



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

“Establecimiento de la Autoadministración Operante de Alcohol en Ratas UChB”

PATROCINANTE

Prof. Mario Rivera Meza.

Laboratorio de Farmacología Experimental

Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas

Universidad de Chile

DIRECTOR

Prof. Mario Rivera Meza.

Laboratorio de Farmacología Experimental

Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas

Universidad de Chile

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

Diego Fernando Lagos García

Santiago de Chile

2020

FINANCIAMIENTO

Esta memoria se desarrolló en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y en el Programa de Farmacología Molecular y Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Fue financiada por los siguientes proyectos: DQFT2018-1, DQFT2019-2 (M. Rivera), PII 2018 (M. Rivera).

CONGRESOS Y PUBLICACIONES

Los resultados de los experimentos desarrollados en esta tesis y actividades complementarias han dado origen a las siguientes presentaciones a congresos y publicaciones:

• Congresos

Lagos D, Quintanilla ME, Israel Y, Rivera-Meza M.

“Establishment of the Experimental Variables of Oral Operant Self-Administration of Alcohol in UChB Rats”. IX Reunión de la Latinoamerican Society for Biomedical Research on Alcoholism (LASBRA); 7-9 de noviembre 2019, Córdoba, Argentina.

Rivera-Meza M, Quintanilla ME, Vásquez D, **Lagos D**, Rojas B, Herrera-Marschitz M, Israel Y. “La administración de Alda-1, un activador de la deshidrogenasa aldehídica 2 (ALDH2), reduce de forma dosis-dependiente el consumo de etanol en ratas”. XL Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. Santa Cruz, Chile, 13-16 de noviembre de 2018. *Rev. Farmacol. Chile* (2018) 11 (1):86

• Publicaciones

Rivera-Meza M, Vásquez D, Quintanilla ME, **Lagos D**, Rojas B; Herrera-Marschitz M, Israel Y. Activation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) by ALDA-1 reduces both the acquisition and maintenance of ethanol intake in rats: a dual mechanism? *Neuropharmacology* **146**:175-183, 2019.

Quiroz G, Sotomayor-Zárate R, González-Gutiérrez J, Vizcarra F, Moraga F, Bermúdez I, Reyes-Parada M, Quintanilla ME, **Lagos D**, Rivera-Meza M, Iturriaga-Vásquez P. UFR2709, a nicotinic acetylcholine receptor antagonist, decreases ethanol intake in alcohol-preferring rats. *Frontiers in Pharmacology* **10**:1429, 2019.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar mis agradecimientos a quien me dio la oportunidad de hacer algo que a la larga encontré muy apasionante, que fue trabajar en el área de la investigación del alcoholismo y las adicciones. La invitación a trabajar en su laboratorio me abrió las puertas a esta área que me es muy interesante por la transversalidad de las disciplinas que lo estudian (farmacología, bioquímica y psiquiatría, entre otras), también a la oportunidad de presentar mi trabajo a la comunidad científica LASBRA en noviembre del año 2019. Por esto y por su inmenso apoyo durante el desarrollo de este trabajo, le agradezco al Prof. Mario Rivera.

La totalidad de los experimentos en esta memoria fueron realizados en el laboratorio de la Prof. María Elena Quintanilla, quien me acogió cálidamente, y me ayudó y guio con su extensa experiencia en el área. Agradecerle a Don Juan Santibáñez le agradezco por su gran apoyo durante mi memoria y por enseñarme todo acerca de lo especial que son ratas. Agradecerle al Dr. Israel, nuevamente a la Dra. Quintanilla y a la Dra. Morales por evaluar el anteproyecto de esta memoria. También a todas las personas de los laboratorios de Farmacología del Alcoholismo y Neurobioquímica de la Facultad de Medicina, quienes me incluyeron en diversas actividades de celebración.

Agradecer a mis padres por la paciencia, amor y apoyo incondicional con las que me permitieron estudiar. A mi hermano por ser un gran compañero. Y principalmente a Carla, quien fue mi cable a tierra cuando las cosas no estaban yendo bien y también por su gran apoyo e interés para que todo saliera bien para mí.

Finalmente, agradecerles a los 28 animales que me mostraron una luz de humildad en la experimentación animal, ya que ellos tienen un importante rol en el desarrollo científico. Nunca pensé en trabajar con animales tan impresionantes como las ratas.

INDICE GENERAL

FINANCIAMIENTO	I
PUBLICACIONES Y CONGRESOS	II
AGRADECIMIENTOS	III
INDICE GENERAL	IV
INDICE DE FIGURAS	V
INDICE DE FIGURAS	VII
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	IX
SUMMARY	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Alcoholismo, realidad en Chile.....	1
1.2. Farmacoterapia actual del alcoholismo.....	2
1.3. Modelos animales de alcoholismo.....	3
1.4. Paradigmas de autoadministración en animales.....	4
1.5. Variables asociadas a un estudio de autoadministración de alcohol en ratas.....	5
1.6. Objetivo de este trabajo.....	6
2. HIPOTESIS	7
3. OBJETIVO GENERAL	7
3.1. Objetivos específicos.....	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1. Soluciones.....	8
4.2. Animales y Mantención.....	8
4.3. Manipulación de los animales.....	9
4.4. Consumo voluntario de soluciones (etanol).....	10
4.5. Aparatos.....	11
4.6. Programación del software.....	15
4.6.1. Sesión de asociación.....	15
4.6.2. Sesión de Autoadministración tipo 1.....	15
4.6.3 Sesión de Autoadministración tipo 2.....	15
4.7. Determinación de alcoholemia.....	16

4.8. Grupo experimental 1 (Saccharin to ethanol fading).....	17
4.9. Grupo experimental 2 (Pre-exposicion a etanol y privación).....	18
4.10. Grupo experimental 3 (Pre-exposicion a etanol y restricción 1h).....	19
4.11. Grupo experimental 4 (Sin tratamiento, control).....	19
4.12. Análisis Estadístico.....	20
5. RESULTADOS	21
5.1. Establecimiento de la autoadministración operante de etanol en ratas UChB mediante el método “saccharin to ethanol fading”.....	21
5.2. Establecimiento de la autoadministración operante de etanol en ratas UChB pre-expuestas al consumo de etanol en libre acceso.....	27
5.3. Establecimiento de la autoadministración operante de etanol en ratas UChB pre-expuestas al consumo de etanol restringido a 1 hora.....	30
5.4. Establecimiento de la autoadministración operante de etanol en ratas UChB sin tratamiento previo.....	33
5.5. Resumen de resultados.....	35
6. DISCUSIÓN	38
6.1. Grupo 1 (Saccharin to Ethanol fading).....	38
6.2. Grupo 2 (Pre-Exposicion a etanol y privación).....	42
6.3. Grupo 3 (Pre-exposicion a etanol y consumo voluntario restringido).....	43
6.4. Grupo 4 (Sin tratamiento previo, control).....	44
6.5. Variables no estudiadas.....	45
7. CONCLUSIONES	48
8. REFERENCIAS	49
9. ANEXO	53

INDICE DE FIGURAS

Figura 1A. Fotografía de la cámara de autoadministración Habitest.....	11
Figura 1B. Fotografía de la pared lateral interna izquierda de la cámara de autoadministración	
Figura 2A. Fotografía de la pared lateral interna derecha de la cámara de autoadministración.	
Figura 2B. Fotografía de la bomba de infusión con una jeringa de 20 ml montada en su riel	
Figura 3A. Fotografía del cubículo de aislamiento	

- Figura 3B.** Fotografía de la tarjeta de conexiones
- Figura 4.** Fotografía del Habitest Linc
- Figura 5.** Fotografía del computador
- Figura 6.** Autoadministración operante de sacarina 0,1% en ratas UChB
- Figura 7.** Efecto del aumento del requerimiento de presiones en la autoadministración operante de sacarina 0,1% en ratas UChB
- Figura 8.** Efecto del aumento de requerimiento de presiones en la autoadministración operante de sacarina 0.1% en ratas UChB
- Figura 9.** Autoadministración operante de solución “cocktail” (sacarina 0.075% + etanol 2%) en ratas UChB expuestas al método de saccharin to ethanol fading
- Figura 10.** Autoadministración operante de solución “cocktail” (sacarina 0.075% + etanol 2%) y solución etanol 5% en ratas expuestas al método de saccharin to ethanol fading
- Figura 11.** Número de dosis durante la etapa final del método de saccharin to ethanol fading
- Figura 12.** Consumo de etanol durante la etapa final del método de inducción al consumo operante de etanol
- Figura 13.** Autoadministración operante de solución etanol 10% en ratas expuestas al método de saccharin to ethanol fading
- Figura 14.** Consumo diario de etanol en ratas UChB expuestas al consumo voluntario de etanol bajo el paradigma de libre elección entre dos botellas
- Figura 15.** Promedio de presiones según sesión de autoadministración en ratas UChB pre-expuestas al consumo voluntario de etanol
- Figura 16.** Consumo promedio de etanol según sesión de autoadministración en ratas UChB pre-expuestas al consumo voluntario de etanol
- Figura 17.** Consumo de etanol en ratas UChB bajo un paradigma de acceso restringido de 1 hora
- Figura 18.** Presiones activas promedio en sesiones de autoadministración de etanol en ratas UChB pre-expuestas al consumo restringido de etanol
- Figura 19.** Consumo promedio de etanol según sesión de autoadministración operante en ratas UChB pre-expuestas al consumo voluntario restringido de etanol
- Figura 20.** Consumo de etanol bajo el paradigma acceso restringido a 1 h en ratas UChB del grupo 3
- Figura 21** Número de presiones activas en Ratas UChB del grupo 4
- Figura 22.** Consumo de etanol en Ratas UChB del grupo 4
- Figura 23.** Resumen de los resultados de presión de palanca y consumo operante de etanol en los 4 grupos experimentales

Figura 24. Presiones de palanca acumuladas en el tiempo en la última sesión de autoadministración operante para cada uno de los 4 grupos experimentales

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla resumen grupo experimental 1

ABREVIATURAS

UChB:	Ratas Universidad de Chile “bebedoras”
UChA:	Ratas Universidad de Chile “abstemias”
OMS:	Organización Mundial de la Salud
SENDA:	Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol
UBE:	Unidad de bebida estándar
FDA:	Food and Drugs Administration
GABA:	Ácido gama-aminobutírico
FR:	Fixed Ratio
SAs:	Sesiones de Asociación
ANOVA:	Analysis of Variance
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography

RESUMEN

La rata UChB es un modelo animal de alcoholismo caracterizado por su alto consumo voluntario de etanol, el cual se verifica bajo el paradigma de libre acceso a dos botellas (agua y alcohol 10%). Sin embargo, el consumo de etanol bajo un paradigma de autoadministración operante (Caja de Skinner) nunca ha sido estudiado en ratas UChB. A diferencia del paradigma de libre acceso a dos botellas, en la autoadministración operante es posible medir: i) la motivación por el consumo de alcohol y ii) el trabajo que el animal está dispuesto a realizar para consumir alcohol. El objetivo de este estudio fue establecer las condiciones experimentales óptimas que permitan la autoadministración operante de etanol en ratas UChB. Veintiocho ratas UChB macho (170-200g) de 60 días de edad, fueron asignadas a 4 grupos experimentales diferentes. El grupo 1 fue previamente entrenado a presionar la palanca utilizando un esquema de “*saccharin to ethanol fading*”; el grupo 2 fue pre-expuesto a 28 días de libre acceso al consumo de alcohol seguido de 7 días de privación; el grupo 3 fue pre-expuesto expuesto a 28 días de libre acceso al consumo de alcohol seguido de 14 días de consumo de alcohol restringido a una hora; el grupo 4 no tuvo ningún tratamiento previo. Luego, los animales fueron expuestos a sesiones de autoadministración operante de alcohol en cajas Skinner equipadas con 2 palancas (una activa y otra inactiva). En sesiones de 1 hora, el cumplimiento de un requisito fijo de presiones de palanca (FR1-4) resultaba en la entrega de 0,1 ml de etanol 10% y un estímulo sonoro. Se registró para cada grupo el consumo de etanol y el número de presiones cuando los animales estabilizaron sus respuestas en FR4. Los resultados mostraron que en comparación con el grupo control (G4), los animales entrenados con sacarina (G1) mostraron un mayor número de presiones activas (156.3 ± 6.3 vs 84.7 ± 4.2 presiones activas/h; $p < 0.001$) y consumo de etanol (0.65 ± 0.02 vs 0.43 ± 0.02 g etanol/kg/h; $p < 0.001$). Los animales pre-expuestos al consumo de etanol (G2 y G3) mostraron un menor número de presiones activas y consumo de etanol que el grupo control. Se concluyó que un tratamiento previo no es necesario para establecer la autoadministración operante de alcohol en ratas UChB. Sin embargo, un entrenamiento previo bajo el esquema *saccharin to ethanol fading* aumenta el consumo de etanol bajo condiciones operantes.

SUMMARY

Establishment of the experimental variables for oral operant self-administration of alcohol in UChB rats

The UChB rat is an animal model of alcoholism characterized by its high voluntary intake of alcohol, which is verified under a two-bottle free-choice paradigm (water and 10% ethanol). However, the alcohol consumption of UChB under an operant self-administration (Skinner box) paradigm has never been studied. Unlike the two-bottle free-choice paradigm, in the operant self-administration paradigm it is possible to measure: i) the motivation for alcohol consumption and ii) the work that the animal is willing to do. The aim of this study was to establish the optimal experimental conditions allowing the operant self-administration of alcohol in UChB rats. Twenty-eight male UChB rats (60 days-old) weighing 170-200g were assigned to 4 different experimental groups. Group 1 was previously trained into bar pressing using a saccharin-fading schedule; Group 2 was pre-exposed to 28 days of two-bottle free-choice ethanol consumption followed by 7 days of deprivation; Group 3 was pre-exposed to 28 days of free-choice ethanol consumption followed by 7 days of ethanol access for 1 hour/day; Group 4 had no prior treatment (control). After that, animals were exposed to operant alcohol self-administration sessions in a Skinner box equipped with two levers (active and inactive). Sessions were 1-hour long, where a fixed number of bar pressings (fixed ratio: 1-4) result in the delivery of 0.1 ml of 10% ethanol and a sound cue. Measurement of the amount of ethanol consumed and the number of active lever pressing were made when animals stabilize their response under a fixed ratio 4. Results showed that compared to control rats (G4), animals previously trained into bar pressing (saccharin fading, G1) showed a higher number of active lever presses (156.3 ± 6.3 vs 84.7 ± 4.2 lever presses/h; $p < 0.001$) and ethanol consumption (0.65 ± 0.02 vs 0.43 ± 0.02 g ethanol/kg/h; $p < 0.001$). Interestingly, animals previously exposed to ethanol consumption (G2 and G3) showed a lower number of lever pressing and ethanol consumption than control rats. We conclude that is not necessary a previous treatment to establish the operant self-administration of alcohol in UChB rats. However, a previous training into bar pressing using a saccharin-fading paradigm can increase the ethanol consumption under operant conditions by UChB rats.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Alcoholismo, realidad en Chile

El alcoholismo tiene consecuencias sociales y sanitarias graves para el individuo y la sociedad, ya que provoca daños en la salud de quien lo padece y tiene repercusiones en el ambiente social del mismo. Se estima que el consumo excesivo de alcohol es responsable anualmente de 3.3 millones de muertes de la población mundial (OMS, 2014), y factor causal de 200 enfermedades y trastornos psiquiátricos (por ejemplo: enfermedad cardíaca, enfermedad hepática, cáncer hepático o trastornos depresivos unipolares). La última encuesta realizada por el Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol (SENDA) estimó que la prevalencia mensual de consumo de alcohol en Chile es de 48,9%, y que la prevalencia mensual de consumo intenso o “binge drinking” (5 o más tragos para hombres y 4 o más para mujeres, en 2 horas) corresponde un 43,6% de la población consumidora de alcohol (Estudio Nacional de Drogas en Población General, 2015). En Chile, el consumo de alcohol es un factor de riesgo de muerte o discapacidad, y se relaciona con el 12,4% de los años de vida saludables perdidos por muerte o discapacidad de cualquier origen, lo cual duplica al impacto de la obesidad en este índice (SENDA, 2016).

El abuso de alcohol es el consumo excesivo de alcohol, y la OMS lo define como el consumo de más de 5 unidades de bebida estándar (UBE) para hombres y 4 UBE para mujeres por ocasión. Una UBE equivale a 10 g de alcohol por bebida, y en comparación, corresponde a 120 mL de vino con una graduación alcohólica de 12°. En Chile, la cantidad estándar de alcohol, de acuerdo con las costumbres de consumo en el país corresponde a 15,5 g de alcohol puro por bebida, es decir, esa es la cantidad promedio de alcohol puro por cada bebida (Encuesta Nacional de la Salud, 2010).

El alcoholismo es una enfermedad neuro-psiquiátrica recurrente y crónica caracterizada por el consumo compulsivo de alcohol, la pérdida de control sobre su consumo y un estado emocional negativo cuando se suspende su consumo (NIAAA, 2018).

1.2. Farmacoterapia actual del alcoholismo

Entre los fármacos aprobados por la Agencia para Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA) para el tratamiento del alcoholismo encontramos a la naltrexona, disulfiram y acamprosato. La **naltrexona**, es un antagonista μ -opiáceo que actúa disminuyendo la

liberación de dopamina en respuesta al consumo de alcohol, lo cual se traduce en una disminución de la ansia de beber alcohol. Estudios clínicos indican que es bien tolerado y es seguro, pero su efectividad depende de la capacidad del paciente por mantenerse abstemio, por lo que solo es indicado en pacientes con este objetivo (SAMHSA & NIAAA, 2015; Shen, 2018). El **acamprosato** es un modulador alostérico positivo de los receptores GABA_A y antagonista de los receptores NMDA que contrarresta el desequilibrio provocado por la exposición crónica al alcohol en los sistemas glutamatérgico y GABAérgico, lo que se traduce en una reducción de los síntomas de la abstinencia (Shen, 2018). El **disulfiram** es un inhibidor de la aldehído deshidrogenasa, lo cual previene la oxidación de acetaldehído a acetato. Un paciente bajo tratamiento con disulfiram al beber alcohol, sufre una serie de efectos aversivos por la acumulación de acetaldehído en la sangre, los que incluyen mareos, náuseas, taquicardia e hipotensión. Este fármaco presenta una baja eficacia principalmente por la baja adherencia que provocan sus efectos adversos (De Sousa, 2010), pero que aumenta cuando la administración de este se realiza bajo la supervisión de un profesional (Suh y cols., 2006).

