticamente seleccionados sobre la base de sus diferencias en reactividad a la novedad (p.ej. Davis *et al.*, 2008). Los resultados indicaron que, en comparación con la cepa RLA-I, la cepa RHA-I mostró más conductas relacionadas con la exploración activa de ambientes novedosos, tanto en condiciones de exposición forzada como de elección libre. Así, en el HB estos animales mostraron una mayor frecuencia y duración de *head-dippings*, así como un mayor número de cruces, mientras que en el

laberinto en Y estos animales permanecieron más tiempo y visitaron con más frecuencia el brazo novedoso. En la prueba de emergencia, sin embargo, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas. Asimismo, en la prueba de consumo voluntario de etanol se comprobó que con todas las dosis utilizadas las ratas RHA-I presentaron valores de preferencia por la sustancia superiores a los registrados en la cepa RLA-I, hallándose correlaciones significativas entre estos valores y algunas medidas de búsqueda de novedad, como el número de *head-dippings* (con respecto a la dosis del 10%), y la frecuencia y tiempo de estancia en el brazo abierto del laberinto en Y (en relación con las dosis del 6% y el 8%). Estos hallazgos van en la misma línea que los obtenidos en estudios anteriores y sugieren que las ratas RHA-I y RLA-I constituyen un modelo animal que puede ser de utilidad para analizar el rasgo comportamental de búsqueda de novedad y su relación con el consumo/preferencia por alcohol.

En primer lugar, los resultados obtenidos en relación con el HB son comparables a los hallados en estudios previos, tanto con cepas consanguíneas como no consanguíneas, al menos en relación con la variable dependiente más directamente relacionada con el rasgo de búsqueda de novedad (*head-dipping*). Escorihuela *et al.* (1999) observaron que las ratas RHA-I (procedentes de la décima generación de un programa de cruzamiento selectivo iniciado en la Universidad Autónoma de Barcelona) mostraban más conductas exploratorias que las ratas RLA-I en este test. En concreto, cuando la prueba se realizó sin colocar objetos bajo los agujeros, la cepa RHA-I mostró más ambulación y *rearings* que la RLA-I. La frecuencia y duración de los *head-dippings* aumentó significativamente en ambas cepas al colocar los objetos, debido básicamente al marcado aumento en dichas conductas observado en la cepa RHA-I. Estos resultados son similares a los obtenidos con ratas Romanas no consanguíneas (Fernández-Teruel *et al.*, 1992; Fernández-Teruel, Driscoll *et al.*, 2002; Steimer *et al.*, 1998), lo que sugiere que el rasgo de búsqueda de novedad se mantiene estable en ambos tipos de animales. En apoyo de esta afirmación, y en concordancia con Escorihuela *et al.* (1999), en el presente experimento se observó una mayor frecuencia y duración de los *head-dippings*, así como más ambulación (medida a través del cálculo del número de cruces). Sin embargo, en relación con la variable “tiempo de *rearing*” los resultados apuntan en la dirección contraria, dado que fue la cepa RLA-I la que mostró valores más elevados en dicha variable en comparación con la RHA-I. Aunque de forma especulativa, estos datos podrían deberse a que la cepa más emocional (RLA-I) tendería a evitar la zona central del aparato y a permanecer más tiempo en las zonas protegidas por paredes, donde es más habitual observar conductas de *rearing*. Asimismo, el hecho de que

esta cepa presentara una mayor frecuencia de *groomings* se relacionaría con el carácter ansiógeno que las experiencias de novedad tienen para estos animales, dado que esta conducta es considerada como una actividad de desplazamiento que aparece en situaciones de conflicto relacionadas con ansiedad (Fernández -Teruel *et al.*, 1997).

Por otro lado, en el presente experimento se analizó por primera vez el comportamiento de las ratas RHA-I y RLA-I en dos pruebas basadas en elección libre/preferencia por novedad: el laberinto en Y y la prueba de emergencia, lo que nos permitió ampliar la caracterización fenotípica de estos animales en relación con este rasgo comportamental. Los resultados apoyaron parcialmente nuestras hipótesis y predicciones, dado que en el laberinto en Y la cepa RHA-I mostró una mayor frecuencia y tiempo de estancia en el brazo novedoso en relación con la RLA-I, un resultado similar al observado con otras cepas de animales, tales como las HR vs. LR (Dellu *et al.*, 1993). Sin embargo, en la prueba de emergencia no se hallaron diferencias significativas en ninguna de las variables dependientes registradas, un resultado que no concuerda con lo obtenido en estudios previos realizados en nuestro laboratorio, en los que se hallaron diferencias significativas entre las cepas en relación con el número de cruces y la latencia de emergencia (Cuenya *et al.*, 2010). Estos datos resultan también algo sorprendentes si se tienen en cuenta los resultados presentados en el Estudio 2 de esta Tesis Doctoral, en el que se comprobó que los animales (ratas Wistar hembra) que mostraban más conductas de búsqueda de novedad en el HB y el laberinto en Y eran los que presentaban una menor latencia de emergencia. Se hace necesario, por tanto, replicar estos estudios y utilizar animales del mismo sexo antes de poder llegar a una conclusión definitiva sobre la utilidad de la prueba de emergencia para estudiar el rasgo de búsqueda de novedad en las ratas Romanas.

Finalmente, los resultados obtenidos con respecto a los patrones de consumo/preferencia por alcohol indican, en concordancia con los datos presentados en el Estudio1 de esta Tesis Doctoral, que la cepa RHA-I consume más alcohol que la RLA-I cuando se utilizan diferentes concentraciones de la droga (2, 4, 6, 8, 10%), si bien a partir del 6% (para la cepa RLA-I) y del 8% (para la RHA-I) estas dosis resultan aversivas para ambas cepas. Estos hallazgos concuerdan con lo obtenido en estudios previos con respecto a las cepas no consanguíneas (Fernández-Teruel, Driscoll *et al.*, 2002; Giorgi *et al.*, 1997; Razafimanalina *et al.*, 1996) lo que sugiere que la variedad consanguínea de ratas Romanas puede ser también un modelo animal valioso para estudiar la conducta adictiva y su relación con el rasgo de búsqueda de novedad. En apoyo de esta afirmación, se obtuvieron

correlaciones significativas entre los índices de preferencia por distintas dosis de etanol y respuestas exploratorias registradas en el *Hole-Board* y el laberinto en Y, tales como número de *head-dippings* (dosis del 10%), número de cruces (dosis del 6, 8 y 10%), número de entradas al brazo novedoso y tiempo de estancia en el mismo (dosis del 6 y 8%). Estos resultados coinciden y amplían los datos obtenidos en experimentos realizados con las cepas Romanas no consanguíneas, donde se hallaron correlaciones significativas entre el número y tiempo de *head dipping* registrado en el HB y el consumo total acumulado de etanol, registrado en una prueba de elección agua/alcohol (10%) de cuatro días de duración (Fernández-Teruel, Driscoll *et al.*, 2002).

Numerosas evidencias experimentales sugieren que las conductas vinculadas con la búsqueda de sensaciones y el consumo de sustancias de abuso están biológicamente conectadas, dado que ambas conductas dependen de la activación de circuitos cerebrales esenciales para la supervivencia y la adaptación de los organismos, con especial énfasis en el circuito dopaminérgico mesotelencefálico. En concreto, se argumenta que tanto el consumo de sustancias de abuso como la conducta de búsqueda de novedad constituyen experiencias reforzantes para ciertos individuos porque dichas sustancias son capaces de activar regiones cerebrales vinculadas con los circuitos de recompensa. Por tanto, las diferencias individuales existentes en relación con la “necesidad” de novedad pueden predecir el riesgo que tiene un sujeto de desarrollar un cuadro de abuso o de dependencia de sustancias, una asociación que reflejaría las profundas diferencias en sensibilidad a la recompensa que muestran los organismos (Blanchard *et al.*, 2009).

Los animales altamente reactivos a la novedad muestran de forma muy consistente una mayor tendencia a consumir sustancias de abuso, una tendencia que se manifiesta, por ejemplo, en mayores tasas de consumo espontáneo de etanol y de autoadministración de psicoestimulantes, entre otras drogas (para revisión véase Blanchard *et al.*, 2009). Esta conexión entre el rasgo de búsqueda de novedad y consumo de sustancias parece depender de la mayor sensibilidad a la recompensa que muestran estos individuos, vinculada a su vez con ciertas características funcionales de sus circuitos de recompensa (Bardo *et al.*, 1996).

La evidencia experimental que pone en relación este circuito cerebral con el rasgo de búsqueda de novedad y el consumo de drogas es abrumadora, poniendo de manifiesto que cualquier intervención que modifique el funcionamiento dopaminérgico en estas regiones tiene un profundo impacto sobre ambos comportamientos. Así, por ejemplo, la administración de antagonistas dopaminérgicos aumenta la tasa de presión de palanca en la prueba de autoadministración intravenosa de cocaína (Roberts y Vickers, 1984) y

anfetamina (Yokel y Wise, 1975), un resultado que se interpreta considerando que estos compuestos reducirían la capacidad reforzante de los psicoestimulantes, obligando al animal a aumentar su respuesta instrumental. Del mismo modo, la actividad locomotora inducida por novedad puede bloquearse administrando antagonistas dopaminérgicos mediante inyección sistémica o microinyección directa en el NAc (Bardo *et al.*, 1989; Hooks y Kalivas, 1995; Misslin, Ropartz y Jung, 1984), un resultado que parece independiente de los efectos de estas sustancias sobre la actividad locomotora general, y que más bien reflejaría el bloqueo (inducido farmacológicamente) del valor de incentivo positivo de la novedad (véase Bardo *et al.*, 1996, para revisión).

En la misma línea, los estudios de lesión ponen de manifiesto que la destrucción de estas vías mediante la administración de la neurotoxina 6-OHDA en el NAc elimina las respuestas de presión de palanca asociadas con la autoadministración de psicoestimulantes, así como el condicionamiento de preferencia por un lugar asociado con estas sustancias y con los opiáceos (Pettit, Ettenberg, Bloom y Koob, 1984; Spyraiki, Fibiger y Phillips, 1982, 1983). Estos hallazgos son comparables a los observados con relación a la conducta de búsqueda de novedad, dado que la destrucción general de las vías dopaminérgicas mesotelencefálicas, así como la lesión localizada del NAc, reducen de forma significativa las conductas exploratorias dirigidas a un objeto novedoso, las registradas en la prueba de campo abierto, y las observadas en una prueba de preferencia por un lugar novedoso (Fink y Smith, 1979; Pierce, Crawford, Nonneman, Mattingly y Bardo, 1990).

Por su parte, los estudios de microdiálisis demuestran que las sustancias de abuso (incluyendo estimulantes, opiáceos, nicotina, alcohol, cannabis y MDMA) comparten su capacidad para aumentar los niveles de dopamina extracelular registrados en NAc, lo que sugiere que estos cambios vinculados con la actividad dopaminérgica mesoacumbal constituyen un sustrato neural que es crítico para las acciones reforzantes de todas las drogas de abuso (Giorgi *et al.*, 2006). Aunque los resultados referentes a las conductas de búsqueda de novedad son más controvertidos en este contexto, Rebec *et al.* (1994) observaron mediante voltametría que cuando a los animales se les permitía explorar un compartimento novedoso adyacente a otro familiar, la entrada a dicho compartimento (pero no otras actividades motoras inespecíficas) producía un aumento transitorio en la actividad dopaminérgica accumbal.

La implicación de las vías cerebrales del refuerzo en las conductas de búsqueda de drogas y novedad también ha sido demostrada a partir del estudio de animales que muestran diferencias extremas en dichas conductas. En relación con las ratas HR y LR, por ejemplo,

Piazza *et al.*, 1991; en Bardo, 1989) observaron que los niveles de dopamina y de su principal metabolito (DOPAC) registrados en el NAc (tanto basales como inducidos por novedad) eran más elevados en el grupo HR en comparación con el LR, mientras que se obtuvo el patrón contrario en la corteza prefrontal. En una línea similar, Bradberry, Gruen, Berridge y Roth (1991) hallaron correlaciones significativas entre la actividad dopaminérgica (inducida en el NAc mediante anfetamina) y la conducta exploratoria observada en el HB y tras la presentación de un objeto novedoso. Además, cuando se tomaron medidas basales de neurotransmisores que ejercen una función reguladora sobre la liberación de dopamina, se halló una menor expresión de reguladores inhibitorios en el área tegmental ventral (p. ej., colecistoquinina) y una mayor de excitatorios en el NAc (p.ej. preprodinorfina, preproencefalina) en las ratas HR en comparación con las LR (Lucas, Angulo, Le Moal, McEwen y Piazza, 1998; en Pawlak, 2008). En relación con otros sistemas de neurotransmisión también relacionados con el control de impulsos, las ratas HR presentan unos niveles basales de 5-HT y de 5-HIAA más reducidos que las ratas LR en la corteza prefrontal, el NAc y el estriado dorsal (Piazza *et al.*, 1991; en Blanchard, 2009), así como una menor expresión de receptores 5-HT₆ y 5-HT₇ en otras regiones del sistema nervioso central (Ballaz, Akil y Watson, 2007)². Recientes estudios genéticos han encontrado, además, una expresión reducida en los niveles de receptores de glucocorticoides en el hipocampo en el grupo HR en relación con el LR (Kabbaj *et al.*, 2000), un hallazgo que podría explicar por qué el primero muestra una respuesta de corticosterona más elevada y de mayor duración que el segundo (Piazza *et al.*, 1991, en Pawlak, 2008), y por qué el segundo muestra mayores respuestas de ansiedad en pruebas como el laberinto elevado (Kabbaj *et al.*, 2000). Asimismo, en condiciones de estrés inducido por amenaza social, se observó en las ratas LR un aumento significativo en la expresión de genes como el de la CAM-KIIB y el de la leptina en el hipocampo, estando ambos genes relacionados con funciones de aprendizaje, memoria y plasticidad sináptica (Kabbaj *et al.*, 2004).

Con respecto a las ratas HR-*bred* y LR-*bred*, se han hallado diferencias significativas entre las mismas en los niveles de expresión del factor de crecimiento de los fibroblastos en el hipocampo (FGR1; más elevados en HR-*bred* que en LR-*bred*; Turner *et al.*, 2008), así como del autorreceptor D2 en el NAc y el estriado (más reducidos en las primeras que en las segundas; Hooks *et al.*, 1994, en Blanchard, 2009). Este último resultado explicaría por qué

²Este patrón neuroquímico diferencial ha sido también descrito en otros animales con diferencias extremas en conductas de búsqueda de novedad, tales como las ratas HRA vs. LRA, o las HE vs. LE (véase Pawlak *et al.*, 2008, para revisión).

estos animales necesitan ocho veces más dosis del fármaco quinpirole (un agonista D2) para inhibir el disparo de las neuronas dopaminérgicas (Marinelli y White, 2000). Asimismo, la liberación mesolímbica dopaminérgica inducida por cocaína es mayor en la cepa HR en relación con la LR, siendo el incremento proporcional a la cantidad de actividad locomotora inducida por novedad (Hooks, Jones, Smith, Neill y Justice, 1991, Hooks *et al.*, 1992). En relación con el sistema neuroquímico colinérgico, implicado también en la activación inducida por novedad, Ballaz (2009) observó que la administración del antagonista muscarínico escopolamina provocó cambios diferenciales HR/LR en la expresión del gen del receptor M₂ que se localizaron en la región del septum medial/banda diagonal de Broca y en la corteza orbitofrontal medial, un hallazgo que el autor relaciona con las diferencias de ejecución mostradas por estas cepas en la prueba de exploración de objetos novedosos.

Las cepas APO-SUS vs. APO-UNSUS también ha sido caracterizadas neurobiológicamente, y de nuevo los sistemas monoaminérgicos parecen ocupar un papel central en relación sus diferencias comportamentales. Así, el grupo de animales APO-SUS es menos sensible a los efectos de agonistas β_2 y α_2 adrenérgicos (como salbutamol y clonidina, respectivamente), tanto a nivel periférico como central (Cools *et al.*, 1990; Smits, telch y Randall, 2002; en Pawlak, 2008). Estas diferencias también se observan en relación con los sistemas dopaminérgicos, siendo este grupo más sensible a los efectos locomotores inducidos por anfetamina y ergometrina (Cools *et al.*, 1990, Cools, Ellenbroek, Gingras, Engbersen y Heeren, 1997; en Pawlak, 2008). Asimismo, las ratas APO-SUS y APO-UNSUS muestran diferencias en diversos parámetros relacionados con el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, dado que las primeras presentan una mayor densidad de mineralocorticoides, mayor expresión del ARNm para la hormona liberadora de la corticotropina, una densidad sináptica superior en el núcleo paraventricular del hipotálamo, y niveles plasmáticos superiores de ACTH, tanto en condiciones basales como en respuesta al estrés (véase Pawlak *et al.*, 2008, para revisión). Este perfil neurobiológico divergente se acompaña, además, de diferencias en la expresión del gen Aph-1b, relacionado con procesos de desarrollo y cuya relación con la conducta adictiva se investiga en la actualidad (Ellenbroek *et al.*, 2005).

Finalmente, de un modo similar a lo discutido en las líneas anteriores en relación con otras cepas de animales, los resultados obtenidos en el presente experimento podrían depender de las diferencias neurobiológicas halladas entre las ratas RHA y RLA³. En efecto,

³Analizadas sobre todo en la variedad no consanguínea.

numerosas evidencias experimentales apoyan la hipótesis de que los patrones conductuales divergentes que caracterizan a estas cepas dependen en gran medida de las diferencias funcionales observadas en el sistema dopaminérgico mesotelencefálico (véase Driscoll *et al.*, 2009; Giorgi *et al.*, 2007, para revisión). Así, por ejemplo, la cepa RHA muestra, en relación con la RLA, mayor *turnover* de dopamina en el núcleo caudado, una mayor respuesta estereotipada ante la administración aguda del agonista apomorfina (Driscoll *et al.*, 1985, 1990; Giménez-Llort *et al.*, 2005), una mayor expresión de receptores D₁ y D₃ en el NAc (Giorgi *et al.*, 1994; Guitart-Masip *et al.*, 2006b), y niveles basales de dopamina, noradrenalina y serotonina más elevados en el NAc y el estriado (estando dichos niveles relacionados con las diferencias halladas entre las cepas en relación con su conducta impulsiva; Moreno *et al.*, 2010).

Del mismo modo, numerosos estudios de microdiálisis y voltametría indican que algunos estresores, sustancias ansiogénicas y drogas de abuso (incluyendo morfina, amfetamina, cocaína y alcohol) activan este sistema en mayor medida en la cepa RHA en comparación con la RLA (D'Angio *et al.*, 1988; Giorgi *et al.*, 1997, 2003b, 2005a; Lecca *et al.*, 2004). Estas diferencias funcionales se acompañan de importantes diferencias conductuales, dado que las sustancias de abuso, así como reforzadores naturales, producen una reacción comportamental mucho más robusta en la cepa RHA en comparación con la RLA – incluyendo actividad ambulatoria y estacionaria - (Giorgi *et al.*, 1997; 2005b; Lecca *et al.*, 2004).

Por otro lado, la cepa RHA se caracteriza por desarrollar sensibilización conductual ante la administración repetida de amfetamina (Corda *et al.*, 2005), cocaína (Giorgi *et al.*, 2005b) y morfina (Piras *et al.*, 2003). Este fenómeno parece crucial para determinar la vulnerabilidad de los individuos a desarrollar un cuadro adictivo (Everitt y Wolf, 2002; en Driscoll *et al.*, 2009), y de nuevo las diferencias funcionales y adaptativas halladas en el circuito de la recompensa podrían explicar estos hallazgos comportamentales divergentes entre las cepas. Así, por ejemplo, aunque la administración repetida de morfina y cocaína no parece alterar de forma significativa el estado funcional basal de las proyecciones dopaminérgicas dirigidas al NAc (tanto en su división *shell* como en la región *core*), el tratamiento repetido con estas sustancias indujo cambios importantes ante la administración aguda posterior de la misma sustancia, y estos cambios dependieron de la cepa y de la región del NAc analizada. En concreto, se comprobó que la administración aguda de morfina o de cocaína produjo un marcado aumento en los niveles de dopamina registrados en el NAc *core* sólo en los animales RHA que habían recibido previamente inyecciones

repetidas de morfina o de cocaína, respectivamente (Giorgi, Piras y Corda, 2007). Se sabe, asimismo, que otros neurotransmisores relevantes, como el glutamato, juegan un papel crucial en los fenómenos de sensibilización comportamental (Fernández-Espejo, 2002), un neurotransmisor que muestra diferencias funcionales apreciables entre las cepas Romanas consanguíneas en respuesta a la administración repetida de anfetamina (Guitar-Masip *et al.*, 2008). Estas diferencias podrían estar relacionadas, además, con el pobre control inhibitorio que caracteriza a las ratas RHA en comparación con las RLA y con animales no seleccionados (Fernández-Teruel *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2010).

En definitiva, los resultados obtenidos en el presente experimento indican, en concordancia con lo hallado en estudios previos, que el programa de cruzamiento selectivo realizado con las ratas Romanas (basado inicialmente en sus diferencias de ejecución en la tarea de evitación de dos sentidos) ha producido al mismo tiempo una clara selección bidireccional de rasgos que influyen en la propensión de los animales a mostrar conductas vinculadas con trastornos adictivos, tales como el consumo voluntario de etanol y las conductas de búsqueda de novedad, ambos rasgos relacionados y más preponderantes en la cepa RHA-I en comparación con la RLA-I. Estos resultados sugieren que estas cepas de animales constituyen un modelo animal de gran relevancia para la comprensión de los determinantes genéticos del comportamiento, así como para el estudio de la interacción entre dichos determinantes y los factores ambientales, una cuestión que se aborda en la última fase de esta Tesis Doctoral.

FASE II: FRUSTRACIÓN Y CONSUMO DE ALCOHOL

El ser humano ha utilizado sustancias químicamente activas durante siglos para disminuir el dolor, atenuar la enfermedad, corregir el comportamiento y modificar la psique. Desde épocas muy remotas, las plantas y sus efectos psicoactivos han sido empleados con distintas finalidades: éxtasis religioso, dominio de la mente, búsqueda de placer, o alivio de una gran variedad de condiciones patológicas, incluyendo las enfermedades mentales (Conesa y Brugger, 1998). Esta práctica constituye un fiel reflejo de las ideas y creencias de cada época relativas a la salud, la enfermedad, la naturaleza de la existencia humana, o las causas de las diversas patologías corporales y mentales (Torres y Escarabajal, 2005). Paralelamente a su uso terapéutico, sustancias como el opio, ciertas bebidas alcohólicas, el cáñamo, el beleño, la mandrágora o el ergot, entre otros, se han empleado desde tiempos remotos con propósitos recreativos y enteogénicos, lo que pone de manifiesto el carácter curativo, adictivo o tóxico que pueden tener las drogas dependiendo del uso que el individuo haga de las mismas (Escotado, 1999). En la actualidad, la adicción a sustancias psicoactivas constituye un problema de salud pública con sustanciales implicaciones médicas, sociales, judiciales y políticas (Ellenbroek *et al.*, 2005), siendo muchos los esfuerzos que se realizan para comprender desde un punto de vista científico las causas y consecuencias de este complejo trastorno comportamental.

Numerosas aproximaciones teóricas han intentado identificar cuáles son las motivaciones fundamentales que llevan a un individuo a consumir sustancias de abuso. Desde esta perspectiva, algunas teorías defienden que el valor reforzante de estos estímulos constituye el factor crítico que determina la conducta de consumo, siendo el refuerzo positivo asociado con esta experiencia el componente fundamental que determina que la misma pueda desembocar con el tiempo en un trastorno por abuso de sustancias. Por su parte, las teorías adaptativas de la drogadicción postulan que las diferencias existentes entre los individuos antes de tener su primera experiencia con la droga constituyen un determinante crítico para desarrollar una patología adictiva (Conway *et al.*, 2003). La forma más radical de este planteamiento teórico es la hipótesis de la automedicación, que afirma que el tipo de sustancia elegida por el individuo depende de la habilidad de la misma para aliviar una psicopatología preexistente o un estado negativo inducido por estímulos ambientales aversivos (Becker, López y Doremus-Fitzwater, 2011; Khantzian, 1985, en Bardo *et al.*, 1996). Así, en contraste con los modelos que consideran a las drogas como estímulos reforzantes, las teorías adaptativas las conceptualizan como reforzadores

negativos, dada su capacidad para eliminar estados de valencia afectiva negativa. En este contexto, existen numerosas evidencias experimentales que demuestran que las experiencias ambientales estresantes constituyen determinantes críticos en el consumo y abuso de sustancias psicoactivas (Briand y Blendy, 2009; Yap y Miczek, 2008), en especial en relación con el fenómeno de las recaídas que muestran muchas personas adictas (Becker *et al.*, 2011; Lê y Shaham, 2002; Ungless, Argilli y Bonci, 2010). En efecto, la investigación clínica ha demostrado que los individuos expuestos a estrés agudo y/o crónico son más propensos a convertirse en alcohólicos. Por ejemplo, las tasas de abuso de alcohol y otras sustancias registradas en combatientes de guerra que sufren un trastorno por estrés postraumático son significativamente superiores a las encontradas en los veteranos que no han desarrollado dicho trastorno, y además las experiencias de estrés agudo provocan recaídas con más frecuencia en el primer grupo de sujetos que en el segundo (Ouimette, Coolhart, Funderburk, Wade y Brown, 2007; en Brian y Blendy, 2009). En la misma línea, las personas que han sido víctimas de abuso físico o sexual, abandono temprano, catástrofes naturales, muerte de un ser querido, conflictos familiares, pobreza, etc. consumen más alcohol y otras sustancias adictivas, mostrando también con mayor frecuencia conductas desviadas (véase Gordon, 2002, para revisión). La revisión de la literatura al respecto pone de manifiesto, en definitiva, que en seres humanos son muchos y de muy diversa índole los eventos vitales estresantes que pueden predisponer a los individuos a la drogadicción o a perpetuar, una vez iniciado, el ciclo crónico que caracteriza a esta patología (Brian y Blendy, 2009; El-Shikh *et al.*, 2004).

Para determinar si el estrés constituye un factor causal en el desarrollo del trastorno adictivo en general, y del consumo de alcohol en particular, se han llevado a cabo infinidad de trabajos con modelos animales, los cuales permiten un estudio sistemático y exhaustivo de los mecanismos neurobiológicos que los relacionan (véase Becker *et al.*, 2011; Yap y Miczek, 2008, para revisión). Muchos de ellos utilizan descargas eléctricas, evaluando el impacto de dicha experiencia sobre la adquisición, el mantenimiento o la reinstauración del consumo de etanol. Así, por ejemplo, Anisman y Waller (1974) comprobaron que la administración de descargas eléctricas inescapables en ratas con acceso simultáneo a alcohol al 10% (presentado mediante un procedimiento de aclimatación) produjo un aumento significativo en el consumo y la preferencia por esta droga con respecto al agua y a un grupo control sin experiencia con la descarga. Este resultado apareció tanto cuando el animal podía predecir la presentación de la misma utilizando claves temporales, como en condiciones de presentación aleatoria. En cambio, cuando el animal tuvo posibilidad de controlar con su

respuesta la presentación de este estímulo aversivo no se encontró efecto alguno sobre la ingesta de alcohol, lo que sugiere que dicho control constituye un determinante importante en la conducta de consumo (Anisman y Waller, 1974). Este resultado fue similar al hallado por Bond y Digiusto (1977) utilizando una dosis de alcohol al 6%⁴. No obstante, cuando la preferencia por esta dosis frente a agua se aumentó experimentalmente (bien mezclándola con sacarina al 0.4%, o bien presentándola previamente en la jaula-hogar como único fluido disponible) los resultados fueron en la dirección contraria, lo que sugiere que el efecto del estrés inescapable sobre el consumo de alcohol depende también del grado de preferencia inicial del animal por el alcohol (Bond y Digiusto, 1977). Otro factor relevante en este tipo de situaciones parece ser la disponibilidad de un lugar de seguridad asociado con la ausencia de descarga, dado que cuando ésta se administra en una caja experimental y el alcohol en la jaula hogar se observa un mayor consumo de esta sustancia en comparación con la registrada en procedimientos en los que descarga y droga se presentan en el mismo contexto de alojamiento (Volpicelli, Tiven y Kimmel, 1982; en Caplan y Puglisi, 1986). Estos resultados y otros similares se han discutido a menudo en el marco de la hipótesis de la reducción de la tensión propuesta por Conger (1956; en Boyd, Callen y House, 1989), que postula que en situaciones de estrés el consumo voluntario de etanol puede ser conceptualizado como una respuesta de escape cuya consecuencia es la reducción de la tensión emocional, siendo este mecanismo de reforzamiento negativo el responsable de iniciar, mantener y reforzar la ingesta de esta droga de abuso con propiedades ansiolíticas (Becker *et al.*, 2011; Boyd *et al.*, 1986; Mustaca y Kamenetzky, 2006). Se ha propuesto, además, que durante el periodo post-estrés podría emerger una respuesta de alivio/relajación con propiedades reforzantes la cual se asociaría con el alcohol perpetuando su consumo (Boyd *et al.*, 1989).

La prueba de natación forzada constituye otra experiencia aversiva utilizada para analizar el impacto del estrés sobre el consumo voluntario de etanol. Los animales sometidos a esta prueba suelen mostrar posteriormente un aumento en el consumo de alcohol, si bien dicho aumento suele ser modesto y transitorio (Fullgrabe, Vengeliene y Spanagel, 2007; Siegmund, Vengeliene, Singer y Spanagel, 2005), y también dependiente de la cepa de animales utilizada (Vengeliene *et al.*, 2003). Más aún, en ocasiones no se ha observado efecto alguno de la natación forzada sobre la ingesta voluntaria de etanol

⁴ Resultados similares han sido encontrados más recientemente por Fullgrabe *et al.* 2007; Siegmund *et al.* 2005; o Vengeliene *et al.* 2003 (véase Becker *et al.*, 2011, para revisión).

(Sommer *et al.* 2008), sin que hasta el momento se haya encontrado una explicación satisfactoria de estos resultados aparentemente contradictorios (Becker *et al.*, 2011).

Otros tipos de experiencias estresantes utilizadas en situaciones de consumo voluntario de etanol implican someter a los sujetos a condiciones ambientales aversivas de carácter crónico. Así, por ejemplo, animales expuestos repetidamente a estresores sociales moderados (como los relacionados con la prueba intruso-residente) aumentan su consumo de alcohol cuando son sometidos a una prueba de elección agua/alcohol (al 6%), especialmente cuando esta prueba se realiza dos horas después del test conductual (Caldwell y Riccio, 2010). En la misma línea, Roske, Baeger, Frenzel y Oehme (1994) observaron que someter a los animales a condiciones de aislamiento social en la jaula-hogar (durante 20 semanas), pero no a episodios intermitentes de inmovilización forzada (durante 7 semanas) produjo un aumento en los índices de preferencia mostrados por ratas Wistar en una prueba de elección agua/alcohol al 10%. Por el contrario, Nash y Maickel (1985) hallaron que ambos tipos de experiencias (aislamiento e inmovilización), administradas aleatoriamente durante 14 días, aumentaron el consumo de una solución de alcohol al 10%. Procedimientos relacionados con aislamiento social también han sido utilizados por Parker y Radow (1974) y más recientemente por Thorsell, Slawecki, Khoury, Mathe y Ehlers (2005), encontrándose efectos significativos sobre el consumo voluntario de alcohol en el primero de estos estudios, pero no en el segundo. Por su parte, Lynch, Kushner, Rawleigh, Fiszdon y Carroll (1999) observaron que someter diariamente a los sujetos a inmovilización forzada durante 15 minutos tuvo un efecto significativo sobre la preferencia de los animales por una solución de alcohol frente agua, aumentando dicha preferencia incluso después de haber finalizado el periodo de inducción de estrés. El impacto del estrés de aislamiento sobre la preferencia por el alcohol frente al agua puede depender, además, del tipo de sujetos utilizado, dado que en ocasiones se ha observado que dicho impacto es más acentuado en ratas viejas que en jóvenes (Núñez *et al.*, 2002).