La principal limitación para desarrollar nuevas terapias farmacológicas es el bajo entendimiento de la neuroquímica cerebral involucrada en la acción del alcohol y en el desarrollo del alcoholismo. Nuevos estudios neuro bioquímicos y la correlación entre estos hallazgos y el comportamiento asociado a esta patología, permitirán encontrar nuevos blancos farmacológicos para el alcoholismo.

1.3. Modelos Animales de Alcoholismo

Para investigar el efecto y la seguridad de nuevos fármacos para el tratamiento de la adicción al alcohol, es necesaria la utilización de modelos animales de alcoholismo que nos permitan estudiar el potencial terapéutico de estas nuevas moléculas y sus potenciales efectos en seres humanos.

Los modelos animales son herramientas muy útiles en la investigación científica porque nos permiten simular en animales una condición patológica humana. Analizar el comportamiento de un paciente con alcoholismo puede ser muy complejo, ya que por la naturaleza de su condición es difícil controlar todas las variables de la enfermedad, como la cuantía de la ingesta y los factores ambientales y genéticos que la afectan, junto también a las restricciones éticas que regulan la experimentación en humanos.

El diseño y uso de estos modelos animales de alcoholismo se basan en su capacidad de imitar diferentes aspectos de la enfermedad en humanos, tales como: i) las **ansias de beber**, se puede estudiar estableciendo paradigmas en los que la rata debe operar un mecanismo para obtener alcohol, pudiéndose establecer la motivación por beber de acuerdo al número de activaciones que puede realizar el animal para recibir una dosis de alcohol (Spanagel, 2000), ii) la **recaída en el consumo**, se puede modelar mediante la reinstauración del consumo de alcohol por factores ambientales en animales en los cuales se había logrado extinguir su consumo (Ciccocioppo y cols., 2006), y iii) la **pérdida de control al beber**, estableciendo regímenes intermitentes de privación de alcohol, se ha podido lograr un consumo de alcohol superior al normal en animales de experimentación (Spanagel, 2000). Un modelo animal debe correlacionarse adecuadamente con el alcoholismo en humano en varios aspectos, tales como: (1) debe ser sensible a los tratamientos efectivos en humanos (validez predictiva), (2) debe imitar las principales características del comportamiento del alcoholismo humano (validez aparente) y (3) el comportamiento animal debe estar controlado por los mismos factores ambientales, neuroquímicos, neurobiológicos y psicobiológicos considerados importantes en el desarrollo de esta enfermedad en humanos (validez establecida) (Ciccocioppo y cols., 2006).

Se han desarrollado distintas líneas de ratas como modelos animales de alcoholismo. Las líneas de ratas UChA (abstemias) y UChB (bebedoras) de la Universidad de Chile, se generaron a partir de ratas Wistar en 1953 por el Dr. Jorge Mardones y colaboradores (Quintanilla y cols., 2006). Este grupo de investigadores observó variaciones importantes en el consumo de alcohol en un grupo de ratas no seleccionadas. Estas diferencias en el consumo sugerían la participación de un componente genético en la apetencia por el consumo de alcohol, por lo que se dio inicio al proyecto de cruce selectiva de acuerdo a su elevado o bajo consumo de alcohol (líneas UChB y UChA, respectivamente), encontrándose una significativa heredabilidad del fenotipo y un aumento progresivo de los niveles de consumo en las distintas generaciones de la línea UChB. El consumo voluntario actual promedio de ratas UChB es de 7,5-8 g/kg/día en machos (Quiroz y cols., 2018) y 8-8.5 g/kg/día en hembras (Quintanilla y Tampier, 2011), y de las ratas UChA 0,3-0,6 g/kg/día en machos y hembras (Quintanilla y cols., 2006).

1.4. Paradigmas de Autoadministración Operante de Alcohol en Animales

La autoadministración operante es un método experimental a través del cual se puede estudiar y cuantificar la motivación de un individuo por obtener una sustancia que genera reforzamiento. Consiste en un mecanismo físico que, al ser operado por el animal (presionando un pedal con la pata o un botón con la nariz), suministra cantidades fijas de droga (alcohol, por ejemplo), los cuales son ingeridos o administrados parenteralmente en el animal. Como se menciona anteriormente, con este tipo de método se puede determinar el grado de motivación del animal por consumir alcohol, que puede estar condicionado por su propia voluntad de beber o por el efecto farmacológico de algún compuesto que haya sido administrado a la rata. Al establecer tasas progresivas de activación, es decir aumentando el número de activaciones del mecanismo requeridas para adquirir alcohol, se alcanzará un punto de quiebre o “breakpoint”, en el cual el animal deja de ejercer el trabajo necesario para obtener la droga, y marca el límite del esfuerzo que un individuo está dispuesto a hacer para conseguir una dosis de refuerzo (Vacca y cols., 2002; Peana y cols., 2015).

Es posible dejar de beber por voluntad propia, pero ciertos estímulos pueden generar ansiedad por consumir alcohol (por ejemplo, el aroma de bebidas alcohólicas o pasar por fuera de un bar) y consecuentemente una recaída al alcoholismo. En animales, posterior a un régimen de autoadministración, cuando la conducta de operar un mecanismo para recibir alcohol esta instaurada, es posible modelar la recaída en el consumo después de extinguir el comportamiento operante (configurando el mecanismo para que no entregue alcohol después de su activación). Esta recaída puede ser generada mediante la presentación de estímulos previamente asociados al consumo, como patrones luminosos o sonoros.

Existen distintas vías de autoadministración para determinar la motivación de la rata por beber etanol, tales como: (1) vía oral, el método más básico de administración, que determina la motivación de la rata por beber alcohol, pero en el cual no se puede diferenciar si la motivación es nutricional/organoléptica o farmacológica, (2) vía intra-visceral, por esta vía se puede asegurar que la rata no está motivada a beber alcohol por sus propiedades organolépticas, ya que, al ser liberado el etanol directamente al lumen intestinal (mediante el uso de sondas) se podría asumir que la rata bebe alcohol por sus propiedades farmacológicas, (3) vía intracerebral, ésta vía libera la droga directamente en el cerebro, y al ser una administración local, se podrían estudiar el impacto neuroquímico

tisular del etanol, sin tener que considerar el efecto que podrían tener productos de su metabolismo, y (4) vía intravenosa, que permite estudiar la motivación sin considerar el factor organoléptico de beber alcohol (Spanagel, 2000).

1.5. Variables asociadas a un estudio de autoadministración operante de alcohol en ratas

Hay un gran número de variables que es necesario controlar para establecer un comportamiento operante de consumo de etanol en ratas. El proceder común de estos estudios comienza siempre por una etapa de entrenamiento, donde a las ratas se les adiestra en la presión de una palanca para obtener un fluido de gran apetencia (sacarina, por ejemplo), y posteriormente una etapa de mantenimiento, donde una vez ya adquirido el comportamiento operante, se insta a la rata a realizar sesiones operantes regularmente para fijar un patrón estable de consumo.

Para comenzar un estudio, los primeros parámetros a fijar son las características de las ratas, tales como; la línea y el número de ratas, sexo, edad y peso. Todos varían ampliamente, pero la edad escogida por autores generalmente es 60 días en que la rata alcanza su periodo de adultez. Posteriormente, antes de la etapa de entrenamiento, se recomienda un periodo de acostumbamiento a la manipulación por humanos, con el propósito de disminuir el estrés que el transporte hacia las cámaras de autoadministración les pueda provocar. La siguiente etapa de entrenamiento tendrá como objetivo que la rata reconozca que el accionar el mecanismo le entregará fluido, y para aumentar la actividad exploratoria del animal algunos investigadores proponen privar a las ratas de todo fluido durante 2-3 días (June y cols., 2010) o incluso de alimento (Samson y cols., 1988). Como el objetivo principal de estos estudios es condicionar una conducta operante para el consumo de alcohol, la adición de sacarina para aumentar la apetencia se utiliza para, en una primera instancia, motivar el comportamiento, pero posteriormente se retira lentamente a medida que se introduce etanol en la botella. Esto se conoce como “sucrose-fading” (o “saccharin-fading”, cuando se utiliza sacarina) y consiste en la introducción de etanol (una sustancia no tan apetente en concentraciones sobre el 10% v/v) cuando la rata se ha acostumbrado a presionar para beber una sustancia apetente (como lo es el agua con sacarina). Mientras la sacarina es retirada, la concentración de etanol es incrementada secuencialmente (Samson y cols., 1988). En relación a la

periodicidad y duración de las sesiones, cuando se trata de ratas no seleccionadas se recomienda realizar sesiones de 30 minutos, mientras que para ratas seleccionadas por su alto consumo voluntario de etanol se recomiendan sesiones de 1 hora, ya que estas alcanzan un mayor número de operaciones a lo largo de la sesión, a diferencia de las no seleccionadas. En la etapa de mantenimiento, se conservan las condiciones de las sesiones para obtener un valor estable de operaciones por consumo de etanol, lo que se define como no más de un 20% de variación entre dos sesiones seguidas. Para estudiar el efecto sobre el comportamiento operante de un fármaco, se recomienda extender esta etapa por 2 semanas (June y cols., 2010).

1.6. Objetivo de este trabajo

Las ratas UChB han sido seleccionadas por su alto consumo voluntario de etanol y son utilizadas actualmente para estudiar los efectos de nuevos fármacos sobre el consumo de etanol. Se han realizado numerosos estudios de preferencia, bajo el paradigma de libre elección entre dos botellas (una de las cuales tiene etanol 10% y la otra agua), o estudios de “binge-drinking”, en donde después de un periodo de privación de etanol se les da la oportunidad de beber etanol nuevamente, pero nunca se ha estudiado el consumo de etanol de ratas UChB bajo un paradigma de autoadministración operante. El objetivo de esta tesis es determinar las condiciones experimentales necesarias para inducir la autoadministración operante, en cantidades farmacológicamente relevantes, de etanol en ratas UChB.

2. HIPOTESIS

Ratas bebedoras de la línea UChB se autoadministran de forma operante etanol en cantidades farmacológicamente relevantes.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar si ratas UChB se auto administran etanol de forma operante evaluando distintos métodos de aprendizaje y esquemas de pre-exposición a etanol.

3.1. Objetivos específicos

1. Determinar si ratas UChB previamente entrenadas en la auto administración operante (paradigma saccharin to ethanol fading) se auto administran etanol en cantidades farmacológicamente relevantes (experimento 1).
2. Determinar si ratas UChB pre-expuestas al consumo crónico de etanol y posterior privación se auto administran etanol en cantidades farmacológicamente relevantes (experimento 2).
3. Determinar si ratas UChB pre-expuestas al consumo crónico de etanol y posterior restricción de acceso se autoadministran etanol en cantidades farmacológicamente relevantes (experimento 3).
4. Determinar si las ratas UChB sin tratamiento previo se autoadministran etanol en cantidades farmacológicamente relevantes (experimento 4).

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Soluciones

Todas las soluciones utilizadas en cada experimento fueron preparadas con agua potable. Las soluciones que contenían etanol fueron preparadas utilizando etanol de calidad analítica Merck (Darmstadt, Alemania). Las soluciones que contenían sacarina fueron preparadas semanalmente con sacarina sódica (Droguería Michelson, Chile).

4.2. Animales y Mantención

Los animales utilizados en este trabajo fueron ratas machos de la línea UChB, de 8-12 semanas de edad y peso entre 170-230 g. Cada rata estaba identificada por un patrón único de marcas en las orejas, asignadas al momento del destete. Los animales se mantuvieron individualmente en cajas de policarbonato (alto 26 cm x largo 47,6 cm x ancho 20,3 cm) con lecho de coronta de maíz triturada cuya función es actuar como material absorbente, dar cobijo a la rata y mantener la higiene del animal. El control de peso de cada animal se realizó una vez cada semana junto con el cambio de sustrato y el aseo de la caja (realizado con agua y detergente común). En todo momento, las ratas tuvieron acceso libre a alimento de rata (Fórmula Mardones, Alimentos Cisternas, Buin, Chile) y agua potable. El ciclo de luz/oscuridad para la sala de procedimientos era oscuridad de 7 am a 7 pm y la temperatura fue mantenida entre 18 y 20 °C.

Para determinar el número mínimo de animales a utilizar en cada objetivo planteado en este proyecto se utilizó el método matemático sugerido en Dell y cols. (2002) para experimentos en el que se midan variables continuas.

Para el cálculo del número de animales (n) se utilizó la siguiente fórmula:

$$n = 1 + 2C \left(\frac{s}{d} \right)^2$$

En donde, s = desviación estándar; d = magnitud de la diferencia a detectar; C = constante definida por la significancia estadística deseada

Para el cálculo del número de animales necesarios para el desarrollo de los experimentos propuestos en este proyecto, se fijó una significancia estadística de 0,05. Los valores de varianza y la magnitud de la diferencia a detectar para cada experimento se obtuvieron a

partir de experimentos similares publicados en la literatura (Vacca y cols. 2002; Files y cols., 1997).

El número total de animales para cada experimento se calculó considerando una desviación estándar (s)= 12, una magnitud de la diferencia a detectar de 20 presiones de palanca respecto del control y una constante C de 10,5 derivada de fijar una significancia estadística de 0.05.

$$n = 1 + 2 * 10,5 * \left(\frac{12}{20} \right)^2 = 8,56$$

Por lo tanto, el número teórico de animales a utilizar para cada objetivo específico fue de 8 animales. La posibilidad de repetición de los experimentos o de reemplazo de animales en alguno de los grupos fue evaluada en conjunto con el director de Tesis. Todos los procedimientos experimentales fueron previamente aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile bajo el protocolo CBA 1052 FMUCH.

4.3. Manipulación de los animales

Durante los 10 días previos a los procedimientos en la caja de autoadministración, los animales fueron manipulados para reducir el estrés y ansiedad asociados a los procedimientos experimentales. Durante la manipulación, los animales fueron expuestos por al menos 5 minutos diarios a la interacción directa con el investigador. Las dos primeras sesiones de manipulación consideraron el traslado de la caja a un mesón y la apertura de ésta. Luego, en las 2 siguientes sesiones el investigador colocó su mano al alcance de la rata, pero sin tocarla. En las siguientes 2 sesiones de manipulación el investigador tuvo contacto directo con el animal sin sacarlo de su caja. Finalmente, durante las 2 últimas sesiones se sacó de la caja, tuvo contacto directo con el investigador y luego se devolvió a la caja.

4.4. Consumo voluntario de soluciones (etanol)

Los grupos 2 (pre-exposición a etanol y privación) y 3 (pre-exposición a etanol y consumo restringido) fueron expuestos a 28 días de consumo voluntario bajo el paradigma de libre elección. Este método se basa en la exposición del animal a dos botellas una conteniendo etanol 10% y la otra agua. Las botellas eran probetas de 50 ml que contaban con un tapón hermético de caucho, un vástago de vidrio para beber y que eran colocadas de forma invertida en la parte superior de la caja. A los animales mantenidos en la sala de procedimientos, cada día a las 11 AM (durante la etapa activa de los animales) se medía el consumo de etanol. Mientras que los animales mantenidos en el bioterio general, su consumo era medido entre las 12 pm y las 14 pm (durante la etapa inactiva de los animales). Adicionalmente, el grupo 3 fue expuesto a 14 días de consumo voluntario bajo el paradigma de libre elección restringido a 1 hora diaria. Este método es similar a lo descrito previamente, pero en este caso la botella con etanol 10% era presentada cada día a las 11 AM para luego ser retirada luego de una hora de acceso.

4.5. Aparatos

Los estudios de autoadministración operante de etanol se realizaron en dos equipos de autoadministración (*cajas de Skinner*), que consisten cada uno de ellos en una cámara modular (Habitest, Coulbourn Instruments, Lehigh valley, EE. UU.) (**Figura 1A**), la cual tiene un pocillo de entrega de líquidos que es externamente alimentado por una bomba de infusión (Modelo E73-05, Coulbourn Instruments) y todo lo anterior dentro de un cubículo de aislamiento que cuenta con un ventilador y una mirilla. Toda la información de la actividad animal en la caja de autoadministración era recopilada por un Lab Linc (Habitest Linc Modelo H02-01, Coulbourn Instruments), que a su vez era controlado el software GraphicState3 (Coulbourn Instruments).

Las cámaras modulares contaban adicional al pocillo de entrega de líquidos con dos palancas metálicas y dos juegos de tres luces (verde, amarillo y rojo) ubicadas sobre de las palancas. Además, sobre el pocillo de entrega de líquidos, casi llegando al techo de la cámara, había una luz blanca tenue (**Figura 1B**). En la pared contraria, a la misma altura de la luz tenue, se encontraba una bocina que podía emitir sonidos a distintos volúmenes y frecuencias de acuerdo con la programación del software (**Figura 2A**).

La bomba de infusión programable (**Figura 2B**) funcionaba de forma automática de acuerdo con la programación del software. Cada bomba de infusión se equipó con una jeringa de 20 mL y de acuerdo con la calibración realizada por cada activación de la bomba se entregaba un volumen de 0,1 ml del fluido en el pocillo.

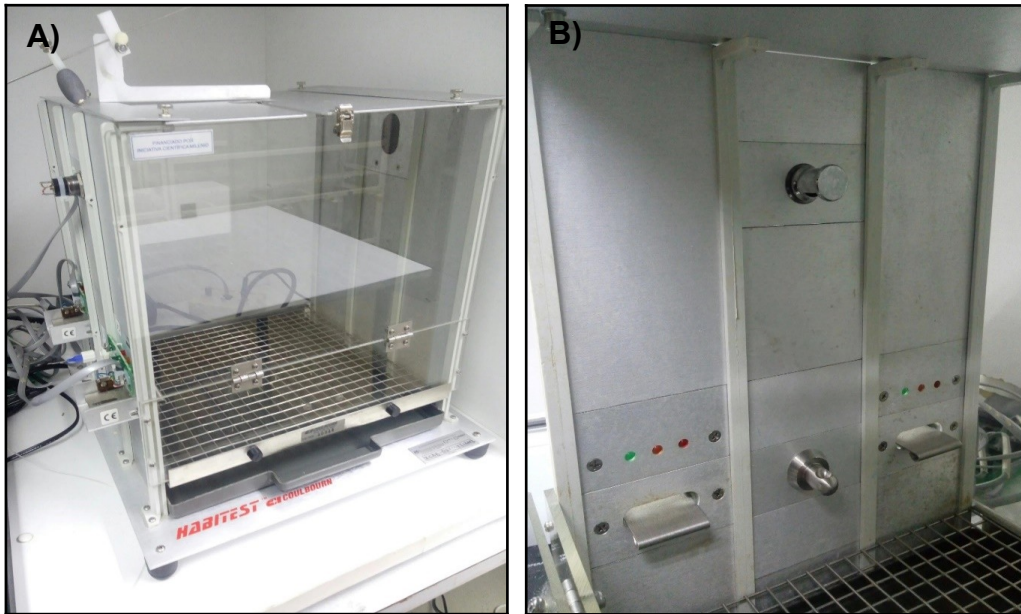


Figura 1. **A)** Fotografía de la cámara de autoadministración Habitest. **B)** Fotografía de la pared lateral interna izquierda de la cámara de autoadministración. En ella se observan el pocillo de entrega de líquidos (centro), las palancas, los juegos de luces (sobre las palancas) y la luz principal en la zona superior.