Estos datos inconsistentes sugieren la existencia de una relación compleja entre la naturaleza, duración e intensidad de la experiencia estresante y su impacto sobre la motivación para ingerir etanol, estando esta última modulada, además, por factores individuales de índole biológica tales como los genes, la edad o el sexo (Becker *et al.*, 2011; Mustaca y Kamenetzky, 2006).

Estudios más recientes han permitido ampliar estos hallazgos a otras sustancias de abuso y a paradigmas experimentales más complejos (véase Lu *et al.*, 2003a, para revisión). En este contexto, por ejemplo, Barsy, Mikics, Barsvari y Haller (2011) comprobaron que la

administración de descargas eléctricas inescapables aumenta la resistencia a la extinción de un aprendizaje previo de preferencia por un lugar asociado con morfina, y acelera la aparición de tolerancia a los efectos hipertérmicos de esta droga. En la misma línea, experiencias sociales estresantes (como la utilizada en la prueba de derrota social –*social defeat stress*–) incrementan la conducta de preferencia por un lugar asociado con los efectos de la morfina (Ribeiro do Couto *et al.*, 2006; Mathews, Wilton, Styles y McCormick, 2008, en Brian y Blendy, 2009). Por su parte, en pruebas de autoadministración asociadas con respuestas operantes se constata que este y otro tipo de experiencias estresantes (como separación maternal, administración de descargas intermitentes, aislamiento social, administración de estímulos dolorosos o privación de comida, entre otros) facilitan la autoadministración de cocaína (Goeders y Guerin, 1994), anfetamina (Piazza *et al.*, 1990) y heroína (Shaham y Stewart, 1994), reinstaurando la respuesta instrumental asociada con la administración de alcohol después de haber sometido a los animales a una fase de extinción (Le *et al.*, 2000).

Aunque, en su conjunto, los hallazgos revisados en estas líneas ponen de manifiesto la utilidad y validez de los modelos animales para el estudio de las relaciones entre el estrés y la conducta adictiva, los resultados contradictorios que a menudo se constatan cuando se revisa la literatura especializada reflejan ciertas limitaciones de esta aproximación científica (véase Becker *et al.*, 2011), algunas de las cuales tienen una especial relevancia para la presente Tesis Doctoral.

En primer lugar, algunas de las pruebas de estrés utilizadas en este campo (por ejemplo, la inmovilización forzada o la administración de descargas eléctricas) no permiten analizar de forma directa cómo responde el animal al estresor durante su presentación, y cómo dicha respuesta se relaciona con el consumo de alcohol, una cuestión de importancia crucial en este tipo de estudios. En este sentido, aquellas pruebas que permiten registrar esta respuesta (como la natación forzada o los tests basados en interacciones sociales, entre otros) ofrecen la oportunidad de poner en relación diferencias individuales en estrategias de afrontamiento con patrones de consumo voluntario de etanol, una cuestión que sin duda puede facilitar la comprensión de las complejas relaciones entre ambos comportamientos.

En segundo lugar, muchos de los estudios revisados anteriormente no tienen en cuenta que, con independencia de las experiencias estresantes a los que son sometidos, los animales muestran claras diferencias en su propensión “natural” a consumir sustancias de abuso, estando estas diferencias moduladas por factores genéticos. En este sentido, algunos de los resultados aparentemente contradictorios hallados en la literatura podrían deberse a la

utilización de cepas de ratas diferentes, como Long–Evans vs. Wistar (Becker *et al.*, 2011). Estos sujetos podrían mostrar valores basales o iniciales de preferencia por alcohol diferentes, condicionando los resultados que se obtienen cuando son expuestos a eventos estresantes (véase, por ejemplo, Bond y Digiusto, 1977). Algunos investigadores han intentado analizar esta cuestión de forma sistemática, bien clasificando a los animales en función de estas diferencias, o bien utilizando animales genéticamente seleccionados en función de su conducta de consumo o de otro rasgo comportamental vinculado con dicha conducta. Así, por ejemplo, Rockman, Hall y Glavin (1986) dividieron a los sujetos (ratas Wistar) en tres grupos (dependiendo de los niveles basales de preferencia por una solución de alcohol al 9%), sometiéndolos después a una prueba de estrés por inmovilización. Los resultados indicaron que esta experiencia aumentó la ingesta de etanol en los animales con niveles medios de consumo, los redujo en los sujetos con niveles elevados, y no tuvo efecto alguno en aquellos que mostraron un consumo inicial bajo. En la misma línea, Rockman *et al.* (1986) observaron que el estrés inducido por actividad redujo el consumo de alcohol sólo en los animales que mostraban previamente una alta preferencia por dicha sustancia, lo que pone de manifiesto la utilidad de evaluar el previamente consumo de alcohol del animal para comprender el impacto del estrés sobre el mismo.

Más relevante aún para la presente Tesis Doctoral es la revisión de los estudios con animales genéticamente seleccionados, que permiten poner en relación la influencia del estrés ambiental con la vulnerabilidad o susceptibilidad individual a consumir alcohol de forma excesiva. Vengeliene *et al.* (2003) analizaron esta cuestión comparando diversas líneas de ratas criadas de forma selectiva en función de su preferencia por el alcohol (HAD, P y AA) con ratas Wistar no seleccionadas. Las expusieron durante 24 horas a dos botellas que contenían una solución de etanol al 5% y al 20%, y a una tercera con agua. Los animales fueron sometidos repetidamente a dos experiencias estresantes, descargas eléctricas incontrolables y natación forzada, comprobándose que la primera experiencia aumentó el consumo de alcohol en todos los grupos de animales, mientras que la segunda sólo lo hizo en las ratas Wistar.

Por su parte, van der Kam *et al.*, (2005a) sometieron a ratas APO-SUS y APO-UNSUS a tres situaciones, una neutra y dos estresantes, evaluando simultáneamente su consumo de etanol en una prueba de elección agua/alcohol en la que las concentraciones de la droga fueron aumentando paulatinamente (del 2 al 10%). La primera de las situaciones (estrés agudo) consistió en colocar al animal durante 24 horas en una caja cuyo suelo estaba formado por barras metálicas de 2 mm. En la segunda (estrés crónico) los animales fueron

sometidos consecutivamente a diversas experiencias moderadamente estresantes (serrín húmedo, colocar al animal en una caja de metabolismo, inclinar la jaula-hogar, encender y apagar las luces cada 30 minutos, alojarlos en cajas inclinadas con el suelo compuesto por barras metálicas, e invertir el ciclo de luz-oscuridad). Los resultados obtenidos fueron los siguientes: (a) en condiciones basales (sin estrés) las ratas APO-UNSUS consumieron más alcohol y mostraron más preferencia que las APO-SUS, observándose estas diferencias a partir de concentraciones al 4%; (b) la prueba de estrés agudo produjo un aumento en el consumo de alcohol en ambas cepas, si bien dicho aumento fue más prolongado en el grupo APO-SUS; (c) el estrés crónico aumentó el consumo y la preferencia por alcohol en ambos genotipos, si bien el patrón de consumo fue mucho más irregular en el grupo APO-SUS en comparación con el APO-UNSUS. Resultados similares han sido hallados en relación con la conducta de autoadministración de cocaína, dado que las diferencias que se observan entre estas cepas en condiciones basales (APO-UNSUS > APO-SUS) se invierten tras someter a los animales a una experiencia de estrés consistente en apagar la luz durante la autoadministración (van der Kam *et al.*, 2005b). Estos datos parecen sugerir que ciertos estresores ambientales pueden cambiar los patrones de consumo de sustancias de abuso dependiendo de la naturaleza de los mismos y de las características genéticas del animal, las cuales podrían condicionar, por ejemplo, la reactividad del eje HPA en respuesta a dichos estresores (van der Kam *et al.*, 2005b). Volveremos a esta cuestión más adelante.

Resultados similares se han obtenido utilizando cepas de animales que muestran diferencias extremas en un rasgo conductual íntimamente relacionado con la conducta adictiva: las ratas HR y LR. Así, Norton (2001) observó que una experiencia crónica de estrés social (*social defeat*) es capaz de igualar las diferencias basales que muestran las ratas HR y LR en relación con sus tasas de autoadministración de cocaína. En concreto, se comprobó que dicha experiencia demoró el inicio de la autoadministración en el grupo HR sin afectar a su nivel máximo de respuesta, mientras que produjo un aumento dramático de la autoadministración en el grupo LR. En opinión de los autores, los resultados sugieren que algunos animales (HR) podrían buscar drogas debido a su tendencia a buscar sensaciones novedosas, mientras que otros (LR) lo harían como reacción al estrés social, una interpretación que pone de manifiesto la utilidad de los modelos animales para identificar algunos de los factores desencadenantes del consumo de sustancias de abuso (Kabbaj *et al.*, 2004).

Finalmente, otra limitación importante que a menudo se constata en los estudios que analizan la relación entre estrés y consumo de sustancias en modelos animales es la reducida validez ecológica que tienen las pruebas de estrés utilizadas (Becker *et al.*, 2011). En efecto, a pesar de la utilidad de procedimientos basados en la administración de descargas eléctricas, o la prueba de natación forzada, es evidente que ninguno de ellos se asemeja a los acontecimientos vitales que en seres humanos se asocian con patologías relacionadas con abuso de drogas (Clark *et al.*, 2001; El-Shikh *et al.*, 2004; Hayaki *et al.*, 2005; Hyman y Sinha, 2009; Waldrop *et al.*, 2007). En este contexto podrían cobrar una especial relevancia los modelos animales de frustración, basados en la pérdida inesperada de fuentes de reforzamiento significativas para el sujeto, una experiencia vital de “dolor psicológico” relativamente común en seres humanos (véase Cochrane y Robertson, 1973; Scully *et al.*, 2000). Estos modelos consisten en situaciones experimentales en las que los animales son expuestos a la devaluación u omisión súbita e inesperada en la calidad o cantidad de un reforzador apetitivo, en presencia de señales previamente asociadas con un reforzador de mayor magnitud (Amsel, 1992, 1994; Papini *et al.*, 2006). Así, por ejemplo, el CSN consiste en una reducción o deterioro transitorio en la respuesta que aparece ante bajos niveles de recompensa en animales que previamente han sido expuestos a valores de recompensa superiores (Domjan, 2006; Mackintosh, 1974). El efecto básico de CSN se obtiene al comparar la ejecución de un grupo devaluado con la de un grupo control que siempre recibe bajos niveles de recompensa (Pellegrini, Wood, Daniel y Papini, 2005). Así, la reducción de la magnitud de la recompensa en el grupo experimental provoca un deterioro en la ejecución situando la respuesta de los animales por debajo de los niveles observados en el grupo control. Este fenómeno paradójico ha sido observado en una gran variedad de especies (Mustaca, Bentosela y Papini, 2000; Papini, 2003), usando reforzadores tanto sólidos como líquidos (Pellegrini y Mustaca, 2000) y exponiendo a los sujetos a la reducción tanto de la cantidad como de la calidad del reforzador presentado (Crespi, 1942; Mitchell y Flaherty, 2005). El deterioro conductual que define el fenómeno de contraste ha sido observado, además, en tareas consumatorias (Flaherty, 1996), como instrumentales apetitivas (Crespi, 1942) e instrumentales aversivas (Cándido, Maldonado, Mejías y Catena, 1992). En tareas consumatorias (CSNc) este fenómeno suele observarse mediante el efecto que tiene la manipulación en la concentración de una determinada solución azucarada sobre, por ejemplo, la frecuencia con que los animales lamen una bureta que contiene dicha solución. Así, dicho efecto aparece cuando se reduce la concentración de la solución a la que los animales han tenido acceso (usualmente del 32% al 4%), lo que provoca una clara reducción en la frecuencia

de lametadas (véase para una revisión Flaherty, 1996). El efecto de CSN también puede observarse manipulando la magnitud de un reforzador asociado con la ejecución de una respuesta instrumental (CSNi). Así, por ejemplo, dicho efecto aparece cuando se reduce el número de *pellets* a los que los animales tienen acceso en la caja meta de un laberinto recto (Crespi, 1942) o también cuando se reduce el tiempo de permanencia en el lugar de seguridad en la tarea de evitación en un solo sentido (Cándido *et al.*, 1992).

Otro fenómeno relevante relacionado en este caso con la omisión de una recompensa esperada es la extinción de una respuesta previamente aprendida. En este caso, los sujetos expuestos a un procedimiento de extinción reciben en una primera fase una recompensa tras la ejecución de una respuesta instrumental, mientras que en una segunda fase no tiene lugar la aparición de la recompensa tras la ejecución de dicha respuesta. El efecto básico que se observa tras la omisión de la recompensa es un deterioro o disminución de la respuesta objeto de estudio (Domjan, 2006; Mackintosh, 1974). Al igual que el CSN, la extinción ha sido observada en distintas especies (Thomas y Papini, 2003), utilizando reforzadores sólidos y líquidos (Norris *et al.*, 2008; Yee, Feldon y Rawlins, 1997) y empleando tareas consumatorias e instrumentales (Norris *et al.*, 2008; Kawasaki e Iwasaki, 1997), tratándose de un fenómeno que puede verse influido por variables tales como el intervalo entre ensayos, el número de ensayos de adquisición, la magnitud y demora del reforzador o el uso de sustancias ansiolíticas (véase para una revisión Mackintosh, 1974).

Por otro lado, se sabe que las experiencias repetidas de frustración pueden llegar a inmunizar al animal ante posteriores experiencias inesperadas de pérdida, generando conductas de persistencia que reflejan su resistencia a la frustración (Pellegrini, Muzio, Mustaca y Papini, 2004). Así, el efecto del reforzamiento parcial en la extinción es el fenómeno que se obtiene al reforzar una determinada respuesta sólo en algunos ensayos, normalmente el 50%, durante una primera fase de adquisición. Tras ésta, la recompensa se suprime (fase de extinción). El efecto del reforzamiento parcial en la extinción puede observarse mediante la comparación de la ejecución de este grupo con la de otro grupo igualmente suprimido de recompensa, pero que ha sido sometido a un programa de reforzamiento continuo durante la fase de adquisición. El resultado obtenido es una extinción más lenta, es decir, una mayor resistencia a la extinción en el grupo de reforzamiento parcial en comparación con el grupo de reforzamiento continuo (Domjan, 2006; Mackintosh, 1974). Resultados similares se obtienen cuando, tras un entrenamiento en reforzamiento parcial, el animal es sometido posteriormente a la devaluación (en lugar de a la omisión) de la misma. Este es el llamado “efecto del reforzamiento parcial en el

contraste”, que consiste en una atenuación del mismo que aparece en aquellos animales que han tenido experiencia previa con reforzamiento parcial, en comparación con la de aquéllos sometidos a condiciones de reforzamiento continuo (Cuenya *et al.*, 2012; Pellegrini *et al.*, 2004).

La evidencia que pone en relación los fenómenos de frustración comentados más arriba con el consumo de alcohol es prácticamente inexistente, aunque sí se han descrito las propiedades ansiolíticas de esta sustancia utilizando estos modelos (véase Mustaca y Kamenetzky, 2006, para revisión). Así, Becker y Flaherty (1982, 1983) hallaron que la administración de una inyección intraperitoneal de 0.75 g/kg y de 1 g/kg de 15% de etanol redujo la magnitud del efecto de CSNc, siempre que la droga se administrara antes de la segunda experiencia con la solución de sacarosa devaluada, pero no antes de la primera. Los efectos del etanol en el contraste fueron contrarrestados por Ro 15-4513, un antagonista del receptor de benzodiazepinas, lo que pone de manifiesto la implicación del sistema GABAérgico en sus efectos ansiolíticos (Becker y Hale, 1991). Estos resultados fueron replicados y ampliados por Kamenetzky y Mustaca (2005), apoyando la hipótesis de que el alcohol tiene propiedades análogas a las descritas por las benzodiazepinas y los barbitúricos, dado que es capaz de atenuar los efectos provocados por un dolor psicológico inducido por experiencias agudas o crónicas de frustración (Kamenetzky, 2008b; Mustaca y Kamenetzky, 2006).

En cuanto a los efectos que pueden tener los estados de frustración sobre el consumo de alcohol, no se han realizado estudios ni hallado evidencias que vayan en esta dirección. Sólo conocemos un trabajo realizado por Kamenetzky (2008a), quien analizó el efecto de la disminución sorpresiva del refuerzo sobre la búsqueda de claves asociadas con el etanol. En este experimento los animales fueron sometidos a un entrenamiento de preferencia por un lugar asociado con alcohol (0.5 g/kg de una solución al 15%). Al mismo tiempo, recibieron en una caja de condicionamiento una solución de sacarosa al 32% que fue devaluada después de 10 días hasta el 4%. La prueba de preferencia por el lugar se realizó durante el segundo día de esta segunda fase, comprobándose que los animales frustrados permanecieron más tiempo en el lugar asociado con el alcohol que los controles inyectados con salino, invirtiendo la tendencia a permanecer en lugares oscuros que mostraron estos últimos cuando se encontraban en un estado de ansiedad inducida por frustración.

Aunque en este estudio no se evaluó directamente el consumo de alcohol en los animales sometidos a la experiencia de devaluación de la recompensa, sus resultados ponen en evidencia una posible relación entre estrés inducido por pérdida y alcohol, una cuestión no

explorada hasta el momento y que merece nuestra atención por varias razones. En primer lugar, dada la frecuencia con que los seres humanos experimentamos experiencias vinculadas con dolor psicológico, los modelos animales de pérdida de recompensa pueden tener gran validez ecológica y ser de utilidad para comprender mejor la influencia de este tipo de factores ambientales en la conducta adictiva. En segundo lugar, a diferencia de otros protocolos de estrés, las pruebas de frustración permiten una caracterización exhaustiva de la conducta que el sujeto manifiesta durante la realización de las mismas, sean éstas de carácter consumatorio o instrumental. De este modo, nos permiten estudiar el modo en que las diferencias individuales en estrategias de afrontamiento ante estas situaciones negativas se relacionan con patrones específicos de consumo de etanol. Finalmente, numerosas evidencias experimentales sugieren que estas diferencias individuales están moduladas por factores genéticos, tal y como lo demuestran los estudios llevados a cabo con animales genéticamente seleccionados sobre la base de su reactividad emocional (véase Cuenya *et al.*, 2011, para revisión). Por su especial relevancia para la presente Tesis Doctoral, destacan los trabajos realizados con ratas RHA-I y RLA-I, las cuales muestran claras diferencias comportamentales cuando son sometidas a condiciones de omisión de recompensa (Gómez *et al.*, 2009), devaluación de la magnitud de un reforzador (Rosas *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2005a) o reforzamiento parcial (Gómez *et al.*, 2008; Cuenya *et al.*, 2012). Estos hallazgos, junto con las diferencias que presentan estos animales en su conducta de autoadministración de drogas de abuso (Giorgi *et al.*, 2007) ponen de manifiesto la posible utilidad de estas cepas como modelo animal para el estudio de la frustración y su efecto sobre el consumo de alcohol, un tema que se aborda en los experimentos que se presentan a continuación.

El primero de ellos tuvo como objetivo fundamental establecer las condiciones experimentales adecuadas para analizar el efecto de la frustración sobre el consumo de etanol. Para ello, ratas Wistar fueron sometidas a un procedimiento de CSN instrumental apetitivo (laberinto recto), analizando el efecto de la devaluación de la recompensa (de 12 *pellets* a 2 *pellets*) sobre el consumo posterior de una solución de alcohol al 2% (estudio 4). Los resultados obtenidos en este estudio piloto sirvieron para planificar los estudios 5 y 6 de esta Tesis Doctoral, en los cuales se analizó el efecto de la omisión de una recompensa esperada (extinción) sobre el consumo de alcohol (2 %) en ratas RLA-I y RLA-I, tanto en una prueba consumatoria (estudio 5) como en tarea instrumental (laberinto recto, estudio 6).

Sobre la base de las teorías emocionales propuestas para dar cuenta de los fenómenos comportamentales relacionados con pérdida de recompensa, así como de las diferencias que

presentan las ratas Romanas en este tipo de pruebas (Rosas *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2008, 2009) y en consumo voluntario de etanol (estudios 1 y 3 de la presente Tesis Doctoral), se establecieron las siguientes predicciones: (a) en el estudio 4, la reducción en la magnitud de la recompensa (12 *pellets*-2 *pellets*, 12-2) provocará un deterioro en la ejecución de la respuesta instrumental registrada en el laberinto recto (es decir, un efecto de CSN), cuando este grupo sea comparado con su grupo control 2-2; (b) la experiencia de devaluación constituirá un acontecimiento negativo de carácter estresante que aumentará el consumo de alcohol registrado en una prueba de preferencia agua/alcohol posterior; (b) en los estudio 5 y 6, la omisión de una recompensa previamente presentada (concentración de sacarosa al 22% en el estudio 5, 12 *pellets* en el estudio 6) provocará un deterioro en la ejecución de la respuesta más marcado en la cepa más emocional (RLA-I) en comparación con la menos emocional (RHA-I); estas diferencias de cepa en resistencia a la extinción aparecerán siempre que los animales hayan recibido un entrenamiento en reforzamiento continuo durante la adquisición, mientras que en situaciones de reforzamiento parcial tales diferencias no aparecerán (estudio 6); (c) dado que la cepa RLA-I es emocionalmente más reactiva ante experiencias de omisión de recompensa, se espera que dicha cepa muestre un mayor consumo de alcohol que la cepa RHA-I cuando la droga se presente en una prueba posterior de preferencia (estudio 5 y 6).

ESTUDIO 4.

Como se ha comentado en el apartado anterior, el presente estudio se realizó con el objetivo de averiguar si el paradigma de CSN instrumental apetitivo puede ser adecuado como experiencia frustrante capaz de influir en el consumo voluntario de etanol, llevando a cabo para ello un estudio piloto con ratas Wistar expuestas a la reducción inesperada en la magnitud de la recompensa presentada en la caja meta de un laberinto recto (12 *pellets*-2 *pellets*).

Método

Sujetos

Se utilizaron 20 ratas macho Wistar, hembras de 5 meses de edad, con un peso medio aproximado de 350 gramos, las cuales fueron colocadas en jaulas individuales una semana antes del inicio del experimento, teniendo libre acceso de agua y privadas de alimento hasta alcanzar el 82-85% de su peso corporal inicial. La temperatura del estabulario y de la sala experimental se mantuvo constante (22^o aproximadamente). Los ciclos de luz-oscuridad fueron de 12 horas, y el inicio del período de luz tuvo lugar a las 8:00. Los experimentos se realizaron una hora después del inicio del período de luz.

Aparatos

Para realizar la prueba instrumental se utilizaron dos laberintos rectos de madera de color verde con medidas de 120 cm de longitud, 14 cm de altura y 11 cm de ancho (véase la Figura 17). La asignación de los animales a los laberintos se realizó de forma contrabalanceada para hacer que el mismo número de animales de cada grupo fuera expuesto a cada uno de los laberintos. Uno de ellos tenía tres brazos, por lo que uno de los brazos se anuló con un cartón. Cada laberinto fue dividido en tres secciones: salida, recorrido y meta. La longitud del compartimento de salida era de 20 cm, el recorrido comprendía una distancia de 80 cm y el compartimento de meta media igual que el de salida (20 cm). Los compartimentos del laberinto estaban delimitados por cartones, los cuales eran levantados para que la rata recorriera el laberinto y se bajaban cuando la misma alcanzaba el compartimento-meta con las cuatro patas. En el caso del laberinto de tres brazos, el cartón

que obstruía el acceso al tercer brazo permaneció colocado durante todas las sesiones experimentales.

Para registrar el tiempo que el animal tardaba en recorrer el laberinto, así como el tiempo de permanencia en la caja meta necesario para ingerir los *pellets*, se utilizaron cronómetros manuales (Extech, modelo 365510). Se empleó además una hoja de registro donde estaba especificado el número de la rata, y el grupo al que pertenecía, en la cual se anotaba el tiempo que transcurría desde que cada animal partía del compartimento de salida hasta que llegaba al compartimento meta.

Por último, se usó un bote de pellets de 45 mg cada uno como recompensa (fórmula P; Research Diets, Inc., Noyes Precision Pellets, Lancaster, NH) y una báscula con la que se controlaba el peso del animal diariamente (Baxtran modelo BS3). Dichos pesos se anotaban igualmente en hojas de registro para facilitar el almacenamiento informático posterior de estos datos.

La prueba de preferencia por el alcohol para cada rata se realizó en su caja hogar. Las características de estas cajas, así como de las botellas en las que se presentaban las distintas concentraciones de alcohol, la báscula digital para tomar las medidas de consumo, y la elaboración de la concentración utilizada, fueron idénticas a las descritas en el Estudio 1.

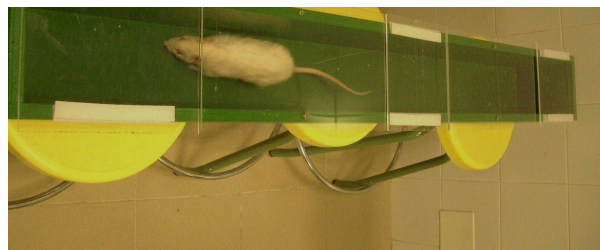


Figura 17. Laberinto recto

Procedimiento

Antes de empezar con la tarea de CSN se procedió a la aclimatación de los animales al alcohol. Para ello se procedió de manera idéntica a como se hizo en el Estudio 1, si bien la concentración más alta, y única, de etanol, fue del 2%. Asimismo, se procedió del mismo

modo al descrito en nuestro primer estudio para la preparación de la concentración y la colocación de las botellas en las jaulas hogar. Los primeros 4 días los animales tuvieron acceso a dos botellas de 150 ml con sólo agua. A partir del quinto día una botella de agua fue remplazada por otra botella con la concentración de etanol al 2%. Esta situación se mantuvo hasta lograr que los animales ingirieran al menos la misma cantidad de alcohol que de agua durante 2 días seguidos.

Durante la fase de precambio los animales tuvieron en su jaula-hogar una sola botella con agua, que cada día se fue cambiando de lugar (izquierda/derecha). Se midió el consumo cada 15 minutos, durante 2 horas, justo después de la sesión conductual. A partir del primer día de postcambio, e inmediatamente después de la sesión, se colocó a los animales dos botellas: una con agua y otra con alcohol (2%).

Los animales fueron transportados a la sala experimental en grupos de 10 (5 ratas de cada grupo). La tarea instrumental duró aproximadamente 45 minutos para cada grupo de 10 animales. El procedimiento diseñado para la tarea instrumental obedece a la adaptación del utilizado por Flaherty *et al.*, (1998), y constó de tres partes sucesivas; pre-experimento o habituación, entrenamiento o precambio y extinción o postcambio.

Pre-experimento o habituación: Esta fase tuvo una duración de tres días y consistió en un proceso de habituación al aparato. Durante este período cada rata se introducía en el laberinto y se le dejaba explorar libremente el mismo, con el fin de disminuir la neofobia que pudiera ocasionarle el contexto. El primer día se realizaron cinco ensayos de un minuto con cada uno de los animales, durante los cuales la rata podía explorar libremente el aparato sin encontrar en el mismo recompensa en forma de *pellets*.

El segundo día las ratas fueron expuestas a dos ensayos sin comida de un minuto de duración cada uno, y a continuación a dos ensayos más, en los que se mantuvo a cada rata alojada durante un tiempo máximo de 1 minuto en el compartimento de meta con 12 ó 2 *pellets* según correspondiera a cada grupo. Finalmente se realizó un último ensayo de un minuto de duración en el que se colocaba la recompensa (12 ó 2 *pellets*, según el grupo) a lo largo del laberinto y se exponía a la rata al mismo.

Por último, en el tercer día, se realizaron tres ensayos con cada rata en los que se les colocaba en la caja meta la recompensa (12 ó 2 *pellets*, según grupo). El tiempo máximo permitido para el consumo de la recompensa fue de 30 segundos. Si la rata finalizaba antes, se sacaba de la caja meta. Por otro lado y con el mismo fin, se proporcionó a todos los animales 12 *pellets* en la jaula hogar junto a la comida habitual.

Entrenamiento o precambio: Esta fase tuvo una duración de 10 días, durante los cuales se realizaron sesiones de seis ensayos diarios de entrenamiento con cada rata en la secuencia que se describe a continuación y en tandas de 10 animales para cada laberinto.

El experimentador colocaba los *pellets* correspondientes en el compartimento-meta con la puerta abierta (12 ó 2, según el grupo). Posteriormente se situaba a la rata en el compartimento de salida con la compuerta cerrada. Una vez abierta ésta, el animal tenía un máximo 20 segundos para recorrer el laberinto. Si una vez transcurrido ese tiempo no había alcanzado el compartimento-meta, se le empuja hacia él suavemente y se registraban 20 segundos como latencia de respuesta. Tras esto, se le cerraba la puerta del compartimento-meta, donde permanecía hasta haber consumido los *pellets* o por un tiempo máximo de 30 segundos, tras lo cual la rata era extraída del laberinto y se devolvía a su jaula hasta el siguiente ensayo. El tiempo aproximado entre ensayos (ITI) para cada rata fue de unos 10 minutos.

Inmediatamente después de que cada animal finalizara la sexta sesión diaria, los animales fueron devueltos a su jaula-hogar. La alimentación de los animales se realizó 30 minutos después de finalizar la prueba de preferencia por el alcohol. Cada dos días se procedió a la limpieza de la jaula hogar y al cambio de serrín.

Extinción o postcambio: Esta fase tuvo una duración de 5 días. Durante cada día el procedimiento fue idéntico al realizado en la fase de entrenamiento, con la salvedad de que el compartimento-meta contuvo sólo 2 pellets de recompensa. Inmediatamente después de que cada animal finalizara la sexta sesión diaria, los animales fueron devueltos a su jaula-hogar, en la que, durante 2 horas, una vez retirada la botella de avituallamiento estándar de agua (500 ml), tuvieron acceso a dos botellas (150 ml) una con agua y la otra con alcohol (al 2%). Las concentraciones de alcohol se prepararon cada día de igual modo que la explicitada en el Estudio 1. Asimismo, cada día se intercambiaba la posición de las botellas de agua y alcohol en la jaula para evitar una posible preferencia por el lugar. Para cada animal se registró el consumo de cada botella durante 2 horas, cada 15 minutos. Una vez finalizada la prueba de preferencia las botellas empleadas en ésta fueron retiradas, y reemplazadas por una botella de agua (500 ml).

Tabla 4

Diseño del Experimento 4

GRUPO	N	FASE DE PRECAMBIO	FASE DE POSTCAMBIO
12-2	10	12 <i>pellets</i>	2 <i>pellets</i>
2-2	10	2 <i>pellets</i>	2 <i>pellets</i>

Nota. N: número de ratas en cada uno de los grupos. 12-2 y 2-2 se refiere a los dos grupos de ratas en función del número de pellets recibidos en cada una de las fases del experimento.

Variables dependientes

La variable dependiente registrada en la prueba instrumental fue la latencia media de respuesta de cada sesión experimental (promediando la latencia de respuesta de los 6 ensayos que componían la misma), es decir, el tiempo invertido por el animal en llegar a la caja meta desde el compartimento de salida, en segundos. Las medidas tomadas en la prueba de preferencia y los índices de consumo calculados a partir de estas medidas fueron los mismos que los especificados en los experimentos previos sobre preferencia incluidos en esta Tesis Doctoral.

Análisis estadísticos

Para las distintas variables dependientes registradas en cada una de las pruebas se realizaron análisis de varianzas (ANOVA) en las distintas fases atendiendo a los factores sesión y grupo (12-2 vs. 2-2). Finalmente, con el objetivo de analizar si las respuestas de frustración (latencia de respuesta) podrían estar relacionadas con los patrones de consumo de alcohol (preferencia) se calcularon los correspondientes coeficientes de correlación de Pearson para cada sesión. Para todos estos análisis se estableció un nivel de significación estadística de $p < 0.05$.

Resultados

Latencia de respuesta

La Figura 18 presenta los valores medios de latencia de respuesta registrados en los grupos 12-2 y 2-2, a lo largo de las sesiones de precambio y de postcambio. La observación de esta figura parece indicar que, en la fase de precambio, ambos grupos mostraron valores

de latencia similares, que se fueron reduciendo a lo largo de las sesiones. En la fase de postcambio, sin embargo, la reducción del número de *pellets* en el grupo 12-2 aumentó la latencia de la respuesta comparada con el grupo de control 2-2, sobre todo durante las dos primeras sesiones. Estas observaciones se vieron confirmadas por los análisis estadísticos pertinentes. El ANOVA grupo (12-2 vs. 2-2) x sesión (10) realizado con los datos de la fase de precambio mostró un efecto estadísticamente significativo de la variable sesión, $F(9, 162) = 20,541$, $p < 0,0001$, sin que ningún otro efecto principal o interacción fueran significativos. Este resultado indica que ambos grupos mostraron valores de latencia similares a lo largo de las sesiones correspondientes a la fase de precambio, y que estas latencias fueron reduciéndose conforme avanzó el entrenamiento.

El ANOVA grupo (12-2 vs. 2-2) x sesión (5) realizado con los datos de la fase de postcambio mostró un efecto principal de la variable grupo, $F(1, 18) = 9,172$, $p < 0,007$, sin que ningún otro efecto principal ni interacción fueran significativos. Este resultado indica que el grupo de contraste mostró unos valores de latencia superiores a los registrados en el grupo de control.

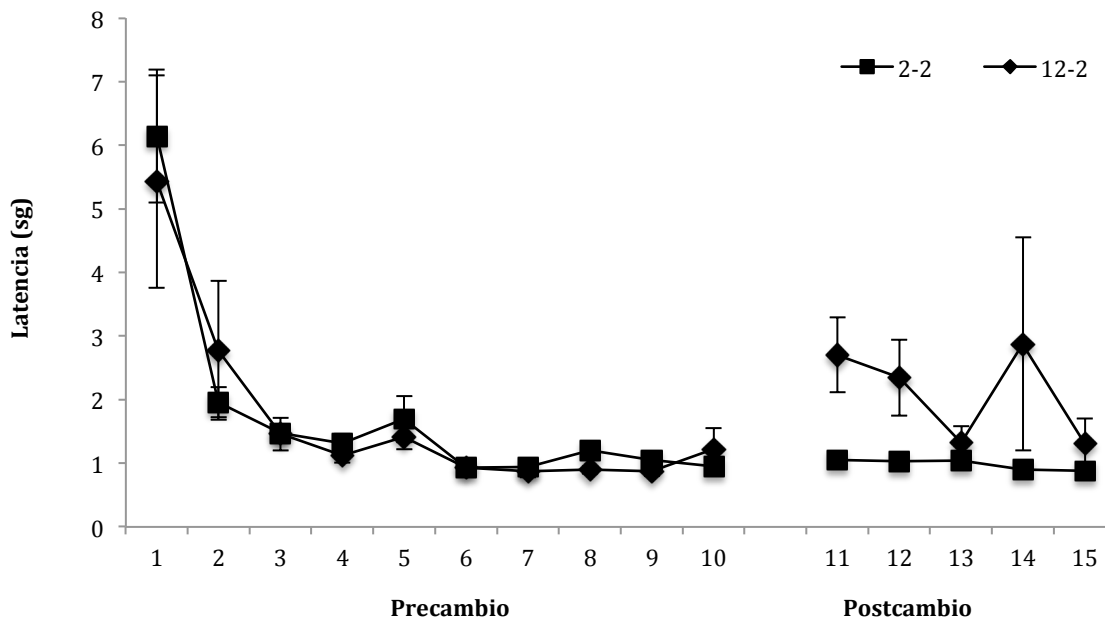


Figura 18. Latencia de respuesta promedio registrada durante las fases de precambio (sesiones 1 a 10) y de postcambio (sesiones 11 a 15) en la tarea de CSN en el grupo de control (2-2) y el grupo experimental (12-2).

Consumo de etanol

En la Figura 19 se presentan los valores promedio del consumo de etanol de los grupos 12-2 y 2-2 durante la fase de postcambio. Como se puede apreciar, los datos no parecen ser concluyentes con respecto a las diferencias en consumo entre los grupos y en cada una de las sesiones. El ANOVA grupo (12-2 vs. 2-2) x sesión (5) mostró un efecto de sesión, $F(4, 72) = 3,967$, $p < 0,006$, así como de la interacción sesión x grupo, $F(4, 72) = 5,739$, $p < 0,0001$. El análisis de la interacción indicó que las diferencias entre los grupos apareció solo en la sesión 3, $F(1, 18) = 5,116$, $p < 0,036$, mostrando el grupo de contraste un consumo mayor de etanol que el grupo control en esta sesión.

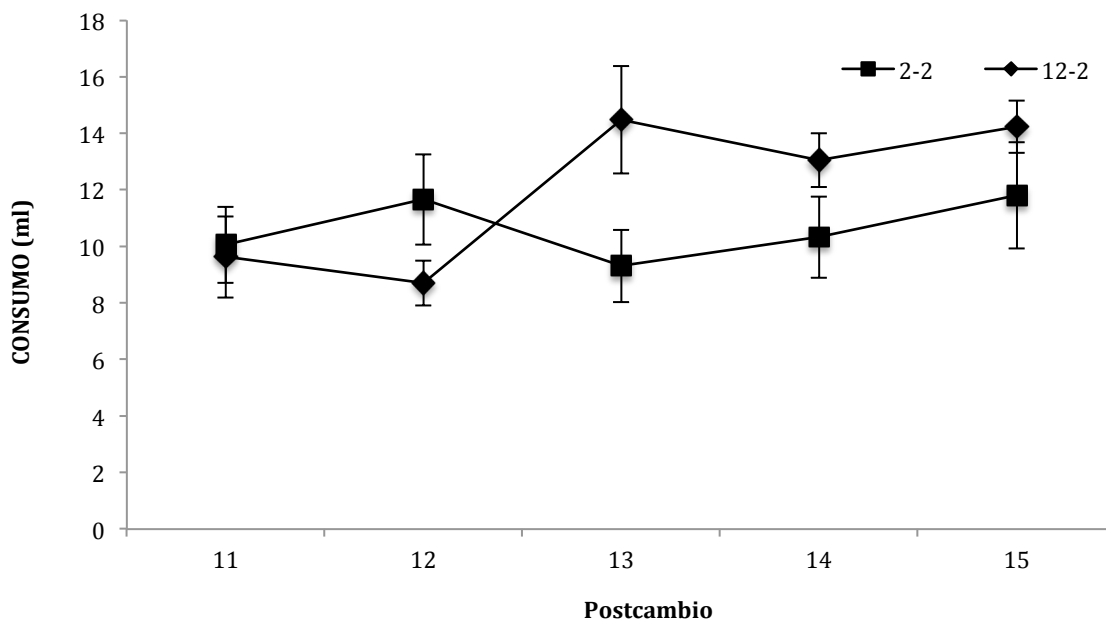


Figura 19. Consumo promedio de etanol (en mililitros) durante la fase de postcambio en la prueba de preferencia en el grupo de control (2-2) y el grupo experimental (12-2).

Preferencia por etanol

La Figura 20 representa los valores promedio de preferencia por etanol en los grupos 12-2 y 2-2 obtenidos en la fase de postcambio.

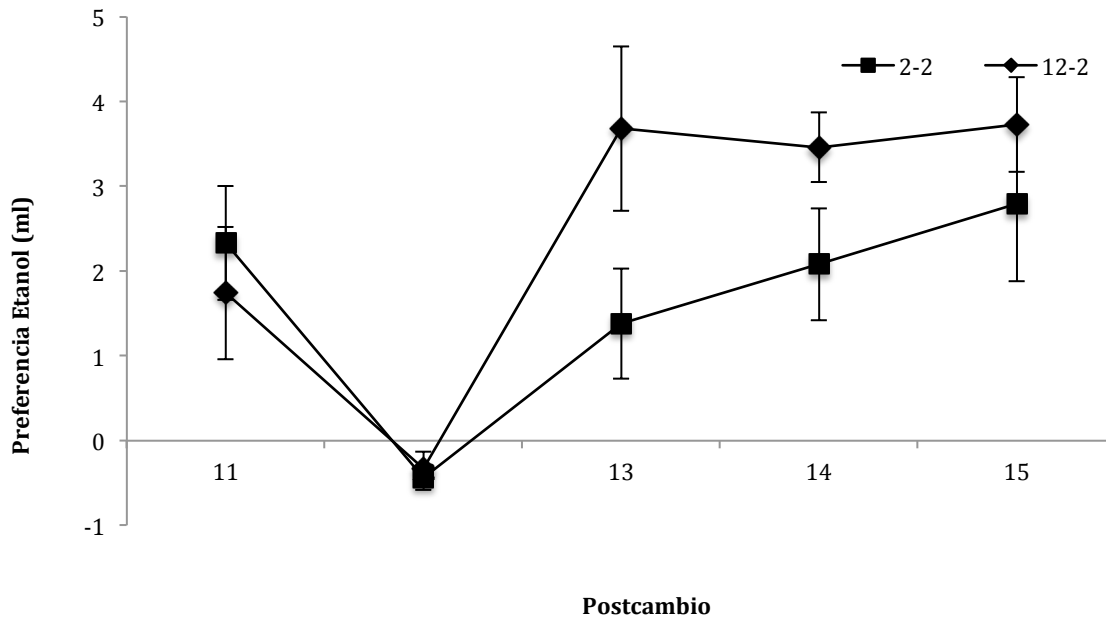


Figura 20. Preferencia promedio por el etanol (en mililitros) registrada durante la fase de postcambio en el grupo de control (2-2) y el grupo experimental (12-2).

El ANOVA grupo (12-2 vs. 2-2) x sesión (5) mostró un efecto principal de la variable sesión, $F(4, 72)$, sin que ningún otro efecto principal ni interacción fuera significativo.

Correlaciones entre latencia de respuesta y preferencia por alcohol

La relación entre las medidas de latencia de respuesta y consumo de etanol se realizó calculando el correspondiente coeficiente de correlación de Pearson en cada sesión. No se obtuvo ninguna correlación significativa entre las mismas, ni en relación con los valores de consumo de etanol, ni en relación con las medidas de preferencia.

Discusión

El presente experimento se realizó con el objetivo de analizar si una experiencia en devaluación de recompensa (CSN instrumental) puede aumentar el consumo de etanol en una prueba posterior de preferencia, tratando de identificar, en ratas Wistar, cuáles podrían ser las condiciones experimentales más idóneas para obtener este efecto. Los resultados indicaron que la reducción en la magnitud de una recompensa esperada (de 12 *pellets* a 2 *pellets*) produjo un deterioro en la ejecución de los animales sometidos a dicha reducción, cuando su ejecución fue comparada con la mostrada por un grupo control que recibió 2 *pellets* durante todo el entrenamiento. De este modo, la manipulación experimental realizada en este estudio permitió la obtención de un efecto de contraste de similares características al

obtenido en estudios anteriores de la misma naturaleza (Crespi, 1942; Flaherty *et al.*, 2008; Rosas *et al.*, 2007)

Sin embargo, los resultados no fueron concluyentes ni demostraron que la devaluación en la magnitud de la recompensa provocara un aumento claro en el consumo de alcohol, dado que sólo se observó un aumento significativo en el consumo de esta sustancia en la sesión 3 de la fase de postcambio, sin que dicho aumento fuera significativo cuando se utilizaron los valores de preferencia por etanol como variable dependiente. Asimismo, no se obtuvieron correlaciones significativas que nos permitieran poner en relación la respuesta instrumental medida en el laberinto con la respuesta consumatoria dirigida a la ingestión de alcohol.

Las investigaciones que han puesto en relación las experiencias de frustración con el alcohol han sido escasas, y la mayoría de ellas se han centrado en analizar de qué modo la administración forzada de alcohol puede influir en la magnitud del efecto de CSN, tanto en tareas instrumentales como consumatorias. Estos estudios se basan en las propiedades ansiolíticas de esta droga de abuso, demostrando que dichas propiedades atenúan la magnitud del contraste de un modo similar al observado tras la administración de benzodiazepinas o de barbitúricos (Flaherty, 1996; Gray, 1987). Por el contrario, no existen evidencias en el momento actual que demuestren que la exposición a una experiencia frustrante puede aumentar el consumo voluntario posterior de etanol. Los resultados obtenidos en el presente experimento parecen indicar que la exposición a la devaluación inesperada y repentina en la magnitud de un reforzador no tiene un efecto significativo sobre el consumo posterior de alcohol, dado que sólo se observó un aumento significativo en dicho consumo en la sesión 3 de la fase de postcambio, mientras que no aparecieron resultados relevantes con respecto a la variable dependiente preferencia por alcohol, ni tampoco se obtuvieron correlaciones significativas entre las latencias de respuesta de la fase de postcambio y los patrones de consumo de etanol registrados en dicha fase. Estos resultados negativos podrían deberse a varios factores. En primer lugar, es posible que la experiencia en devaluación del reforzador (de 12 *pellets* a 2 *pellets*) no fuera lo suficientemente aversiva o frustrante como para tener un impacto significativo sobre el consumo de alcohol, dado que el animal pudo mantener el acceso a una fuente de reforzamiento (2 *pellets*), si bien de menor magnitud. En segundo lugar, cabría la posibilidad de que la experiencia de los animales con el alcohol no hubiera sido lo suficientemente extensa como para permitir a los sujetos habituarse a la dosis utilizada e identificar sus propiedades psicoactivas. Finalmente, es posible que para observar el efecto de la frustración sobre el consumo de alcohol sea

necesario emplear animales altamente reactivos en términos emocionales, es decir, capaces de mostrar respuestas de frustración extremas, en cuyo caso las ratas Wistar no serían un modelo animal adecuado para este tipo de estudios.

Los experimentos que se presentan en las páginas siguientes fueron diseñados atendiendo a estas consideraciones. Así, (a) se aumentó la aversividad de la prueba comportamental, utilizando la omisión (en lugar de la devaluación) del reforzador presentado en la fase de precambio; (b) se aumentó el tiempo de exposición al alcohol, introduciendo la prueba de preferencia después de cada una de las sesiones, tanto en la fase de adquisición como de extinción; (c) se utilizaron tanto tareas instrumentales como consumatorias, incorporando diseños experimentales más complejos que nos permitieron valorar la generalidad de los resultados obtenidos (por ejemplo, incluyendo grupos de reforzamiento parcial en la tarea instrumental); y (d) se emplearon ratas RHA-I y RLA-I, que muestran diferencias extremas en el rasgo conductual de ansiedad, así como en sus respuestas de frustración ($RLA-I > RHA-I$).

ESTUDIO 5.

El objetivo del presente trabajo de investigación fue analizar el impacto de una experiencia frustrante sobre el consumo voluntario de alcohol en las ratas Romanas RHA-I y RLA-I. Para ello, los animales fueron expuestos a una tarea consumatoria en la que se omitió una solución de sacarosa al 22% tras haberla presentado durante 10 sesiones de cinco minutos cada una. Inmediatamente después, los sujetos tuvieron acceso a una solución de alcohol, presentada en una prueba de preferencia agua/etanol (al 2%) que tuvo una duración de 2 horas. Sobre la base de las diferencias en reactividad emocional y en tendencia a consumir alcohol voluntariamente que muestran estas cepas, se establecieron las siguientes predicciones: (a) las ratas RLA-I mostrarán una mayor respuesta de frustración que las RHA-I cuando sean expuestas a la omisión del reforzador apetitivo (sacarosa), lo que provocará la aparición de respuestas incompatibles con la consumatoria (inmovilización) que harán que la extinción de esta respuesta sea más rápida en la primera cepa en comparación con la segunda; (b) el consumo de alcohol después de la omisión del reforzador será mayor en la cepa RLA-I en comparación con la RHA-I, dado que esta experiencia frustrante inducirá a los animales más ansiosos a consumir esta droga para reducir dicho estado aversivo.

Método

Sujetos

Se utilizaron 40 ratas macho (20 RHA-I y 20 RLA-I), procedentes de la Universidad Autónoma de Barcelona. A su llegada al laboratorio las ratas fueron colocadas en jaulas individuales con acceso libre a agua y comida. Una semana antes de dar comienzo el experimento, los animales fueron privados de comida para que alcanzaran aproximadamente el 82% de su peso *ad libitum*, peso que se mantuvo constante durante todo el periodo experimental. El peso de los animales antes de la privación oscilaba entre 340 y 380 gramos. Las condiciones de temperatura y los ciclos de luz-oscuridad fueron idénticas a las establecidas en los experimentos anteriores. La exposición de los animales al alcohol se realizó en sesiones de 2 horas, inmediatamente después de la prueba consumatoria, y el registro de las variables dependientes se llevó a cabo entre las 9.00 y las 14.00 horas.

Aparatos

Para llevar a cabo la tarea consumatoria se emplearon seis cajas de plexiglás, con unas dimensiones de 15 cm de ancho, 30 cm de largo, y 30 cm de alto. La parte superior de cada caja estaba abierta para poder introducir y extraer a los animales. Las paredes frontal y posterior de la caja eran transparentes, y los laterales de color negro. Una bandeja con serrín fue colocada en el suelo de la caja para recoger las heces y la orina. En la pared frontal de cada caja y a través de un agujero situado a 10,7 cm del suelo se colocó una boquilla acoplada a una bureta graduada que contenía la solución azucarada. Las buretas se encontraban fijadas por la parte exterior de la caja mediante un soporte con pinzas de sujeción, evitando así que se cayeran o movieran durante los ensayos (véase la Figura 21). La solución de sacarosa se elaboró mezclando 22 gramos de azúcar con 78 gramos de agua destilada. Se utilizó un agitador magnético para conseguir una disolución completa de la mezcla. Para controlar el tiempo que debían permanecer las ratas en la caja durante el ensayo (5 minutos) se usaron seis cronómetros. En las hojas de registro se anotó diariamente la cantidad, en mililitros, de solución de sacarosa consumida por cada rata.



Figura 21. Cajas de plexiglás donde se realizó la tarea consumatoria.

La prueba de preferencia por el alcohol para cada rata se realizó en su caja hogar. Las características de estas cajas, así como de las botellas en las que se presentaban las distintas concentraciones de alcohol, la báscula digital para tomar las medidas de consumo, y la elaboración de la concentración de alcohol fueron idénticas a las descritas en el Estudio 4.

Procedimiento

Las ratas fueron transportadas en tandas de seis sujetos en sus propias jaulas hogar desde el estabulario hasta la habitación experimental. Cada rata fue asignada a una de las cajas experimentales disponibles, y siempre era entrenada en la misma. El orden de entrenamiento de los grupos se contrabalanceó en cada sesión y también a través de los días. El entrenamiento duró un total de 14 sesiones, de las cuales 10 fueron de precambio y 4 de postcambio, así como una fase de habituación, previa a la fase de precambio.

Habituación. Esta fase que duró una única sesión consistió en la exposición de las ratas a las cajas de consumo. Tuvo una duración de cinco minutos, durante la cual no tuvieron acceso a solución alguna.

Adquisición. La fase de adquisición duró diez días, y cada día para cada rata tuvo lugar una sesión de cinco minutos, durante los cuales los sujetos tuvieron libre acceso a una solución de sacarosa al 22%. El tiempo comenzaba a registrarse a partir de la primera lametada del animal a la boquilla. Tras los cinco minutos de exposición a la solución, los animales eran inmediatamente devueltos a su jaula-hogar, donde fueron expuestos a la prueba de preferencia por el alcohol.

Extinción. Después de que los animales fueran expuestos durante diez días a la solución de sacarosa, dio comienzo la fase de extinción, cuyo procedimiento fue idéntico al utilizado en la fase de adquisición, con la salvedad de que todos los animales recibieron agua destilada. Esta fase se prolongó durante 4 sesiones.

La prueba de preferencia por el alcohol se realizó diariamente, una vez finalizada la tarea consumatoria. Los primeros cuatro días fueron utilizados para la habituación de las ratas a las dos botellas con agua (150 ml). A partir del día quinto (haciendo coincidir este día con el día de habituación de la tarea consumatoria) los animales tuvieron acceso a dos botellas (150 ml) una con agua y la otra con alcohol (al 2%), o bien a dos botellas con agua en función de su asignación a los distintos grupos (grupos ET y W, respectivamente). Las concentraciones de alcohol se prepararon cada día de igual modo que la explicitada en el Estudio 1. Asimismo, cada día se intercambiaba la posición de las botellas del agua y el alcohol en la jaula hogar para evitar una posible preferencia por el lugar. Una vez finalizada la prueba de preferencia las botellas empleadas en ésta fueron retiradas, y reemplazadas por una botella de agua (500 ml). La alimentación de los animales se realizó 30 minutos después de finalizar la prueba de preferencia por el alcohol. Cada dos días se procedió a la limpieza de la jaula hogar y al cambio de serrín. El consumo de la solución de alcohol y de agua se midió 2 horas después de iniciada la prueba de preferencia.

Cada cepa de ratas (RHA-I y RLA-I) se dividió en dos grupos en función de su peso, con el objetivo de que dichos grupos que estuvieran igualados con respecto a esta variable. Un grupo de cada cepa tuvo acceso a las dos botellas con agua en su jaula hogar inmediatamente después de la prueba consumatoria (grupos RHA/W y RLA/W), mientras que los otros dos grupos de ratas fueron expuestos a una botella con agua y a otra con etanol al 2% (grupos RHA/ET y RLA/ET, véase el diseño del Estudio 5 en la Tabla 5).

Tabla 5.
Diseño del Experimento 5

CEPA	PREFERENCIA	N	GRUPO
RHA	ET	10	RHA(ET)
	W	10	RHA(W)
RLA	ET	10	RLA(ET)
	W	10	RLA(W)

Nota: RHA y RLA se refiere a cada una de las cepas de ratas que participaron en este estudio. ET se refiere a la condición de preferencia en la que los animales disponen de dos botellas, una de ellas con etanol y la otra con agua, y W representa la condición de preferencia en la que las dos botellas contienen agua. Inmediatamente antes de la prueba de preferencia las ratas habían realizado la tarea consumatoria. Grupo se refiere a la nomenclatura de cada uno de los grupos que surgen de la combinación factorial de los factores Cepa y Preferencia, y N al número de animales en cada grupo.

Variables dependientes

En la prueba consumatoria se registró la cantidad de solución consumida (sacarosa o agua) en mililitros. Las medidas tomadas en la prueba de preferencia, y los índices de consumo calculados a partir de estas medidas, fueron los mismos que los especificados en los experimentos previos sobre preferencia por el etanol de esta tesis doctoral.

Análisis estadísticos

El tratamiento estadístico de las variables dependientes se realizó mediante análisis de varianzas (ANOVA) en los que se tuvieron en cuenta los factores cepa, sesión, y acceso a alcohol o sólo a agua. Se estableció un nivel de significación estadística de $p < 0.05$.

Resultados

Consumo de la solución de sacarosa/agua (prueba consumatoria)

La Figura 22 representa el consumo diario de la solución de sacarosa (durante la fase de adquisición) o de agua (durante la fase de extinción) en la prueba consumatoria. Como se puede observar, los distintos grupos de animales no parecen mostrar diferencias sensibles en su consumo. El ANOVA cepa (RHA vs. RLA) x preferencia (ET vs. W) x sesión (10) sobre el consumo registrado durante la fase de adquisición arrojó un efecto significativo del factor sesión, $F(9, 324) = 52,863$, $p < 0,0001$, y de la interacción cepa x sesión, $F(9, 324) = 2,659$, $p < 0,005$. Ningún otro efecto principal ni interacción resultó estadísticamente significativo. El análisis de la interacción mostró un efecto de cepa sólo en la última sesión, $F(1, 38) = 6,537$, $p < 0,015$.

El ANOVA cepa (RHA vs. RLA) x preferencia (ET vs. W) x sesión (4) sobre el consumo registrado durante la fase de extinción no arrojó ningún efecto significativo, indicando que todos los grupos mostraron una extinción similar en su respuesta de consumo.

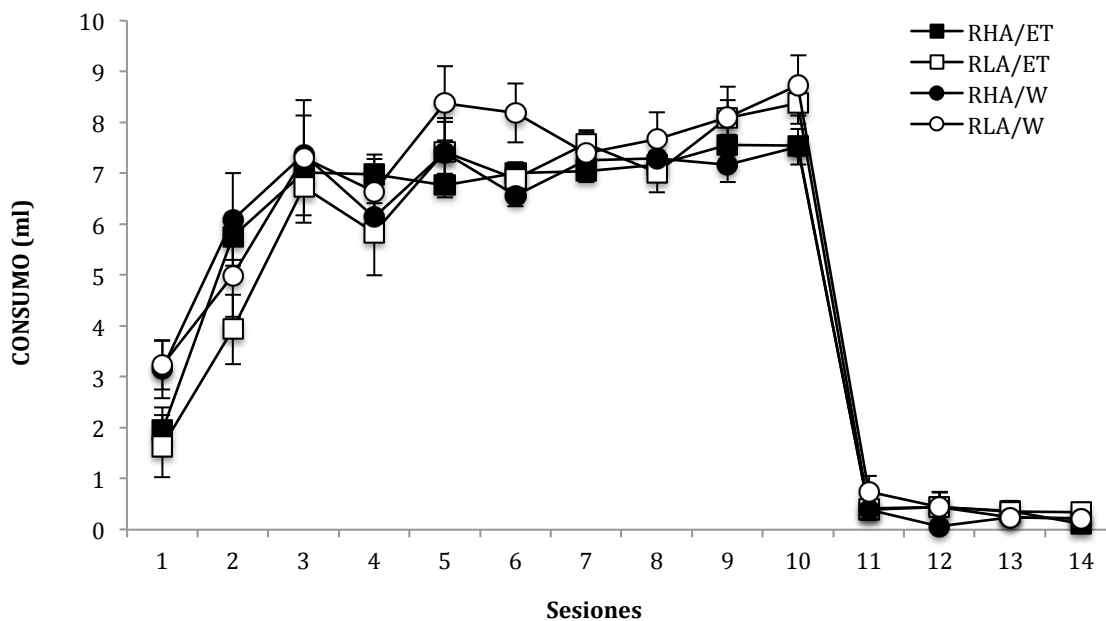


Figura 22. Consumo promedio (en mililitros) durante las fases de adquisición (sesiones 1 a 10) y de extinción (sesiones 11 a 14) en la prueba consumatoria en cada cepa (RHA y RLA) en función de la condición de la condición del factor de preferencia asignado. ET y W indican el contenido de las botellas durante la fase de interferencia, que podían contener una etanol y la otra agua, o bien las dos agua, respectivamente.

Consumo de alcohol

La Figura 23 representa los valores de consumo de la solución de etanol (2%) a lo largo de las sesiones en las cepas de ratas RHA y RLA. La inspección de esta figura parece

sugerir que los animales no mostraron diferencias importantes en dicho consumo durante la fase de adquisición (a excepción de la sesión 10, donde parece que la cepa RHA redujo su consumo con respecto a las sesiones anteriores). Por el contrario, durante los días de extinción la cepa RLA parece mostrar unos valores de consumo superiores a los mostrados por la cepa RHA en las tres primeras sesiones. Los análisis estadísticos pertinentes confirmaron parcialmente estas observaciones. El ANOVA cepa (RHA vs. RLA) x sesión (10) realizado en la fase de adquisición mostró que sólo el efecto de la variable sesión resultó estadísticamente significativo, $F(9,162) = 12,034$, $p < 0,0001$, lo que sugiere que ambas cepas fueron aumentando gradualmente su consumo a lo largo de las sesiones del experimento. El ANOVA cepa (RHA vs. RLA) x sesión (4) realizado en la fase de extinción obtuvo, por el contrario, un efecto significativo de las variables sesión, $F(3, 54) = 7,957$, $p < 0,0001$, y cepa, $F(1, 18) = 14,385$, $p < 0,001$, así como de la interacción entre ambas, $F(3, 54) = 5,327$, $p < 0,003$. El análisis de esta interacción indicó que la cepa RLA consumió más alcohol que la cepa RHA en las tres primeras sesiones de extinción [valor menor de $F(1, 18) = 4,447$, $p < 0,049$].

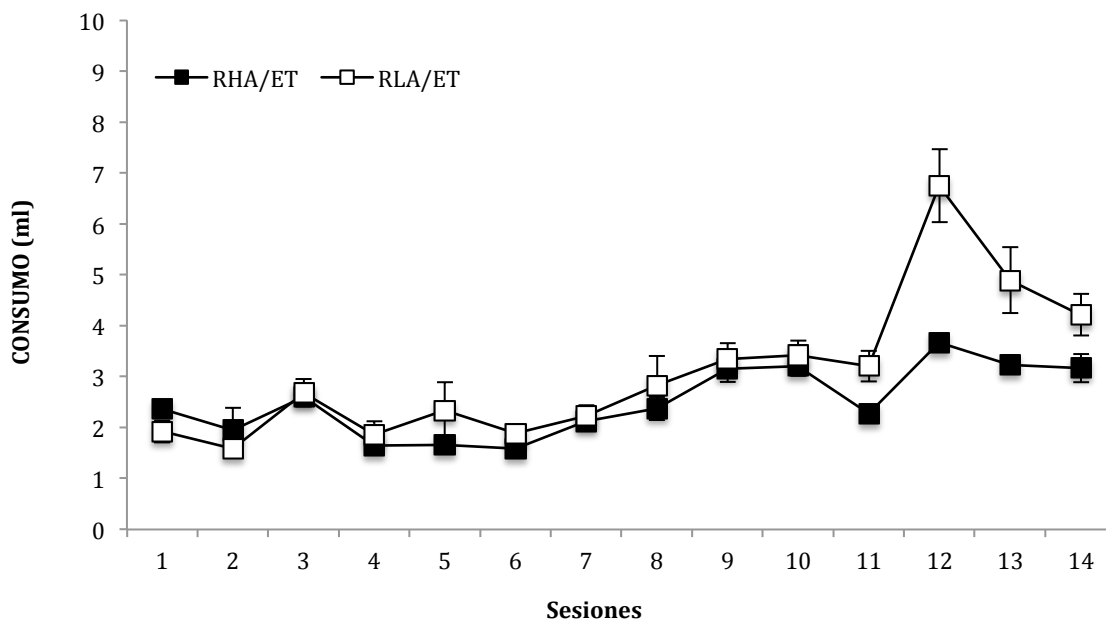


Figura 23. Consumo promedio de etanol (en mililitros) durante las fases de adquisición (sesiones 1 a 10) y de extinción (sesiones 11 a 14) en la prueba de preferencia en cada cepa (RHA y RLA).

Consumo de agua

En la Figura 24 se representan los valores de consumo de agua obtenidos durante la prueba de preferencia en cada una de las cepas (RHA vs. RLA) en función de las

condiciones asignadas en la tarea de preferencia (ET vs. W). Como se puede apreciar en esta Figura aquellos grupos que tuvieron acceso sólo a agua en la prueba de preferencia consumieron más agua que los grupos que fueron expuestos a una botella con agua y otra con etanol (2%). El ANOVA cepa (RHA vs. RLA) x preferencia (ET vs. W) x sesión (10) realizado sobre los datos de la fase de entrenamiento mostró un efecto significativo de las variables sesión, $F(9, 324) = 83,90$, $p < 0,0001$, y preferencia, $F(1, 36) = 111,038$, $p < 0,0001$, así como de la interacción entre ambas, $F(9,324) = 7,600$, $p < 0,0001$. El análisis de la interacción reveló que las diferencias entre los grupos que recibieron sólo agua y aquellos que tuvieron acceso a agua y a etanol aparecieron en todas las sesiones de la fase de adquisición [valor menor de $F(1,38) = 18,467$, $p < 0001$]. El ANOVA cepa (RHA vs RLA) x preferencia (ET vs. W) x sesión (4) en la fase de extinción arrojó diferencias estadísticamente significativas en las variables sesión, $F(3, 108) = 6,538$, $p < 0,0001$ y preferencia, $F(1,369) = 113, 130$, $p < 0,0001$, indicando, de nuevo, que los animales que recibieron sólo agua consumieron más este líquido que aquellos que recibieron agua y alcohol.