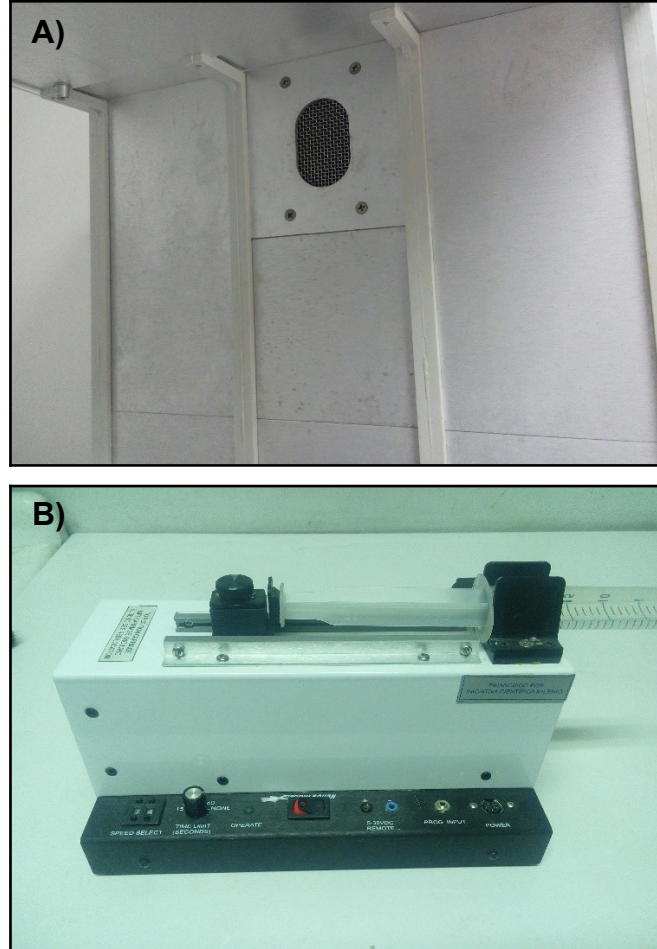


Figura 2. A) Fotografía de la pared lateral interna derecha de la cámara de autoadministración. En ella se observa la bocina utilizada para emitir los estímulos sonoros asociados a la entrega de una dosis. **B)** Fotografía de la bomba de infusión con una jeringa de 20 ml montada en su riel.

Los cubículos de aislamiento (**Figura 3A**), que aislaban las cámaras de autoadministración del ambiente exterior, contaban con un ventilador para generar ruido de fondo, una mirilla para observar la actividad del animal al interior de la cámara de autoadministración, y un pequeño orificio donde pasaba el cableado de los equipos en su interior.

Cada cámara de autoadministración contaba con una tarjeta de conexiones que permitía su conexión a un equipo integrador de señales llamado Habitest Linc (**Figura 3B**). Este integrador (**Figura 4**) a su vez permitía el control de la cámara de autoadministración

mediante el software GraphicState. El Habitest Linc poseía un tablero de luces que indicaba la situación de activación en tiempo real de cada accesorio de la cámara de autoadministración.

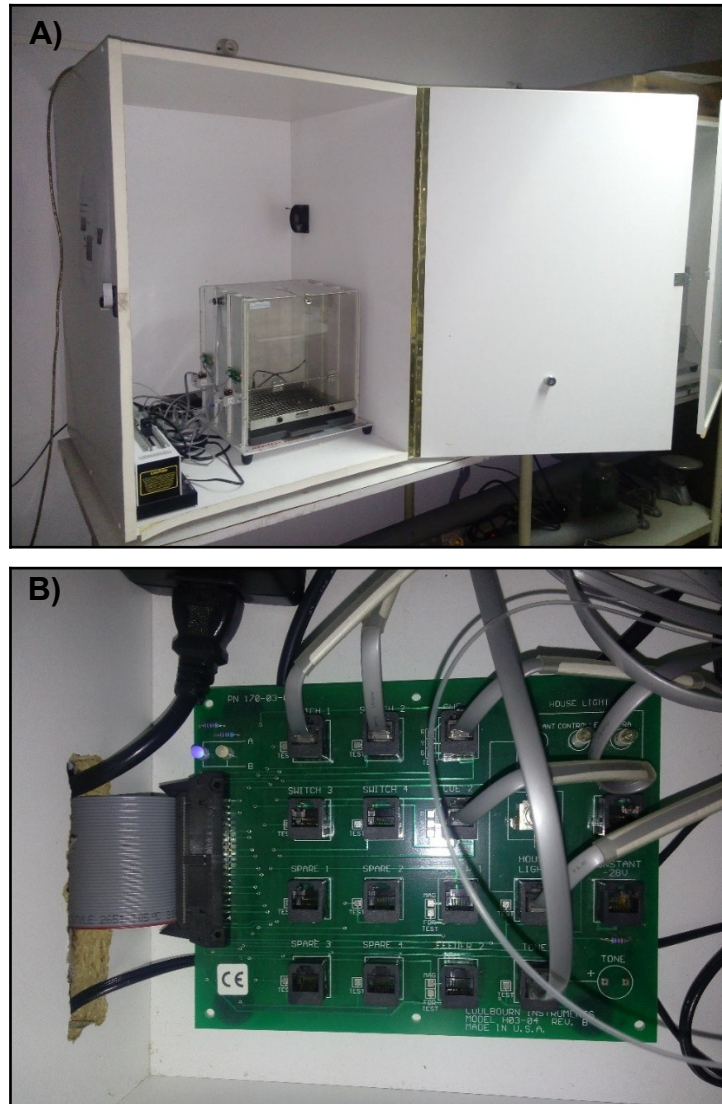


Figura 3. A) Fotografía del cubículo de aislamiento. En ella se observa la cámara de autoadministración (en el centro), un ventilador de CPU (instalado en la pared lateral izquierda) y la bomba de infusión (a un lado derecho de la cámara de autoadministración). **B)** Fotografía de la tarjeta de conexiones. En ella se observan ranuras para conectar hasta 16 accesorios.



Figura 4. Fotografía del Habitest Linc. Se puede observar un tablero de luces que podía mostrar el estado de activación de dos cámaras de autoadministración (diferenciados como paneles A y B).

El software GraphicState3 que permitió el control de las cámaras de autoadministración se instaló en un computador (**Figura 5**) equipado con Windows XP profesional como sistema operativo, un procesador Intel Pentium Dual CPU @2GHz con 2 GB de RAM. El computador estaba conectado al Habitest Linc y a través de este equipo a la cámara de autoadministración.



Figura 5. Fotografía del computador. Al costado de la CPU se encuentra el Habitest Linc.

4.6. Programación del software

Se utilizó el software GraphicState 3 para controlar, recopilar y analizar la información generada en las cámaras de autoadministración. Para programar las sesiones se diseñaron protocolos en base a **estados**, que corresponde a una acción (o ninguna) de manera periódica o finita hasta que se cumpla un evento definido previamente. Un evento puede ser una condición de tiempo o un evento específico (por ejemplo, la presión de la palanca). A continuación, se describen la secuencia de eventos asociada a cada protocolo utilizado durante los estudios. En el **Anexo 1** se describe el procedimiento detallado de programación.

4.6.1. Sesión de asociación: Esta sesión tiene una duración de 60 minutos y considera la luz principal encendida durante toda la sesión. Se inicia con **estado 1** que corresponde a un tiempo de espera de 4 minutos, luego pasa a un **estado 2**, que tiene una duración de 4 segundos en los que ocurre la activación de la bomba de infusión para la entrega de 0,1 ml de fluido y la emisión de un sonido de alrededor de 0,3 segundos de duración, para luego volver nuevamente al **estado 1**. Luego, se repite este ciclo durante 60 minutos totales.

4.6.2. Sesión de Autoadministración tipo 1: Esta configuración sólo tuvo uso en las primeras 4 sesiones de autoadministración del grupo 1. Esta sesión tiene una duración de 60 minutos y considera la luz principal encendida durante toda la sesión. Se inicia con el **estado 1** en la que el animal no recibe ningún estímulo visual ni sonoro, y se prolonga hasta que la rata cumple con un número fijo de presiones (Fixed Ratio) sobre la palanca activa, luego pasa al **estado 2**, que tiene una duración de 4 segundos en los que se ocurre la activación de la bomba de infusión para la entrega de 0,1 ml de fluido, encendido intermitente de los juegos de luces sobre las palancas y la emisión de un sonido de alrededor de 0,3 segundos de duración, para luego volver al **estado 1**. Durante el **estado 2**, las presiones de palanca no son efectivas para la entrega de un siguiente refuerzo.

4.6.3. Sesión de Autoadministración tipo 2: Esta sesión tiene una duración de 60 minutos y considera la luz principal encendida durante toda la sesión. Se inicia con el **estado 1** que considera el encendido intermitente del juego de luces sobre la palanca activa, y se prolonga hasta que la rata cumple con un número fijo de presiones (Fixed Ratio) sobre la palanca activa, luego pasa al **estado 2** que tiene una duración de 4 segundos en los que se ocurre la activación de la bomba de infusión para la entrega de

0,1 ml de fluido y la emisión de un sonido de alrededor de 0,3 segundos de duración, para luego volver al **estado 1**. Durante el **estado 2**, los juegos de luces dejan de parpadear y las presiones de palanca no son efectivas para la entrega de un siguiente refuerzo.

4.7. Determinación de alcoholemia

Las determinaciones de concentración de etanol en sangre se realizaron mediante cromatografía gaseosa. Las mediciones se realizaron en un cromatógrafo Perkin Elmer SRI 8610, equipado con una columna empacada con Carbowax 20M al 5%, sobre un soporte de Carbowax con tamaño de partícula 60-80. La temperatura de trabajo fue de 75°C, el gas de arrastre fue nitrógeno (flujo 65 ml/min) y la detección se realizó mediante ionización a la llama. Como el analito (alcohol) es volatilizable, se utilizó la técnica “head-space”, que consiste en incubar a 70°C la muestra en un frasco hermético (frascos de vidrio con válvulas tipo Mininert) donde los analitos volátiles se evaporarán dentro del frasco, de esta manera al recolectar la parte gaseosa, se recolectará el etanol en la muestra.

Las muestras de sangre se recolectaron después de terminada la última sesión de autoadministración operante. Para ello, a cada animal se le administró 0,3 mg/kg de acepromazina (Pacifor®, Drag Pharma) por vía intraperitoneal para su sedación. Una vez que el animal mostró signos de sedación (letargo), se cortó la punta de la cola y se recolectaron 100 µL de sangre mediante un capilar de vidrio. Luego, las muestras (y también el estándar) fueron transferidas a un vial con válvula Mininert conteniendo 900 µL de agua destilada.

Para realizar las cuantificaciones los viales se incubaron a 70°C durante 15 minutos. Luego, con una jeringa se recolectaron 1 ml de la fase gaseosa dentro del frasco y se inyectó en el cromatógrafo. La corrida estaba programada para 3,5 minutos de duración, donde el pico de la señal para etanol se observaba con un tiempo de retención entre 2,7 y 3,1 minutos.

Para la cuantificación de la concentración de etanol, esta se obtuvo mediante la extrapolación de la altura del pico de etanol obtenida en relación a la altura del pico obtenido al usar como muestra una solución acuosa de etanol de concentración conocida (10-20 mg%).

4.8. Grupo experimental 1 (Saccharin to ethanol fading).

En este experimento, un grupo de 8 ratas **UChB** macho de edad aproximada 2 meses y 2 semanas, fue mantenido en cajas individuales durante 10 días según las condiciones detalladas en **4.2**. En este mismo período, los animales fueron expuestos diariamente a la manipulación por parte del investigador según se describió en **4.3**. Seguido de ello, los animales fueron expuestos a una sesión diaria de autoadministración tipo 1 de sacarina 0,1% durante los días 1-5 con un requerimiento de presión de palanca activa (FR) de 1. Luego, en los días 6 a 8, los animales realizaron una sesión diaria de asociación (ver **4.6.1**) con sacarina 0,1%. Durante los días 9-11 los animales fueron expuestos a una sesión diaria de autoadministración tipo 2 (ver 2.6.3) de sacarina 0,1% con un FR=1. Las sesiones 12 a 15 se realizaron bajo FR=2 y las sesiones 16 a 26 bajo FR4. A continuación, durante las sesiones de autoadministración operante 27 a 34, se realizó un cambio en la composición del fluido de refuerzo a sacarina 0,075% + etanol 2%, a esta solución se le denominó "cocktail". En las sesiones 35 a 40, se alternó entre las soluciones de refuerzo "cocktail" y etanol 5%, comenzando en la sesión 35 con la solución de etanol 5%. La última fase del método "Saccharin to ethanol fading" consistió en 5 sesiones (41 a 45) en que la solución de refuerzo cambió en composición, aumentando la cantidad de etanol a medida que disminuía la de sacarina. Siguiendo el siguiente orden: i) sacarina 0,075% + etanol 2% (41), ii) sacarina 0,05% + etanol 5% (42), iii) sacarina 0,025% + etanol 7% (43), iv) sacarina 0,0125% + etanol 9% (44) y v) etanol 10% (45).

En el siguiente periodo (sesiones 46 a 55), los animales realizaron sesiones de autoadministración en donde la solución de refuerzo fue etanol 10% bajo un requerimiento de FR4. En la sesión 55 se realizó la toma de muestras para determinar etanol en sangre.

En la Tabla 1 se entrega un resumen de las sesiones de autoadministración a que fueron expuestos los animales del Grupo 1, el fluido de refuerzo usado y el tipo de sesión aplicada.

Sesiones	Fluido de Refuerzo	Tipo de sesión
1 – 5	Sacarina 0,1% - FR1	Tipo 1

6 – 8	Sacarina 0,1%	De asociación
9 – 11	Sacarina 0,1% - FR1	Tipo 2
12 – 15	Sacarina 0,1% - FR2	Tipo 2
16 – 26	Sacarina 0,1% - FR4	Tipo 2
27 – 34	Sacarina 0,075 + Etanol 2% - FR4	Tipo 2
35 – 40	Alternado: sacarina 0,075 + etanol 2% y Etanol 5% - FR4	Tipo 2
41 – 45	Gradual aumento de etanol y disminución de sacarina - FR4	Tipo 2
46 – 55	Etanol 10%	Tipo 2

Tabla 1. Tabla resumen del esquema de sesiones usadas en el Grupo 1.

4.9. Grupo experimental 2 (Pre-exposición a etanol y privación).

Este grupo fue compuesto por 7 ratas **UChB** macho, de edad aproximada 2 meses. Los animales fueron mantenidos en cajas individuales según se detalla en **4.2**. Después de 3 días de ser trasladados a la sala de procedimientos, los animales fueron expuestos al consumo de etanol bajo el paradigma de libre elección durante 28 días (ver **4.4**). Seguido de ello, a los animales se les privó del consumo de etanol durante 7 días y durante este mismo periodo se le acostumbró a la manipulación por parte del investigador de manera paulatina como se describió en **4.3**.

Luego, los animales se expusieron a 4 sesiones de asociación (ver **4.6.1**), siendo etanol 10% el fluido de refuerzo. Seguido de esto, en los días 1-4 los animales fueron expuestos a sesiones de autoadministración tipo 2 de etanol 10% con un FR=1. Luego, en las sesiones 5 a 9, el requerimiento fue aumentado a FR2. En las sesiones 10 y 11, el requerimiento fue aumentado a FR3. Y finalmente, en las sesiones 12 a 22, el requerimiento fue aumentado a FR4. En la sesión 22 se realizó la toma de muestras para determinar etanol en sangre.

4.10. Grupo experimental 3 (Pre-exposición a etanol y restricción a 1h).

Este grupo fue compuesto por 5 ratas **UChB** macho, de edad aproximada 1 mes y 3 semanas. Los animales fueron mantenidos en cajas individuales según se detalla en **4.2**. Después de 3 días de ser trasladados a la sala de procedimientos, los animales fueron expuestos al consumo de etanol bajo el paradigma de libre elección durante 28 días (**ver 4.4**). Luego, a los animales se les restringió el acceso a la botella de etanol 10% etanol a 1 hora/día durante 14 días, y durante este mismo periodo se acostumbró a cada uno a la manipulación por parte del investigador de manera paulatina como se describió en **4.3**.

Luego, los animales se expusieron a 4 sesiones de asociación (**ver 4.6.1**), siendo etanol 10% el fluido de refuerzo. Seguido de esto, en los días 1-4 los animales fueron expuestos a sesiones de autoadministración tipo 2 de etanol 10% con un FR=1. Luego, en las sesiones 5-11, el requerimiento fue aumentado a FR2. En las sesiones 12 y 13, el requerimiento fue aumentado a FR3. Y finalmente, en las sesiones 14-23, el requerimiento fue aumentado a FR4.

4.11. Grupo experimental 4 (Sin tratamiento, control).

Este grupo fue compuesto por 8 ratas UChB macho, de edad aproximada 2 meses. Los animales fueron mantenidos en cajas individuales según se detalla en **4.2**. y durante 10 días se acostumbró a cada uno de los animales a la manipulación por parte del investigador de manera paulatina como se describió en **4.3**.

Luego, los animales se expusieron a 4 sesiones de asociación (**ver 4.6.1**), siendo etanol 10% el fluido de refuerzo. Seguido de esto, en los días 1-4 los animales fueron expuestos a sesiones de autoadministración tipo 2 de etanol 10% con un FR=1. Luego, en las sesiones 5 a 11, el requerimiento fue aumentado a FR2. En las sesiones 12 y 14, el requerimiento fue aumentado a FR3. Finalmente, en las sesiones 15 a 30, el requerimiento fue aumentado a FR4.

4.12. Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos fueron agrupados y analizados en gráficos de dispersión contruidos con el software Excel (Microsoft, EEUU). Los resultados se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media (SEM).

Para determinar la significancia estadística de las diferencias observadas en los distintos experimentos se utilizó el análisis de varianza (test ANOVA) de una vía o dos vías según el caso, junto con una prueba *post hoc* de Bonferroni para comparaciones múltiples usando el software GraphPad Prism (GraphPad Software, EEUU).

5. RESULTADOS

5.1. Establecimiento de la autoadministración operante de etanol en ratas UChB mediante el método “saccharin to ethanol fading”

El objetivo de este experimento fue instaurar la autoadministración operante de etanol en ratas UChB mediante el método de “saccharin to ethanol fading” según lo descrito por June y cols., (2010) (Grupo 1).

Este método consideró en las primeras 5 sesiones la autoadministración de sacarina al 0,1% para entrenar al animal en la autoadministración operante. Los resultados obtenidos no fueron los esperados ya que los animales no presentaron más de 5 presiones durante una hora de sesión en las condiciones que se describen en Métodos 4.6.2. Considerando estos resultados no satisfactorios se realizaron 2 modificaciones al protocolo inicial: i) se incorporó 3 sesiones previas de asociación al consumo operante de sacarina como se describe en Métodos 4.6.1, y ii) se modificó la secuencia de las claves luminosas en la caja de Skinner como se describe en Métodos 4.6.3. Luego de estas modificaciones, los animales se expusieron a 3 sesiones de autoadministración de sacarina 0,1% con un requerimiento de 1 presión de palanca (FR1). Se encontró que 6 de estos 8 animales (75%) adquirieron el comportamiento operante, presentando en promedio de 92 ± 15 presiones activas, 4 ± 2 presiones inactivas y la autoadministración de 74 ± 12 dosis de sacarina 0,1% (**Figura 6**). Sin embargo, 2 de estos 8 animales (25%) no presentaron respuesta inmediata a las modificaciones descritas y sus respuestas no se incluyeron en los resultados preliminares de este grupo. En sesiones posteriores estos animales finalmente adquirieron el comportamiento y fueron incorporados al grupo de estudio.

Luego, se aumentó el requerimiento durante 4 sesiones a FR2 y el desempeño de los animales ascendió a 201 ± 8 presiones activas, 4 ± 1 presiones inactivas y 90 ± 4 dosis recibidas ($n=7$). Posteriormente, al aumentar el requerimiento a FR4 durante 11 sesiones, los animales alcanzaron en promedio 333 ± 18 presiones activas, 5 ± 1 presiones inactivas y 80 ± 3 dosis recibidas ($n=7$) (**Figuras 7 y 8**).

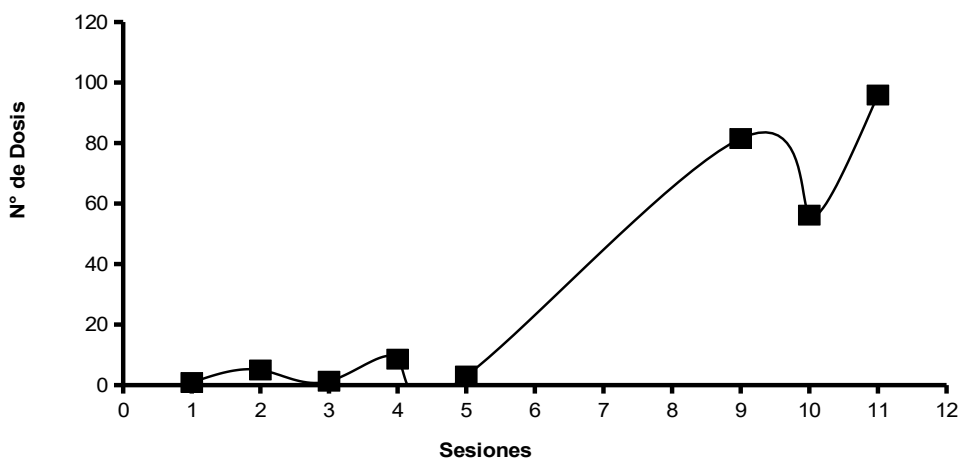


Figura 6. Autoadministración operante de sacarina 0,1% en ratas UChB. En la figura se muestra el número de dosis recibidas promedio de sacarina 0,1% por sesión. Todas las sesiones fueron realizadas con FR1. En las sesiones 6-8 no hubo registro de las presiones, ya que correspondieron a sesiones de asociación.

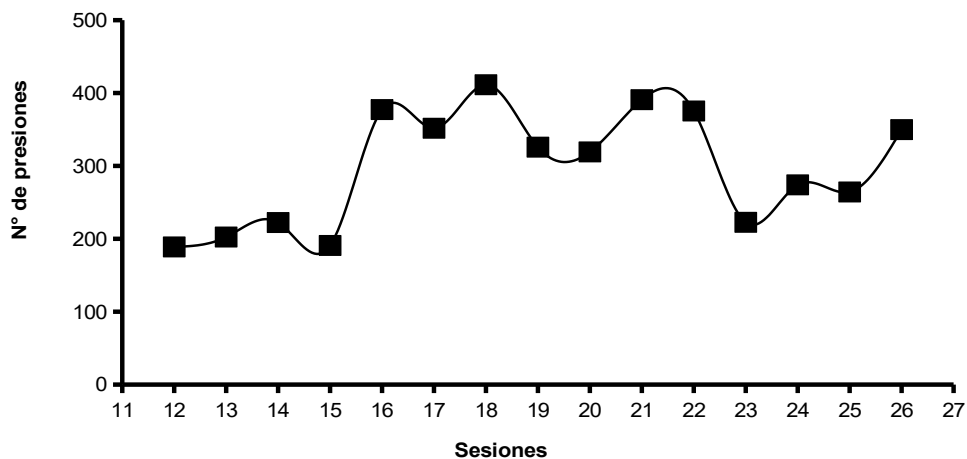


Figura 7. Efecto del aumento del requerimiento de presiones en la autoadministración operante de sacarina 0,1% en ratas UChB. En la figura se observa el número de presiones de palanca activas promedio por sesión. Las sesiones 12-15 fueron realizadas con FR2 y las sesiones 16-26 fueron realizadas con FR4.

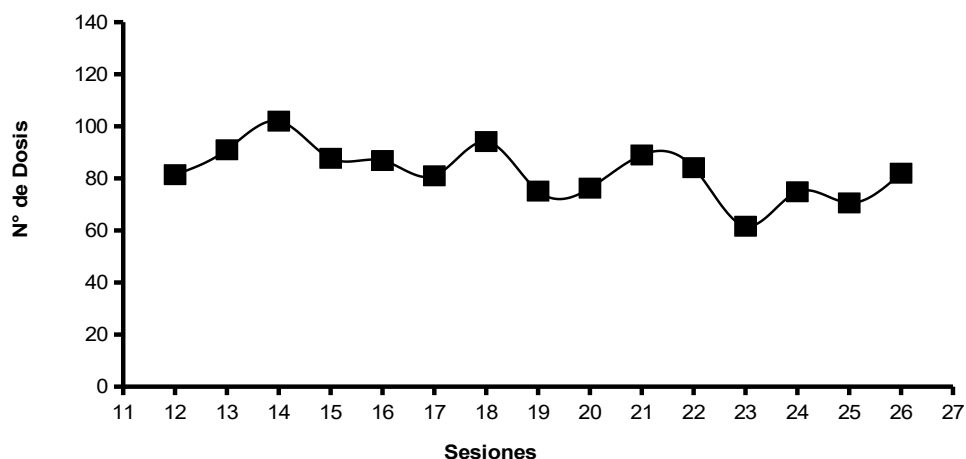
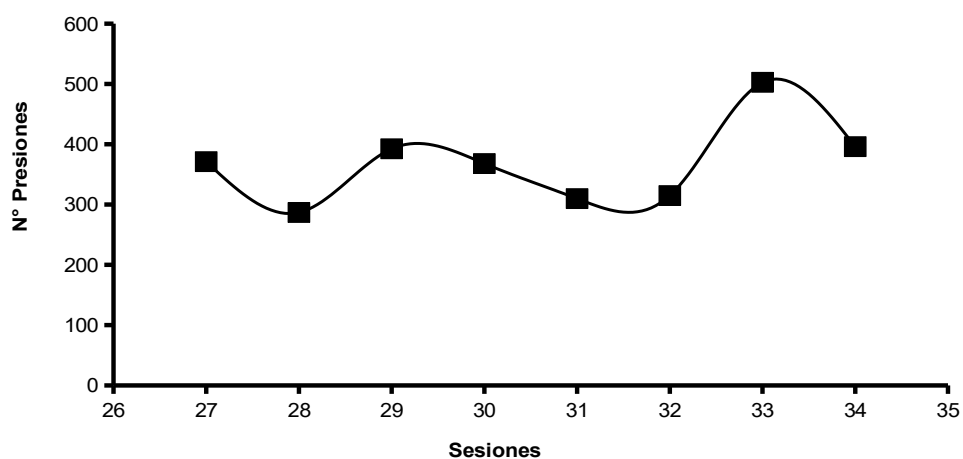


Figura 8. Efecto del aumento de requerimiento de presiones en la autoadministración operante de sacarina 0.1% en ratas UChB. En la figura se observa el número de dosis promedio de sacarina 0,1% por sesión. Las sesiones 12-15 fueron realizadas con FR2 y las sesiones 16-26 fueron realizadas con FR4.

Una vez estabilizada la respuesta operante en FR4, se avanzó a la siguiente etapa del método de saccharin to ethanol fading que considera el cambio gradual de la composición de la solución de refuerzo, disminuyendo la concentración de sacarina e introduciendo concentraciones crecientes de etanol (**Métodos 4.6**).

En primera instancia, se utilizó la solución denominada “cocktail”, cuya composición era 0,075% sacarina y 2% etanol como refuerzo durante 8 sesiones. Los resultados en estas sesiones de autoadministración, bajo un requerimiento de FR4, mostraron que los animales presentaron en promedio 353 ± 26 presiones activas, 5 ± 1 presiones inactivas y 78 ± 5 dosis de solución “cocktail” recibidas lo que equivale a un consumo promedio de $0,36 \pm 0,02$ g etanol/kg/hora ($n=7$) (**Figura 9**).



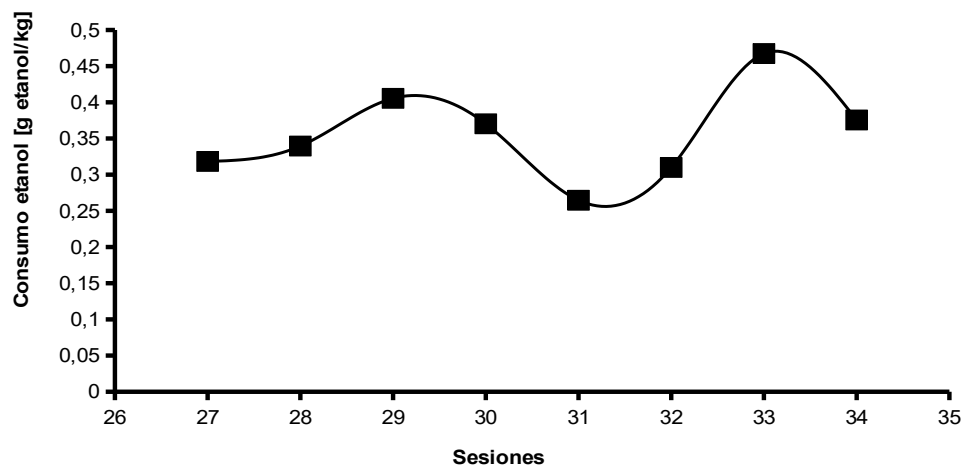


Figura 9. Autoadministración operante de solución “cocktail” (sacarina 0.075% + etanol 2%) en ratas UChB expuestas al método de saccharin to ethanol fading. A) Presiones activas promedio y B) Consumo de etanol promedio en g etanol/kg/h. Las sesiones 27-34 fueron realizadas con FR4.

Seguido de esto, el esquema de sesiones consistió en **alternar durante 6 sesiones entre** la solución cocktail y una solución de etanol al 5%. Los resultados de esta serie de sesiones de autoadministración, bajo un requerimiento de FR4, fue en promedio de 322 ± 40 presiones activas, 5 ± 2 presiones inactivas y 63 ± 7 dosis de solución refuerzo recibidas, lo que equivale a un consumo promedio de $0,41 \pm 0,03$ g etanol/kg/hora ($n=7$) (**Figura 10**).

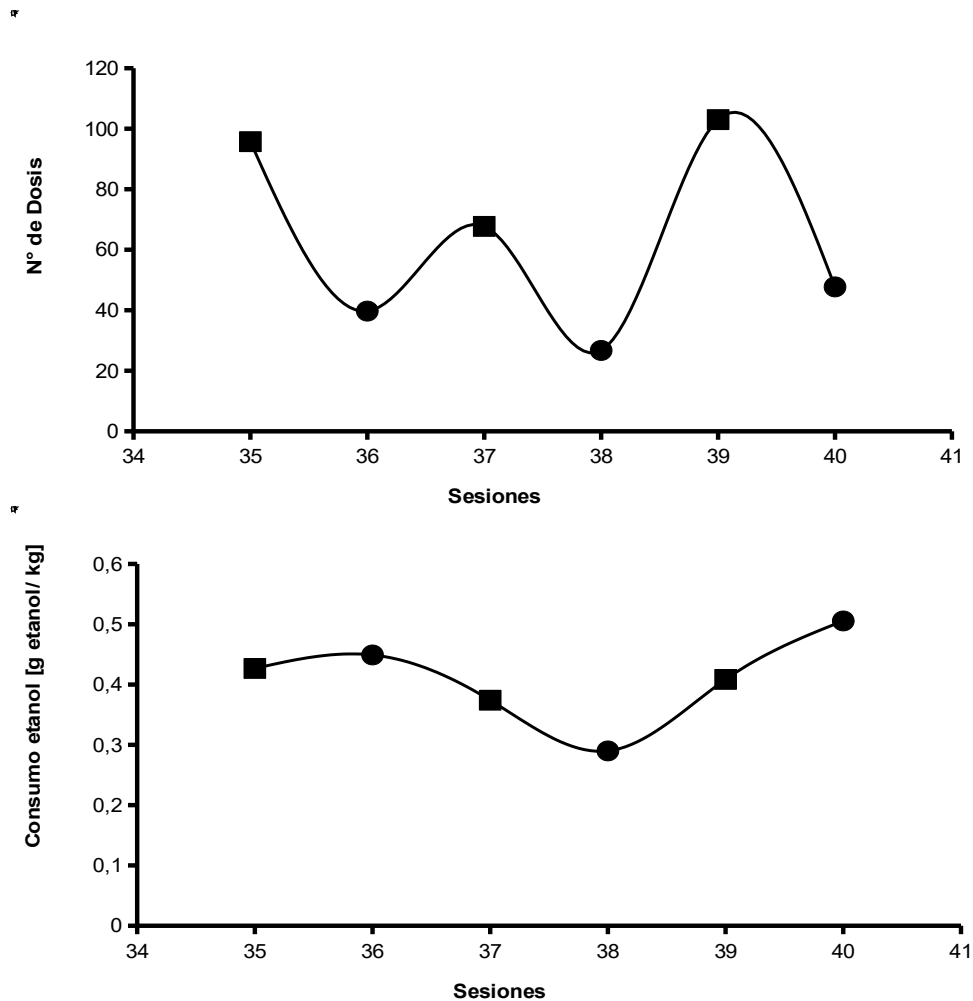


Figura 10. Autoadministración operante de solución “cocktail” (sacarina 0.075% + etanol 2%) y solución etanol 5% en ratas expuestas al método de saccharin to ethanol fading. Las sesiones 35-40 fueron realizadas con FR4. **A)** Número de dosis recibidas promedio por sesión y **B)** Consumo de etanol [g etanol/kg] promedio por sesión.

En la última fase, durante 5 sesiones se utilizó secuencialmente una solución de refuerzo distinta de acuerdo a lo siguiente: i) sacarina 0,075% + etanol 2%, ii) sacarina 0,05% + etanol 5%, iii) sacarina 0,025% + etanol 7%, iv) sacarina 0,0125% + etanol 9%, y v) etanol 10%. Los resultados de esta serie de sesiones, bajo un requerimiento de FR4, fue un promedio de 257 ± 31 presiones activas, 2 ± 1 presiones inactivas y 55 ± 6 dosis de solución refuerzo recibidas (**Figura 11**) lo que equivale a un consumo promedio de $0,61$ g etanol/kg/hora $\pm 0,04$ ($n=7$) (**Figura 12**).

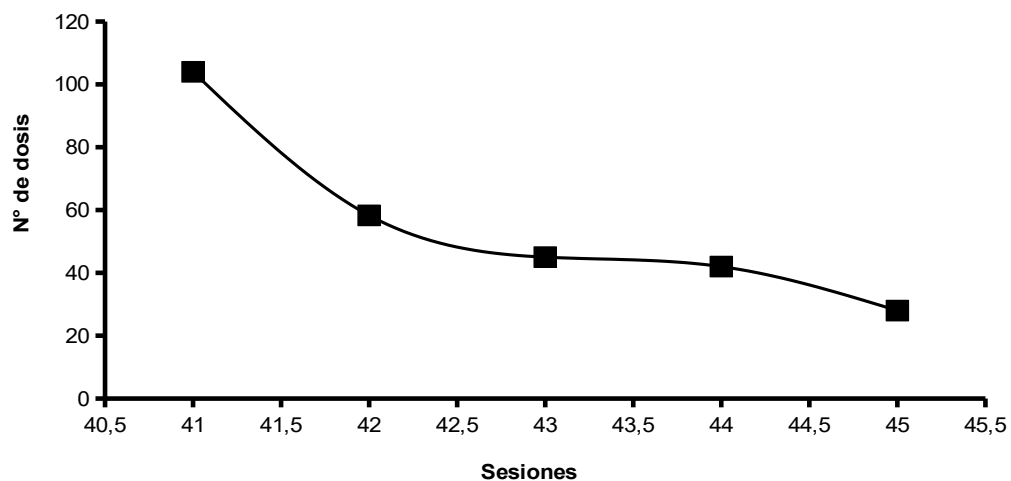


Figura 11.

Número de dosis durante la etapa final del método de saccharin to ethanol fading. Las sesiones 40-46 fueron realizadas con FR4. En la figura se observa el número de presiones activas promedio por sesión.