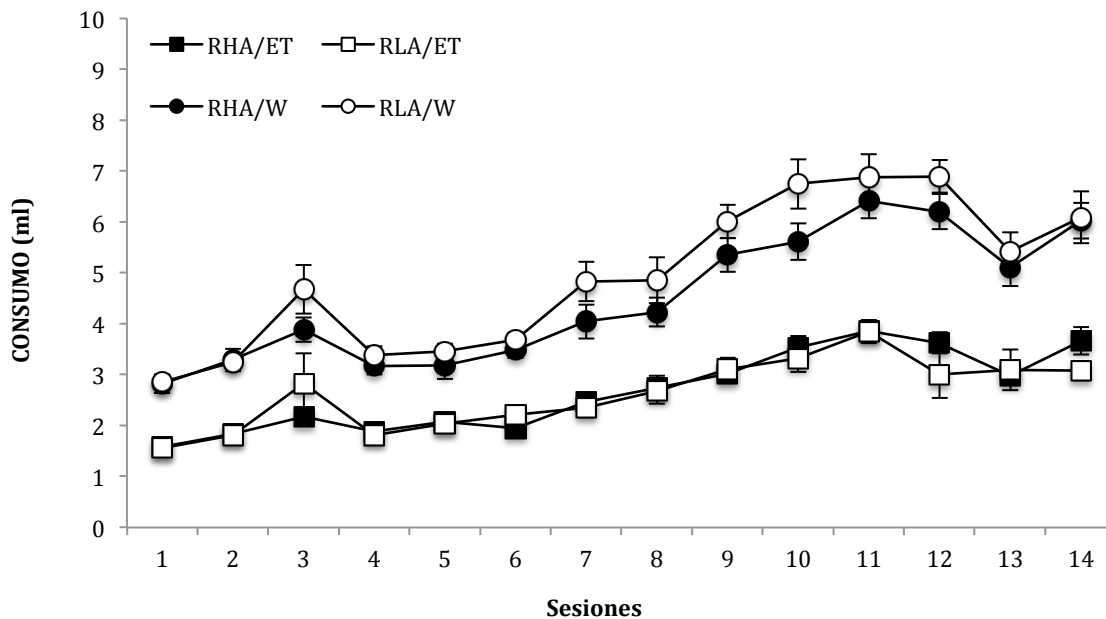


Figura 24. Consumo promedio de agua (en mililitros) durante las fases de adquisición (sesiones 1 a 10) y de extinción (sesiones 11 a 14) en la prueba de preferencia en cada cepa (RHA y RLA), en función de la condición sólo agua (W) o etanol y agua (ET) durante la tarea de preferencia.

Volumen total de consumo

La Figura 25 representa el volumen total de consumo (agua + alcohol) obtenido durante la prueba de preferencia en cada una de las cepas (RHA vs. RLA) en función de las condiciones asignadas en la tarea de preferencia (ET vs. W). En la Figura parece apreciarse que sólo el grupo RLA/ET mostró unos valores de consumo total superiores al resto de los grupos, y sólo durante los primeros días de extinción. El ANOVA cepa (RHA vs. RLA) x preferencia (ET vs. W) x sesión (10) realizado sobre los datos de la fase de entrenamiento mostró un efecto significativo de la variable sesión, $F(9, 324) = 76,757$, $p < 0,0001$. Ningún otro efecto principal ni la interacción resultaron estadísticamente significativos. En la fase de extinción, el ANOVA cepa (RHA vs RLA) x preferencia (ET vs. W) x sesión (4) arrojó un efecto significativo de las variables sesión, $F(3, 108) = 7,710$, $p < 0,0001$, cepa, $F(1, 36) = 8,287$, $p < 0,007$, y preferencia, $F(1,36) = 13,210$, $p < 0,001$, así como de la interacción preferencia x sesión, $F(3, 108) = 2,994$, $p < 0,034$. El análisis de esta interacción indicó que las diferencias entre los grupos de etanol y de agua (ET vs. W) aparecieron en las tres primeras sesiones de extinción [valor menor de $F(1, 38) = 4,574$, $p < 0,039$].

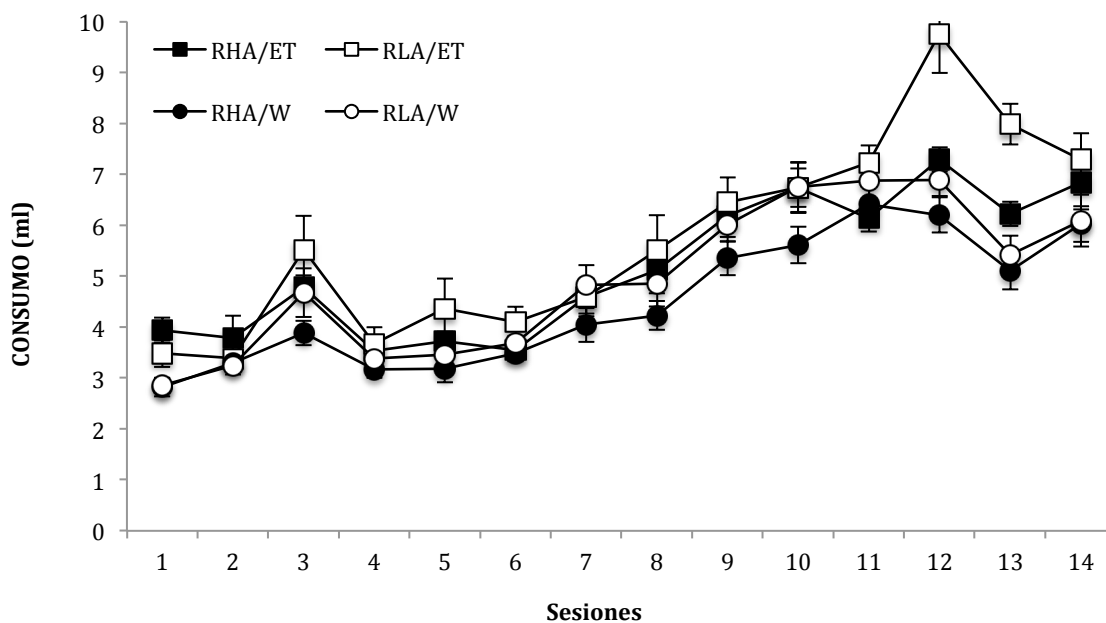


Figura 25. Volumen promedio de consumo de agua + etanol (en mililitros) durante las fases de adquisición (sesiones 1 a 10) y de extinción (sesiones 11 a 14) en la prueba de preferencia en cada cepa (RHA y RLA), en función de la condición sólo agua (W) o etanol y agua (ET) durante la tarea de preferencia.

Discusión

El objetivo del presente trabajo de investigación fue analizar el impacto de una experiencia frustrante sobre el consumo voluntario de alcohol en las ratas RHA-I y RLA-I. Para ello los animales fueron sometidos a una tarea consumatoria en la que se omitió el reforzador (sacarosa) después de diez sesiones de entrenamiento, analizándose el consumo posterior de alcohol en una prueba de elección agua vs. alcohol (2%) que duró 2 horas. Los resultados indicaron que en la prueba consumatoria ambas cepas consumieron la misma cantidad de sacarosa durante la fase de adquisición (a excepción de la sesión 10, donde la cepa RLA-I consumió más que la RHA-I). Estos resultados fueron observados con independencia de que los animales tuvieran acceso a agua (W) o a alcohol (ET) en la prueba de preferencia posterior. En la fase de extinción no se observaron diferencias significativas entre los grupos, indicando que todos ellos extinguieron la conducta de consumo de un modo similar. Por lo que respecta al consumo de alcohol, se comprobó que en la fase de adquisición ambas cepas obtuvieron valores de consumo similares, mientras que inmediatamente después de la omisión del reforzador la cepa más reactiva emocionalmente (RLA-I) consumió más alcohol que la menos reactiva (RHA-I). Estos resultados sugieren que el impacto que una experiencia frustrante de omisión de recompensa puede tener sobre el consumo voluntario de etanol está determinado por influencias genéticas.

Los resultados obtenidos en la prueba consumatoria no parecen adecuarse a nuestras hipótesis y predicciones iniciales. Así, se esperaba encontrar una extinción más rápida en la cepa RLA-I en comparación con la RHA-I, dada su mayor reactividad emocional, tal y como se ha observado en pruebas instrumentales cuando se retira repentinamente un reforzador sólido (12 *pellets*, Gómez, *et al.*, 2009). Estos resultados podrían explicarse desde dos perspectivas. En primer lugar, es posible que la ausencia de diferencias de cepa pudiera deberse a un efecto de suelo, dado que los valores de consumo de agua en todos los grupos fueron extremadamente bajos. Esta posibilidad deberá analizarse en futuros estudios reduciendo (no omitiendo por completo) la magnitud del reforzador en paradigmas de CSN (en lugar de extinción), lo cual podría atenuar el deterioro en la respuesta de consumo en relación con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Una explicación alternativa de los datos obtenidos en este estudio podría estar relacionada con las limitaciones que ofrecen las pruebas consumatorias para encontrar diferencias en respuestas de frustración entre las ratas RHA-I y RLA-I. En efecto, Gómez *et al.*, (2009) observaron que la reducción en la concentración de una solución de sacarosa del 32% al 4% produjo un efecto de contraste similar entre las cepas RHA-I y RLA-I, lo que

obligó a reducir la discrepancia entre las soluciones de pre y postcambio del 22% al 4%. En este caso se comprobó que ambas cepas presentaron un efecto de contraste de igual magnitud el primer día de la devaluación del reforzador, si bien en los días posteriores la cepa RLA-I tuvo una recuperación de dicho efecto más lenta que la RHA-I. No obstante, estos resultados no han podido replicarse en estudios posteriores de naturaleza similar (Sabariego *et al.*, 2011), ni tampoco se han obtenido diferencias de cepa en contraste negativo utilizando otras manipulaciones experimentales (datos no publicados). En este sentido, existen datos en la literatura que sugieren una disociación entre los procedimientos de pérdida de recompensa consumatorios e instrumentales. Así, por ejemplo, la reducción inesperada en la magnitud de una solución de sacarosa genera un contraste negativo consumatorio, pero no es capaz de inducir un deterioro de la respuesta comparable cuando se emplea este reforzador líquido en procedimientos instrumentales. Asimismo, en situaciones de entrenamiento instrumental, la omisión inesperada de un reforzador apetitivo a menudo genera comportamientos agresivos en numerosos mamíferos, mientras que ratas expuestas a una devaluación similar en la magnitud de la recompensa en tareas consumatorias muestran una reducción en comportamientos de carácter agresivo. Otra prueba en favor de esta disociación consumatoria vs. instrumental se deriva de los resultados obtenidos en los estudios de lesiones cerebrales, dado que las lesiones provocadas en el hipocampo y el NAc afectan al contraste instrumental pero no al consumatorio, mientras que las lesiones de la región corticomediale de la amígdala anulan el contraste consumatorio y sólo reducen parcialmente el instrumental. Los estudios farmacológicos arrojan, por último, resultados similares, dado que los ansiolíticos (incluyendo benzodiazepinas y alcohol) aumentan la resistencia a la extinción instrumental mientras que facilitan la consumatoria (Kamenetzky *et al.*, 2009). Estos datos, junto con los obtenidos en nuestro laboratorio, sugieren que los fenómenos de frustración consumatoria e instrumental estarían regulados por principios y mecanismos psicobiológicos que en parte podrían ser diferentes (Sabariego *et al.*, 2011).

Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio en relación con los patrones de consumo de alcohol registrados tras la experiencia en omisión de recompensa parecen sugerir que, con independencia de la conducta registrada en la prueba consumatoria, dicha experiencia tuvo un impacto diferente en cada cepa. Así, mientras que durante la adquisición no se constataron diferencias en consumo de etanol (un hallazgo que concuerda con datos previos obtenidos en nuestro laboratorio con relación a la dosis de etanol utilizada

en este estudio), la cepa más reactiva emocionalmente (RLA-I) consumió más alcohol que la menos reactiva (RHA-I) en las tres primeras sesiones de extinción, un resultado que sí parece adecuarse a nuestras predicciones iniciales. Estos resultados podrían explicarse en el marco de los modelos teóricos explicativos de los fenómenos comportamentales inducidos por pérdida de recompensa. Así, numerosas evidencias obtenidas en el laboratorio animal indican que la devaluación inesperada de la calidad o cantidad de un reforzador apetitivo desencadena un estado fisiológico, cognitivo y comportamental característico que algunos autores denominan frustración (Amsel, 1992). Este estado involucra mecanismos emocionales semejantes a los inducidos por la presentación de estímulos aversivos (relacionados, por ejemplo, con el dolor físico y la novedad), desencadenando respuestas análogas al estrés a través de la activación de circuitos cerebrales vinculados con el miedo y la ansiedad (Flaherty, 1996; Gray y McNaughton, 2000; Papini, 2006). Esta hipótesis ha sido apoyada por numerosos estudios conductuales, farmacológicos, hormonales, endocrinos y psicogenéticos, poniendo de manifiesto la utilidad de los paradigmas de omisión/devaluación de recompensa para el estudio de las bases psicobiológicas de las emociones negativas. Los resultados obtenidos en el presente trabajo parecen ir en la misma dirección, al indicar que la omisión repentina de un reforzador esperado podría constituir una experiencia estresante que aumente el consumo de alcohol en un organismo especialmente vulnerable o sensible a este tipo de experiencias (en nuestro caso la cepa RLA-I). Estos hallazgos son comparables a los obtenidos por otros autores utilizando diversos tipos de experiencias estresantes y otras cepas de animales genéticamente seleccionadas sobre la base de sus diferencias en reactividad emocional o en vulnerabilidad a la adicción (van der Kam *et al.*, 2005, Vengeliene *et al.*, 2003). Asimismo, nuestros datos parecen apoyar lo hallado en estudios previos que sugieren que un animal frustrado tiende a buscar claves previamente asociadas con alcohol, con el probable objetivo de reducir este estado aversivo haciendo uso de las propiedades ansiolíticas de esta sustancia, las cuales se habrían asociado con las claves contextuales mediante condicionamiento clásico (Kamenetzky, Mustaca y Papini, 2008). Por consiguiente, los resultados obtenidos en el presente estudio parecen poner de manifiesto la utilidad de los paradigmas de omisión de recompensa consumatorios, así como de las ratas RHA-I y RLA-I, para explorar las complejas relaciones entre genética, ambiente y conducta adictiva.

ESTUDIO 6.

Este experimento tuvo como objetivo fundamental analizar, en ratas genéticamente seleccionadas (RHA-I y RLA-I), el efecto de una experiencia frustrante inducida en una prueba instrumental sobre el consumo voluntario de alcohol. En concreto, se trató de analizar, por un lado, la resistencia a la extinción de una respuesta instrumental previamente aprendida bajo dos condiciones de adquisición: reforzamiento continuo vs. reforzamiento parcial. Del mismo modo, se estudió el impacto de esta experiencia en omisión de recompensa sobre el consumo voluntario de etanol, tratando de averiguar si dicho impacto podría verse influido por la cepa (RHA-I vs. RLA-I) y/o el programa de entrenamiento utilizados (continuo vs. parcial).

Sobre la base de las diferencias observadas entre las ratas RHA-I y RLA-I en relación con su reactividad a la frustración, su persistencia conductual en situaciones de refuerzo parcial (ERPE) y su tendencia a consumir alcohol de forma voluntaria, se establecieron las siguientes predicciones: (a) las ratas RLA-I mostrarán una extinción más rápida que las RHA-I en su respuesta instrumental cuando hayan recibido reforzamiento continuo durante la adquisición de dicha respuesta; (b) los animales RLA sometidos a reforzamiento parcial tendrán una latencia de respuesta inferior durante la fase de extinción que los animales de la misma cepa sometidos a reforzamiento continuo; en la cepa RHA estas diferencias no aparecerán; (c) en la fase de adquisición, los animales que reciban refuerzo parcial estarán más frustrados y beberán más alcohol en las primeras sesiones que los animales que reciban refuerzo continuo, especialmente aquellos más sensibles a esta experiencia de omisión de recompensa (RLA); (d) durante la fase de extinción ocurrirá lo contrario: los animales sometidos a refuerzo continuo se frustrarán más (especialmente la cepa RLA) y estos sujetos consumirán más alcohol que los RHA sometidos a reforzamiento continuo. Estas diferencias no se observarán en la condición de reforzamiento parcial.

Método

Sujetos

Se utilizaron 52 ratas macho (26 RHA-I y 26 RLA-I), procedentes de la Universidad Autónoma de Barcelona. A su llegada al laboratorio las ratas tenían un peso aproximado de 380 gramos, y fueron colocadas en jaulas individuales con acceso libre a agua y comida.

Una semana antes de dar comienzo el experimento, los animales fueron privados de comida para que alcanzaran aproximadamente el 82% de su peso *ad libitum*, peso que se mantuvo constante durante todo el periodo experimental. Las condiciones de temperatura y los ciclos de luz-oscuridad fueron idénticas a las establecidas en los experimentos anteriores. La exposición de los animales al alcohol se realizó en sesiones de 2 horas, inmediatamente después de la prueba conductual, y el registro de las variables dependientes se llevó a cabo entre las 9.00 y las 16.00 horas.

Aparatos

Para realizar la prueba instrumental se utilizaron los mismos laberintos, cronómetros y básculas descritos en el Estudio 4. Asimismo, los pellets empleados como recompensa tuvieron las mismas características.

La prueba de preferencia por el alcohol para cada rata se realizó en su caja hogar. Las características de estas cajas, así como de las botellas en las que se presentaba la concentración de alcohol, la báscula digital para tomar las medidas de consumo, y la elaboración de las distintas concentraciones de alcohol fueron idénticas a las descritas en el Estudio 1.

Procedimiento

Los animales fueron llevados a la sala experimental en tandas de 13 animales. El procedimiento diseñado para la tarea instrumental obedece a la adaptación del utilizado por Flaherty, Coppotelli, Hsu y Otto (1998), y constó de tres partes sucesivas; pre-experimento o habituación, entrenamiento o precambio y extinción o postcambio.

Pre-experimento o habituación: Esta fase fue idéntica a la descrita en el Estudio 4, con la salvedad de que en esta ocasión todos los animales recibieron 12 pellets en el compartimento de meta durante esta fase.

Entrenamiento o precambio: Esta fase tuvo una duración de 10 días, durante los cuales se realizaron sesiones de seis ensayos diarios de entrenamiento con cada rata en la secuencia que se describe a continuación y en tandas de 13 animales para cada laberinto.

El experimentador colocaba los *pellets* correspondientes en el compartimento-meta con la puerta abierta (12 para los grupos de reforzamiento continuo, 12 ó 0 para los grupos de reforzamiento parcial según la secuencia de cada día). Posteriormente se situaba a la rata en el compartimento de salida con la compuerta cerrada. Una vez abierta ésta, el animal tenía un máximo 20 segundos para recorrer el laberinto. Si una vez transcurrido ese tiempo

no había alcanzado el compartimento-meta, se le empuja hacia él suavemente y se registraban 20 segundos como latencia de respuesta. Tras esto, se le cerraba la puerta del compartimento-meta, donde permanecía hasta haber consumido los *pellets* o por un tiempo máximo de 30 segundos, tras lo cual la rata era extraída del laberinto y se devolvía a su jaula hasta el siguiente ensayo. El tiempo aproximado entre ensayos (ITI) para cada rata fue de unos 13 minutos.

Inmediatamente después de que cada animal finalizara la sexta sesión diaria, los animales fueron devueltos a su jaula-hogar, en la que durante 2 horas, una vez retirada la botella de avituallamiento estándar de agua (500 ml), tuvieron acceso a dos botellas (150 ml), una con agua y la otra con alcohol (al 2%), o bien a dos botellas con agua en función de su asignación a los distintos grupos (grupos ET y W, respectivamente). Las concentraciones de alcohol se prepararon cada día de igual modo que la descrita en el Estudio 1. Asimismo, cada día se intercambia la posición de las botellas de agua y alcohol en la jaula para evitar una posible preferencia por el lugar. Para cada animal se registró el consumo de cada botella en tres momentos diferentes: a los 45 minutos, tras 1 hora y 15 minutos, y a las 2 horas. Una vez finalizada la prueba de preferencia, las botellas empleadas en ésta fueron retiradas, y reemplazadas por una botella de agua (500 ml). La alimentación de los animales se realizó 30 minutos después de finalizar la prueba de preferencia por el alcohol. Cada dos días se procedió a la limpieza de la jaula hogar y al cambio de serrín.

Extinción o postcambio: Esta fase tuvo una duración de nueve días. Durante cada día el procedimiento fue idéntico al realizado en la fase de entrenamiento, con la salvedad de que el compartimento-meta no contuvo recompensa alguna. Asimismo, la prueba de elección agua/etanol posterior a la fase de extinción tuvo lugar en los mismos términos que la descrita para la fase de entrenamiento.

Para cada una de las cepas los animales fueron asignados en función de su peso a los distintos grupos que surgen de la manipulación factorial de las variables modalidad de reforzamiento (continua vs. parcial) y preferencia (agua/agua “W” vs. etanol/agua “ET”, véase diseño del Estudio 6 en la Tabla 6).

Variable dependiente

Las variables dependientes registradas en la tarea instrumental y en la prueba de preferencias fueron las mismas que las indicadas en el Estudio 4 de esta tesis doctoral.

Tabla 6*Diseño del Experimento 6*

CEPA	PREFERENCIA	REFORZAMIENTO	N	GRUPO
RHA	ET	C	7	RHA/C(ET)
		P	7	RHA/P(ET)
	W	C	6	RHA/C(W)
		P	6	RHA/P(W)
RLA	ET	C	7	RLA/C(ET)
		P	7	RLA/P(ET)
	W	C	6	RLA/C(W)
		P	6	RLA/P(W)

Nota: RHA y RLA se refiere a cada una de las cepas de ratas que participaron en este estudio. En cada cepa la mitad de las ratas recibió un tratamiento distinto durante la fase de precambio de la tarea instrumental, bien porque todos los ensayos estuvieron reforzados (C), bien porque sólo la mitad de los ensayos fueron seguidos de la recompensa (P). ET se refiere a la condición de preferencia en la que los animales disponen de dos botellas, una de ellas con etanol y la otra con agua, y W representa la condición de preferencia en la que las dos botellas contienen agua. Inmediatamente antes de la prueba de preferencia las ratas habían realizado la prueba instrumental. Grupo se refiere a la nomenclatura de cada uno de los grupos que surgen de la combinación factorial de los factores Cepa, Preferencia y Reforzamiento, y N al número de animales en cada grupo.

Análisis estadísticos

Para las distintas variables dependientes registradas en cada una de las pruebas se realizaron análisis de varianzas (ANOVA) en las distintas fases atendiendo a los factores sesión, cepa (RHA vs. RLA), reforzamiento (C vs. P) y preferencia (ET vs. W). Finalmente, con el objetivo de analizar si las respuestas de frustración (latencia de respuesta) podrían estar relacionadas con los patrones de consumo de alcohol (preferencia) se calcularon los correspondientes coeficientes de correlación de Pearson para cada sesión. Para todos estos análisis se estableció un nivel de significación estadística de $p < 0.05$.

Resultados***Fase de entrenamiento o precambio (sesiones 1 a 10)***

Latencia de respuesta. El ANOVA cepa (RHA vs. RLA) x reforzamiento (C vs. P) x preferencia (ET vs. W) x sesión (10) mostró un efecto significativo de la variable sesión, $F(9, 396) = 151,796$, $p < 0,0001$, así como de la interacción sesión x preferencia, $F(9, 396) = 2,250$, $p < 0,01$, sesión x reforzamiento x cepa, $F(9, 396) = 2,378$, $p > 0,01$, sesión x

reforzamiento x preferencia, $F(9, 396) = 5\,088$, $p < 0,0001$, y sesión x reforzamiento x cepa x preferencia, $F(9, 396) = 3,907$, $p < 0,0001$.

Para analizar la fuente de esta cuádruple interacción se realizaron los análisis que se describen a continuación. En primer lugar se tomaron en cuenta los datos de cada cepa por separado. En el caso de la cepa RLA (véase parte superior de la Figura 26), el ANOVA sesión x reforzamiento x preferencia mostró un efecto significativo de la variable reforzamiento, $F(9, 198) = 67,591$, $p < 0,0001$, y de las interacciones sesión x preferencia, $F(9, 198) = 2,065$, $p < 0,034$, y sesión x preferencia x reforzamiento, $F(9, 198) = 6,644$, $p < 0,0001$. En relación con esta triple interacción, se analizaron por separado los datos referentes a la condición de agua y de preferencia, respectivamente. En la condición de agua se halló un efecto significativo del factor sesión, $F(9, 90) = 40,692$, $p < 0,0001$, así como una interacción significativa sesión x reforzamiento, $F(9, 90) = 6,503$, $p < 0,0001$. El análisis de esta interacción indicó que las diferencias entre las latencias de respuesta halladas en la condición de reforzamiento continuo vs. parcial aparecieron en las sesiones 1 y 3 [valor menor de $F(1, 10) = 4,96$, $p < 0,05$], siendo marginalmente significativas en las sesiones 9 ($F(1, 10) = 4,758$, $p < 0,054$) y 10 [$F(1, 10) = 4,447$, $p < 0,061$]. La inspección de la Figura 26 indica que en las primeras sesiones el grupo de reforzamiento continuo mostró una latencia de respuesta superior al de parcial, mientras que en las últimas sesiones la tendencia fue la opuesta. Por el contrario, en la condición de preferencia sólo se halló un efecto significativo de la variable reforzamiento, $F(9, 108) = 28,461$, $p < 0,0001$, observándose que, con independencia de la condición de reforzamiento, los valores de latencia a lo largo de las sesiones fueron reduciéndose progresivamente.

También en la cepa RLA se realizó el análisis separado de los datos obtenidos en las condiciones de reforzamiento continuo y parcial, respectivamente. En la condición de reforzamiento continuo se obtuvo un efecto principal de sesión, $F(9, 99) = 68,156$, $p < 0,0001$, así como una interacción significativa sesión x preferencia, $F(9, 99) = 8,072$, $p < 0,0001$, encontrándose diferencias entre la condición ET vs. W en las sesiones 1 y 2 [valor menor de $F(1, 11) = 6,591$, $p < 0,026$, la latencia de respuesta en el grupo ET fue menor que la mostrada por el grupo W]. Por su parte, en la condición de reforzamiento parcial apareció un efecto significativo de sesión, $F(9, 99) = 18,731$, y de la interacción sesión x preferencia, $F(9, 99) = 2,591$, $p < 0,01$. Sin embargo, el análisis de esta interacción no mostró diferencias significativas entre estas condiciones en ninguna de las sesiones analizadas.

Por lo que respecta a la cepa RHA (véase parte inferior de la Figura 26), el ANOVA sesión x reforzamiento x preferencia sólo arrojó un efecto significativo de la variable reforzamiento, $F(9, 198) = 93,046$, $p < 0,0001$ observándose una reducción progresiva en las latencias de respuesta registradas a lo largo de las sesiones.

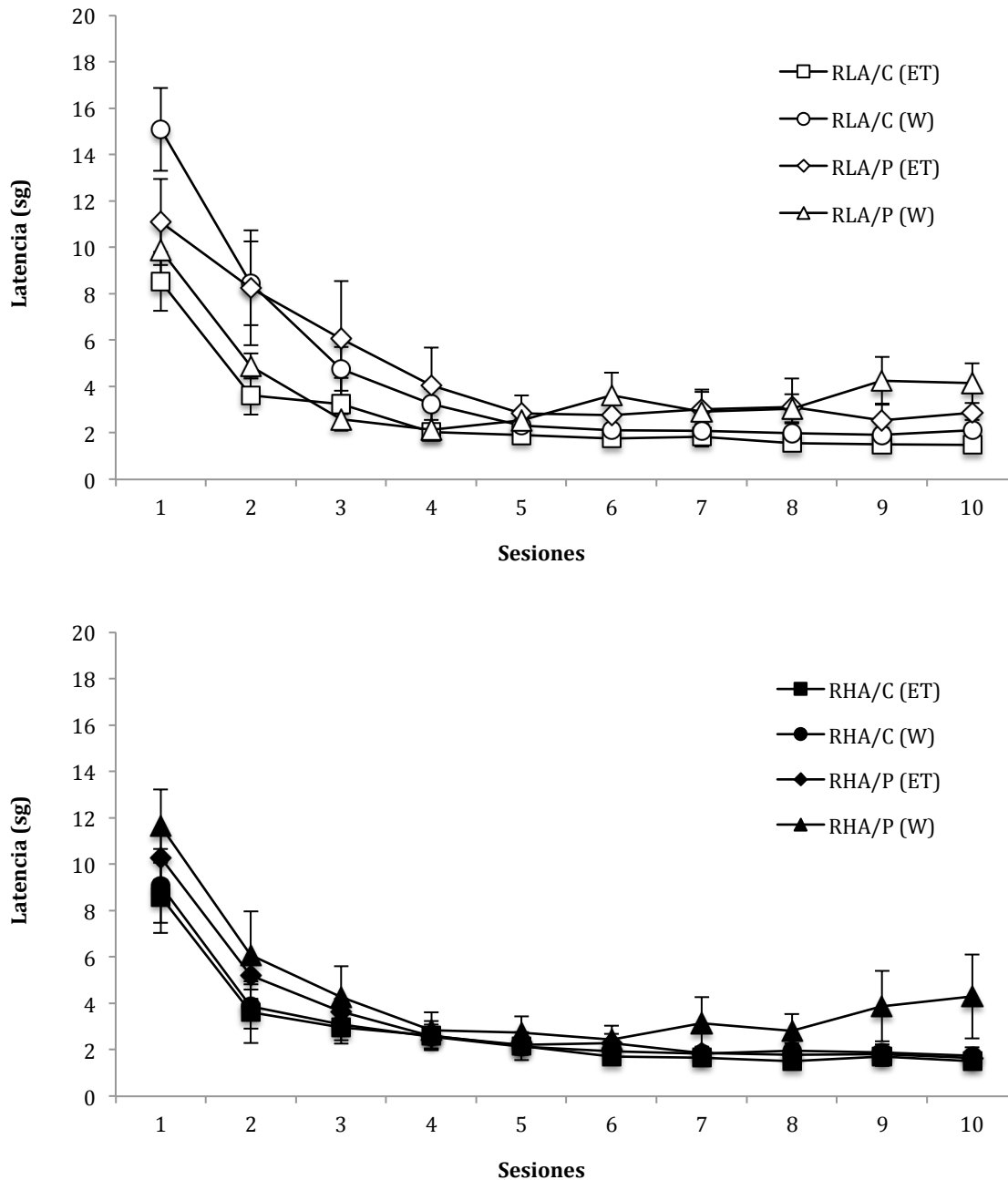


Figura 26. La parte superior de la Figura muestra la latencia promedio medida en segundos para los distintos grupos en la cepa de ratas RLA-I. La parte inferior de la Figura representa las latencias de respuestas en los distintos grupos de la cepa de ratas RHI. C y P se refieren a las modalidades de reforzamiento continuo y parcial, respectivamente, que tuvieron lugar durante la tarea instrumental. ET y W indican el contenido de las botellas durante la fase de interferencia, que podían contener una etanol y la otra agua, o bien las dos agua, respectivamente.

Por otro lado, para comparar las diferencias de cepa en latencia de respuesta se comparó a los grupos de reforzamiento continuo vs. parcial por separado. En la condición de reforzamiento continuo (véase parte superior de la Figura 27), se halló un efecto significativo de sesión, $F(9, 198) = 103,112$, $p < 0,0001$, así como de las interacciones cepa x sesión, $F(9, 198) = 4,213$, $p < 0,0001$, preferencia x sesión, $F(9, 198) = 4,655$, $p < 0,0001$ y cepa x preferencia x sesión, $F(9, 198) = 7,338$, $p < 0,0001$. El análisis de esta triple interacción mostró que, en la condición agua, apareció un efecto significativo del factor sesión, $F(9, 90) = 64,566$, $p < 0,0001$ y de la interacción cepa x sesión, $F(9, 90) = 7,057$, $p < 0,0001$. El análisis de esta interacción indicó que las diferencias de cepa aparecieron solo en las dos primeras sesiones [valor menor de $F(1, 10) = 4,998$, $p < 0,049$], siendo la latencia de respuesta superior en la cepa RLA en relación con la RHA. Por el contrario, en la condición de preferencia, sólo se obtuvo un efecto principal de la variable sesión, $F(9, 108) = 38,223$, $p < 0,0001$, observándose una reducción progresiva en la latencia de respuesta.