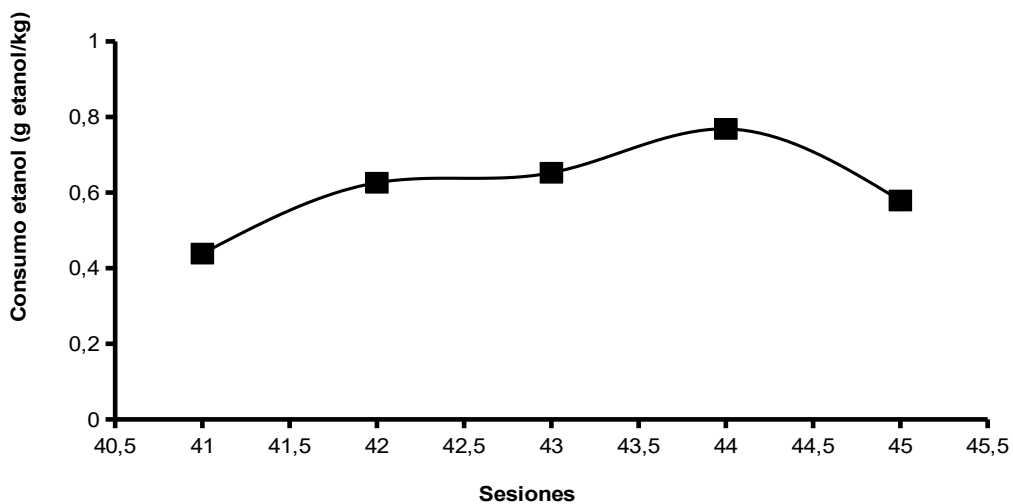


Figura 12. Consumo de etanol durante la etapa final del método de inducción al consumo operante de etanol. En la figura se muestra el consumo promedio de etanol (g etanol/kg) de 7 animales durante las sesiones 40-46 realizadas con FR4.

En la siguiente y última etapa, la solución de refuerzo fue etanol 10% y el requerimiento se mantuvo en FR4 durante 9 sesiones. Los resultados mostraron que en esta etapa los animales en promedio realizaron 157 ± 8 presiones activas, 2 ± 1 presiones inactivas, y recibieron 33 ± 2 dosis de etanol 10%, lo que equivale a un consumo promedio de $0,66 \pm 0,03$ g etanol/kg/hora (**Figura 13**).

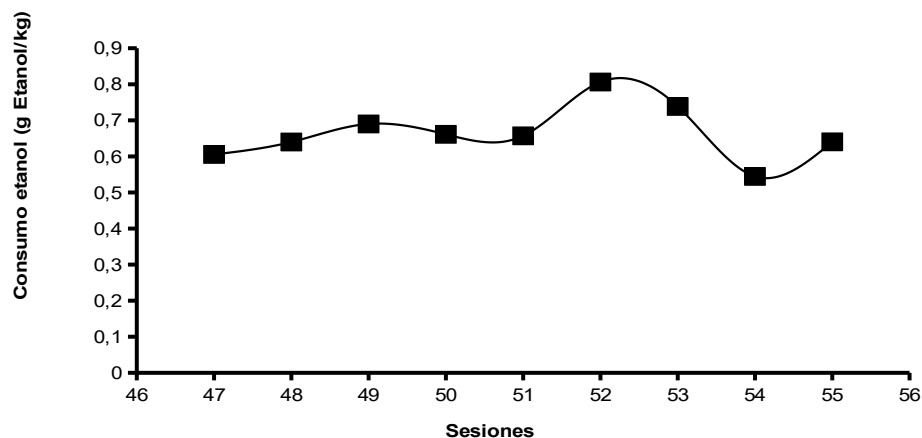


Figura 13. Autoadministración operante de solución etanol 10% en ratas expuestas al método de saccharin to ethanol fading. En la figura se muestra el consumo de etanol (g etanol/kg) promedio por sesión de 60 minutos. Las sesiones 45-55 fueron realizadas con FR4. Un test one-way ANOVA indicó que no existen diferencias significativas entre los valores indicados en este gráfico ($p = 0.82$).

Al término de la última sesión de autoadministración operante (sesión 55), a cada rata se le extrajo 100 μ L de sangre venosa para determinar la concentración plasmática de etanol tal como se indica en **Métodos 4.5**. Los resultados mostraron que la alcoholemia promedio fue de 13 ± 5 mg% ($n=6$) (rango: 2-30 mg%). El desempeño de las ratas en esta última sesión fue de 31 ± 5 dosis recibidas promedio, lo que equivale a un consumo promedio de $0,62 \pm 0,1$ (g etanol/kg) ($n=6$).

5.2 Establecimiento de la autoadministración operante de etanol en ratas UChB pre-expuestas al consumo de etanol en libre acceso.

En este experimento se propuso estudiar el efecto de la exposición previa al consumo de etanol en la adquisición de su autoadministración operante (Grupo 2). Para ello, a los animales ($n=8$) mantenidos en jaulas individuales en la sala de procedimientos conductuales y bajo ciclo invertido luz-oscuridad se les dio libre acceso durante 28 días a dos botellas, una conteniendo etanol 10% y la otra agua como se indica en **Métodos 4.2**. A los 11 días de acceso el consumo promedio de etanol de los animales fue de $3,5 \pm 0,8$ g etanol/kg/día. Este nivel de consumo era más bajo que el esperado para este tipo de ratas (8-9 g etanol/kg/día, Rivera-Meza y cols., 2019), lo que se debía a que 5 animales no

consumían alcohol. Para revertir este bajo consumo, se trasladó a estos 5 animales al bioterio general que estaba en un ciclo normal de luz-oscuridad y se mantuvieron allí hasta el final de este experimento. Con esta medida los animales retomaron su consumo de alcohol, observándose que desde el día 12 al día 28 el consumo promedio de alcohol del grupo total fue de $7,9 \pm 0,2$ g etanol/kg/día ($n=7$, un animal murió por razones no determinadas durante este período) (**Figura 14**).

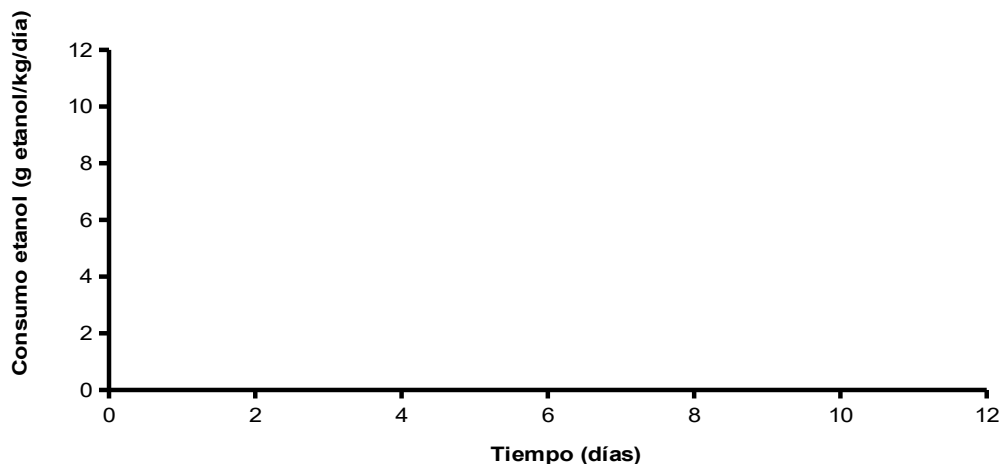


Figura 14. Consumo diario de etanol en ratas UChB expuestas al consumo voluntario de etanol bajo el paradigma de libre elección entre dos botellas. En el gráfico se muestra el consumo de etanol (g etanol/kg) promedio medido diariamente de una botella con etanol 10% ($n=7$). También se observa el cambio (realizado el día 11), donde una parte de los animales fue trasladada al bioterio general.

Luego del día 28, tanto los animales mantenidos en el bioterio general como los mantenidos en la sala de procedimientos, fueron privados del acceso a etanol durante 7 días manteniendo el acceso libre a agua (etapa de privación).

Seguido de esto, los animales fueron expuestos a 4 sesiones de asociación de 1 hora de duración (Ver métodos 4.6.1) en las cuales el fluido de refuerzo fue etanol 10% (1,5 mL en total de etanol 10%). Luego, los animales fueron expuestos a 4 sesiones de autoadministración operante con requerimiento FR1, donde el fluido de refuerzo fue etanol 10%. En las 4 sesiones bajo FR1, los animales mostraron una respuesta promedio de 30 ± 6 presiones activas, 3 ± 2 presiones inactivas y 22 ± 5 dosis de etanol 10%, equivalente a un consumo promedio de etanol de $0,57 \pm 0,1$ g etanol/kg/h ($n=7$). A continuación, el requerimiento de presiones se aumentó a FR2 durante 5 sesiones de autoadministración, en las que los animales realizaron en promedio 32 ± 6 presiones activas, $1 \pm 0,3$

presiones inactivas y recibieron 14 ± 2 dosis de etanol 10%, lo que equivale a un consumo promedio de etanol de $0,36 \pm 0,06$ g etanol/kg/h ($n=7$). Luego, el requerimiento se aumentó a FR3 durante 2 sesiones de autoadministración, donde los resultados promedio fueron de 40 ± 9 presiones activas, $1 \pm 0,5$ presiones inactivas y 12 ± 3 dosis de etanol 10%, lo que equivale a un consumo promedio de etanol de $0,31 \pm 0,07$ g etanol/kg/h ($n=7$). A continuación, el requerimiento fue aumentado a FR4 y se realizaron 11 sesiones de autoadministración con etanol 10% como solución de refuerzo, en las cuales los animales presentaron en promedio 52 ± 6 presiones activas, 1 ± 1 presiones inactivas y 12 ± 2 dosis de etanol 10%, equivalente a un consumo promedio de etanol de $0,29 \pm 0,03$ g etanol/kg/h ($n=7$) (**Figuras 15 y 16**).

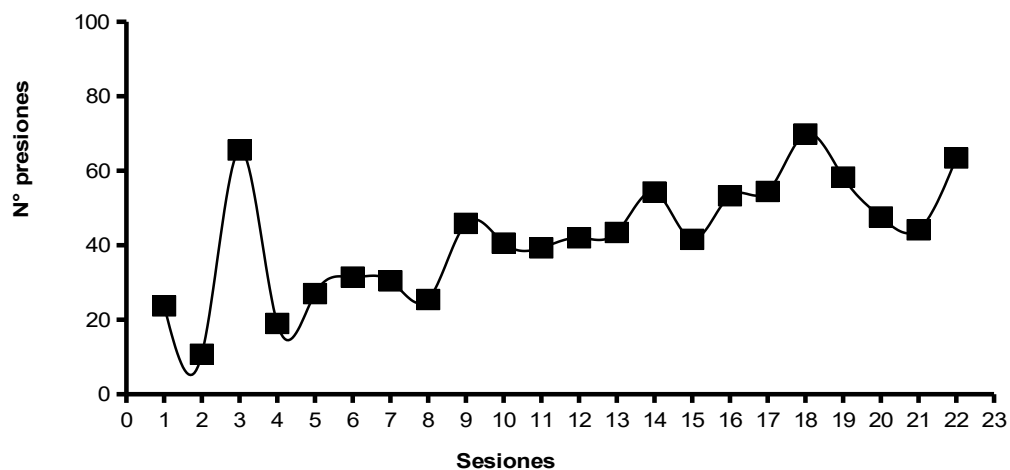


Figura 15. Promedio de presiones según sesión de autoadministración en ratas UChB pre-expuestas al consumo voluntario de etanol. Las flechas dobles superiores indican el aumento del requerimiento para obtener el refuerzo (FR1 a FR4) ($n=7$). En la sesión 3 los animales fueron previamente privados del acceso a agua durante 22 horas.

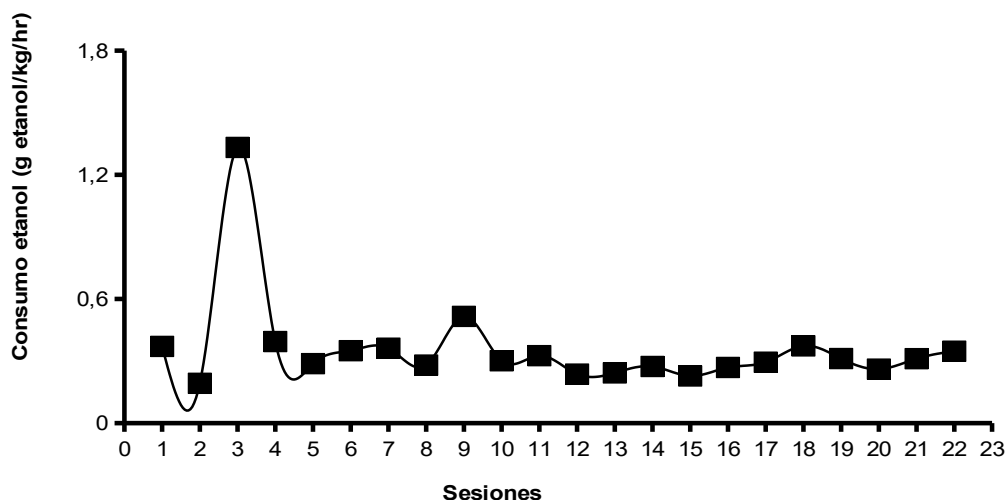


Figura 16. Consumo promedio de etanol según sesión de autoadministración en ratas UChB pre-expuestas al consumo voluntario de etanol. Las flechas dobles superiores indican el aumento del requerimiento para obtener el refuerzo (FR1 a FR4) (n=7).

Al término de la última sesión de autoadministración operante (sesión 22), a cada rata se le extrajo 100 μ L de sangre venosa para determinar la concentración plasmática de etanol tal como se indica en **Métodos 4.5**. Los resultados mostraron que la alcoholemia promedio fue de $5,5 \pm 2$ mg% (n=5) (rango: 2,57-14,29 mg%). El desempeño de las ratas en esta última sesión fue de 15 ± 4 dosis recibidas promedio, lo que equivale a un consumo promedio de $0,3 \pm 0,1$ (g etanol/kg) (n=5).

5.3 Establecimiento de la autoadministración operante de etanol en ratas UChB pre-expuestas al consumo de etanol restringido a 1 hora.

En este experimento se propuso estudiar el efecto de la exposición previa al consumo de etanol en un paradigma de acceso restringido a 1 hora en la adquisición de la autoadministración operante de etanol (Grupo 3). Para ello, a 5 animales mantenidos en jaulas individuales se les dio libre acceso durante 28 días a dos botellas, una conteniendo etanol 10% y la otra agua, tal como se indica en **Métodos 4.3**. En un comienzo los cinco animales fueron mantenidos en el bioterio general durante el libre acceso a etanol. El consumo promedio de etanol durante los 28 días de libre acceso fue de $7,89 \pm 0,09$ g etanol/kg/día (n=5). Luego, el acceso a la botella de etanol 10% fue restringido a 1 hora diaria durante 14 días, como se indica en **Métodos 4.3**. El consumo promedio de etanol de los animales durante los 14 días de acceso restringido a 1 hora fue de $1,19 \pm 0,07$ g etanol/kg/h (n=5) (**Figura 17**).

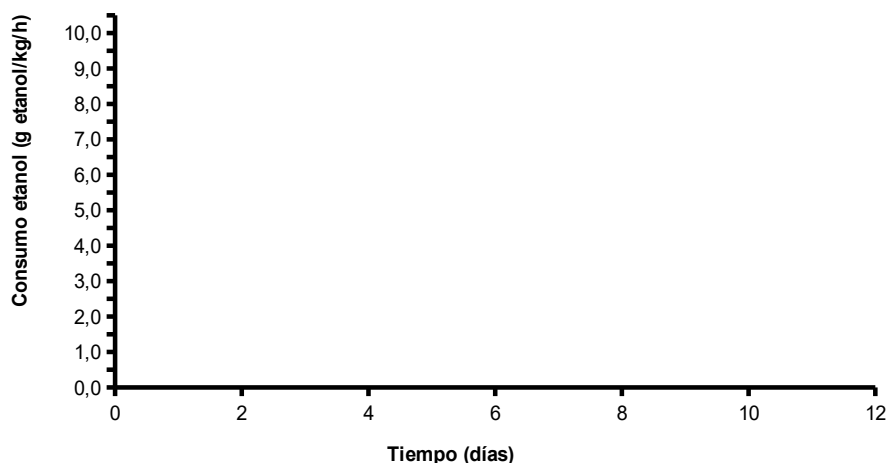


Figura 17. Consumo de etanol en ratas UChB bajo un paradigma de acceso restringido de 1 hora. En la figura se muestra el consumo de etanol promedio por hora (n=5).

Al finalizar los 14 días de consumo voluntario de etanol restringido a 1 h, se realizaron 4 sesiones de asociación con etanol 10% como refuerzo. Al igual que el grupo 2, los animales mantenidos en el bioterio general fueron trasladados a la sala de procedimientos solamente para realizar las sesiones de autoadministración.

Luego se realizaron 4 sesiones de autoadministración bajo un requerimiento de FR1 y con etanol 10% como fluido de refuerzo. Los resultados de esta etapa mostraron en promedio 23 ± 5 presiones activas, 2 ± 1 presiones inactivas y 19 ± 4 dosis de etanol 10%, equivalente a un consumo promedio de etanol de $0,47 \pm 0,1$ g etanol/kg/h (n=5). Seguido de esto, el requerimiento fue aumentado a FR2 durante 7 sesiones. Los resultados de esta etapa mostraron una respuesta de 15 ± 3 presiones activas, 3 ± 1 presiones inactivas y 6 ± 1 dosis de etanol 10%, equivalente a un consumo promedio de etanol de $0,16 \pm 0,04$ g etanol/kg/h (n=5). Luego se aumentó el requerimiento a FR3 durante 2 sesiones, alcanzándose un promedio de 8 ± 3 presiones activas, 2 ± 1 presiones inactivas y 3 ± 1 dosis de etanol 10%, equivalente a un consumo promedio de etanol de $0,077 \pm 0,03$ g etanol/kg/h (n=5). En la siguiente etapa se aumentó el requerimiento a FR4 durante 10 sesiones encontrándose que bajo esta condición los animales alcanzaron en promedio 8 ± 3 presiones activas, $2 \pm 0,4$ presiones inactivas y 2 ± 1 dosis de etanol 10%, equivalente a un consumo de etanol de $0,016 \pm 0,007$ g etanol/kg/h (n=5) (**Figuras 18 y 19**).