Por su parte, el análisis de los datos referentes a la condición de reforzamiento parcial (véase parte inferior de la Figura 27) arrojó un efecto significativo del factor sesión, $F(9,198) = 59,389$, $p < 0,0001$, y de la interacción reforzamiento x preferencia, $F(9,198) = 3,042$, $p < 0,002$. El estudio de esta interacción indicó que las diferencias entre los grupos expuestos a alcohol y a agua aparecieron sólo en la sesión 9, $F(1, 24) = 4,367$, $p < 0,047$.

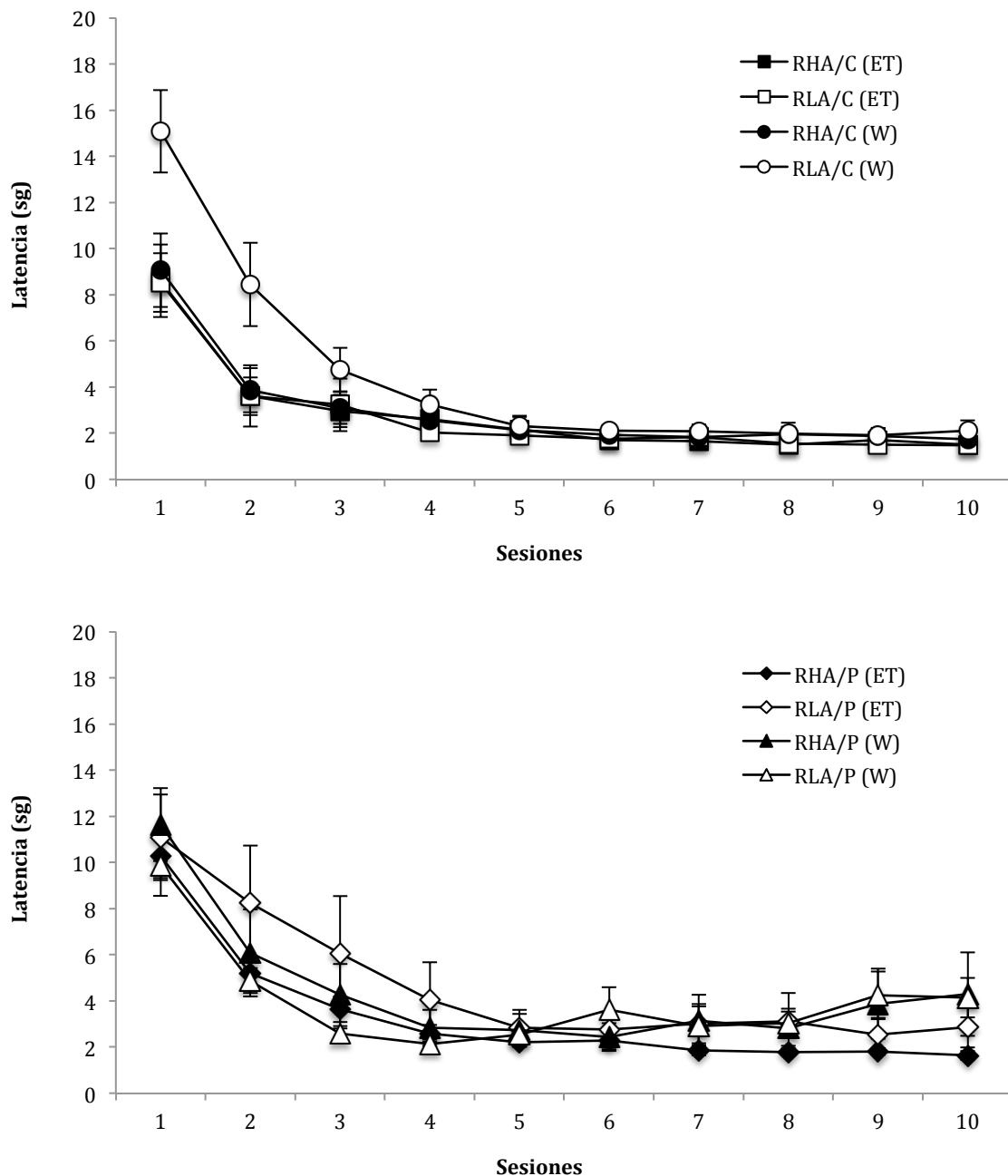


Figura 27. La parte superior de la Figura muestra la latencia promedio (en segundos) durante la fase de entrenamiento para los distintos grupos que recibieron reforzamiento continuo. La parte inferior de la Figura representa las latencias promedio en los distintos grupos que recibieron reforzamiento parcial. C y P se refieren a las modalidades de reforzamiento continuo y parcial, respectivamente. ET y W indican el contenido de las botellas durante la fase de interferencia, que podían contener una etanol y la otra agua, o bien las dos agua, respectivamente.

Finalmente, el análisis separado de las diferencias de cepa en las condiciones de E/W vs. W indicó que, en la condición de W (véase parte superior de la Figura 28), se obtuvo un efecto significativo de sesión, $F(9, 180) = 78,449$, $p < 0,0001$, así como de las interacciones reforzamiento x sesión, $F(1, 180) = 3,650$ y reforzamiento x cepa x sesión, $F(1, 180) = 5,225$, $p < 0,0001$. El análisis de esta triple interacción reveló que, en la condición de

reforzamiento continuo se obtuvo un efecto significativo del factor sesión, $F(9, 90) = 64,566$, $p < 0,0001$, y de la interacción cepa x sesión, $F(9, 90) = 7,057$, $p < 0,0001$, en la que se hallaron diferencias de cepa sólo en las sesiones 1 y 2 [valor menor de $F(1, 10) = 4,998$, $p < 0,049$]. En la condición de reforzamiento parcial sólo se obtuvo un efecto significativo de la variable sesión, $F(9, 90) = 25,277$, $p < 0,0001$, con una tendencia a que las latencias de respuesta fueran reduciéndose a lo largo de las sesiones, a excepción de las dos últimas.

Por su parte, en la condición de etanol (véase parte inferior de la Figura 28) se obtuvo un efecto significativo de sesión, $F(9, 216) = 74,181$, $p < 0,0001$, y de la interacción sesión x reforzamiento, $F(9, 126) = 2,220$, $p < 0,022$. El análisis de esta interacción indicó que las diferencias entre reforzamiento continuo y parcial aparecieron sólo en la sesión 2, $F(1, 26) = 4,325$, $p < 0,048$.

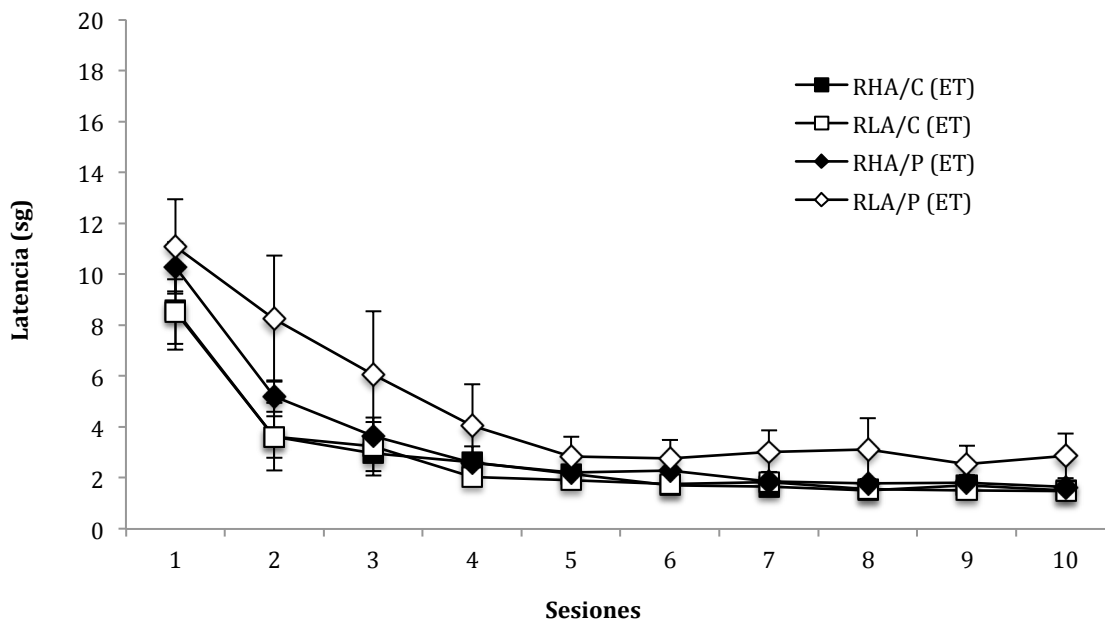
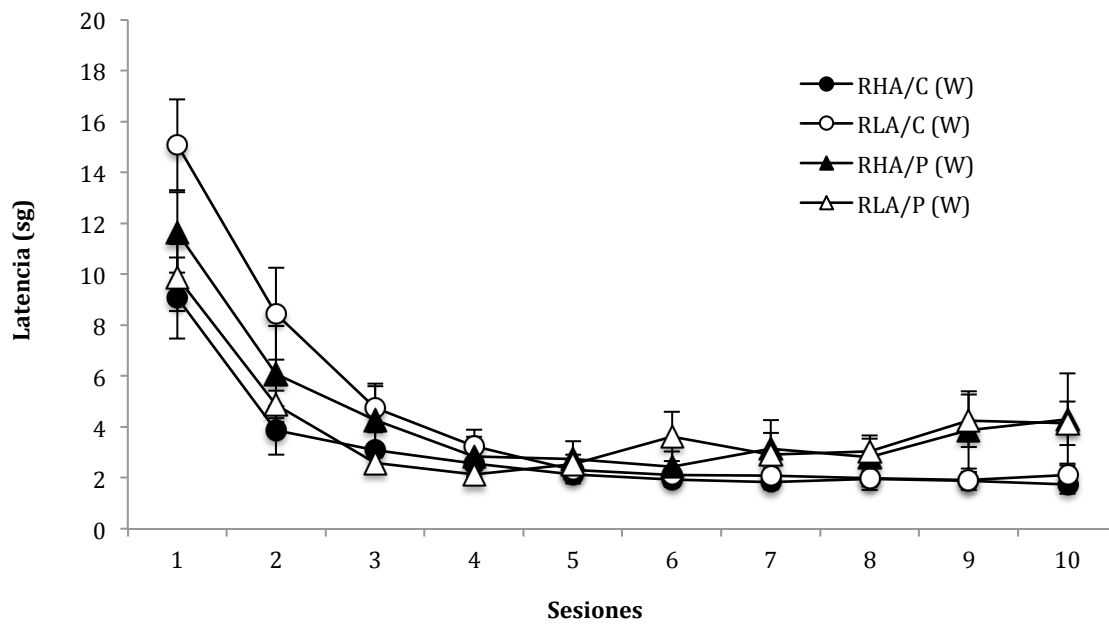


Figura 28. La parte superior de la figura muestra la latencia promedio (en segundos) durante la fase de entrenamiento para los distintos grupos que recibieron sólo agua durante en la tarea de preferencia. La parte inferior de la figura representa las latencias promedio en los distintos grupos que fueron expuestas a dos botellas, una con agua y la otra con etanol durante la prueba de preferencia. C y P se refieren a las modalidades de reforzamiento continuo y parcial, respectivamente.

Preferencia por alcohol. El ANOVA cepa (RHA vs. RLA) x reforzamiento (C vs. P) x sesión (10) realizado con los datos de la condición ET del factor preferencia durante la fase de entrenamiento arrojó un efecto significativo de las variables sesión, $F(9, 216) = 7,486$, $p < 0,0001$ y reforzamiento, $F(1, 24) = 8,801$, $p < 0,001$, así como de la interacción reforzamiento x sesión, $F(9, 216) = 3,075$, $p < 0,002$. El análisis de esta interacción indicó que los animales pertenecientes a la condición de reforzamiento continuo mostraron una

mayor preferencia por alcohol que los sometidos a reforzamiento parcial en las sesiones 2, 4, 6, 7, 8, 9, y 10 (valor menor de $F(1, 26) = 4,971, p < 0,035$). Estas diferencias aparecieron con independencia de la cepa (véase Figura 29).

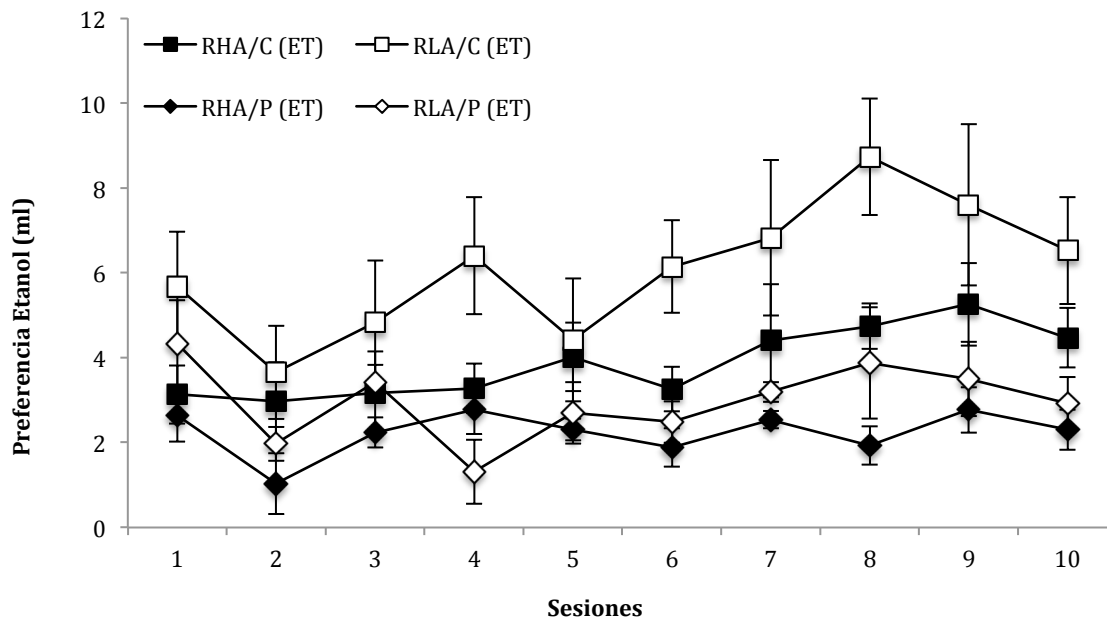


Figura 29. Preferencia promedio por el etanol (en mililitros) registrada durante la fase de entrenamiento en las dos cepas de ratas (RHA y RLA) bajo las condiciones de reforzamiento continuo (C) y de reforzamiento parcial (P).

Fase de extinción o postcambio (sesiones 11 a 19)

Latencia de respuesta. El ANOVA cepa (RHA vs. RLA) x reforzamiento (C vs. P) x preferencia (ET vs. W) x sesión (9) mostró un efecto significativo de los factores sesión, $F(8,352) = 88,691, p < 0,0001$, cepa, $F(1,44) = 8,703, p < 0,005$, reforzamiento, $F(1,44) = 9,874, p < 0,003$ y preferencia, $F(1,44) = 8,394, p < 0,006$. También fueron significativas las interacciones reforzamiento x sesión, $F(8,352) = 8,857, p < 0,0001$, y sesión x preferencia, $F(8,352) = 5,707, p < 0,0001$. El análisis de la interacción reforzamiento x sesión indicó que el grupo de reforzamiento continuo mostró una latencia de respuesta superior a la mostrada por el grupo de reforzamiento parcial en las sesiones 2, 3, 4, 5, 6 y 7 [valor menor de $F(1, 50) = 6,250, p < 0,016$]. En relación con la interacción preferencia x sesión, los análisis estadísticos realizados indicaron que el grupo que tuvo acceso a etanol después de cada sesión mostró una latencia de respuesta inferior a la mostrada por el grupo expuesto

sólo a agua en las sesiones 1, 2, 3 y 4 [valor menor de $F(1, 50) = 4,216, p < 0,045$]. Estas diferencias aparecieron con independencia de la cepa.

Como se puede observar en la Figura 30 estos resultados indican: (a) que la cepa RLA mostró una latencia de respuesta superior a la cepa RHA; (b) que se obtuvo un ERPE en las sesiones 2 a la 7, y que este fenómeno no dependió de la cepa, (c) que el acceso a etanol después de cada sesión aumentó la resistencia a la extinción cuando las latencias de respuesta de este grupo fueron comparadas con las mostradas por el grupo expuesto a agua, al menos en las primeras 4 sesiones de extinción (véase parte superior e inferior de la Figura 30). La inspección de esta figura sugiere, además, que el ERPE apareció en la cepa RLA-I, pero no en la RHA-I, cuando los animales recibieron sólo agua en la prueba de preferencia (parte superior de la Figura 30), mientras que dicho fenómeno de resistencia a la extinción se observó en ambas cepas cuando éstas recibieron alcohol en la prueba de preferencia posterior (parte inferior de la Figura 30).

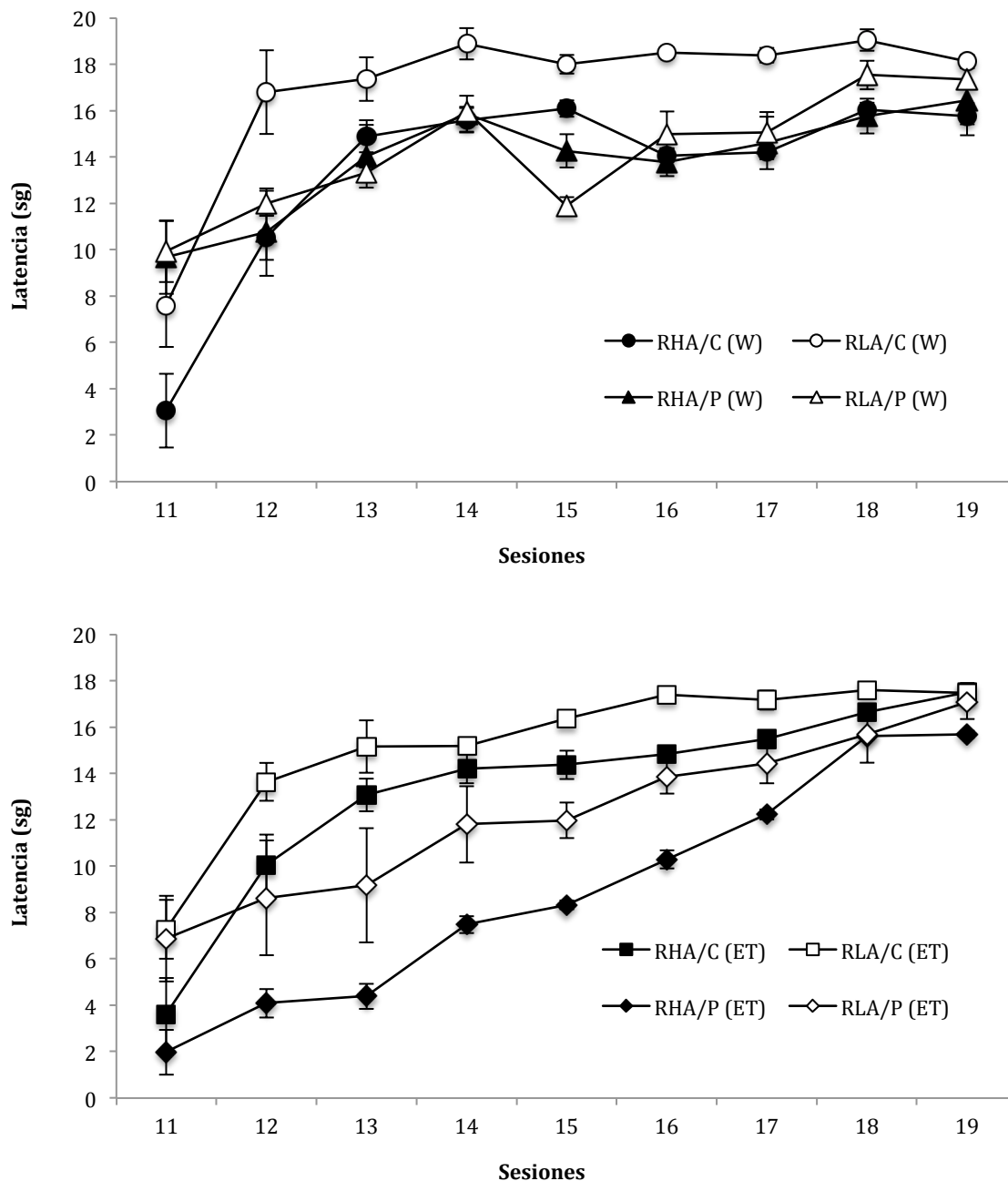


Figura 30. Latencia de respuesta promedio registrada durante la fase de extinción en los grupos que recibieron solo agua en la prueba de preferencia (parte superior de la Figura) o etanol y agua (parte inferior de la Figura). C y P se refieren a las modalidades de reforzamiento continuo y parcial, respectivamente. ET y W indican el contenido de las botellas durante la fase de interferencia, que podían contener una etanol y la otra agua, o bien las dos agua, respectivamente.

Preferencia por alcohol. El ANOVA cepa (RHA vs. RLA) x reforzamiento (C vs. P) x sesión (9) realizado con los datos de la condición ET del factor preferencia durante la fase de extinción arrojó un efecto significativo de los factores sesión, $F(8, 192) =$, $p < 0,0001$, cepa, $F(1, 24) = 5,996$, $p < 0,022$, y reforzamiento, $F(1, 24) = 19,822$, $p < 0,0001$ así como de la interacción reforzamiento x cepa, $F(1, 24) = 6,861$, $p < 0,015$. El análisis de esta interacción indicó que, en la condición de reforzamiento continuo (véase parte superior de la

Figura 31), la cepa RLA mostró una preferencia mayor al etanol que la mostrada por la cepa RHA, $F(1,12) = 10,213$, $p < 0,008$. Por el contrario, en la condición de reforzamiento parcial (véase parte inferior de la Figura 31) no se hallaron diferencias significativas entre las cepas, $F(1, 12) = 0,020$.

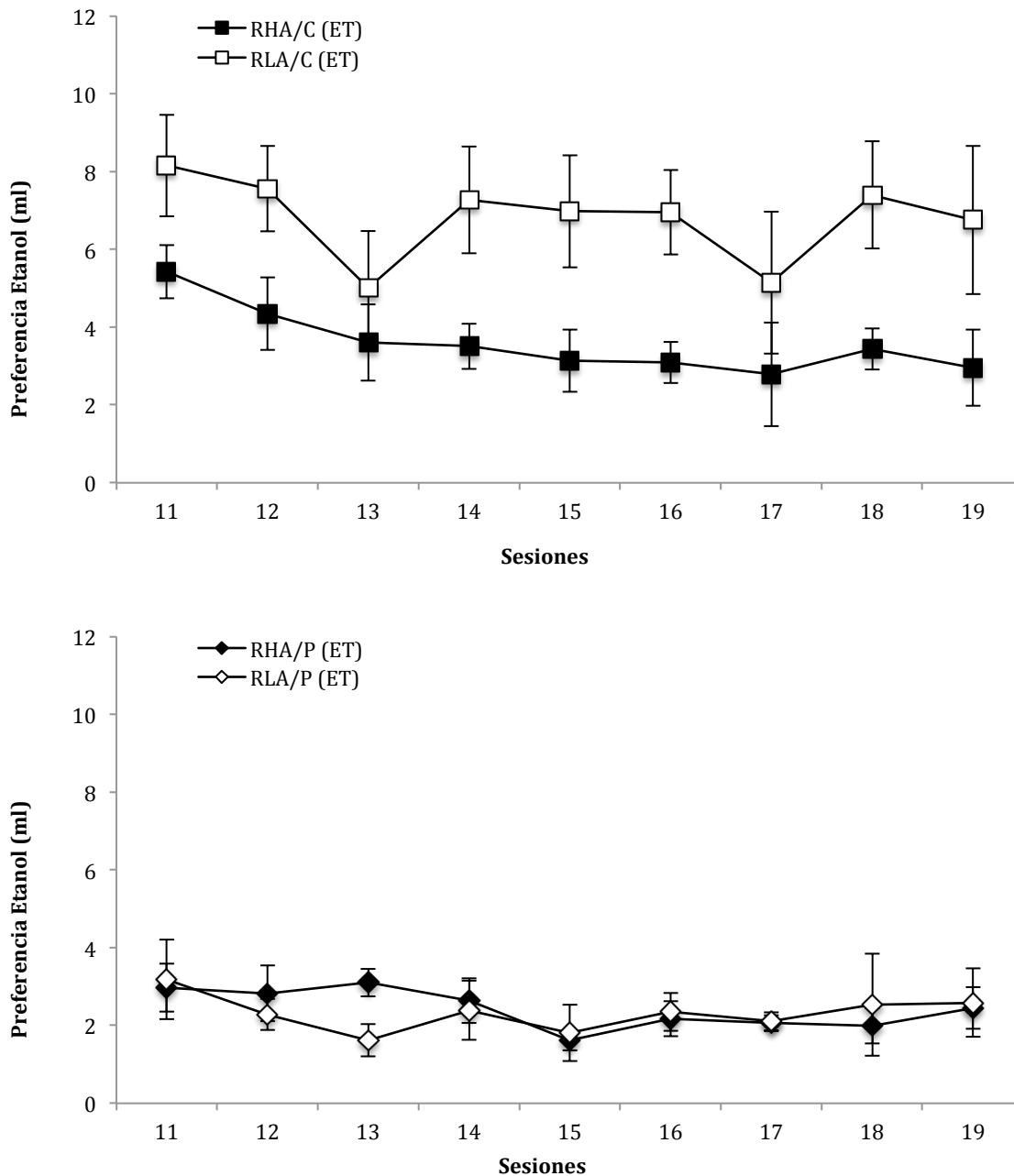


Figura 31. Preferencia promedio por el etanol (en mililitros) registrada durante la fase de extinción en las dos cepas de ratas (RHA y RLA) bajo las condiciones de reforzamiento continuo (C, parte superior de la Figura) y de reforzamiento parcial (P, parte inferior de la Figura).

Correlaciones entre latencia de respuesta y preferencia por alcohol

La relación entre las medidas de latencia de respuesta y preferencia por etanol se realizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson en cada sesión. En la fase de entrenamiento no aparecieron correlaciones significativas en ninguna de las sesiones. Por el contrario, en la fase de extinción se obtuvieron correlaciones significativas de signo positivo en las sesiones 2, 3, 4, 5, 6 y 8, lo que sugiere que aquellos animales que estuvieron más frustrados fueron aquellos que consumieron más alcohol (véase la Tabla 7).

Tabla 7.

<i>Coefficiente de correlación de Pearson</i>	
Latencia2 y Preferencia2	,437(*)
Latencia3 y Preferencia3	,380(*)
Latencia4 y Preferencia4	,460(*)
Latencia5 y Preferencia5	,493(*)
Latencia6 y Preferencia6	,416(*)
Latencia8 y Preferencia8	,504(*)

*Nota:** La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Discusión

El presente trabajo de investigación se realizó con el objetivo de analizar el impacto de una experiencia en omisión de recompensa (extinción instrumental) sobre el consumo voluntario de etanol (2%) en ratas RHA-I vs. RLA-I, tratando de averiguar si dicho impacto depende de las características genéticas de los animales, así como de la experiencia previa en reforzamiento continuo vs. parcial (ERPE). Los resultados indicaron que las ratas más reactivas emocionalmente (RLA-I) consumieron más alcohol que las menos reactivas (RHA-I) durante la fase de extinción cuando dicha fase estuvo precedida por una fase de adquisición con reforzamiento continuo. Por el contrario, cuando los animales fueron frustrados repetidamente durante la fase de adquisición (reforzamiento parcial) no aparecieron diferencias significativas en preferencia por etanol durante la extinción. Al mismo tiempo, se comprobó que el acceso a etanol inmediatamente después de la tarea instrumental tuvo un efecto importante sobre la ejecución de los animales, dado que aumentó la resistencia a la extinción en relación con los grupos que recibieron solo agua en

la prueba de preferencia. Finalmente, las latencias de respuesta registradas durante la fase de extinción correlacionaron positiva y significativamente con los patrones de preferencia por etanol, un hallazgo que pone en relación la reactividad individual a la frustración con el consumo voluntario de alcohol. Estos resultados pueden discutirse en el marco de las teorías, hipótesis y predicciones que han guiado la realización del presente experimento.

En primer lugar, los resultados obtenidos con relación a la latencia de respuesta confirman parcialmente nuestra hipótesis de partida, dado que, de acuerdo con estudios previos, se esperaba encontrar un ERPE en la cepa RLA-I, pero no en la RHA-I (Gómez *et al.*, 2008). Sin embargo, en el presente experimento se observó que los animales que recibieron reforzamiento continuo durante la fase de adquisición extinguieron más rápidamente su respuesta que aquellos que fueron reforzados parcialmente, y que este fenómeno de aumento en la resistencia a la extinción en los últimos se observó tanto en la cepa RHA-I como en la RLA-I. No obstante, la observación de la Figura 30 parece indicar que la ausencia de diferencias de cepa en relación con el ERPE podría deberse al efecto que tuvo el alcohol sobre la ejecución instrumental, dado que en los animales que recibieron solo agua sí que se apreciaron diferencias en la ejecución en la dirección prevista: un aumento en la resistencia a la extinción en el grupo RLA-I de reforzamiento parcial en comparación con el grupo RLA-I de reforzamiento continuo, y ausencia de diferencias entre los grupos RHA-I y RHA-I continuo vs. parcial (Figura 30, parte superior). Por el contrario, en los grupos que tuvieron acceso a etanol se observó el ERPE en ambas cepas (Figura 30, parte inferior). Este resultado es difícil de explicar, dado que a menudo se observa que las propiedades ansiolíticas que tiene el etanol tienden a anular fenómenos de persistencia comportamental como el ERPE (Gray, 1987), en una línea similar a lo observado con otros fármacos ansiolíticos como las benzodiazepinas (Pellegrini *et al.*, 2004). No obstante, en estos experimentos se suele utilizar una administración forzada que es previa a la prueba comportamental de frustración, mientras que en nuestro caso los animales tuvieron acceso al etanol inmediatamente después de la sesión instrumental, pudiendo consumir o no la droga de forma voluntaria. En este sentido, se podría argumentar que, tras varias sesiones de entrenamiento, los animales podrían haber aprendido a anticipar durante la prueba instrumental el acceso posterior a una sustancia con importantes propiedades reforzantes y ansiolíticas. Esta anticipación de un potente reforzador pudo atenuar (de modo comparable al observado en paradigmas de contraste anticipatorio; Flaherty, 1996) el impacto de la manipulación experimental realizada durante la fase de extinción (omisión del reforzador), manteniendo la respuesta instrumental con independencia de la cepa y de que los grupos

hubieran recibido previamente refuerzo continuo o parcial. En cualquier caso, estos resultados constituyen un hallazgo novedoso cuya consistencia e implicaciones teóricas deberán analizarse en estudios futuros.

Del mismo modo, los resultados referentes al consumo de etanol también confirman sólo parcialmente nuestras predicciones, dado que durante la fase de adquisición no se obtuvieron diferencias de consumo relevantes entre los grupos sometidos a reforzamiento parcial vs. reforzamiento continuo. Más relevantes para los objetivos del presente experimento son, sin embargo, los datos referentes a la preferencia por el alcohol que se registraron durante la fase de extinción. Así, se comprobó que los animales más emocionales (RLA-I) mostraron mayor preferencia por el alcohol que los menos emocionales (RHA-I) durante la fase de extinción cuando en la fase de adquisición habían recibido reforzamiento continuo, mientras que no se hallaron diferencias en condiciones de entrenamiento en reforzamiento parcial. Estos resultados pueden discutirse en el marco de las hipótesis desarrolladas para dar cuenta del fenómeno del ERPE, entre las cuales destaca la propuesta por Amsel (1992). Según esta teoría, el aumento de la resistencia a la extinción que se observa tras una experiencia con reforzamiento parcial se debe a que el animal aprende a continuar respondiendo bajo un estado de frustración. Esta teoría asume que durante los ensayos iniciales el animal desarrolla una expectativa de reforzamiento al final del laberinto en los ensayos reforzados. Una vez que esta expectativa de reforzamiento ha tenido lugar, la ausencia de reforzamiento generaría la aparición de un estado emocional de frustración. Tras repetidas experiencias de frustración se desarrollaría simultáneamente una expectativa de no reforzamiento (o de frustración anticipatoria) y de reforzamiento cuando los animales alcanzan el compartimento meta, generando un estado de conflicto en el sujeto que oscilaría entre dar la respuesta de aproximación o la de retirada del compartimento meta. Dado que la respuesta de aproximación acaba siendo reforzada en algunos ensayos, tanto la expectativa de reforzamiento como la expectativa de frustración actuarían como estímulos discriminativos que facilitarían la ejecución de la respuesta de aproximación, provocando así la persistencia comportamental que se observa durante la fase de extinción. Por lo tanto, los animales sometidos a una experiencia de reforzamiento parcial tienden a mantener la respuesta de aproximación a causa de este mecanismo de contracondicionamiento de la frustración anticipatoria (Amsel, 1992).

La idea de que el ERPE puede considerarse un efecto de aprendizaje paradójico basado en mecanismos emocionales ha sido apoyada por una amplia evidencia experimental. En primer lugar, la experiencia previa con un programa de reforzamiento parcial puede

aumentar la resistencia comportamental en otras situaciones relacionadas con pérdida de recompensa, como el CSN, un efecto que puede atenuarse por medio de la administración de un ansiolítico como el clordiazepóxido. En segundo lugar, se ha encontrado en repetidas ocasiones que las lesiones en el sistema septohipocampal, un circuito cerebral que regula las emociones de miedo/ansiedad, abolen el ERPE. Finalmente, la administración crónica de ansiolíticos gabaérgicos en la fase de entrenamiento y extinción reduce la resistencia a la extinción en sujetos que han sido sometidos a un programa de reforzamiento parcial, aboliendo el ERPE en procedimientos de ensayos espaciados (véase Gómez *et al.*, 2008, para revisión). Los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían discutirse en este marco teórico. Así, el hecho de que la cepa más ansiosa (RLA-I) consumiera más alcohol que la menos ansiosa (RHA-I) bajo condiciones de reforzamiento continuo, se explicaría por la reacción emocional más acentuada que tendría la omisión inesperada de un reforzador en aquellos animales más susceptibles ante este tipo de experiencias negativas. Por el contrario, cuando los animales tienen una experiencia repetida de omisión de recompensa (reforzamiento parcial) aprenden a persistir en su respuesta y se vuelven más tolerantes a la frustración. Ello explicaría la ausencia de diferencias de cepa en consumo de alcohol en esta condición experimental de refuerzo parcial. En este sentido, el hecho de que se encontraran correlaciones positivas entre la latencia de respuesta y los valores de preferencia por el alcohol en la fase de extinción parece poner en relación directa la respuesta individual a experiencias de pérdida con la tendencia posterior a consumir alcohol de forma voluntaria.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo pueden ponerse en relación con estudios previos que han analizado la influencia de experiencias negativas de omisión de recompensa sobre conductas asociadas con el alcohol (incluyendo lo hallado en el Estudio 5 de esta Tesis Doctoral). En este sentido, Kamenetzky (2008a) analizó el efecto de la disminución sorpresiva del refuerzo sobre la búsqueda de claves asociadas con el etanol, observando que los animales frustrados permanecieron más tiempo en el lugar asociado con el alcohol que los controles inyectados con salino. Aunque en este estudio no se evaluó directamente el consumo voluntario de alcohol en los animales sometidos a la experiencia de devaluación de la recompensa, sus resultados ponen en evidencia una posible relación entre estrés inducido por pérdida y alcohol, una relación que se ha puesto de manifiesto en el presente experimento. Por todo ello, puede concluirse que los paradigmas de pérdida de recompensa constituyen una aproximación experimental de gran utilidad para analizar las relaciones entre estrés y consumo de drogas de abuso, así como el modo en que dichas relaciones están moduladas por factores genéticos.

DISCUSIÓN GENERAL

El consumo de distintos tipos de drogas ha sido una constante observada desde la Antigüedad en numerosos pueblos y culturas. Sin embargo, el fenómeno de la drogadicción sólo ha alcanzado una extraordinaria importancia en las últimas décadas, debido a las graves consecuencias sociales y sanitarias que se derivan del mismo. Esta expansión se encuentra enmarcada en las propias características de la sociedad industrial y de consumo. En los últimos siglos el hombre ha pasado de recolectar y consumir las plantas silvestres con distintos fines, a obtener y estudiar sus principios activos, purificarlos, modificar sus estructuras químicas y sintetizar en el laboratorio moléculas afines con el propósito de crear componentes de mayor acción psicoactiva. De este modo, la progresiva manipulación galénica ha supuesto la masificación del consumo de estas sustancias, perdiéndose todo el halo mágico-religioso que durante decenas de siglos las acompañó y mantenía su ingesta restringida a ciertas personas y situaciones (Escohotado, 1999). En la actualidad nos encontramos con que en la mayoría de los países conviven drogas aceptadas a nivel social, junto a otras cuyo consumo está sancionado. En España, por ejemplo, existe un elevado número de personas adictas a drogas ilícitas, si bien es cierto que el número es aún mayor en el caso de las drogas lícitas, como el tabaco y el alcohol. Estas consideraciones ponen de manifiesto la magnitud del fenómeno adictivo y la necesidad de avanzar en el conocimiento de las causas, las consecuencias, la prevención y el tratamiento de las drogodependencias.

El estudio científico de la conducta adictiva tiene en la aproximación psicobiológica uno de sus pilares fundamentales. La psicobiología es una ciencia multidisciplinar interesada en el estudio de las bases biológicas de la conducta, tanto normal como patológica. El carácter científico de la psicobiología determina que esta disciplina comparta con otras ciencias biológicas el empleo de animales como sujetos de experimentación, una práctica que ha estado tradicionalmente apoyada en los cimientos aportados por la teoría de la evolución. En efecto, el conocimiento actual de las acciones de las drogas de abuso sobre el sistema nervioso central y la conducta ha sido posible merced al desarrollo de preparaciones experimentales capaces de reproducir en el laboratorio los componentes esenciales de la drogadicción humana. Al mismo tiempo, las limitaciones éticas propias de la investigación con seres humanos han orientado a escoger animales con sistemas nerviosos similares al humano, y a tratar de establecer paralelismos entre los resultados obtenidos en el laboratorio y los conocimientos sobre funcionamiento cerebral humano y su conducta. En condiciones

experimentales adecuadas es posible controlar muchos factores que afectan a la conducta adictiva, como la genética, las experiencias tempranas, el ambiente inmediato, los antecedentes de consumo, la historia conductual del sujeto, etc., unos factores difícilmente controlables fuera del contexto de la experimentación animal. En definitiva, la posibilidad de realizar descripciones objetivas de la conducta, y de controlar de forma precisa las condiciones que hacen posible la aparición de la respuesta en estudio, constituyen las razones principales que explican la amplia aceptación de los modelos animales en el ámbito de estudio de la conducta en general (Metha y Gosling, 2006) y de las adicciones en particular (LeMoal y Koob, 2007). Los trabajos presentados en la presente Tesis Doctoral pueden encuadrarse en este marco teórico, dado que constituyen un intento de identificar algunos de los factores de riesgo que determinan el consumo de alcohol desde un punto de vista psicobiológico. En concreto, se analizó la influencia del rasgo conductual de búsqueda de novedad y de la reactividad emocional ante situaciones de frustración sobre el consumo espontáneo de alcohol, utilizando ratas Romanas consanguíneas de Alta (RHA-I) y Baja Evitación (RLA-I). Los resultados obtenidos se resumen brevemente a continuación.

En primer lugar, se establecieron las condiciones experimentales idóneas para detectar diferencias en consumo voluntario de etanol en las ratas Romanas consanguíneas RHA-I y RLA-I. Para ello se analizaron los patrones de consumo espontáneo y de preferencia por el alcohol en estos animales mediante un procedimiento de aclimatación basado en el aumento progresivo de las concentraciones de etanol utilizadas (2, 4, 6, 8 y 10%), comparando dichos patrones de consumo con los observados tras presentar una única dosis de alcohol al 10% (sin aclimatación). Los resultados obtenidos indicaron la existencia de diferencias de cepa en consumo voluntario de alcohol que dependieron de la dosis y de la variable dependiente utilizada, aunque no de la presencia o ausencia del procedimiento de aclimatación. Estos hallazgos amplían la caracterización fenotípica de estos animales en relación con el consumo de alcohol y permiten utilizarlos como modelo animal en el estudio de las bases psicogenéticas de esta conducta.

En segundo lugar, se realizó un estudio dirigido a validar las pruebas comportamentales utilizadas para analizar el rasgo conductual de búsqueda de novedad, un rasgo repetidamente asociado con la conducta adictiva y que es divergente en las ratas Romanas (Driscoll *et al.*, 2009). En concreto, se trató de comprobar si las respuestas registradas en dichas pruebas son estables entre individuos y nos pueden aportar información sobre su validez. En concreto, se seleccionó como test de referencia el HB, comparando la ejecución de los animales (ratas Wistar) en este test basado en exposición

forzada a la novedad con la observada en dos pruebas basadas en elección libre: el laberinto en Y y la prueba de emergencia. Los resultados obtenidos indicaron que los animales que mostraron más conductas exploratorias relacionadas con novedad en el HB (i.e., *head dipping*) fueron aquellos que visitaron con más frecuencia el brazo novedoso del laberinto en Y, y una mayor tendencia a visitar el compartimento iluminado en la Prueba de Emergencia. Estos resultados parecen poner de manifiesto la utilidad de las pruebas comportamentales empleadas en este estudio para analizar experimentalmente el rasgo conductual de búsqueda de novedad.

En tercer lugar, se realizó un experimento que tuvo como objetivo principal analizar el comportamiento de las ratas RHA-I y RLA-I en las pruebas de novedad previamente comentadas (HB, laberinto en Y y test de emergencia), y relacionar su ejecución con los patrones de consumo voluntario de etanol registrados mediante un procedimiento de elección agua/alcohol basado en la presentación de dosis crecientes de esta droga (2, 4, 6, 8 y 10%). Los resultados indicaron que, en comparación con la cepa RLA-I, la cepa RHA-I mostró más conductas relacionadas con la exploración activa de ambientes novedosos, tanto en condiciones de exposición forzada como de elección libre. Así, en el HB estos animales mostraron una mayor frecuencia y duración de *head-dippings*, así como un mayor número de cruces, mientras que en el laberinto en Y estos animales permanecieron más tiempo y visitaron con más frecuencia el brazo novedoso. En la prueba de emergencia, sin embargo, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas. Asimismo, en la prueba de consumo voluntario de etanol se comprobó que con todas las dosis utilizadas las ratas RHA-I presentaron valores de preferencia por la sustancia superiores a los registrados en la cepa RLA-I, hallándose correlaciones significativas entre estos valores y algunas medidas de búsqueda de novedad, como el número de *head-dippings* (con respecto a la dosis del 10%), y la frecuencia y tiempo de estancia en el brazo abierto del laberinto en Y (en relación con las dosis del 6% y el 8%). Estos hallazgos sugieren que las ratas RHA-I y RLA-I constituyen un modelo animal que puede ser de utilidad para analizar el rasgo comportamental de búsqueda de novedad y su relación con el consumo/preferencia por alcohol.

Finalmente, se analizó si el impacto de experiencias ambientales negativas sobre el consumo de alcohol está modulado por influencias genéticas. En concreto, se estudió si la exposición de los animales a situaciones de pérdida/frustración puede constituir una experiencia estresante que aumente el consumo de alcohol y, sobre todo, si este efecto depende de las diferencias en reactividad emocional que muestran las ratas RHA-I y RLA-I.

Para ello se realizaron tres experimentos. En el primero de ellos se trató de averiguar si el paradigma de CSN instrumental apetitivo puede ser adecuado como experiencia frustrante capaz de influir en el consumo voluntario de etanol, llevando a cabo un estudio piloto con ratas Wistar expuestas a la reducción inesperada en la magnitud de la recompensa presentada en la caja meta de un laberinto recto (12 *pellets*-2 *pellets*). Los resultados indicaron que esta reducción produjo un deterioro en la ejecución de los animales sometidos a la misma, cuando su ejecución fue comparada con la mostrada por un grupo control que recibió 2 *pellets* durante todo el entrenamiento. Sin embargo, los resultados no fueron concluyentes ni demostraron que esta devaluación en la magnitud de la recompensa (al menos en las condiciones utilizadas en este estudio) provocara un aumento claro en el consumo de alcohol.

En el segundo experimento, las ratas RHA-I y RLA-I fueron expuestas a una situación frustrante de extinción consumatoria (en la que recibieron soluciones de agua tras haber recibido previamente soluciones de sacarosa al 22%), teniendo acceso después a alcohol (2%) en una prueba de preferencia. Los resultados indicaron que en la prueba consumatoria ambas cepas consumieron la misma cantidad de sacarosa durante la fase de adquisición, con independencia de que los animales tuvieran acceso a agua (W) o a alcohol (ET) en la prueba de preferencia posterior. En la fase de extinción no se observaron diferencias significativas entre los grupos, indicando que todos ellos extinguieron la conducta de consumo de un modo similar. Por lo que respecta al consumo de alcohol, se comprobó que en la fase de adquisición ambas cepas obtuvieron valores de consumo similares, mientras que inmediatamente después de la omisión del reforzador la cepa más reactiva emocionalmente (RLA-I) consumió más alcohol que la menos reactiva (RHA-I).

Por último, en el tercer experimento de esta última fase las ratas RHA-I y RLA-I fueron expuestas a una tarea instrumental en la que se omitió el reforzador -12 *pellets*- (extinción), después de haber sido presentado de forma continua o parcial (efecto del reforzamiento parcial sobre la resistencia a la extinción; PREE), presentándoles alcohol inmediatamente después de esta experiencia. Los resultados indicaron que las ratas más reactivas emocionalmente (RLA-I) consumieron más alcohol que las menos reactivas (RHA-I) durante la fase de extinción cuando dicha fase estuvo precedida por una fase de adquisición con reforzamiento continuo. Por el contrario, cuando los animales fueron frustrados repetidamente durante la fase de adquisición (reforzamiento parcial) no aparecieron diferencias significativas en preferencia por etanol durante la extinción entre las cepas. Al mismo tiempo, se comprobó que el acceso a etanol inmediatamente después de la

tarea instrumental tuvo un efecto importante sobre la ejecución de los animales, dado que aumentó la resistencia a la extinción en relación con los grupos que recibieron solo agua en la prueba de preferencia. Finalmente, las latencias de respuesta registradas durante la fase de extinción correlacionaron positiva y significativamente con los patrones de preferencia por etanol, un hallazgo que pone en relación la reactividad individual a la frustración con el consumo voluntario de alcohol. En su conjunto, estos resultados sugieren que ciertas experiencias ambientales estresantes vinculadas con experiencias de pérdida pueden constituir factores precipitantes en el consumo de sustancias adictivas en individuos genética y temperamentamente vulnerables, poniendo de manifiesto la complejidad del fenómeno adictivo.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral pueden discutirse en el marco de las teorías, hipótesis y predicciones que han guiado su realización.

En primer lugar, numerosas evidencias clínicas y experimentales sugieren que la adicción en general, y el alcoholismo en particular, son trastornos conductuales con una clara determinación genética. Así, existe una gran variabilidad entre los individuos en relación con sus tasas de preferencia por el alcohol, y estas diferencias pueden determinar su susceptibilidad a desarrollar patrones anormales de consumo (Crabbe *et al.*, 1994; Lovinger y Crabbe, 2005). Esta observación ha permitido desarrollar, mediante un procedimiento de selección psicogenética, pares de cepas de animales caracterizados por diferencias extremas en sus niveles de consumo voluntario de etanol (Ellenbroek *et al.*, 2005). Las ratas RHA-I y RLA-I constituyen un ejemplo de estas cepas de animales, mostrando claras diferencias en sus patrones de preferencia por esta droga, así como en su tendencia a autoadministrarse otras sustancias de abuso (Giorgi *et al.*, 2007). En concreto, las ratas RHA/Verh consumen cantidades de etanol y presentan tasas de preferencia por esta sustancia significativamente superiores a las mostradas por las ratas RLA-I/Verh, tanto cuando se utiliza una dosis única de la droga (10%) como cuando se emplean procedimientos de aclimatación con dosis progresivamente crecientes (Fernández-Teruel, Driscoll *et al.*, 2002; Giorgi *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos en el presente experimento extienden estos hallazgos a la variedad consanguínea de las ratas Romanas (RHA-I y RLA-I), si bien en nuestro estudio las diferencias de cepa en consumo y preferencia por alcohol dependieron de la dosis de etanol y de la variable dependiente utilizada. Además, el empleo de un rango de dosis extenso como el utilizado en este experimento permitió conocer con más detalle este perfil comportamental, posibilitando el análisis de sus bases neurobiológicas y genéticas. En este sentido, los estudios futuros deberán poner en relación estos datos conductuales con las

divergencias funcionales existentes entre las cepas en relación con sus circuitos de recompensa (Giorgi *et al.*, 2007), así como con la expresión diferencial de genes vinculados con la conducta adictiva (Blázquez *et al.*, 2012; Fernández-Teruel, Driscoll *et al.*, 2002; Sabariego *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2005b).

En segundo lugar, la presente Tesis Doctoral persiguió explorar las relaciones entre estos patrones diferenciales de consumo de etanol y la tendencia espontánea de las ratas Romanas a explorar más (RHA-I) o menos (RLA-I) los ambientes novedosos. Este interés deriva de la evidencia experimental indicativa de una estrecha relación entre estos dos rasgos comportamentales en diversas cepas de animales y en el ser humano (Ballaz, 2009; Kabbaj y Akil, 2001; Pawlak *et al.*, 2008; Piazza *et al.*, 1990). Así, el Estudio 3 permitió caracterizar de forma precisa a las ratas Romanas en relación con su conducta de búsqueda de novedad, al utilizar pruebas de laboratorio basadas tanto en elección libre como en elección forzada. La obtención de correlaciones significativas entre las respuestas exploratorias dirigidas a ambientes novedosos y los valores de consumo y preferencia por etanol refuerzan las hipótesis que ponen en relación estos dos rasgos comportamentales, y ponen de manifiesto, una vez más, la utilidad de las ratas Romanas para identificar algunos de los factores de personalidad que pueden aumentar la vulnerabilidad a desarrollar trastornos adictivos. Un paso adicional en este sentido, y que deberá estudiarse en futuros experimentos, será identificar las regiones cerebrales que regulan este tipo de respuestas, que sin duda están determinadas genéticamente y tienen una base biológica común, vinculada, de nuevo, con los circuitos cerebrales de miedo/ansiedad y de recompensa (Bardo *et al.*, 1996; Driscoll *et al.*, 2009; Meyza *et al.*, 2009;). En este contexto, recientes estudios de *microarray* han encontrado diferencias de cepa en la expresión génica cerebral del gen Homer3 (Sagariego *et al.*, 2011). Este gen codifica un miembro de la familia de proteínas dentríticas Homer, algunas de las cuales regulan el funcionamiento del receptor glutamatérgico metabotrópico y la plasticidad sináptica dependiente de este sistema neuroquímico (Fagni *et al.*, 2004). Estas proteínas se han relacionado con la conducta de consumo de drogas y con el rasgo de búsqueda de novedad (Szumlinski, Ary y Lominac, 2008; Szumlinski, Ary, Lominac, Klugmann y Kippin 2008; Szumlinski, Kalivas y Worley, 2006), ofreciendo una vía de investigación futura que permitirá explorar en las ratas Romanas las bases neurogenéticas de este tipo de conductas.

Finalmente, además de las influencias genéticas y los rasgos de personalidad, es sabido que numerosos acontecimientos estresantes pueden precipitar el consumo de drogas de abuso, en especial las recaídas (LeMoal y Koob, 2007; Lu *et al.*, 2003a; Yap y Miczek,

2008), siendo factores desencadenantes que interaccionan con la vulnerabilidad propia de cada individuo (Blanchard *et al.*, 2009; Ellenbroek *et al.*, 2005, van der Kam *et al.*, 2005). En esta Tesis Doctoral nos focalizamos en aquellas situaciones que tienen que ver con experiencias de pérdida de recompensa, debido a los escasos estudios centrados en esta cuestión, que podría ser de gran relevancia clínica. Los resultados obtenidos en los experimentos 5 y 6 mostraron que la omisión inesperada de un reforzador (tanto en una tarea consumatoria como instrumental) aumentó el consumo posterior de etanol en la cepa más sensible a este tipo de experiencias (RLA-I). No obstante, se comprobó también que los animales sometidos a omisiones repetidas de la recompensa (reforzamiento parcial) desarrollaron resistencia a la frustración y no mostraron más consumo de etanol que el grupo RHA-I. Estos hallazgos podrían explicarse sobre la base de la confluencia existente entre los mecanismos neurobiológicos que regulan las respuestas de estrés y la adicción, con especial énfasis en el funcionamiento del sistema nervioso simpático y del eje HPA (Ungless *et al.*, 2010). La respuesta de estrés constituye una cascada de acontecimientos que permiten al organismo realizar los cambios fisiológicos y metabólicos necesarios para hacer frente a las demandas provocadas por acontecimientos que altera su equilibrio homeostático. Las respuestas del sistema nervioso simpático incluyen aumento en la tasa cardíaca y en la presión sanguínea, cambios en el flujo sanguíneo dirigido a los músculos, aumento en los niveles de glucosa en sangre, dilatación de las pupilas y estimulación de la respiración. Por su parte, el eje HPA se activa inicialmente por la secreción de la hormona liberadora de la corticotropina (CRH) desde el hipotálamo. Las neuronas que contienen CRH proyectan desde la división parvocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo a la zona externa de la eminencia media, liberando el péptido en la circulación portal de la adenohipófisis en respuesta al estrés. La unión de la CRH a los receptores localizados en la pituitaria anterior resulta en la síntesis de proopiomelanocortina, el precursor natural de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), la cual difunde a través de la circulación general hasta alcanzar las glándulas adrenales para estimular la síntesis de adrenocorticoides (corticosterona en ratas y cortisol en humanos; Goeders, 2003).

¿De qué manera este sistema se relaciona con la vulnerabilidad a la adicción? Numerosas evidencias indican que la activación del eje HPA aumenta la motivación y/o la vulnerabilidad al consumo de sustancias de abuso, sensibilizando al organismo a los efectos reforzantes de las mismas (LeMoal y Koob, 2007; Yap y Miczek, 2008). Prueba de ello son los estudios indicativos de que la inyección exógena de corticosterona facilita la adquisición de la conducta de autoadministración de cocaína, haciendo a los animales más sensibles a

dosis bajas de esta droga (Mantsch, Saphier y Goeders, 1998; en Goeders, 2003)⁵. En la misma línea, se ha comprobado que el pretratamiento con un inhibidor de la síntesis de corticosterona reduce la tasa de adquisición de la autoadministración de cocaína y el número de animales que alcanzan el criterio de adquisición (Campbell y Carroll, 2001, en Goeders, 2003). Estos estudios farmacológicos tienen un importante paralelismo con los trabajos que han utilizado estresores para analizar su influencia sobre la conducta adictiva, incluyendo descargas eléctricas inescapables, novedad, inmovilización, estrés social, natación forzada, etc., los cuales demuestran de forma consistente que estos acontecimientos aumentan la conducta de consumo de drogas de abuso y estimulan el eje HPA. Aunque se asume que la exposición a estos estresores (o la administración de corticosterona) constituye un evento aversivo, la consecuencia final de este evento es un aumento en la sensibilidad a los efectos reforzantes de la droga, mediada a su vez por la influencia de esta respuesta de estrés sobre los circuitos dopaminérgicos mesolímbicos (Ungless *et al.*, 2010). Se ha observado, por ejemplo, que ciertos eventos aversivos (como descargas eléctricas) pueden aumentar la liberación de dopamina en un subgrupo de neuronas localizado en la porción ventral del área tegmental ventral (Joseph, Datla y Young, 2003). En la misma línea, Saal, Dong, Bonci y Malenka (2003) hallaron que el estrés inducido por natación forzada indujo una forma de potenciación a largo plazo en las neuronas dopaminérgicas similar a la observada en respuesta a las drogas de abuso, activando mecanismos moleculares similares mediados por el factor de transcripción CREB (Brian y Blendy, 2009; Nestler, 2004). Estos hallazgos podrían explicar por qué ciertas experiencias estresantes podrían aumentar el valor reforzante de las drogas de abuso, al compartir ambos eventos mecanismos cerebrales comunes. Al mismo tiempo, de esta evidencia se deriva la idea que aquellos individuos más sensibles al estrés podrían ser los más vulnerables a desarrollar trastornos adictivos (LeMoal y Koob, 2007; Piazza y LeMoal, 1998), una hipótesis que ha encontrado un amplio apoyo experimental. Así, se han registrado niveles de corticosterona más elevados en las ratas HR vs. LR en respuesta a estresores moderados relacionados con novedad (Blanchard *et al.*, 2009; Piazza *et al.*, 1990). Del mismo modo, la cepa HR-*bred* presenta una expresión reducida de receptores de glucocorticoides en el hipocampo, lo que implicaría un mecanismo de *feedback* de la regulación de corticosterona disminuido en esta cepa en comparación con la cepa LR-*bred* (Pawlak *et al.*, 2008). En la misma línea, las ratas APO-SUS tienen más receptores de mineralocorticoides en el hipocampo, niveles basales

⁵ Datos comparables se han obtenido con seres humanos administrando cortisol (Yap y Miczek, 2008).

plasmáticos más elevados de ACTH, y una mayor respuesta de esta hormona ante situaciones de estrés y ante la administración exógena de CRH que la cepa APO-UNSUS, mientras que los niveles de prolactina son más bajos en la primera que en la segunda, postulándose que la cepa APO-SUS podría tener un sistema de *feedback* deficitario en su eje HPA (Pawlak *et al.*, 2008). Si bien estas evidencias sugieren que aquellas cepas más proclives a administrarse sustancias de abuso son también las que presentan una mayor activación del eje HPA en condiciones de reposo y/o en respuesta a estresores, los datos referentes a las ratas Romanas ofrecen un panorama algo distinto. En efecto, la cepa RLA (con menos tendencia a consumir sustancias de abuso de forma espontánea) presenta una respuesta neuroendocrina y vegetativa más acentuada en respuesta a estresores cuando se la compara con la cepa RHA, en lo referente a los niveles amigdalinos de vasopresina, oxitocina y CRH, a la densidad de receptores de glucocorticoides en el hipocampo (disminuida en la primera en comparación con la segunda), a una mayor expresión de ARNm de vasopresina en el núcleo paraventricular del hipotálamo y de prolactina en el cerebro completo, a unos niveles de prolactina más elevados en respuesta a situaciones de novedad, etc. (Pawlak *et al.*, 2008; Sabariego *et al.*, 2011). Estos hallazgos podrían dar cuenta de los resultados obtenidos en los experimentos de la última fase de esta Tesis Doctoral. Así, numerosas evidencias indican que la devaluación inesperada de la calidad o cantidad de un reforzador apetitivo desencadena un estado fisiológico, cognitivo y emocional de frustración, desencadenando respuestas análogas al estrés (Mitchel y Flaherty, 1998; Pecoraro, de Jong, Ginsberg, Dallman, 2008). En apoyo de esta hipótesis se ha comprobado, además, que la inyección postensayo de postcambio de corticosterona (considerada como un marcador de estrés emocional) aumenta la magnitud del CSN consumatorio (Bentosela, Ruetti, Muzio, Mustaca y Papini, 2006). Siguiendo con este razonamiento, podría hipotetizarse que la cepa RLA-I consumió más alcohol tras la experiencia en omisión de recompensa debido a una mayor activación de su eje HPA en respuesta a estas situaciones estresantes, una activación que pudo aumentar el valor de incentivo de la droga en esta cepa en comparación con la cepa RHA-I, provocando un mayor consumo de alcohol en la primera en comparación con la segunda. Esta hipótesis deberá ser analizada en futuros experimentos utilizando medidas directas de dicha actividad hormonal y de su influencia sobre la actividad de los circuitos mesocorticolímbicos.

En definitiva, descubrir cómo los eventos aversivos y el estrés modulan el funcionamiento de los circuitos neurales que subyacen a la adicción y a la búsqueda de novedad en ratas genéticamente seleccionadas constituye el principal reto que se deriva de

los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, un reto que permitirá avanzar en la comprensión de las bases psicobiológicas de los trastornos adictivos.

CONCLUSIONES

1.- Las ratas Romanas Consanguíneas de Alta (RHA-I) y Baja (RLA-I) Evitación muestran diferencias en sus patrones de consumo voluntario de etanol. Estas diferencias dependen de la dosis de sustancia presentada, si bien no están influidas por la utilización o no de un procedimiento de aclimatación al alcohol.

2.- El Hole-Board, la Prueba de Emergencia y el Laberinto en Y son aparatos que permiten estudiar el rasgo comportamental de búsqueda de novedad. Los animales (ratas Wistar) sometidos a estas pruebas muestran respuestas exploratorias que correlacionan significativamente.

3.- En comparación con las ratas RLA-I, las ratas RHA-I muestran más conductas relacionadas con la exploración activa de ambientes novedosos, tanto en condiciones de exposición forzada (HB) como de elección libre (Laberinto en Y). Asimismo, las ratas RHA-I presentan un mayor consumo voluntario de etanol con respecto a las RLA-I, hallándose correlaciones significativas entre estos valores y algunas medidas de búsqueda de novedad registradas en las pruebas indicadas.

4.- La exposición de ratas Wistar a la reducción súbita en la magnitud de una recompensa esperada (de 12 pellets a 2 pellets, laberinto recto) provoca un deterioro en la ejecución de la respuesta instrumental (CSN), sin afectar al consumo de alcohol posterior registrado en una prueba de preferencia agua/alcohol (2%).

5.- Cuando las ratas RHA-I y RLA-I son sometidas a una prueba de extinción consumatoria (utilizando una solución de sacarosa al 22% seguida por su omisión), se observa que ambas cepas muestran una extinción similar en su respuesta. Sin embargo, inmediatamente después de la omisión del reforzador la cepa más reactiva emocionalmente (RLA-I) consumió más alcohol (2%) que la menos reactiva (RHA-I).

6.- La exposición de las ratas Romanas a una prueba de extinción instrumental (presentando 12 pellets en la caja meta de un laberinto recto, seguida por su omisión) provoca un aumento en el consumo de alcohol posterior en la cepa más reactiva emocionalmente (RLA-I), en comparación con la menos reactiva (RHA-I), siempre y cuando la fase de adquisición se lleve a cabo utilizando un procedimiento de reforzamiento

continuo. Por el contrario, cuando los animales reciben reforzamiento parcial durante la fase de adquisición, no aparecen diferencias significativas entre las cepas en la preferencia por etanol durante la fase de extinción.

7.- Las ratas RHA-I y RLA-I constituyen un modelo animal útil para analizar algunos de los factores genéticos y ambientales que modulan la conducta de consumo de alcohol.