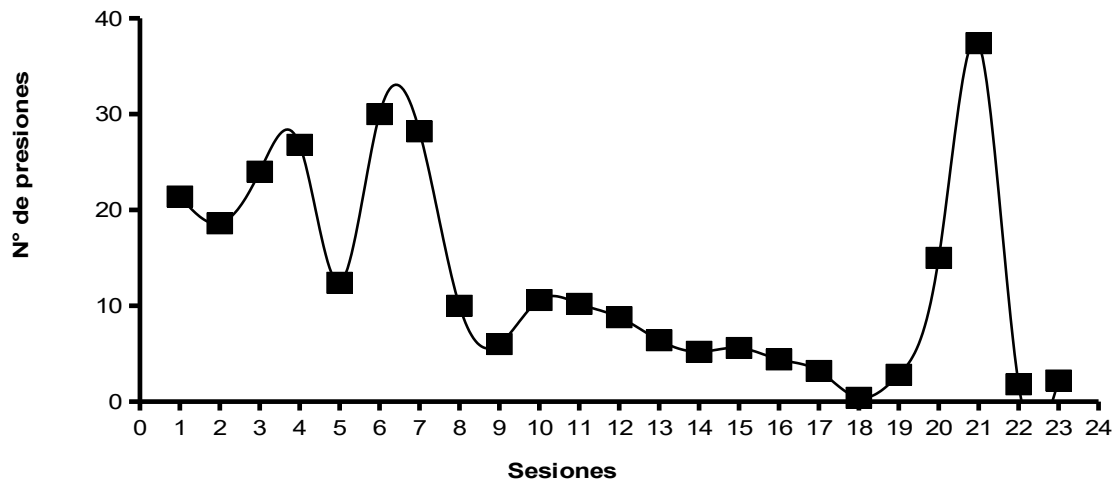


Figura 18. Presiones activas promedio en sesiones de autoadministración de etanol en ratas UChB pre-expuestas al consumo restringido de etanol. En el grafico se muestra el número de presiones promedio por número de sesión (n=5 animales). Las flechas dobles superiores indican el aumento del requerimiento para obtener el refuerzo (FR1 a FR4).

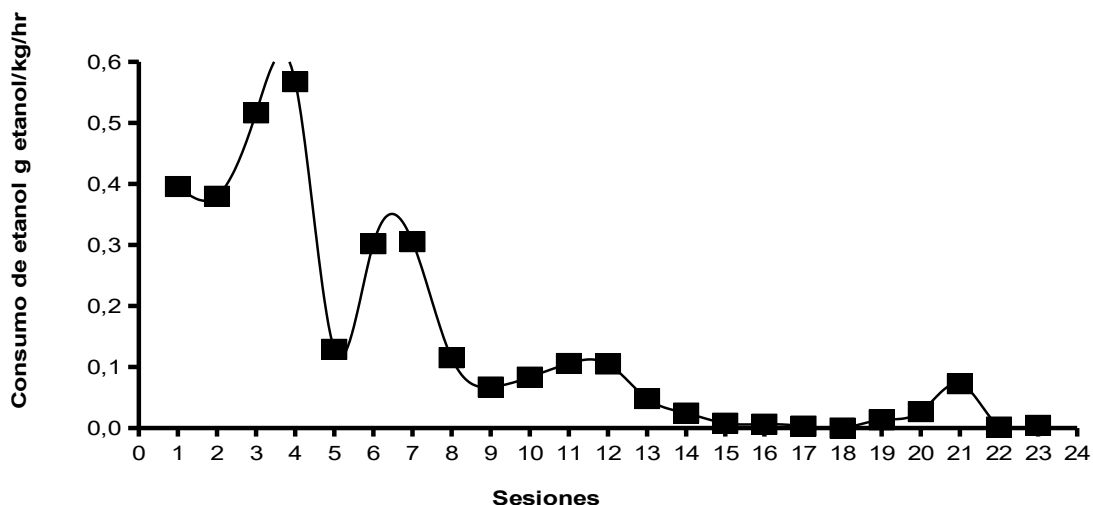


Figura 19. Consumo promedio de etanol según sesión de autoadministración operante en ratas UChB pre-expuestas al consumo voluntario restringido de etanol. En el grafico se muestra el consumo de etanol promedio (g etanol/kg) por número de sesión (n=5). Las flechas dobles superiores indican el aumento del requerimiento para obtener el refuerzo (FR1 a FR4).

Debido al bajo consumo de etanol por parte de este grupo, se decidió no realizar la medición de los niveles plasmáticos de etanol después de una sesión de autoadministración operante.

Adicionalmente, para evaluar si los animales de este grupo aún presentaban una preferencia por el consumo de etanol, se expuso a los animales al libre acceso a etanol (paradigma de 2 botellas) durante 1 hora al día durante 14 días. Los resultados mostraron que los animales presentaron un consumo promedio de etanol de $1,09 \pm 0,08$ g etanol/kg/h (n=5) (**Figura 20**).

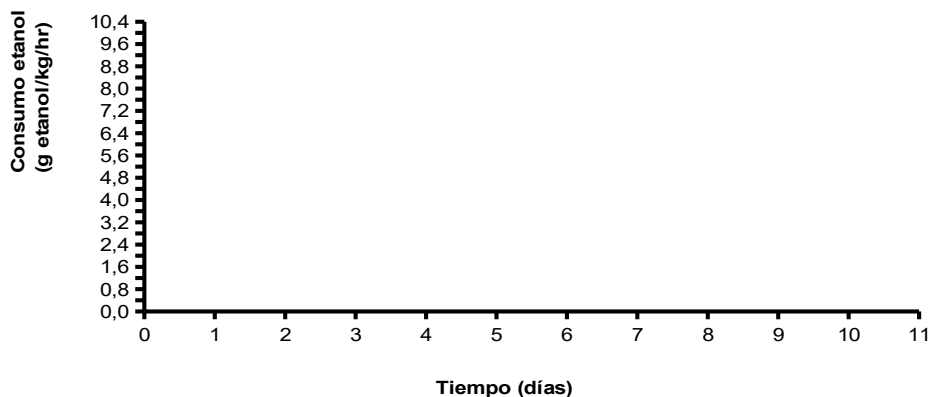


Figura 20. Consumo de etanol bajo el paradigma acceso restringido a 1 h en ratas UChB del grupo 3. En la figura se observa el consumo de etanol en una hora de acceso durante 14 días consecutivos.

El análisis de la alcoholemia en la última sesión de acceso libre durante 1 hora mostró un valor promedio de 72 ± 17 mg% (rango 12-120 mg%) ($n=5$), con un consumo promedio en la última sesión de $0,8 \pm 0,3$ g etanol/kg/h ($n=5$). No se encontró una correlación lineal entre el consumo de alcohol y la alcoholemia alcanzada en este grupo de animales ($R^2 = 0,07$) (datos no mostrados).

5.4 Establecimiento de la autoadministración operante de etanol en ratas UChB sin tratamiento previo.

En este experimento se estudió la adquisición de la autoadministración operante de etanol en ratas UChB no expuestas a ningún tipo de pre-exposición al consumo de etanol (Grupo 4). Para ello, los animales se expusieron a 4 sesiones de asociación con etanol 10% como fluido de refuerzo. Luego, se realizaron 4 sesiones de autoadministración con requerimiento FR1, presentando los animales un promedio de 10 ± 2 presiones activas, $2 \pm 0,4$ presiones inactivas y 7 ± 2 dosis de etanol 10%, equivalente a un consumo promedio de etanol de $0,19 \pm 0,04$ g etanol/kg/h ($n=8$). Luego el requerimiento se aumentó a FR2 durante 6 sesiones, presentando los animales un promedio 56 ± 8 presiones activas, 4 ± 1 presiones inactivas y 20 ± 3 dosis de etanol 10%, equivalente a un consumo promedio de etanol de $0,52 \pm 0,07$ g etanol/kg/h ($n=8$). A continuación, el requerimiento se aumentó a FR3 durante 3 sesiones, con una respuesta promedio de 78 ± 12 presiones activas, 3 ± 1 presiones inactivas y 22 ± 3 dosis de etanol 10%, equivalente a un consumo

promedio de etanol de $0,49 \pm 0,06$ g etanol/kg/h ($n=8$). Finalmente, el requerimiento se aumentó a FR4 durante 17 sesiones de autoadministración. En esta etapa los animales mostraron en promedio 95 ± 7 presiones activas, $2 \pm 0,4$ presiones inactivas y 22 ± 2 dosis de etanol 10%, equivalente a un consumo promedio de etanol de $0,50 \pm 0,03$ g etanol/kg/h ($n=8$) (**Figuras 21 y 22**).

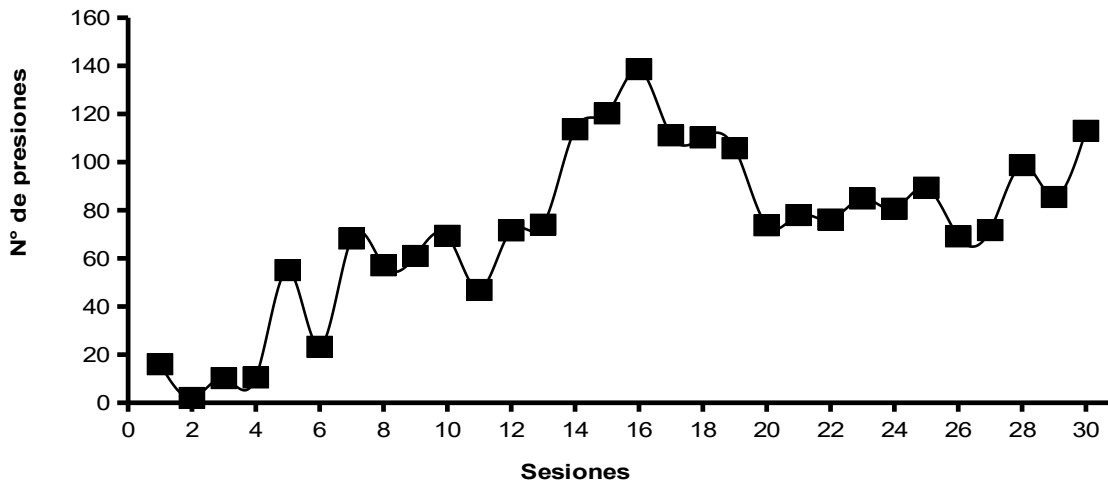


Figura 21. Número de presiones activas en ratas UChB del grupo 4. En la figura se muestra el número de presiones de la palanca activa promedio por sesión ($n=8$), durante las 30 sesiones de autoadministración. Las líneas superiores indican el aumento del requerimiento para obtener el refuerzo (FR1 a FR4).

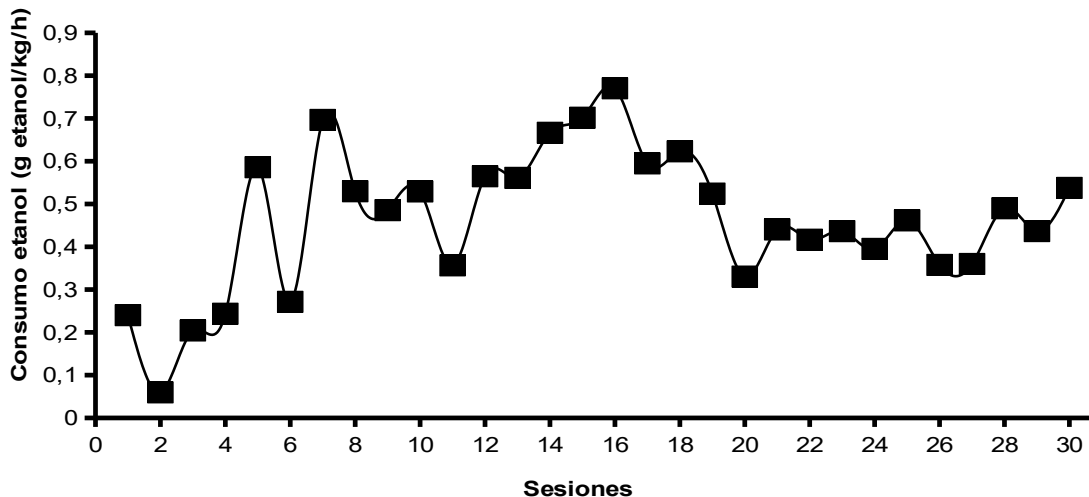


Figura 22. Consumo de etanol en ratas UChB del grupo 4. En la figura se muestra el consumo de etanol g etanol/kg/h promedio por sesión (n=8), durante las 30 sesiones de autoadministración. Las líneas superiores indican el aumento del requerimiento para obtener el refuerzo (FR1 a FR4).

Para este grupo tampoco se midió los niveles de etanol plasmático debido a un desperfecto del cromatógrafo gaseoso con el cual se realizaban estos análisis.

5.5 Resumen de resultados

A modo de resumen de los resultados obtenidos, se tomaron los datos de las últimas 10 últimas sesiones de autoadministración bajo un requerimiento FR4, para cada uno de los 4 grupos experimentales, y se obtuvo el promedio de presiones de la palanca activa y el consumo promedio de consumo de etanol.

En relación con el número de presiones, los resultados mostraron que los grupos 1 (saccharin to ethanol fading) y 4 (control) presentaron el mayor número de presiones activas (156 ± 6 y 85 ± 4 presiones/hora, respectivamente). Estos mismos grupos presentaron los mayores niveles de consumo operante de etanol ($0,65 \pm 0,03$ y $0,50 \pm 0,03$ g etanol/kg/sesión, respectivamente). Los animales tratados previamente con etanol (grupos 2 y 3) mostraron menores valores de presiones activas promedio (53 ± 3 y 8 ± 4 presiones/hora, respectivamente) y también los niveles más bajos de consumo promedio de etanol ($0,29 \pm 0,02$ y $0,01 \pm 0,004$ g etanol/kg/sesión, respectivamente). Un análisis de ANOVA de una vía mostró que las diferencias entre los grupos eran estadísticamente significativas ($p < 0,001$) (**Figura 23**).

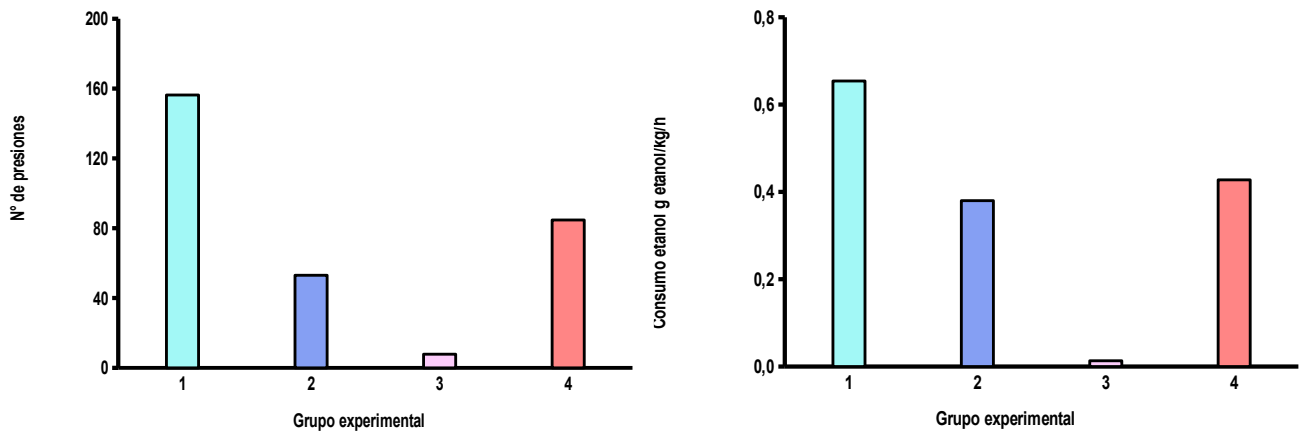


Figura 23. Resumen de los resultados de presión de palanca y consumo operante de etanol en los 4 grupos experimentales. A) Número de presiones de palanca activa promedio. **B)** Consumo de etanol promedio de las últimas 10 sesiones de autoadministración bajo FR4. One-way ANOVA $p < 0.001$. *** = $p < 0.001$ comparado con el grupo 4; Bonferroni's Multiple Comparison Test. Grupos experimentales, **1:** Saccharin to ethanol fading; **2:** Pre-exposición a etanol y privación; **3:** Pre-exposición a etanol y consumo restringido; **4:** Control.

En la **Figura 24** se muestra un gráfico de presiones acumulativas para cada grupo experimental durante la última sesión de autoadministración operante bajo FR4. Los resultados muestran que los animales de los grupos 1, 2 y 4 realizaban al menos el 75% de las respuestas durante los primeros 30 minutos de cada sesión. El grupo 3 (Pre-exposición a etanol y consumo restringido) presentó un bajo número de respuestas y no se observa variación apreciable en la gráfica. Un análisis ANOVA de dos vías mostró que las diferencias entre los grupos eran estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

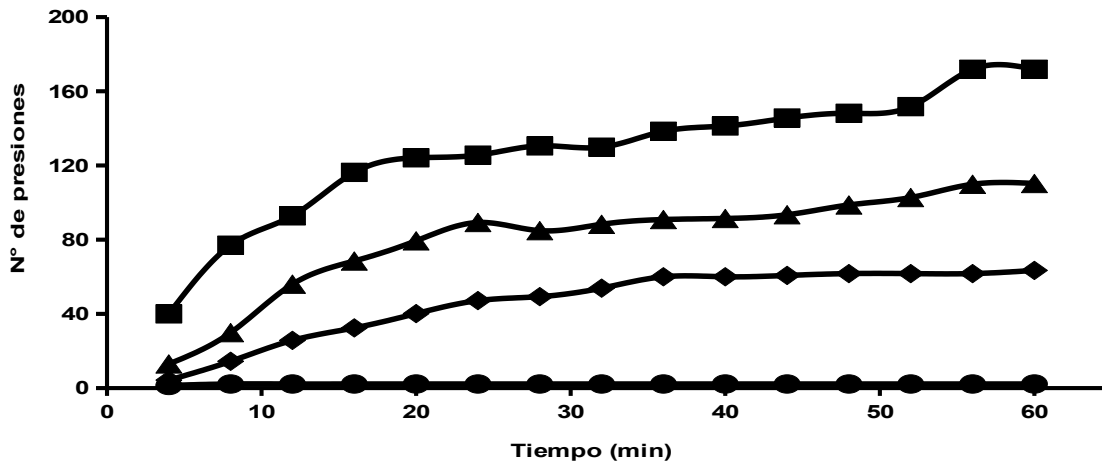


Figura 24. Presiones de palanca acumuladas en el tiempo en la última sesión de autoadministración operante para cada uno de los 4 grupos experimentales. Los datos corresponden a la última sesión de autoadministración realizada con requerimiento FR4 y con etanol 10% como refuerzo. Two-way ANOVA $p < 0.001$. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$ comparado con el grupo 4; Bonferroni's Multiple Comparison Test. Grupos experimentales, **1:** Saccharin to ethanol fading; **2:** Pre-exposición a etanol y privación; **3:** Pre-exposición a etanol y consumo restringido; **4:** Control.

6. DISCUSION

En esta memoria se estudió cómo las variables relacionadas con la experiencia previa a etanol por parte de ratas UChB podían afectar la autoadministración operante de etanol en este tipo de animales. Para ello se establecieron 4 condiciones de pre-exposición a etanol: i) animales expuestos al entrenamiento operante de “*saccharin to ethanol fading*”; ii) animales expuestos al libre consumo de etanol durante 28 días; iii) animales expuestos al consumo al libre consumo de etanol durante 28 días seguido de 14 días de acceso restringido a 1 hora y iv) animales sin ningún tipo de tratamiento previo. Los resultados mostraron que bajo un requerimiento de operación de FR4 los animales expuestos al método de “*saccharin to ethanol fading*” presentaron la mejor respuesta operante al consumo de etanol (157 ± 8 presiones activas/h; $0,66 \pm 0,03$ g etanol/kg/h), seguido del grupo experimental sin ningún tipo de exposición previa (95 ± 7 presiones activas/h; $0,50 \pm 0,03$ g etanol/kg/h). El grupo expuesto previamente al consumo de etanol durante 28 días presentó una respuesta menor (52 ± 6 presiones activas/h; $0,29 \pm 0,03$ g etanol/kg/h), mientras que el grupo expuesto al esquema de consumo de etanol 28 +14 presentó una respuesta operante marginal (8 ± 3 presiones activas/h; $0,02 \pm 0,01$ g etanol/kg/h).

Estos resultados muestran que es posible establecer el consumo operante de etanol en ratas UChB sin ningún tipo de tratamiento previo, sin embargo, el entrenamiento operante precedente con una solución de sacarina podría resultar en una respuesta operante a etanol más estable y de mayor magnitud.

A continuación, se discutirán en mayor detalle cómo estos resultados se comparan con los descritos en la literatura especializada, la interpretación de los resultados obtenidos en cada grupo experimental, las limitaciones y las proyecciones futuras de este estudio.

6.1. Grupo 1 (Saccharin to Ethanol fading).

En un principio, los animales de este grupo mostraron una baja motivación a presionar la palanca para obtener sacarina como refuerzo, lo que posiblemente se debió a que los estímulos programados en la caja Skinner no fueron efectivos en condicionar el comportamiento operante en los animales. Para lograr esta asociación se introdujeron cambios a la metodología de entrenamiento, que consistieron en lograr una asociación

entre los estímulos visuales y sonoros con la entrega del fluido. Para ello se instauraron las Sesiones de Asociación (SAs), en las cuales de forma automática en la caja Skinner se repetían ciclos regulares de luces/sonidos/entrega de fluido de forma de que el animal asociara los estímulos a la entrega del reforzante. La siguiente etapa era lograr la asociación entre la presión de la palanca con el complejo luces/sonido/fluido. Una alternativa para ello es dejar que la rata apretara de forma casual la palanca y lograra la asociación. Para reforzar este proceso, se incorporó una pequeña cantidad de una sustancia rica en azúcar sobre la palanca activa (jarabe de maíz), lo que hacía que el animal presionara la palanca involuntariamente al intentar comer esta sustancia y se desencadenara toda la gama de estímulos programados, los cuales ya había asociado en las SAs. Con estas modificaciones se logró aumentar el número de animales que **mostraron aprendizaje de la conducta operante**, es decir, que el animal alcanzara al menos 10 dosis de sacarina al 0,1% en la primera sesión de autoadministración. Este aprendizaje no fue homogéneo entre los animales del grupo, ya que algunos animales requirieron sesiones de asociación adicionales para evidenciar la conducta operante.

Desde las primeras sesiones de autoadministración de sacarina al 0,1% con un requerimiento de FR1, los animales mostraron un creciente número de respuestas sesión tras sesión, hasta alcanzar un nivel estable que se definió de forma que en 3 sesiones consecutivas no hubiera una variación mayor al 20% en el número de respuestas. En el caso de la autoadministración inicial de sacarina este nivel estable de respuesta se alcanzó después de 3 sesiones. Luego de esto se aumentó el requerimiento a 2 presiones de palanca por estímulo (FR2).

Una vez establecido el comportamiento operante utilizando sacarina 0,1%, se introdujo por primera vez etanol mezclado con sacarina (solución cocktail: 0,075% sacarina + 2% etanol) y no hubo cambios apreciables en el número de refuerzos promedio recibidos por sesión (sacarina 0,1%: 79 ± 4 vs cocktail: 78 ± 5).

El siguiente paso en el esquema de aprendizaje "*saccharin to ethanol fading*" es cuando se presenta como refuerzo una solución de alcohol sin sacarina por primera vez, y esto corresponde a la etapa donde se alterna entre las soluciones cocktail y etanol 5% (sesiones 35 a 40). En esta etapa (**Figura 10**) se observó que el número de presiones disminuía al reemplazar la solución cocktail (sacarina 0,075% y etanol 2%) por etanol 5% y que luego volvían a aumentar al entregar como recompensa solución cocktail. Estos resultados podrían interpretarse con que la solución de sacarina sería un reforzante más

potente que el etanol o que el aumento de la concentración de etanol podría tener un efecto aversivo en los animales. En ratas, las soluciones con baja concentración de etanol (hasta 6% p/v) en general tienen una mayor preferencia vs agua, pero al aumentar la concentración (10 a un 15%), para la mayoría de estos animales se vuelve aversivo y da lugar a grandes diferencias entre líneas de ratas alcohólicas seleccionadas y ratas no seleccionadas (Spanagel, 2000). Sin embargo, a pesar de la variación en el número de respuestas, los niveles de consumo de etanol se mantuvieron estables (~ 0,4 g/kg/h) debido a la compensación que generó la diferencia de concentración de etanol entre la solución cocktail y la de etanol 5%. Un efecto similar se observó en la etapa de desaparición de la sacarina y aumento progresivo de la concentración de etanol hasta 10% (sesiones 41 a 45; **Figuras 10 y 11**), observándose una disminución de 61% de presiones de la palanca. Sin embargo, el aumento de la concentración de alcohol en la solución compensó esta baja de presiones de la palanca activa, observándose un aumento neto del consumo de etanol a 0,6 g/kg/h. Esto desprende la idea de que los animales no solamente operaban la palanca por el intenso efecto reforzante de la sacarina, sino que también por el efecto reforzante del etanol ya que alcanzan incluso una mayor cantidad de etanol consumido.

Los resultados de la determinación de alcoholemia realizado a este grupo muestran una falta de correlación entre el consumo de etanol (calculado a partir del número de dosis recibidas) y la concentración sanguínea de alcohol. Estos resultados inesperados pueden deberse a varios factores, incluyendo aspectos de la metodología, de la analítica y aspectos relacionados con la farmacocinética del etanol. Respecto de la metodología (**ver Métodos 2.5**), es posible que en el periodo de espera entre que la muestra es incubada en frascos herméticos a 70°C y la inyección al espectrofotómetro, podría haberse producido fugas del etanol en estado gaseoso (punto de ebullición: 78,4 °C) desde las válvulas Mininert, ya que estas no eran nuevas y podrían haber presentado un sellado deficiente. Otro factor que podría haber afectado la correlación entre consumo/alcoholemia son las diferencias en el tiempo transcurrido entre el término de la sesión y la toma de la muestra de sangre para cada animal. Sin embargo, esta variación no superó nunca los 10 minutos, lo cual no explicaría las diferencias observadas. Un factor que no pudo ser controlado fue el hecho de que los animales presentaron un patrón de consumo heterogéneo a lo largo de la sesión, encontrándose animales que consumían la mayoría del etanol al inicio de la sesión, mientras que otros la distribuían a lo largo de ella. Considerando que las sesiones eran de una hora de extensión, que los animales

consumían cerca del 75% del etanol durante los primeros 30 minutos (**Figura 24**), y que la tasa de eliminación del etanol en la rata adulta es de 42 mg/dl por hora (Kelly y cols, 1987), esta variación en el patrón de consumo *si* pudiera haber afectado la correlación consumo/alcoholemia.

Sin embargo, en el estudio realizado por Vacca y cols., (2002) se encontró que en ratas sP que se auto administraron de forma operante etanol 10% en una tasa promedio de $0,63 \pm 0,05$ g etanol/kg, los niveles de alcoholemia alcanzados estuvieron en un rango de 30-45 mg%. Este nivel de alcoholemia corresponde a 0.3 – 0.45 g/L, rango de concentraciones plasmáticas que en humanos genera efectos tales como desinhibición, reducción del pensamiento crítico, sensación de relajación y aumento de la frecuencia cardíaca. Sin ir más lejos, en la Ley de Transito chilena un conductor con un nivel de alcoholemia superior a 0,3 g/L se considera bajo la influencia del alcohol. Considerando que en el Grupo 1 el consumo de etanol fue de 0,66 g/kg/h, se podría inferir que este nivel de consumo de alcohol si genera efectos farmacológicos relevantes.

El nivel de consumo operante de etanol obtenidos en el grupo 1 ($0,66 \pm 0,03$ g etanol/kg/h) son comparables a los obtenidos en otras líneas de ratas en las cuales se indujo el aprendizaje al consumo de etanol operante mediante variantes del método “*saccharin/sucrose to ethanol fading*”. Por ejemplo, Samson (1986) reportaron que ratas Long Evans entrenadas en el consumo de etanol usando sacarosa, alcanzaban un consumo operante promedio de etanol de $0,51 \pm 0,07$ g en sesiones de **30 minutos** bajo un requerimiento de FR4 y etanol 10% como fluido de refuerzo. Por otra parte, Vacca y cols. (2002) encontraron que ratas de la línea bebedora sP, entrenadas en el consumo de etanol mediante el método de sucrose fading, alcanzaban un consumo de etanol de $0,63 \pm 0,05$ g etanol/kg promedio en sesiones de **30 minutos** de duración, bajo un requerimiento de FR4 y etanol 10% como fluido de refuerzo. Finalmente, y utilizando el mismo método de entrenamiento con sacarosa, Files y cols. (1997) reportó un consumo operante de etanol de 0,28 g etanol/kg promedio en ratas Long-Evans en sesiones de **30 minutos** de duración.

Existe la variante de realizar la introducción al consumo de etanol utilizando sacarosa en vez de sacarina y es sabido que la diferencia principal entre estas dos sustancias es que la sacarosa tiene un aporte calórico/nutricional, mientras que la sacarina carece de este. En un experimento con ratas Sprague-Dawley se estudió la preferencia de los animales sobre soluciones de sacarina o sacarosa, en donde no se encontraron diferencias

importantes en la cantidad de consumo, pero sí en que con sacarina se observaron más episodios de consumo que con sacarosa (Smith y cols., 1987). En este mismo sentido, experimentos realizados en ratas muestran que el consumo de sacarosa podría verse auto limitado por el efecto de saciedad que genera su consumo en el animal debido a su carga calórica, mientras que para el consumo de sacarina este efecto no es observable (Scalafani y cols., 1985).

6.3. Grupo 2 (Pre-Exposición a etanol y privación)

Las condiciones experimentales de este grupo consideraban una pre-exposición previa al consumo de etanol (libre elección entre dos botellas) durante 28 días y 7 días de privación antes de ser expuestos al consumo operante de etanol en la caja de Skinner. Sorprendentemente, durante el acceso inicial a etanol un número importante de estos animales (5/8) mostraron un consumo voluntario de etanol muy reducido respecto del consumo habitual para las ratas de la línea UChB. Sólo el cambio a las instalaciones originales de donde provenían estos animales pudo aumentar su consumo voluntario de alcohol a los valores previamente esperados. Según lo observado, esta disminución del consumo de alcohol por los animales se debió al cambio de la sala en que fueron alojados. La diferencia más importante entre la sala original y la sala de procedimientos era el ciclo de luz/día, el cual estaba invertido entre ellas. Las jaulas, material de cama, agua y alimentación eran idénticos. En un trabajo realizado en el año 2014 en las mismas instalaciones y condiciones ambientales no se observaron cambios de relevancia en el consumo de etanol por ratas UChB tanto machos como hembras al ser trasladadas desde la sala original a la sala de procedimientos (Villarroel y Repullo, 2014). Es posible que un período de adaptación más prolongado a las nuevas condiciones de iluminación podría haber minimizado los cambios en el patrón de consumo de etanol que se observaron en estos animales al ser cambiados de sala.

Durante la administración operante de etanol y a lo largo de los distintos niveles de requerimiento (FR 1 a 4), estos animales presentaron consistentemente un menor número de presiones de la palanca activa como promedio grupal en comparación a los animales del Grupo 1, esto en parte por 2 animales que cuya motivación por operar el mecanismo se vio paulatinamente extinguida al aumentar el requerimiento. Por ejemplo, bajo requerimiento FR4, como resultado grupal, estos animales presentaron un promedio de

53 ± 6 presiones activas por sesión en comparación a las 150 presiones que en promedio presentaron los animales del Grupo 1, pero al restar del promedio a los dos animales mencionados anteriormente este aumenta a 74 ± 7 presiones activas por sesión. En lo que respecta al consumo de etanol por sesión, se observó que este se mantuvo relativamente constante a medida que se aumentaba el requerimiento de presiones, lográndose un promedio grupal de consumo de 0,29 ± 0,03 g etanol/kg/h bajo FR4, que corresponde a la mitad del consumo de etanol operante observado en el Grupo 1 (0,66 ± 0,03 g etanol/kg/h). Sin embargo, este valor aumenta a 0,41 ± 0,04 g etanol/kg/h al eliminar estos 2 animales que no presentaron respuesta.

En comparación con otros experimentos similares descritos en la literatura, un grupo de 27 ratas P pre-expuestas durante 30 días al consumo de alcohol bajo el paradigma de dos botellas (etanol al 15%) y seguido de 15 días de privación de alcohol, fue entrenado a la autoadministración operante de etanol al 15% bajo un requerimiento de FR5 en sesiones de 90 minutos. El consumo operante de etanol promedio alcanzado por los animales fue de 1,4 ± 0,1 g etanol/kg/sesión (n=27) (Rodd-Hendricks y cols., 2002). Estos resultados distan mucho de los obtenidos con el Grupo 2 ya que el consumo observado en nuestro experimento fue 5 veces menor al reportado en este estudio. Algunos factores que podrían explicar estas diferencias podrían estar relacionados con la cepa animal, la concentración de etanol utilizada y el tiempo de privación que se usó en ambos estudios.

Los resultados de las determinaciones de etanol plasmático para este grupo presentaron el mismo problema que las del Grupo 1, es decir una falta de correlación entre la cantidad de etanol consumida y los niveles de alcoholemia. Es muy posible que la falta de correlación observada se deba a los mismos factores que afectaron a este resultado en el Grupo 1.

6.4. Grupo 3 (Pre-exposición a etanol y consumo voluntario restringido)

El número de animales para este grupo fue menor al definido por la proyección estadística inicial (8 animales), debido a restricciones en la disponibilidad de animales en el momento del experimento (n=5 animales). Este grupo fue expuesto al consumo de alcohol bajo el paradigma de acceso libre a dos botellas durante 28 días, alcanzando un consumo promedio de 7,89 ± 0,09 g etanol/kg/día, en concordancia con el consumo habitual de alcohol que logran estos animales (8-9 g etanol/kg/día, Rivera-Meza y cols., 2019). En la

siguiente etapa y durante 14 días, el acceso al consumo de alcohol se restringió a 1 hora por día, alcanzando un consumo promedio de $1,19 \pm 0,07$ g etanol/kg/h, que es un poco menor a los niveles de consumo mostrados por esta línea de ratas en experimentos previos de acceso limitado a 1 hora que alcanzaron consumos de etanol de 1,6-1,8 g etanol/kg/h (Quintanilla y cols., 2012).

Luego de 4 sesiones de asociación, todos los animales de este grupo mostraron aprendizaje del mecanismo operante, pero al aumentar el requerimiento, los animales comenzaron a disminuir su consumo, pasando de 19 dosis bajo FR1 a 2 ± 1 dosis bajo FR4. Estos valores fueron muy bajos en relación al Grupo 1 que bajo FR4 alcanzó aproximadamente 33 dosis por sesión. Hasta el momento no se tiene una explicación a este bajo desempeño que consistentemente los grupos pre-expuestos a etanol (Grupos 2 y 3) mostraron durante el consumo operante. Es posible que el acceso previo al paradigma de consumo de etanol en dos botellas haya generado un aprendizaje en los animales que fue más persistente que el potencial efecto reforzante del etanol bajo el paradigma operante que requería un trabajo por parte del animal para recibir el reforzante. En este sentido, se encontró que al re-exponer estos mismos animales al consumo voluntario de etanol bajo el paradigma de acceso libre a dos botellas durante 1 hora por 14 días, éstos presentaron un nivel usual de consumo (**Figura 20**) demostrando que su voluntad por beber no se había extinguido. Un aspecto importante para discutir acerca de los resultados obtenidos con este grupo es que no se pudo completar el número de individuos requeridos según el análisis estadístico (5 animales en vez de 8). Esto repercutió aumentando la variabilidad de los resultados obtenidos. Para este grupo no hubo determinación de alcoholemias durante las sesiones operante debido al casi nulo consumo de etanol. Sin embargo, la determinación de la alcoholemia al final del acceso voluntario restringido a 1 hora volvió a mostrar una falta de correlación con el consumo de etanol, al igual que en los grupos 1 y 2.

6.4. Grupo 4 (Sin tratamiento previo, control)

Los resultados obtenidos con este grupo experimental mostraron que no es necesaria una introducción con sacarina o una pre-exposición al consumo de etanol para lograr que las ratas UChB se auto-administren etanol bajo una condición operante. Bajo un requerimiento de FR4 los animales del grupo 4 alcanzaron un consumo operante de

etanol de $0,50 \pm 0,03$ g etanol/kg/h, valor que es significativamente menor ($p < 0,001$, t-test) al alcanzado bajo las mismas condiciones por el grupo 1 “saccharin to ethanol fading” ($0,62 \pm 0,1$ g etanol/kg/h). De estos resultados se puede concluir que el entrenamiento operante con sacarina y la introducción gradual del etanol en la solución de refuerzo permiten establecer un mayor consumo operante de etanol en ratas UChB.