REFERENCIAS

- Aguilar, R., Escorihuela, R. M., Gil, L., Tobena, A., y Fernandez-Teruel, A. (2002). Differences between two psychogenetically selected lines of rats in a swimming pool matching-to-place task: long-term effects of infantile stimulation. *Behavior Genetic*, 32, 127-134.
- Aguilar, R., Gil, L., Gray, J. A., Driscoll, P., Flint, J., Dawson, G. R., et al. (2003). Fearfulness and sex in F2 Roman rats: males display more fear though both sexes share the same fearfulness traits. *Physiology Behavior*, 78, 723-732.
- Altoa, A., Eller, M., Herm, L., Rincken, A., y Harro, J. (2007). Amphetamine-induced locomotion, behavioral sensitization to amphetamine, and striatal D2 receptor function in rats with high or low spontaneous exploratory activity: differences in the role of locus coeruleus. *Brain Research*, 1131, 138-148.
- Amsel, A. (1992). Frustration theory--many years later. *Psychology Bulletin*, 112, 396-399.
- Amsel, A. (1994). Précis of Frustration Theory: An analysis of dispositional Learning and Memory. *Psychonomic Bulletin and Review*, 1, 280-296.
- Anisman, H., y Waller, T. G. (1974). Effects of alcohol on discriminative active avoidance behavior in mice. *Quarterly Journals of Studies on Alcohol*, 35, 439-444.
- Anthony, J. C., Warner, y L. A., Kessler, R.C. (1994). Comparative epidemiology of dependence on tobacco, alcohol, controlled substances, and inhalants: Basic findings from the National Comorbidity Survey. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 2, 244-268.
- Aragon, C. M., Sternklar, G., y Amit, Z. (1985). A correlation between voluntary ethanol consumption and brain catalase activity in the rat. *Alcohol*, 2, 353-356.
- Badia-Elder, N. E., y Kiefer, S. W. (1999). Taste reactivity in alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Alcohol*, 18, 159-163.
- Ballaz, S. J. (2009). Differential novelty detection in rats selectively bred for novelty-seeking behavior. *Neuroscience Letters*, 461, 45-48.
- Ballaz, S. J., Akil, H., y Watson, S. J. (2007). Previous experience affects subsequent anxiety-like responses in rats bred for novelty seeking. *Behavior Neuroscience*, 121, 1113-1118.
- Bardo, M. T., Donohew, R. L., y Harrington, N. G. (1996). Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behavior Brain Research*, 77, 23-43.

- Bardo, M. T., Neisewander, J. L., y Pierce, R. C. (1989). Novelty-induced place preference behavior in rats: effects of opiate and dopaminergic drugs. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *32*, 683-689.
- Barsy, B., Mikics, E., Barsvari, B., y Haller, J. (2011). The long-term impact of footshock stress on addiction-related behaviors in rats. *Neuropharmacology*, *60*, 267-273.
- Beauge, F., Kerfriden, G., Menez, J. F., Aufrere, G., y Le Bourhis, B. (1994). Synaptic membrane responses to acute and chronic alcohol intoxication in high alcohol sensitive (HAS) and low alcohol sensitive (LAS) selectively bred rats. *Alcohol and Alcoholism*, *29*, 745-750.
- Becker, H. C., y Flaherty, C.F. (1982). Influence of ethanol on contrast in consummatory behavior. *Psychopharmacology*, *77*, 253-258.
- Becker, H. C., y Flaherty, C.F. (1983). Chlordiazepoxide and ethanol additively reduce gustatory negative contrast. *Psychopharmacology*, *80*, 35-37.
- Becker, H. C., y Hale, R. L. (1991). RO15-4513 antagonizes the anxiolytic effects of ethanol in a nonshock conflict task at doses devoid of anxiogenic activity. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *39*, 803-807.
- Becker, H. C., Lopez, M. F., y Doremus-Fitzwater, T. L. (2011). Effects of stress on alcohol drinking: a review of animal studies. *Psychopharmacology (Berl)*, *218*, 131-156.
- Bentosela, M., Ruetti, E., Muzio, R. N., Mustaca, A. E., y Papini, M. R. (2006). Administration of corticosterone after the first downshift trial enhances consummatory successive negative contrast. *Behaviour Neuroscience*, *120*, 371-376.
- Berke, J. D., y Hyman, S. E. (2000). Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron*, *25*, 515-532.
- Berridge, K. C., y Robinson, T. E. (2003). Parsing reward. *Neuroscience*, *26*, 507-513.
- Bignami, G. (1965). Selection for high rates and low rates of avoidance conditioning in the rat. *Animal Behavior*, *13*, 221-227. .
- Blanchard, M. M., Mendelsohn, D., y Stamp, J. A. (2009). The HR/LR model: Further evidence as an animal model of sensation seeking. *Neuroscience Biobehavioural Reviews*, *33*, 1145-1154.
- Blázquez G., Diaz-Moran S., Palència M., Mont-Cardona C., Cañete A., Martínez-Membrives E., et al. (2012, Julio). *Hippocampal gene expression profile in inbred Roman high- (RHA-I) and Low- (RLA-I) Avoidance rats*. Poster session at the meeting of Forum of European NeuroScience. Barcelona, España.

- Boissier, J. R., y Simon, P. (1962). [The exploration reaction in the mouse. Preliminary note]. *Therapie*, 17, 1225-1232.
- Bond, N. W., y Digiusto, E. L. (1977). Effects of prenatal alcohol consumption on shock avoidance learning in rats. *Psychological Reports*, 41, 1269-1270.
- Boyd, T. L., Callen, E. J., y House, W. J. (1989). The effects of post-stress exposure to alcohol upon the development of alcohol consumption in rats. *Behaviour Research and Therapy*, 27, 35-41.
- Bradberry, C. W., Gruen, R. J., Berridge, C. W., y Roth, R. H. (1991a). Individual differences in behavioral measures: correlations with nucleus accumbens dopamine measured by microdialysis. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 39, 877-882.
- Briand, L. A., y Blendy, J. A. (2009). Molecular and genetic substrates linking stress and addiction. *Brain Research*, 1314, 219-234.
- Burchfield, S. R. (1979). The stress response: a new perspective. *Psychosomatic Medicine*, 41, 661-672.
- Caldwell, E. E., y Riccio, D. C. (2010). Alcohol self-administration in rats: Modulation by temporal parameters related to repeated mild social defeat stress. *Alcohol*, 44, 265-274.
- Campbell, U. C., y Carroll, M. E. (2001). Effects of ketoconazole on the acquisition of intravenous cocaine self-administration under different feeding conditions in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 154, 311-318.
- Candido, A., Maldonado, A., Megias, J. L., y Catena, A. (1992). Successive negative contrast in one-way avoidance learning in rats. *The Quarterly journal of experimental psychology. B, Comparative and physiological psychology*, 45, 15-32.
- Cañete T, Guitart-Masip M, Fernández-Teruel A, Tobeña A, y Giménez-Llort L. (2003). Apomorphine and amphetamine induce differential activity patterns in Roman High- and Low-Avoidance rats. *Acta Neurobiology Experimental*, 63:55.
- Caplan, M. A., y Puglisi, K. (1986). Stress and conflict conditions leading to and maintaining voluntary alcohol consumption in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24, 271-280.
- Carroll, M. E., Anker, J. J., y Perry, J. L. (2009). Modeling risk factors for nicotine and other drug abuse in the preclinical laboratory. *Drug and Alcohol Dependence*, 104 Suppl 1, S70-78.

- Chester, J. A., Risinger, F. O., y Cunningham, C. L. (1998). Ethanol reward and aversion in mice bred for sensitivity to ethanol withdrawal. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 22, 468-473.
- Clark, H. W., Masson, C. L., Delucchi, K. L., Hall, S. M., y Sees, K. L. (2001). Violent traumatic events and drug abuse severity. *Journal Substance Abuse Treatment*, 20, 121-127.
- Cloninger, CR., Sigvardsson, S., Przybeck, TR., y Svrakic DM. (1995). Personality Antecedents of Alcoholism in a National Area Probability Sample. *European Archives of Psychiatry Clinic and Neuroscience*, 245, 239-244.
- Cloninger, CR., y Svrakic, NM. (1998). Psychobiological Model of Personality.
- Cochrane, R., y Robertson, A. (1973). The life events inventory: a measure of the relative severity of psycho-social stressors. *Journal of Psychosomatic Research*, 17, 135-140.
- Colombo, G., (1977). Ethanol drinking behaviour in sardinian alcohol preferring Rats. *Alcohol & Alcoholism*, 32, 443-53.
- Comings, D. E., Gonzalez, N., Wu, S., Saucier, G., Johnson, P., Verde, R., et al. (1999). Homozygosity at the dopamine DRD3 receptor gene in cocaine dependence. *Molecular Psychiatry*, 4, 484-487.
- Conesa, P., y Brugger, A. (1998). Historia de los modelos experimentales en psicofarmacología. En D. Barcia (Ed.), *Historia de la Psicofarmacología*, 509-620. Madrid: You & Us.
- Conger, J. J. (1956). Alcoholism: theory, problem and challenge. II. Reinforcement theory and the dynamics of alcoholism. *Quarterly Journal of Studies on Alcohol*, 17, 296-305.
- Conway, K. P., Kane, R. J., Ball, S. A., Poling, J. C., y Rounsaville, B. J. (2003). Personality, substance of choice, and polysubstance involvement among substance dependent patients. *Drug and Alcohol Dependence*, 71, 65-75.
- Cools, A. R., Brachten, R., Heeren, D., Willems, A., y Ellenbroek, B. (1990). Search after neurobiological profile of individual-specific features of Wistar rats. *Brain Research Bulletin*, 24, 49-69.
- Cools, A. R., Ellenbroek, B. A., Gingras, M. A., Engbersen, A., y Heeren, D. (1997). Differences in vulnerability and susceptibility to dexamphetamine in Nijmegen high and low responders to novelty: a dose-effect analysis of spatio-temporal programming of behaviour. *Psychopharmacology (Berl)*, 132, 181-187.

- Corda, M.G., Lecca, D., Piras, G., Di Chiara, G. y Giorgi, O. (1997). Biochemical parameters of dopaminergic and GABAergic neurotransmission in the CNS of Roman high-avoidance and Roman low-avoidance rats. *Behavior Genetics*, 27, 527-536.
- Corda, M.G., Lecca, D., Piras, G., Viola, H. J.H. M., y Giorgi, O. (2001). Voluntary ethanol intake activates the meso-accumbal dopaminergic transmission in the Roman, high-avoidance but not Roman low-avoidance rats. *Journal Neurochemistry*, 78, 80.
- Corda, M. G., Piras, G., Lecca, D., Fernandez-Teruel, A., Driscoll, P., y Giorgi, O. (2005). The psychogenetically selected Roman rat lines differ in the susceptibility to develop amphetamine sensitization. *Behavioural Brain Research*, 157, 147-156.
- Crabbe, J. C., Belknap, J. K., y Buck, K. J. (1994). Genetic animal models of alcohol and drug abuse. *Science*, 264, 1715-1723.
- Crespi, L. (1942). *Quantitative variation of incentive and performance in the white rat*. American Journal Psychology, 55, 467-517.
- Crusio, W. E. (2001). Genetic dissection of mouse exploratory behaviour. *Behavioural Brain Research*, 125, 127-132.
- Cuenya, L., Fosachecha, S., Mustaca, A., y Kamenetzky, G. (2011). Efectos del aislamiento en la adultez sobre el dolor y la frustración. *Psicológica*, 32, 49-63.
- Cuenya, L., Kamenetzky, G. V. y Mustaca, A. E. (2009). Dimensiones temperamentales en roedores: aspectos metodológicos y conceptuales. En: Recientes desarrollos iberoamericanos en investigación en Ciencias del Comportamiento. Edición CIIPMECONICET, 2, 849-874.
- Cuenya, L., Sabariego, M., Donaire, R., Fernandez-Teruel, A., Tobena, A., Gomez, M. J., et al. (2012). The effect of partial reinforcement on instrumental successive negative contrast in inbred Roman High- (RHA-I) and Low- (RLA-I) Avoidance rats. *Physiology Behavior*, 105, 1112-1116.
- Cuenya, L., Sabariego, M., Martínez, A. L., Fernández-Teruel, A., Mustaca, A., y Torres, C. (2010, Septiembre). *Behavioral characterization of roman high and low avoidance rats in a battery of tests based on locomotory activity and novelty seeking*. Poster session at the meeting of XXII Congress of the Spanish Society for Comparative Psychology. Almería.
- D'Angio, M., Serrano, A., Driscoll, P., y Scatton, B. (1988). Stressful environmental stimuli increase extracellular DOPAC levels in the prefrontal cortex of hypoemotional (Roman high-avoidance) but not hyperemotional (Roman low-avoidance) rats. An in vivo voltammetric study. *Brain Research*, 451, 237-247.

- Dackis, C., y O'Brien, C. (2005). Neurobiology of addiction: treatment and public policy ramifications. *Nature Neuroscience*, *8*, 1431-1436.
- Dantzer, R. (1987). Behavioral analysis of anxiolytic drug action. En A. J. Greenshaw y C. T. Dourish (Eds.), *Experimental Psychopharmacology* Clifton, N. J: Human Press. 263-297.
- Davis, B. A., Clinton, S. M., Akil, H., y Becker, J. B. (2008). The effects of novelty-seeking phenotypes and sex differences on acquisition of cocaine self-administration in selectively bred High-Responder and Low-Responder rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *90*, 331-338.
- Dawe, S., y Loxton, N. J. (2004). The role of impulsivity in the development of substance use and eating disorders. *Neuroscience Behavioral Review*, *28*, 343-351.
- de Waele, J. P., Kiiianmaa, K., y Gianoulakis, C. (1995). Distribution of the mu and delta opioid binding sites in the brain of the alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA lines of rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *275*, 518-527
- DeJong, W. (1994). Relapse prevention: an emerging technology for promoting long-term drug abstinence. *The International journal of the addictions*, *29*, 681-705.
- Dellu, F., Mayo, W., Cherkaoui, J., Le Moal, M., y Simon, H. (1992). A two-trial memory task with automated recording: study in young and aged rats. *Brain Research*, *588*, 132-139.
- Dellu, F., Mayo, W., Piazza, P. V., Le Moal, M., y Simon, H. (1993). Individual differences in behavioral responses to novelty in rats: Possible relationship with the sensation-seeking trait in man. *Personality and Individual Differences*, *4*, 411-418.
- Dellu, F., Piazza, P. V., Mayo, W., Le Moal, M., y Simon, H. (1996). Novelty-seeking in rats--biobehavioral characteristics and possible relationship with the sensation-seeking trait in man. *Neuropsychobiology*, *34*, 136-145.
- Di Chiara, G., y Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*, 5274-5278.
- Domjan, M. (2006) *The Principles of Learning and Behavior*. Belmont CA, Thomson. Wadsworth, Fifth Edition.
- Donaire, R., Sabariego, M., Gómez, M.J., Carmona, R., Núñez, M., Manzo, L., et al (2011). The effect of a frustrative experience of reward devaluation on hippocampal gene

- expression in inbred roman high- (rha-i) and low- (rla-i) avoidance rats. *Poster presentado en el 43 European Brain and Behaviour Society Meeting* (Sevilla, España).
- Drewak, K. J., y Broadhurst, P. L. (1979). Alcohol selection by strains of rats selectively bred for behavior. *Journal of Studies of Alcohol*, 40, 723-728.
- Driscoll, P., y Bättig, K., (1982). *Behavioral, emotional and neurochemical profiles of rats selected for extreme differences in active, two way avoidance performance*. In: Genetics of the brain (Lieblich I, ed), Genetics of the brain, 96-123. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press.
- Driscoll, P., Cohen, E., Fackelman, P., y Bättig, K. (1990). Differential ethanol consumption in Roman high- and low-avoidance (RHA and RLA) rats, body weight, food intake and the influence of pre- and post-natal exposure of nicotine and/or injection stress. *Experientia*, 46, A60.
- Driscoll, P., Escorihuela, R. M., Fernandez-Teruel, A., Giorgi, O., Schwegler, H., Steimer, T., et al. (1998). Genetic selection and differential stress responses. The Roman lines/strains of rats. *Annals of the New York Academy Sciences*, 851, 501-510.
- Driscoll, P., Fernández-Teruel, A., Corda, M., Giorgi, O. y Steimer, T. (2009). *Some guidelines for defining personality differences in rats*. En K. Yong-Kyu (Ed.), Handbook of behavior genetics. New York: Springer.
- Driscoll, P., Lieblich, I., y Cohen, E. (1986). Amphetamine-induced stereotypic responses in Roman high- and Roman low-avoidance rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavioural*, 24, 1329-1332.
- Driscoll, P., Riley, E. P., y Meyer, L. S. (1985). Delayed taste aversion learning in preweanling rats exposed to alcohol prenatally. *Alcohol*, 2, 277-280.
- Durcan, M. J., Wraight, K. B., y Fulker, D. W. (1984). The current status of two sublines of the Roman High and Low Avoidance strains. *Behavior Genetics*, 14, 559-569.
- El-Shikh, H., Fahmy, E., Michael, V.S. y Mosehly, H. F. (2004). Acontecimientos vitales y adicción: una revisión de la bibliografía. *European Journal of Psychiatry*, 18, 162-170.
- Ellenbroek, B. A., Sluyter, F., y Cools, A. R. (2000). The role of genetic and early environmental factors in determining apomorphine susceptibility. *Psychopharmacology (Berl)*, 148, 124-131.

- Ellenbroek, B. A., van der Kam, E. L., van der Elst, M. C., y Cools, A. R. (2005). Individual differences in drug dependence in rats: the role of genetic factors and life events. *European Journal of Pharmacology*, 526, 251-258.
- Elmer, G. I., Meisch, R. A., y George, F. R. (1987). Differential concentration-response curves for oral ethanol self-administration in C57BL/6J and BALB/cJ mice. *Alcohol*, 4, 63-68.
- Eriksson, K. (1974). Genetic aspects of alcohol drinking behaviour. *International Journal of Neurology*, 9, 125-133.
- Escarabajal, M.D., Gómez M. J., de la Torre L., Morón, I., Torres, C., Tobeña, A. *et al.* (2007). *Whole genome microarray analysis reveals changes in brain gene expression in rats with strain behavioral divergences*. Póster presentado en el XII Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia. Valencia, España.
- Escorihuela, R. M., Fernandez-Teruel, A., Gil, L., Aguilar, R., Tobena, A., y Driscoll, P. (1999). Inbred Roman high- and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviors. *Physiological Behavioral*, 67, 19-26.
- Escorihuela, R. M., Fernandez-Teruel, A., Tobena, A., Langhans, W., Battig, K., y Driscoll, P. (1997). Labyrinth exploration, emotional reactivity, and conditioned fear in young Roman/Verh inbred rats. *Behavior Geneicst*, 27, 573-578.
- Escohotado, A. (1999). Historia general de las drogas. *Madrid: Espasa-Calpe*.
- Everitt, B. J., y Robbins, T. W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nature Neuroscience*, 8, 1481-1489.
- Everitt, B. J., y Wolf, M. E. (2002). Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *The Journal of Neuroscience*, 22, 3312-3320.
- Eysenck, H. J., y Levey, A. (1967). Conditioning, introversion--extroversion and the strength of the nervous system. *Zeitschrift fur Psychologie mit Zeitschrift fur Angewandte Psychologie*, 174, 96-106.
- Fagni, L., Ango, F., Perroy, J., y Bockaert, J. (2004). Identification and functional roles of metabotropic glutamate receptor-interacting proteins. *Seminars in & Cell Developmental Biology*, 15, 289-298.
- Fattore, L., Piras, G., Corda, M. G., y Giorgi, O. (2009). The Roman high- and low-avoidance rat lines differ in the acquisition, maintenance, extinction, and reinstatement of intravenous cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology*, 34, 1091-1101.

- Fernandez-Espejo, E. (2002). Neurobiological basis of drug addiction. *Revista de Neurología*, 34, 659-664.
- Fernández-Teruel, A. (2008). *Farmacología de la conducta: de los psicofármacos a las terapias psicológicas*. Barcelona: Servei de publicacions Universitat Autònoma de Barcelona.
- Fernandez-Teruel, A., Blazquez, G., Perez, M., Aguilar, R., Canete, T., Guitart, M., et al. (2006). [Latent inhibition threshold in Roman high-avoidance rats: a psychogenetic model of abnormalities in attentional filter?]. *Actas Españolas de psiquiatría*, 34, 257-263.
- Fernández-Teruel, A., Driscoll, P., Gil, L., Aguilar, R., Tobena, A., y Escorihuela, R. M. (2002). Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking, saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh and RLA/Verh) differing in incentive-seeking behavior. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 73, 225-231.
- Fernandez-Teruel, A., y Escorihuela, R. M. (1997). Modeling emotional reactivity and sensation/novelty seeking with the Roman/Verh rat lines/strains: an introduction. *Behavior Genetics*, 27, 499-501.
- Ferre, P., Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Driscoll, P., Corda, M. G., Giorgi, O., et al. (1995). Behavior of the Roman/Verh high- and low-avoidance rat lines in anxiety tests: relationship with defecation and self-grooming. *Physiology and Behavior*, 58, 1209-1213.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Driscoll, P., Tobena, A., y Battig, K. (1994). Evaluating activity and emotional reactivity in a hexagonal tunnel maze: correlational and factorial analysis from a study with the Roman/Verh rat lines. *Behavior Genetics*, 24, 419-425.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Gray, J. A., Aguilar, R., Gil, L., Gimenez-Llort, L., et al. (2002). A quantitative trait locus influencing anxiety in the laboratory rat. *Genome Research*, 12, 618-626.
- Fernandez-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Nunez, J. F., Goma, M., Driscoll, P., y Tobena, A. (1992). Early stimulation effects on novelty-induced behavior in two psychogenetically-selected rat lines with divergent emotionality profiles. *Neuroscience Letters*, 137, 185-188.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Nunez, J. F., Zapata, A., Boix, F., Salazar, W., et al. (1991). The early acquisition of two-way (shuttle-box) avoidance as an anxiety-

- mediated behavior: psychopharmacological validation. *Brain Research Bulletin*, 26, 173-176.
- File, S. E. (2001). Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behavioural Brain Research*, 125, 151-157.
- File, S. E., y Wardill, A. G. (1975a). The reliability of the *Hole-Board* apparatus. *Psychopharmacologia*, 44, 47-51.
- File, S. E., y Wardill, A. G. (1975b). Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified *Hole-Board*. *Psychopharmacologia*, 44, 53-59.
- Fink, J. S., y Smith, G. P. (1979). Decreased locomotor and investigatory exploration after denervation of catecholamine terminal fields in the forebrain of rats. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, 93, 34-65.
- Flaherty, C. F. (1996) *Incentive relativity*. New York: Cambridge University press.
- Flaherty, C. F., Coppotelli, C., Hsu, D., y Otto, T. (1998). Excitotoxic lesions of the hippocampus disrupt runway but not consummatory contrast. *Behavioural Brain Research*, 93, 1-9.
- Fullgrabe, M. W., Vengeliene, V., y 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, 320-326.
- Gallinat, J., Kunz, D., Lang, U. E., Neu, P., Kassim, N., Kienast, T., et al. (2007). Association between cerebral glutamate and human behaviour: the sensation seeking personality trait. *Neuroimage*, 34, 671-678.
- Gimenez-Llort, L., Canete, T., Guitart-Masip, M., Fernandez-Teruel, A., y Tobena, A. (2005). Two distinctive apomorphine-induced phenotypes in the Roman high- and low-avoidance rats. *Physiology Behavior*, 86, 458-466.
- Giorgi O, Corda MG, Carboni G, Frau V, Valentini V, y Di Chiara G. (1997). Effects of cocaine and morphine in rats from two psychogenetically selected lines: a behavioral and brain dialysis study. *Behavior Genetics* 27,537-546.
- Giorgi O, Lecca D, Piras G, Driscoll P, y Corda MG. (2003). Dissociation between mesocortical dopamine release and fear-related behaviours in two psychogenetically selected lines of rats that differ in coping strategies to aversive conditions. *European Journal of Neuroscience* 17, 2716-2726.
- Giorgi, O., Orlandi, M., Escorihuela, R. M., Driscoll, P., Lecca, D., y Corda, M. G. (1994). GABAergic and dopaminergic transmission in the brain of Roman high-avoidance and Roman low-avoidance rats. *Brain Research*, 638, 133-138.

- Giorgi, O., Piras, G., Lecca, D., Corda, M. G. (2005a) Differential activation of dopamine release in the nucleus accumbens core and shell after acute or repeated amphetamine injections: a comparative study in the Roman high- and low-avoidance rat lines. *Neuroscience* 135, 987-998.
- Giorgi, O., Piras, G., Lecca, D., Corda, M., G. (2005b) Behavioural effects of acute and repeated cocaine treatments: a comparative study in sensitisation-prone RHA rats and their sensitisation-resistant RLA counterparts. *Psychopharmacology (Berl)* 180,530-538.
- Giorgi, O., Piras, G., Lecca, D., Hansson, S., Driscoll, P., y Corda, M. G. (2003b). Differential neurochemical properties of central serotonergic transmission in Roman high- and low-avoidance rats. *Journal of Neurochemistry*, 86, 422-431.
- Giorgi, O., Piras, G., y Corda, M. G. (2007). The psychogenetically selected Roman high- and low-avoidance rat lines: a model to study the individual vulnerability to drug addiction. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 31, 148-163.
- Glass, M. J., Billington, C. J., y Levine, A. S. (1999). Opioids and food intake: distributed functional neural pathways? *Neuropeptides*, 33, 360-368.
- Goeders, N. E. (2003). The impact of stress on addiction. *European Neuropsychopharmacology*, 13, 435-441.
- Goeders, N. E., y Guerin, G. F. (1994). Non-contingent electric footshock facilitates the acquisition of intravenous cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 114, 63-70.
- Goldman, D., Oroszi, G., y Ducci, F. (2005). The genetics of addictions: uncovering the genes. *Nature Review Genetic*, 6, 521-532.
- Gomez, M. A., de la Torre, L., Callejas-Aguilera, J. E., Lerma-Cabrera, J. M., Rosas, J. M., Escarabajal, M. A., et al. (2008). The partial reinforcement extinction effect (PREE) in female Roman high- (RHA-I) and low-avoidance (RLA-I) rats. *Behavioural Brain Research*, 194, 187-192.
- Gomez, M. J., de la Torre, L., Callejas-Aguilera, J. E., Rosas, J. M., Escarabajal, M. D., Agüero, A., et al. (2012). Differences in extinction of an appetitive instrumental response in female inbred Roman High-(RHA-I) and Low-(RLA-I) Avoidance rats. *Psicologica*, 33, 181-188.
- Gomez, M. J., Escarabajal, M. D., de la Torre, L., Tobena, A., Fernandez-Teruel, A., y Torres, C. (2009). Consummatory successive negative and anticipatory contrast effects in inbred Roman rats. *Physiology Behavior*, 97, 374-380.

- Gordon, H.W. (2002). Early environmental stress and biological vulnerability to drug abuse. *Psychoneuroendocrinology*, 27, 115-126
- Gosling, S. D. (2001). From mice to men: what can we learn about personality from animal research? *Psychology Bulletin*, 127, 45-86.
- Gray, J. A. (1987). *The psychology of fear and stress* (2nd ed.). Cambridge: University Cambridge Press.
- Gray, J. y McNaughton, N. (2000). *The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. New York: Oxford University Press.
- Green, A. S., y Grahame, N. J. (2008). Ethanol drinking in rodents: is free-choice drinking related to the reinforcing effects of ethanol? *Alcohol*, 42, 1-11.
- Guitart-Masip, M., Gimenez-Llort, L., Fernandez-Teruel, A., Canete, T., Tobena, A., Ogren, S. O., et al. (2006a). Reduced ethanol response in the alcohol-preferring RHA rats and neuropeptide mRNAs in relevant structures. *European Journal of Neuroscience*, 23, 531-540.
- Guitart-Masip, M., Johansson, B., Fernandez-Teruel, A., Canete, T., Tobena, A., Terenius, L., et al. (2006b). Divergent anatomical pattern of D1 and D3 binding and dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa mRNA expression in the Roman rat strains: Implications for drug addiction. *Neuroscience*, 142, 1231-1243.
- Guitart-Masip, M., Johansson, B., Fernandez-Teruel, A., Tobena, A., y Gimenez-Llort, L. (2008). Divergent effect of the selective D3 receptor agonist pd-128,907 on locomotor activity in Roman high- and low-avoidance rats: relationship to NGFI-A gene expression in the Calleja islands. *Psychopharmacology (Berl)*, 196, 39-49.
- Harro, J., Oreland, L., Vasar, E., y Bradwejn, J. (1995). Impaired exploratory behaviour after DSP-4 treatment in rats: implications for the increased anxiety after noradrenergic denervation. *European Neuropsychopharmacology*, 5, 447-455.
- Hayaki, J., Stein, M. D., Lessor, J. A., Herman, D. S., y Anderson, B. J. (2005). Adversity among drug users: relationship to impulsivity. *Drug Alcohol Dependence*, 78, 65-71.
- Health statistics - key data on health 2002 (*Office for official publications of the European Communities*. Luxembourg, 2002).
- Henderson, N. D. (1967). Prior treatment effects on open field behaviour of mice--a genetic analysis. *Animal Behavior*, 15, 364-376.

- Hooks, M. S., Jones, G.H., Smith, A.D., Neill, D.B., y Justice, J.B., Jr. (1991) Response to novelty predicts the locomotor and nucleus accumbens dopamine response to cocaine. *Synapse*, 9,121-128.
- Hooks, M. S., Colvin, A. C., Juncos, J. L., y Justice, J. B., Jr. (1992). Individual differences in basal and cocaine-stimulated extracellular dopamine in the nucleus accumbens using quantitative microdialysis. *Brain Research*, 587, 306-312.
- Hooks, M. S., Juncos, J. L., Justice, J. B., Jr., Meiergerd, S. M., Povlock, S. L., Schenk, J. O., et al. (1994). Individual locomotor response to novelty predicts selective alterations in D1 and D2 receptors and mRNAs. *The Journal of Neuroscience*, 14, 6144-6152.
- Hooks, M. S., y Kalivas, P. W. (1995). The role of mesoaccumbens--pallidal circuitry in novelty-induced behavioral activation. *Neuroscience*, 64, 587-597.
- Horlings E, Scoggins A (2006). *An ex ante assessment of the economic impacts of EU alcohol policies*. Leiden: Rand corporation.
- Hyman, S. E., y Malenka, R. C. (2001). Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nature Reviews Neuroscience*, 2, 695-703.
- Hyman, S. M., y Sinha, R. (2009). Stress-related factors in cannabis use and misuse: implications for prevention and treatment. *Journal Substances of Abuse and Treatment*, 36, 400-413.
- Ibáñez, M. I., Ávila, C., Ruipérez, M. A., Moro, M., y Ortet, G. (2008). Temperamental traits in mice (II): Consistency across apparatus. *Personality and individual differences*, 46, 3-7.
- Imperato, A., y Di Chiara, G. (1986). Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 239, 219-228.
- Johannesson, M., Lopez-Aumatell, R., Stridh, P., Diez, M., Tuncel, J., Blazquez, G., et al. (2009). A resource for the simultaneous high-resolution mapping of multiple quantitative trait loci in rats: the NIH heterogeneous stock. *Genome Research*, 19, 150-158.
- Joseph, M. H., Datla, K., y Young, A. M. (2003). The interpretation of the measurement of nucleus accumbens dopamine by in vivo dialysis: the kick, the craving or the cognition? *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 27, 527-541.
- Kabbaj, M., y Akil, H. (2001). Individual differences in novelty-seeking behavior in rats: a c-fos study. *Neuroscience*, 106, 535-545.

- Kabbaj, M., Devine, D. P., Savage, V. R., y Akil, H. (2000). Neurobiological correlates of individual differences in novelty-seeking behavior in the rat: differential expression of stress-related molecules. *The Journal of Neuroscience*, 20, 6983-6988.
- Kabbaj, M., Evans, S., Watson, S. J., y Akil, H. (2004). The search for the neurobiological basis of vulnerability to drug abuse: using microarrays to investigate the role of stress and individual differences. *Neuropharmacology*, 47 Supplement 1, 111-122.
- Kamenetzky, G. (2008a). *Etanol y omisión sorpresiva del reforzador* [Ethanol and surprise omission of the booster one]. Tesis de doctorado no publicada. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Kamenetzky, G.V. (2008b). *Etanol y frustración* [Ethanol and frustration]. Manuscrito no publicado.
- Kamenetzky, G., Cuenya, L., Elgier, A., López, S. F., Fosachecha, S., Martin, L., y Mustaca, A.E. (2009). Respuestas de frustración en humanos. *Terapia Psicológica* 27,191-201.
- Kamenetzky, G., V. y Mustaca, A., E. (2005). Modelos Animales para el Estudio del Alcoholismo. *Terapia Psicológica*, junio, 65-72.
- Kamenetzky, G., Mustaca, A. y Papini, M. (2008). An analysis of the anxiolytic effects of etanol on consummatory successive negative contrast. *Avances en Psicología Latinoamericana*, 26(2): 135-144.
- Kamenetzky, G., Mustaca, A.E., Pedrón, V., Cuenya, L., y Papini, M. R. (2009). Ethanol facilitates consummatory extinction. *Behavioural processes*, November, 352- 354.
- Katner, S. N., y Weiss, F. (2001). Neurochemical characteristics associated with ethanol preference in selected alcohol-preferring and -nonpreferring rats: a quantitative microdialysis study. *Alcoholism, Clinic and Experimental Research*, 25, 198-205.
- Kawasaki, K., y Iwasaki, T. (1997). Corticosterone levels during extinction of runway response in rats. *Life Sciences*, 61, 1721-1728.
- Kelley, A. E., Bakshi, V. P., Haber, S. N., Steininger, T. L., Will, M. J., y Zhang, M. (2002). Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum. *Physiology Behavior*, 76, 365-377.
- Khantzian, E. J. (1985). The self-medication hypothesis of addictive disorders: focus on heroin and cocaine dependence. *The American Journal of Psychiatry*, 142, 1259-1264.

- Klebaour, J. E., y Bardo, M.T. (1999). Individual differences in novelty seeking on the playground maze predict amphetamine conditioned place preference. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 6,131-136.
- Koob, G. F., Ahmed, S. H., Boutrel, B., Chen, S. A., Kenny, P. J., Markou, A., et al. (2004). Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. *Neuroscience Biobehavioral Review*, 27, 739-749.
- Koob, G. F., y Le Moal, M. (1997). Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*, 278, 52-58.
- Kreek, M. J., Nielsen, D. A., Butelman, E. R., y LaForge, K. S. (2005). Genetic influences on impulsivity, risk taking, stress responsivity and vulnerability to drug abuse and addiction. *Nature Neuroscience*, 8, 1450-1457.
- Koob, G. F. y Volkov, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1): 217–238.
- Lankford, M. F., Roscoe, A. K., Pennington, S. N., y Myers, R. D. (1991). Drinking of high concentrations of ethanol versus palatable fluids in alcohol-preferring (P) rats: valid animal model of alcoholism. *Alcohol*, 8, 293-299.
- Lansade, L., Bouissou, M-E. y Erhard, H. W. (2008). Fearfulness in horses: a temperament trait stable across time a situations. *Applied animal behavior Science*, 115,182-200.
- Le, A. D., Harding, S., Juzysch, W., Watchus, J., Shalev, U., y Shaham, Y. (2000). The role of corticotrophin-releasing factor in stress-induced relapse to alcohol-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 150, 317-324.
- Le, A.D., y Shaham, Y. (2002). Neurobiology of relapse to alcohol in rats. *Pharmacology and Therapeutics*, 94, 137-156.
- Le Bon, O., Basiaux, P., Streel, E., Tecco, J., Hanak, C., Hansenne, M., et al., (2004). Personality profile and drug of choice; a multivariate analysis using Cloninger's TCI on heroin addicts, alcoholics, and a random population group. *Drug and Alcohol Dependence*, 73, 175-182.
- Le Moal, M., y Koob, G. F. (2007). Drug addiction: pathways to the disease and pathophysiological perspectives. *European Neuropsychopharmacology*, 17, 377-393.
- Lecca, D., Piras, G., Driscoll, P., Giorgi, O., y Corda MG. (2004). A differential activation of dopamine output in the shell and core of the nucleus accumbens is associated with the motor responses to addictive drugs: a brain dialysis study in Roman high- and low-avoidance rats. *Neuropharmacology*, 46,688-699.

- Li, S. X., Wang, Z. R., Li, J., Peng, Z. G., Zhou, W., Zhou, M., et al. (2008). Inhibition of Period1 gene attenuates the morphine-induced ERK-CREB activation in frontal cortex, hippocampus, and striatum in mice. *American Journal Drug Alcohol Abuse*, 34, 673-682.
- Li, T. K., Lumeng, L., McBride, W. J., y Waller, M. B. (1979). Progress toward a voluntary oral consumption model of alcoholism. *Drug and Alcohol Dependence*, 4, 45-60.
- Li, T. K., Lumeng, L., McBride, W. J., y Waller, M. B., (1981). Indiana selected studies on alcohol-related behaviors. *In development animals models pharmacogenetic tools. Rockville, MD: U. S. Departament of Health and Health Science. NIAAA Research Monograph. 6, 161-191.*
- Lobina, C., Agabio, R., Diaz, G., Fa, M., Fadda, F., Gessa, G. L., et al. (1997). Constant absolute ethanol intake by Sardinian alcohol-preferring rats independent of ethanol concentrations. *Alcohol and Alcoholismo*, 32, 19-22.
- López-Aumatell, R., Blazquez, G., Gil, L., Aguilar, R., Canete, T., Gimenez-Llort, L., et al. (2009). The Roman High- and Low-Avoidance rat strains differ in fear-potentiated startle and classical aversive conditioning. *Psicothema*, 21, 27-32.
- Lovinger, D. M., y Crabbe, J. C. (2005). Laboratory models of alcoholism: treatment target identification and insight into mechanisms. *Nature Neuroscience*, 8, 1471-1480.
- Lu, L., Shepard, J. D., Hall, F. S., y Shaham, Y. (2003a). Effect of environmental stressors on opiate and psychostimulant reinforcement, reinstatement and discrimination in rats: a review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27, 457-491.
- Lucas, L. R., Angulo, J. A., Le Moal, M., McEwen, B. S., y Piazza, P. V. (1998). Neurochemical characterization of individual vulnerability to addictive drugs in rats. *European Journal of Neuroscience*, 10, 3153-3163.
- Lynch, W. J., Kushner, M. G., Rawleigh, J. M., Fiszdon, J., y Carroll, M. E. (1999). The effects of restraint stress on voluntary ethanol consumption in rats. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 7, 318-323.
- Mackintosh, N. J. (1974). *Psychology of Animal Learning*. Academic Press.
- Mantsch, J. R., Saphier, D., y Goeders, N. E. (1998). Corticosterone facilitates the acquisition of cocaine self-administration in rats: opposite effects of the type II glucocorticoid receptor agonist dexamethasone. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 287, 72-80.
- Manzo, L., Gómez, M. J., Callejas-Aguilera, J. E., Fernandez- Teruel, A., Papini, M. R., y Torres, C. (2012). Oral ethanol self- administration in imbred Roman high- and

- low-avoidance rats: Gradual versus abrupt ethanol presentation. *Physiology and Behavior*. In press.
- Mardones, J., y Segovia-Riquelme, N. (1983). Thirty-two years of selection of rats by ethanol preference: UChA and UChB strains. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*, 5, 171-178.
- Marinelli, M., y White, F. J. (2000). Enhanced vulnerability to cocaine self-administration is associated with elevated impulse activity of midbrain dopamine neurons. *J Neuroscience*, 20, 8876-8885.
- Martin, J. R., y Baettig, K. (1980). Acquisition and extinction of gustatory aversion in two lines of rats selectively bred for differential shuttlebox avoidance performance. *Behavioural Processes*, 5, 303-310.
- Mathews, I. Z., Wilton, A., Styles, A., y McCormick, C. M. (2008). Increased depressive behaviour in females and heightened corticosterone release in males to swim stress after adolescent social stress in rats. *Behavioural Brain Research*, 190, 33-40.
- McBride, W. J., Murphy, J. M., Lumeng, L., y Li, T. K. (1990). Serotonin, dopamine and GABA involvement in alcohol drinking of selectively bred rats. *Alcohol*, 7, 199-205.
- McLellan, A. T., Lewis, D. C., O'Brien, C. P., y Kleber, H. D. (2000). Drug dependence, a chronic medical illness: implications for treatment, insurance, and outcomes evaluation. *JAMA*, 284, 1689-1695.
- Mehta, P. H., y Gosling, S. D. (2006). How can animal studies contribute to research on the biological bases of personality? In T. Canli. *Biology of Personality and Individual Differences*, 427-448. New York: Guilford.
- Meisch, R. A., y Thompson, T. (1972). Ethanol intake during schedule-induced polydipsia. *Physiology Behavior*, 8, 471-475.
- Mello, N. K., y Mendelson, J. H. (1964). Operant Performance by Rats for Alcohol Reinforcement. A Comparison of Alcohol-Preferring and Nonpreferring Animals. *Quarterly Journal of Studies on Alcohol*, 25, 226-234.
- Meyza, K. Z., Boguszewski, P. M., Nikolaev, E., y Zagrodzka, J. (2009). Diverse sensitivity of RHA/Verh and RLA/Verh rats to emotional and spatial aspects of a novel environment as a result of a distinct pattern of neuronal activation in the fear/anxiety circuit. *Behavior Genetics*, 39, 48-61.

- Misslin, R., Ropartz, P., y Jung, L. (1984). Impairment of responses to novelty by apomorphine and its antagonism by neuroleptics in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 82, 113-117.
- Mitchell, C., y Flaherty, C. (1998). Temporal dynamics of corticosterone elevation in successive negative contrast. *Physiology and Behavior*, 64, 287-292.
- Mitchell, C. P., y Flaherty, C. F. (2005). Differential effects of removing the glucose or saccharin components of a glucose-saccharin mixture in a successive negative contrast paradigm. *Physiology and Behavior*, 84, 579-583.
- Moreno, M., Cardona, D., Gomez, M. J., Sanchez-Santed, F., Tobena, A., Fernandez-Teruel, A., et al. (2010). Impulsivity characterization in the Roman high- and low-avoidance rat strains: behavioral and neurochemical differences. *Neuropsychopharmacology*, 35, 1198-1208.
- Murphy, B. C., Chiu, T., Harrison, M., Uddin, R. K., y Singh, S. M. (2002). Examination of ethanol responsive liver and brain specific gene expression, in the mouse strains with variable ethanol preferences, using cDNA expression arrays. *Biochemical Genetics*, 40, 395-410.
- Mustaca, A. E., Bentosela, M., y Papini, M. R. (2000). Consummatory successive negative contrast in MICE. *Learning and Motivation*, 31, 272-282.
- Mustaca, A., E. Kamenetzky, G. V. (2006). Alcoholismo y ansiedad: modelos animales. *International Journal of Psychology and Psychological Therapy*, 3, 343-364.
- Mustaca, A. E. y Papini, M. R. (2005) Consummatory successive negative contrast induces hypoalgesia. *International Journal of Comparative Psychology* 18, 255-262.
- Myers, R. D., y Tytell, M. (1972). Volitional consumption of flavored ethanol solution by rats: the effects of pCPA, and the absence of tolerance. *Physiology and Behavior*, 8, 403-408.
- Nadal, R., Armario, A., y Janak, PH. (2002). Positive relationship between activity in a novel environment and operant ethanol self-administration in rats. *Psychopharmacology*, 3, 333-338.
- Nash, J. F., Jr., y Maickel, R. P. (1985). Stress-induced consumption of ethanol by rats. *Life Science*, 37, 757-765.
- Nestler, E. J. (2004). Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*, 47 Supplement 1, 24-32.
- Nicola, S. M., y Deadwyler, S. A. (2000). Firing rate of nucleus accumbens neurons is dopamine-dependent and reflects the timing of cocaine-seeking behavior in rats on

- a progressive ratio schedule of reinforcement. *Journal Neuroscience*, 20, 5526-5537.
- Noble, E. P. (2000). Addiction and its reward process through polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene: a review. *European Psychiatry*, 15, 79-89.
- Norris, J. N., Daniel, A. M. y Papini, M. R. (2008). Spontaneous recovery of consummatory behavior, but not of consummatory successive negative contrast. *Learning and Motivation*, 39, 296-312.
- Norton, G. R. (2001). Substance use/abuse and anxiety sensitivity: what are the relationships? *Addictive Behaviors*, 26, 935-946.
- Núñez, M. J., Rivas, M., Riveiro, P., Suarez, J., Balboa, J., Nunez, L. A., et al. (2002). Effects of nefazodone on voluntary ethanol consumption induced by isolation stress in young and aged rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 73, 689-696.
- Observatorio Español Sobre Drogas (2007). Informe 2010. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Oswald, L. M., Mathena, J. R., y Wand, G. S. (2004). Comparison of HPA axis hormonal responses to naloxone vs psychologically-induced stress. *Psychoneuroendocrinology*, 29, 371-388.
- Ouimette, P., Coolhart, D., Funderburk, J. S., Wade, M., y Brown, P. J. (2007). Precipitants of first substance use in recently abstinent substance use disorder patients with PTSD. *Addictive Behaviors*, 32, 1719-1727.
- Paivarinta, P., y Korpi, E. R. (1993). Voluntary ethanol drinking increases locomotor activity in alcohol-preferring AA rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 44, 127-132.
- Papini, M. R. (2003) Comparative psychology of surprising nonreward. *Brain, Behavior and Evolution*, 62, 83-95.
- Papini, M. R. (2006). Role of surprising nonreward in associative learning. *The Japanese Journal of Animal Psychology*, 56, 35-54.
- Papini, M. R. (2009). Role of opioid receptors in incentive contrast. *International Journal of Comparative Psychology* 22:170-187.
- Papini, M. R. y Dudley, T. (1997). Consequences of surprising reward omissions. *Review of General Psychology*, 1, 175-197.
- Papini, M. R., Wood, M., Daniel, A. M. y Norris, J. N. (2006b). Reward loss as psychological pain. *International Journal of Psychology and Psychological Therapy*, 6, 189-213.

- Parker, L. F., y Radow, B. L. (1974). Isolation stress and volitional ethanol consumption in the rat. *Physiology and Behavior*, *12*, 1-3.
- Pawlak, C. R., Ho, Y. J., y Schwarting, R. K. (2008). Animal models of human psychopathology based on individual differences in novelty-seeking and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *32*, 1544-1568.
- Pawlak, C. R., y Schwarting, R. K. (2002). Object preference and nicotine consumption in rats with high vs. low rearing activity in a novel open field. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *73*, 679-687.
- Pawlak, C. R., y Schwarting, R. K. (2005). Repeated nicotine treatment in rats with high versus low rearing activity: analyses of behavioural sensitisation and place preference. *Psychopharmacology (Berl)*, *178*, 440-450.
- Pecoraro, N., de Jong, H., Ginsberg, A. B., y Dallman, M. F. (2008). Lesions of the medial prefrontal cortex enhance the early phase of psychogenic fever to unexpected sucrose concentration reductions, promote recovery from negative contrast and enhance spontaneous recovery of sucrose-entrained anticipatory activity. *Neuroscience*, *153*, 901-917.
- Pellegrini, S. y Mustaca, A. E. (2000). Successive negative consummatory contrast effect with solid food as reinforcer. *Learning & Motivation*, *31*, 200-209.
- Pellegrini, S., Muzio, R. N., Mustaca, A. E., y Papini, M. R. (2004). Successive negative contrast after partial reinforcement in the consummatory behavior of rats. *Learning & Motivation*, *35*, 303-321.
- Pellegrini, S., Wood, M., Daniel, A. M., y Papini, M. R. (2005). Opioid receptors modulate recovery from consummatory successive negative contrast. *Behavioural Brain Research*, *164*, 239-249.
- Pelloux, Y., Costentin, J. y Duterte-Boucher D. (2006). Novelty preference predicts place preference conditioning to morphine and its oral consumption in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *84*, 43-50.
- Pisula, W. (2003). The Roman high- and low-avoidance rats respond differently to novelty in a familiarized environment. *Behavioural Processes*, *63*: 63-72.
- Pettit, H. O., Ettenberg, A., Bloom, F. E., y Koob, G. F. (1984). Destruction of dopamine in the nucleus accumbens selectively attenuates cocaine but not heroin self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *84*, 167-173.

- Piazza, P. V., Deminiere, J. M., Le Moal, M., y Simon, H. (1989). Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science*, *245*, 1511-1513.
- Piazza, P. V., Deminiere, J. M., Maccari, S., Mormede, P., Le Moal, M., y Simon, H. (1990). Individual reactivity to novelty predicts probability of amphetamine self-administration. *Behavioural pharmacology*, *1*, 339-345.
- Piazza, P. V., Deroche-Gamont, V., Rouge-Pont, F., y Le Moal, M. (2000). Vertical shifts in self-administration dose-response functions predict a drug-vulnerable phenotype predisposed to addiction. *The Journal of Neuroscience*, *20*, 4226-4232.
- Piazza, P. V., y Le Moal, M. (1998). The role of stress in drug self-administration. *Trends in Pharmacological Sciences*, *19*, 67-74.
- Piazza, P. V., Rouge-Pont, F., Deminiere, J. M., Kharoubi, M., Le Moal, M., y Simon, H. (1991). Dopaminergic activity is reduced in the prefrontal cortex and increased in the nucleus accumbens of rats predisposed to develop amphetamine self-administration. *Brain Research*, *567*, 169-174.
- Pierce, R. C., Crawford, C. A., Nonneman, A. J., Mattingly, B. A., y Bardo, M. T. (1990). Effect of forebrain dopamine depletion on novelty-induced place preference behavior in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *36*, 321-325.
- Piras, G., Lecca, D., Corda, M. G., y Giorgi, O. (2003). Repeated morphine injections induce behavioural sensitization in Roman high- but not in Roman low-avoidance rats. *Neuroreport*, *14*, 2433-2438.
- Pollock, J. D. (2002). Gene expression profiling: methodological challenges, results, and prospects for addiction research. *Chemistry and Physics of Lipids*, *121*, 241-256.
- Razafimanalina, R., Mormede, P., y Velly, L. (1996). Gustatory preference-aversion profiles for saccharin, quinine and alcohol in Roman high- and low-avoidance lines. *Behavioural Pharmacology*, *7*, 78-84.
- Rebec, G. V., Grabner, C. P., Johnson, M., Pierce, R. C., y Bardo, M. T. (1996). Transient increases in catecholaminergic activity in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens shell during novelty. *Neuroscience*, *76*, 707-714.
- Rebec, G. V., Grabner, C. P., Pierce, R. C., y Bardo, M. T. (1994). Voltammetry in freely moving rats: novelty-dependent increases in accumbal DOPAC, *Society for Neuroscience Abstracts*, *20*: 826.

- Ribeiro Do Couto, B.; Aguilar, M.A; Manzanedo, C.; Rodríguez-Arias, M; Armario, A., Miñarro, J. (2006). Social stress is as effective as physical stress in reinstating morphine-induced place preference in mice. *Psychopharmacology*, 185, 459-470.
- Richter, C. P., y Campbell, K. H. (1940). Alcohol Taste Thresholds and Concentrations of Solution Preferred by Rats. *Science*, 91, 507-508.
- Ritz, M. C., George, F. R., y Meisch, R. A. (1989). Ethanol self-administration in ALKO rats: I. Effects of selection and concentration. *Alcohol*, 6, 227-233.
- Ritz, M. C., George, F. R., y Meisch, R. A. (1989). Ethanol self-administration in ALKO rats: II. Effects of selection and fixed-ratio size. *Alcohol*, 6, 235-239.
- Roberts, D. C., y Vickers, G. (1984). Atypical neuroleptics increase self-administration of cocaine: an evaluation of a behavioural screen for antipsychotic activity. *Psychopharmacology (Berl)*, 82, 135-139.
- Robbins, T. W., y Everitt, B. J. (1999). Drug addiction: bad habits add up. *Nature*, 398, 567-570.
- Robinson, T. E., y Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 18, 247-291.
- Robinson, T. E., y Berridge, K. C. (2001). Incentive-sensitization and addiction. *Addiction*, 96, 103-114.
- Rockman, G. E., Hall, A., y Glavin, G. B. (1986). Effects of restraint stress on voluntary ethanol intake and ulcer proliferation in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 25, 1083-1087.
- Rockman, G. E., Hall, A. M., Markert, L., Glavin, G. B., y Pare, W. P. (1987). Ethanol-stress interaction: immediate versus delayed effects of ethanol and handling on stress responses of ethanol-consuming rats. *Alcohol*, 4, 391-394.
- Rodgers, D. A., y McCleam, C. G. (1962). Mouse strain differences in preference for various concentrations of alcohol. *Quarterly Journal of Studies on Alcohol*, 23, 26-33.
- Rosas, J. M., Callejas-Aguilera, J. E., Escarabajal, M. D., Gómez, M. J., de la Torre, L., Agüero, A., et al. (2007). Successive negative contrast effect in instrumental runway behaviour: a study with Roman high- (RHA) and Roman low- (RLA) avoidance rats. *Behavioural Brain Research*, 185, 1-8.
- Roske, I., Baeger, I., Frenzel, R., y Oehme, P. (1994). Does a relationship exist between the quality of stress and the motivation to ingest alcohol? *Alcohol*, 11, 113-124.

- Rouge-Pont, F., Piazza, P. V., Kharouby, M., Le Moal, M., y Simon, H. (1993). Higher and longer stress-induced increase in dopamine concentrations in the nucleus accumbens of animals predisposed to amphetamine self-administration. A microdialysis study. *Brain Research*, 602, 169-174.
- Saal, D., Dong, Y., Bonci, A. y Malenka, R.C. (2003). Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron*, 37: 577-582.
- Sabariego, M., Gomez, M. J., Moron, I., Torres, C., Fernandez-Teruel, A., Tobena, A., et al.(2011) Differential gene expression between inbred Roman high- (RHA-I) and low- (RLA-I) avoidance rats. *Neurosciences Letters*, 504, 265-270.
- Salles, J., Lopez de Jesus, M., Goni, O., Fernandez-Teruel, A., Driscoll, P., Tobena, A., et al. (2001). Transmembrane signaling through phospholipase C in cortical and hippocampal membranes of psychogenetically selected rat lines. *Psychopharmacology (Berl)*, 154, 115-125.
- Samson, H. H. (1986). Initiation of ethanol reinforcement using a sucrose-substitution procedure in food- and water-sated rats. *Alcoholism Clinical Experimental Research*, 10, 436-442.
- Satinder, K. P. (1975). Interactions of age, sex and long-term alcohol intake in selectively bred strains of rats. *Journal of Studies on Alcohol*, 36, 1493-1507.
- Scully, J.A., Tosi, H., y Banning, K. (2000). Life event checklists: Revisiting the social Readjustment Rating Scale after 30 years. *Educational and Psychological Measurement* 60: 864-876.
- Shaham, Y., y Stewart, J. (1994). Exposure to mild stress enhances the reinforcing efficacy of intravenous heroin self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 114, 523-527.
- Siegel, S. (1977). Morphine tolerance acquisition as an associative process. *Journal Experimental Psychology, Animal Behavior Process*, 3, 1-13.
- Siegel, J., Sisson, D. F., y Driscoll, P. (1993). Augmenting and reducing of visual evoked potentials in Roman high- and low-avoidance rats. *Physiology Behavior*, 54, 707-711.
- Siegmund, S., Vengeliene, V., Singer, M. V., y Spanagel, R. (2005). Influence of age at drinking onset on long-term ethanol self-administration with deprivation and stress phases. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 29, 1139-1145.

- Sluyter, F., Hof, M., Ellenbroek, B. A., Degen, S. B., y Cools, A. R. (2000). Genetic, sex, and early environmental effects on the voluntary alcohol intake in Wistar rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *67*, 801-808.
- Smits, J. A., Telch, M. J., y Randall, P. K. (2002). An examination of the decline in fear and disgust during exposure-based treatment. *Behaviour Research and Therapy*, *40*, 1243-1253.
- Sommer, W. H., Rimondini, R., Hansson, A. C., Hipskind, P. A., Gehlert, D. R., Barr, C. S., et al. (2008). Upregulation of voluntary alcohol intake, behavioral sensitivity to stress, and amygdala *crhr1* expression following a history of dependence. *Biological Psychiatry*, *63*, 139-145.
- Spanagel, R. (2000). Recent animal models of alcoholism. *Alcohol Reserch Health*, *24*, 124-131.
- Spanagel R. (2002) Behavioral and molecular aspects of alcohol craving and relapse. In: Maldonado R, ed. Molecular biology of drug addiction. Totowa, N.J.: Humana Press: 372-376.
- Spanagel, R. (2003). Alcohol addiction research: from animal models to clinics. *Best Practice Reserch Clinic Gastroenterology*, *17*, 507-518.
- Spanagel, R., y Holter, S. M. (1999). Long-term alcohol self-administration with repeated alcohol deprivation phases: an animal model of alcoholism? *Alcohol and Alcoholism*, *34*, 231-243.
- Spyraki, C., Fibiger, H. C., y Phillips, A. G. (1982). Cocaine-induced place preference conditioning: lack of effects of neuroleptics and 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Research*, *253*, 195-203.
- Spyraki, C., Fibiger, H. C., y Phillips, A. G. (1983). Attenuation of heroin reward in rats by disruption of the mesolimbic dopamine system. *Psychopharmacology (Berl)*, *79*, 278-283.
- Stead, J. D., Clinton, S., Neal, C., Schneider, J., Jama, A., Miller, S., et al. (2006). Selective breeding for divergence in novelty-seeking traits: heritability and enrichment in spontaneous anxiety-related behaviors. *Behavior Genetics*, *36*, 697-712.
- Steimer, T., y Driscoll, P. (2003). Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress*, *6*, 87-100.
- Steimer, T., y Driscoll, P. (2005). Inter-individual vs line/strain differences in psychogenetically selected Roman High-(RHA) and Low-(RLA) Avoidance rats:

- neuroendocrine and behavioural aspects. *Neuroscience Biobehavioral Review*, 29, 99-112.
- Steimer, T., Escorihuela, R. M., Fernandez-Teruel, A., y Driscoll, P. (1998). Long-term behavioural and neuroendocrine changes in Roman high-(RHA/Verh) and low-(RLA-Verh) avoidance rats following neonatal handling. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 16, 165-174.
- Steimer, T., la Fleur, S., y Schulz, P. E. (1997). Neuroendocrine correlates of emotional reactivity and coping in male rats from the Roman high (RHA/Verh)- and low (RLA/Verh)-avoidance lines. *Behavior Genetics*, 27, 503-512.
- Suto, N., Austin, J. D., y Vezina, P. (2001). Locomotor response to novelty predicts a rat's propensity to self-administer nicotine. *Psychopharmacology (Berlin)*, 158, 175-180.
- Szumliński, K. K., Ary, A.W. y Lominac, K.D. (2008a). Homers regulate drug-induced neuroplasticity: Implications for addiction. *Biochem Pharmacol* 75, 112-133.
- Szumliński, K. K., Ary, A. W., Lominac, K. D., Klugmann, M., y Kippin, T. E. (2008b). Accumbens Homer2 overexpression facilitates alcohol-induced neuroplasticity in C57BL/6J mice. *Neuropsychopharmacology*, 33, 1365-1378.
- Szumliński, K. K., Kalivas, P. W., y Worley, P. F. (2006). Homer proteins: implications for neuropsychiatric disorders. *Current Opinion Neurobiology*, 16, 251-257.
- Thiel, C. M., Muller, C. P., Huston, J. P., y Schwarting, R. K. (1999). High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience*, 93, 243-251.
- Thomas, B.L., y Papini, M.R. (2003). Mechanisms of spaced-trial runway extinction in pigeons. *Learning and Motivation*, 34, 104-126
- Thorsell, A., Slawecki, C. J., Khoury, A., Mathe, A. A., y Ehlers, C. L. (2005). Effect of social isolation on ethanol consumption and substance P/neurokinin expression in Wistar rats. *Alcohol*, 36, 91-97.
- Tiffany, S. T. (1990). A cognitive model of drug urges and drug-use behavior: role of automatic and nonautomatic processes. *Psychology Review*, 97, 147-168.
- Torres, C. (2012). Reward Loss and Gene Expression in Roman High- and Low- Avoidance Rats. *Comunicación presentada en el 2012 Annual Convention of the American Psychological Association* (Orlando, EEUU).
- Torres, C., Candido, A., Escarabajal, M. D., de la Torre, L., Maldonado, A., Tobena, A., et al. (2005a). Successive negative contrast in one-way avoidance learning in female Roman rats. *Physiology Behavior*, 85, 377-382.

- Torres, C., y Escarabajal, M. D. (2005b). Psicofarmacología: Una aproximación histórica. *Anales de Psicología*, 2, 199-212.
- Turner, C. A., Flagel, S. B., Clinton, S. M., Akil, H., y Watson, S. J. (2008). Cocaine interacts with the novelty-seeking trait to modulate FGFR1 gene expression in the rat. *Neuroscience Letters*, 446, 105-107.
- Tzschentke, T. M. (1998). Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Progress in Neurobiology*, 56, 613-672.
- Tzschentke, T. M. (2001). Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Progress in Neurobiology*, 63, 241-320.
- Ungless, M. A., Argilli, E., y Bonci, A. (2010). Effects of stress and aversion on dopamine neurons: implications for addiction. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 35, 151-156.
- van der Kam, E. L., Coolen, J. C., Ellenbroek, B. A., y Cools, A. R. (2005). The effects of stress on alcohol consumption: mild acute and sub-chronic stressors differentially affect apomorphine susceptible and unsusceptible rats. *Life Science*, 76, 1759-1770.
- van der Kam, E. L., Ellenbroek, B. A., y Cools, A. R. (2005). Gene - environment interactions determine the individual variability in cocaine self-administration. *Neuropharmacology*, 48, 685-695.
- Vengeliene, V., Sigmund, S., Singer, M. V., Sinclair, J. D., Li, T. K., y Spanagel, R. (2003). A comparative study on alcohol-preferring rat lines: effects of deprivation and stress phases on voluntary alcohol intake. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 27, 1048-1054.
- Volkow, N. D., y Li, T. K. (2004). Drug addiction: the neurobiology of behavior gone awry. *Nature Review Neuroscience*, 5, 963-970.
- Volpicelli, J., Tiven, J., y Kimmel, S., C. (1982). The relationship between tension reduction and ethanol consumption in rats. *Physiological Psychology*, 10, 114-116.
- Waldrop, A. E., Back, S. E., Brady, K. T., Upadhyaya, H. P., McRae, A. L., y Saladin, M. E. (2007). Daily stressor sensitivity, abuse effects, and cocaine use in cocaine dependence. *Addictive Behaviors*, 32, 3015-3025.
- Waller, S., y Lorch, B. (1978). Social and psychological characteristics of alcoholics: a male--female comparison. *The International Journal of the Addictions*, 13, 201-212.

- West, A. R., Floresco, S. B., Charara, A., Rosenkranz, J. A., y Grace, A. A. (2003). Electrophysiological interactions between striatal glutamatergic and dopaminergic systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1003, 53-74.
- Wise, R. A. (1998). Drug-activation of brain reward pathways. *Drug and Alcohol Dependence*, 51, 13-22.
- Wolffgramm, J., y Heyne, A. (1995). From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat. *Behavioural Brain Research*, 70, 77-94.
- Wood, W. G. (1976). Associated differences in response to alcohol in rats and mice: biochemical and behavioral review. *Experimental Aging Research*, 2, 543-562.
- Yap, J. J., y Miczek, K. A. (2008). Stress and Rodent Models of Drug Addiction: Role of VTA-Accumbens-PFC-Amygdala Circuit. *Drug Discovery. Today Disease Models*, 5, 259-270.
- Yee, B.K., Feldon, J., y Rawlins, J.N.P. (1997). Cytotoxic lesions of the retrohippocampal region attenuate latent inhibition but spare the partial reinforcement extinction effect. *Experimental Brain Research*, 115, 247-256.
- Yokel, R. A., y Wise, R. A. (1975). Increased lever pressing for amphetamine after pimozide in rats: implications for a dopamine theory of reward. *Science*, 187, 547-549.
- Zeier, H., Baettig, K., y Driscoll, P. (1978). Acquisition of DRL-20 behavior in male and female, Roman high- and low-avoidance rats. *Physiology Behavior*, 20, 791-793.
- Zuckerman, M. (1974). The sensation seeking motive. *Progress in Experimental Personality Research*, 7, 79-148.
- Zuckerman, M. (1993). P-impulsive sensation seeking and its behavioral, psychophysiological and biochemical correlates. *Neuropsychobiology*, 28, 30-36.
- Zuckerman, M. (1994a). *Behavioral expressions and biosocial bases of sensation seeking*. New York: Cambridge University Press.
- Zuckerman, M. (1994b). *Impulsive unsocialized sensation seeking: the biological foundations of a basic dimension of personality*. In: *Temperament: individual differences at the interface of biology and behavior* (Bates JE, Wachs TD, eds). Washington DC: American Psychology Association.
- Zuckerman, M. (1996). The psychobiological model for impulsive unsocialized sensation seeking: a comparative approach. *Neuropsychobiology*, 34, 125-129.