En un experimento similar a este, Augier y cols. (2014) encontraron que un grupo de ratas Wistar fue capaz de adquirir el comportamiento operante de autoadministración de etanol sin ningún tipo de tratamiento previo, alcanzando un consumo de $0,76 \pm 0,12$ g etanol/kg/sesión en sesiones de 30 minutos de duración. Las diferencias en los niveles de consumo de etanol en comparación al encontrado en esta tesis pueden deberse a que, en el estudio de Augier y cols., se usó requerimiento fijo de FR1 y la concentración de etanol en el fluido de refuerzo fue de 20%.

Una limitante identificada en los experimentos realizados en esta tesis y que podría influir en un menor consumo operante de etanol, dice relación con la extensión temporal (número de sesiones) de cada nivel de requerimiento de presiones (FR). Debido a restricciones de acceso a las instalaciones, no se pudo extender cada nivel de FR a un número de sesiones suficientes que indicaran una estabilización del comportamiento. Es posible que la progresión rápida entre los niveles de FR hubiese tenido un efecto negativo en la consolidación del aprendizaje y resultado en menores niveles de consumo operante de etanol.

6.5. Variables no estudiadas

Hay diversos factores que no fueron estudiados en estos experimentos y que podrían haber impactado los resultados obtenidos. Entre estos factores podemos mencionar el sexo, la edad de los animales, la concentración de etanol utilizada, la configuración del equipo de autoadministración y el estrés. En relación al sexo de los animales, en este estudio se utilizaron sólo ratas macho UChB, por lo que se desconoce los resultados que se habrían obtenido al utilizar ratas hembra. Sin embargo, en el estudio de Randall y cols. (2018) que utilizó el método de “*sucrose to ethanol fading*” (variante que utiliza sacarosa en vez de sacarina) para el aprendizaje del comportamiento operante en ratas Long Evans, no se encontraron diferencias significativas en el consumo de etanol entre machos y hembras. Un factor dependiente del sexo que si puede afectar los niveles de consumo

de etanol es la diferencia en la velocidad de crecimiento entre ratas hembras y machos de la línea UChB. En esta línea de ratas los machos adultos (aproximadamente 16 semanas) alcanzan en promedio un peso entre 400 y 450 gramos, mientras que las ratas adultas hembra alcanzan un peso cercano a los 300 g. Como los valores de consumo se expresan de forma relativa al peso (g etanol/kg) al usar ratas hembras y aun mismo nivel absoluto de consumo de etanol, la expresión relativa al peso podría resultar en un valor mayor.

Otra de las variables no estudiada fue la edad de los individuos. Según Doherty y cols. (2015), no existen diferencias en el consumo operante de etanol entre ratas Long-Evans juveniles (36 días) o adultas (60 días). Sin embargo, Anderson y cols. (2014) proponen que el etanol tiene un efecto negativo sobre el aprendizaje y el reconocimiento de claves en ratas Sprague-Dawley juveniles (23 días).

La concentración de etanol entregada como refuerzo en las sesiones de autoadministración es una variable importante en cuanto a patrones de consumo y preferencia por parte del animal. Existen estudios de autoadministración de etanol operante en que la concentración de etanol en el fluido de refuerzo se aumentó progresivamente. En uno de estos estudios, realizado en ratas Long-Evans y utilizando el método de “*Sucrose to ethanol fading*”, se aumentó la concentración de etanol hasta 40%, alcanzándose un consumo operante de etanol de $0,94 \pm 0,05$ g etanol/kg (Samson, 1986). Otro experimento realizado en ratas sP, bajo condiciones experimentales similares al estudio anterior, pero utilizando una concentración de etanol de 30% logró establecer un consumo operante de etanol de $1,07 \pm 0,06$ g etanol/kg (Vacca y cols., 2002). Estos resultados sugieren que si se aumenta progresivamente la concentración de etanol en la solución de refuerzo podría obtenerse mayores niveles de consumo operante en ratas UChB.

Las cajas de *Skinner* utilizadas en este trabajo presentaban dos palancas fijas (una activa y otra inactiva) y un pocillo central en donde se erogaba el fluido de refuerzo (**Ver Figura 1A**). En la literatura se reportan distintas configuraciones de palancas y elementos de entrega del refuerzo que podrían tener un efecto en la respuesta operante. Por ejemplo, en el estudio de Samson y cols. (1986) realizado en ratas Long-Evans que consumían etanol de manera operante, para estudiar la preferencia de los animales entre dos fluidos se instaló en la caja *Skinner* una segunda palanca y un segundo pocillo el que bajo un requerimiento de FR4 entregaban otras soluciones de refuerzo (agua, sacarosa 1% o

sacarosa 5%). Como resultado global, las respuestas por etanol vs las distintas soluciones de refuerzo presentadas en el segundo pocillo no disminuyeron en magnitud, si no que el número de presiones global aumentó. Estos resultados sugieren que la respuesta operante al etanol no se ve afectada por otros elementos reforzadores presentes en la caja de Skinner.

El estrés que los animales podrían estar sufriendo durante las sesiones de autoadministración podría afectar el aprendizaje de las claves entregadas por la caja Skinner, y un signo claro de estrés en la rata es el aumento de la frecuencia de defecación (Mönnikes H y cols., 1993). A pesar de que en este trabajo no se cuantificó esta variable, un conteo en el número de deposiciones después de cada sesión podría ser una medida del estrés que manifiesta cada animal, y este podría ser comparado a su vez con su desempeño durante las sesiones de autoadministración.

Finalmente, y como una forma de integrar los resultados obtenidos en los 4 grupos experimentales, en la **Figura 24** se muestra un gráfico de presiones acumuladas de la palanca activa versus el tiempo en la última sesión de autoadministración con un requerimiento de FR4. De esta manera se pudo modelar el patrón temporal de consumo de etanol de los animales según el grupo experimental. Los resultados mostraron que para todos los grupos cerca del 75% de las presiones activas, y por ende el consumo de etanol, se concentraba en los primeros 30 minutos de sesión. Estos resultados sugieren que las sesiones de autoadministración podrían reducirse de 60 a 30 minutos sin grandes modificaciones de los resultados obtenidos, lo que permitiría en experimentos futuros aumentar el número de sesiones al día que se podrían realizar y también estimar con mayor exactitud los valores máximos de alcoholemia al minimizar el decaimiento de este parámetro debido a la metabolización del etanol que se verifica entre el término del consumo de alcohol y la toma de la muestra de sangre.

Es necesario también mencionar que existen otras metodologías, diferentes a la cromatografía gaseosa, para la determinación de la alcoholemia. Dentro de ellas la determinación mediante HPLC y la fluorometría/colorimetría enzimática. La metodología HPLC es menos preferida que la cromatografía gaseosa porque no hay detectores de alta sensibilidad para la cuantificación del etanol (Carey y cols., 2005). Por otro lado, la metodología basada en fluorometría/colorimetría enzimática es preferida por ser simple y rápida, y se basa en la cuantificación del peróxido de hidrogeno producido por la oxidación del etanol por la enzima alcohol oxidasa (Carey y cols., 2005).

7. CONCLUSIONES

- Los grupos 1 (saccharin to ethanol fading) y 4 (sin tratamiento previo, control) mostraron el mayor número de presiones activas, lo que resultó en un consumo de etanol promedio de $0,65 \pm 0,03$ y $0,50 \pm 0,03$ g etanol/kg/sesión, respectivamente.
- Los niveles de autoadministración operante de alcohol de los grupos 1 y 4 son comparables con los mostradas por otras cepas de ratas, tales como las cepas sP ($0,63 \pm 0,05$ g etanol/kg/sesión) y Long-Evans ($0,56 \pm 0,05$ g etanol/kg/sesión).
- Los animales pre-expuestos al consumo de alcohol (grupos 2 y 3) mostraron un menor número de presiones de palanca y consumo de etanol que el grupo control.
- Los animales realizaron cerca del 75% de las presiones promedio en los primeros 30 minutos de sesión, lo cual sugiere que sesiones de 30 minutos de duración serían suficientes para establecer la autoadministración operante de etanol en ratas UChB.
- No se logró establecer una correlación entre el consumo operante de etanol y los niveles de alcoholemia en los animales principalmente por limitaciones metodológicas e instrumentales. Sin embargo, y de acuerdo a reportes de la literatura, la tasa de consumo de alcohol de los grupos 1 y 4 es suficiente para lograr niveles de alcoholemia farmacológicamente relevantes.
- El consumo operante de etanol de las ratas UChB en sesiones de 1 hora ($0,66 \pm 0,03$ g etanol/kg/hora; Grupo 1) es un 40% menor al consumo voluntario que muestran frente a un paradigma de acceso limitado a dos botellas ($1,09 \pm 0,08$ g etanol/kg/h; Grupo 3).
- En conclusión, una autoadministración operante de alcohol de impacto relevante puede ser establecida sin ningún tratamiento ni entrenamiento previo en ratas UChB.

8. REFERENCIAS

Anderson R & Spear L. Age differences in ethanol discrimination: Acquisition and ethanol dose generalization curves following multiple training conditions in adolescent and adult rats. *Alcohol: Clinical and Experimental Research*, 38(1): 186-194 (2014).

Augier E, Flannigan M, Dulman R, Pincus A, Schank J, Rice K, Kejun C, Heilig M & Tapocik J. Wistar rats acquire and maintain self-administration of 20% ethanol without water deprivation, saccharin/sucrose fading, or extended access training. *Psychopharmacology* 231: 4561-4568 (2014).

Carey K, Hustad J. Methods for Determining Blood Alcohol Concentration: Current and Retrospective. *Comprehensive Handbook of Alcohol Related Pathology Vol 3*: 1429-1444 (2005).

Ciccocioppo R, Economidou D, Cippitelli A, Cuccutelli M, Ubaldi M, Soverchia L, Anbarasu L & Massi M. Genetically selected Marchigian Sardinian alcohol-preferring (msP) rats: an animal model to study the neurobiology of alcoholism. *Addiction Biology* 11: 339-355 (2006).

Colombo G, Lobina C, Mauro A. M. Carai & Gessa GL. Phenotypic characterization of genetically selected Sardinian alcohol-preferring (sP) and non-preferring (sNP) rats. *Addiction Biology*, 11(3-4): 324-338 (2006).

De Sousa A. The Pharmacotherapy of Alcohol Dependence: A State-of-the-Art Review. *Mens Sana Monogr.* 8(1): 69-82 (2010).

Doherty J & Gonzales R. Operant self-administration of sweetened ethanol and time course of blood ethanol levels in adolescent and adult male Long-Evans rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 39(3): 485-495 (2015).

Files F, Denning C, Hyytia P, Kiianmaa K & Samson H. Ethanol-reinforced responding by AA and ANA rats following the sucrose-substitution initiation procedure. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 21(4): 749-753 (1997).

June H & Gilpin N. Operant self-administration models for testing the neuropharmacological basis of ethanol consumption in rats. *Preclinical Models of Neurologic and Psychiatric Disorders* 51: 1-26. (2010).

Kelly S, Bonthius D, & West J. Developmental changes in alcohol pharmacokinetics in rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 11(3): 281-286 (1987).

Ministerio de Salud de Chile (2010), "Encuesta Nacional de la Salud 2009-2010".

Organización Mundial de la Salud (2014), "Global Status Report on Alcohol and Health".

Palm S, Roman E, Nylander I. Differences in voluntary ethanol consumption in Wistar rats from five different suppliers. *Alcohol*, 45(6): 607-614 (2011).

Peana A, Porcheddu V, Bernnardini F, Carta A, Rosas M & Acquas E. Role of ethanol-derived acetaldehyde in operant oral self-administration of ethanol in rats. *Psychopharmacology* 232: 4269-4276 (2015).

Quintanilla ME, Israel Y, Sapag A & Tampier L. The UChA and UChB rat lines: metabolic and genetic differences influencing ethanol intake. *Addiction Biology* 11: 310-323 (2006).

Quintanilla ME & Tampier L. Place conditioning with ethanol in rats bred for high (UChB) and low (UChA) voluntary alcohol drinking. *Alcohol* 45: 751-762 (2011).

Quintanilla ME, Tampier L, Karahanian E, Rivera-Meza M, Herrera-Marschitz M & Israel Y. Reward and relapse: complete gene-induced dissociation in an animal model of alcohol dependence. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 36(6): 517-522 (2012).

Quiroz G, Guerra-Díaz N, Iturraga-Vásquez P, Rivera-Meza M, Quintanilla ME, Sotomayor-Zárate R. Erysodine, a competitive antagonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors, decreases ethanol consumption in alcohol-preferring UChB rats. *Behavioural Brain Research* 349: 169-176 (2018).

Randall P, Stewart R & Besheer J. Sex differences in alcohol self-administration and relapse-like behavior in Long-Evans rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 156: 1-9 (2017).

Rivera-Meza M, Vázquez D, Quintanilla ME, Lagos D, Rojas B, Herrera-Marschitz & Israel Y. Activation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) by ALDA-1 reduces both the acquisition and maintenance of ethanol intake in rats: A dual mechanism? *Neuropharmacology* 146: 175-183 (2019).

Rodd-Hendricks Z, Bell R, Kuc K, Murphy J, McBride W, Lumeng L & Li T. Effects of Ethanol Exposure on Subsequent Acquisition and Extinction of Ethanol Self Administration

and Expression of Alcohol-Seeking Behavior in Adult Alcohol Preferring (P) Rats: II. Adult Exposure. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 26(11): 1642-1652 (2002).

SAMHSA (Substance Abuse and Mental Health Services Administration) and NIAAA (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism). Medication for the Treatment of Alcohol Use Disorder: A Brief Guide. *HHS Publication No. (SMA) 15-4907*. Rockville, MD: Substance Abuse and Mental Health Services Administration, 2015.

Samson H. Initiation of ethanol reinforcement using a sucrose-substitution procedure in food-and-water-sated rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 10(4): 436-442 (1986).

Samson H, Pfeffer A & Tolliver G. Oral ethanol self-administration in rats: Models of alcohol-seeking behavior. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 12(5): 591-598 (1988).

Sclafani A, Nissenbaum J. On the Role of the Mouth and Gut in the Control of Saccharin and Sugar Intake: A Reexamination of the Sham-Feeding Preparation. *Brain Research Bulletin* 14: 569-576 (1985).

Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol (2016), "El Consumo de Alcohol en Chile: Situación Epidemiológica".

Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol (2015), "11° Estudio Nacional de Drogas en Población General".

Shen W. Anticraving therapy for alcohol use disorder: A clinical review. *Neuropsychopharmacology Reports* 38: 105-116 (2018).

Smith J, Wilson L, Krimm R & Merryday D. A moment-by-moment comparison of sucrose and saccharin drinking by the rat. *Chemical Senses* 12(1): 99-112 (1987)

Spanagel R. Recent Animal Models of Alcoholism. *Alcohol Research & Health* 24: 124-131 (2000).

Suh J, Pettinati H, Kampman K, O'Brien C & Charles P. The status of disulfiram: A half of a century later. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 26(3): 290-302 (2006).

Vacca G, Serra S, Brunetti, Carai M, Samson H, Gessa GL & Colombo G. Operant self-administration of ethanol in Sardinian alcohol-preferring rats. *Alcoholism, clinical & experimental research* 26(11): 1678-1685 (2002).

Villarroel G, Repullo P. Caracterización temporal del consumo de alcohol en ratas bebedoras UChB. Curso de Unidad de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad de Chile (2014).

9. ANEXOS

9.1 ANEXO 1. Creación de un protocolo de sesión utilizando GraphicState

Para comenzar a experimentar con este software es necesario crear un nuevo proyecto, este funcionara como la base de datos en que se programen las sesiones a utilizar. Para hacer esto seleccionar la opción “Select/Create Project Database”, seguido en el cuadro que aparecerá, llenar los campos requeridos en el cuadro “Enter a New Project”.

Luego será necesario fijar la configuración del Linc, en este caso seleccionar la opción “2 stations per Linc – 2 inputs per station”.

Lo siguiente será fijar los “Master Switches”, que en este caso son las palancas activa e inactiva. De esta manera, nos fijamos en la ranura SWITCH en la que está conectada la palanca que deseamos que sea la activa.

Active lever	Active lever
Inactive lever	Inactive lever

Hay dos opciones para cada switch, una opción ONSET y otra OFFSET. La primera opción significa que el registro de la presión del switch será apenas el switch sea activado (presionado en el caso de una palanca), mientras que el otro cuando el switch una vez activado sea desactivado, es decir, que cuando el animal retira sus patas de la palanca es cuando se registra la presión. En este trabajo se utilizó la opción ONSET para realizar las sesiones de autoadministración.

A continuación, el procedimiento para crear un protocolo de experimento. En el menú File, seleccionar la opción Create Experiment Protocol. En la ventana que se abrió, asignar un número y un nombre a dicho protocolo, y presionar State Creation. En la pantalla se ve que hay 3 elementos en la "State List".

RDY corresponde al momento previo a comenzar la sesión, para este estudio se configuró que la luz principal se encendiera, haciendo clic izquierdo sobre el botón al lado de H LITE del menú de botones.

FIN corresponde al estado en que termina la sesión. En este estado no se hizo ninguna configuración. S1 corresponde al primer estado de la sesión al comenzar. Para este estudio se configuró para que el juego de luces sobre la palanca activa parpadeara. Para hacer esto, seleccionar S1 en el State List y luego en la caja de botones hacer doble clic izquierdo sobre el primer botón de la fila bajo CUES. Configurar como se muestra en la siguiente ventana.

También se configuró que la luz principal estuviera encendida en todo momento, al igual que en el estado RDY.

Luego, en S1 nuevamente, presionar el botón Add Event Go To. Esto abrirá un pequeño menú que servirá para avanzar a otros estados. En este se indicará cuantos eventos de tal switch avanzarán al estado que programes. En este estudio se configuró para que 1 presion del Switch 1 – Active Lever (para OFFSET entre “[]”) nos mueva al estado S2. NOTA1: Para programar sesiones con FR distinto a 1, es en este menú donde se tiene que configurar el número de presiones que se desee estudiar.

Una vez configurado este evento, el estado 2 (S2) aparecerá automáticamente en la State List. Este estado será el que entrega fluido. Para programar dicha acción, seleccionar S2

en el State List y en la caja de botones hacer clic izquierdo en AUX 1 (o donde esté conectada la bomba de infusión al Linc). Luego hacer clic en Add Time Go To y llenar el menú con “AFTER 3 Seconds GO TO S1”. NOTA2: El tiempo en este estado es dependiente de la configuración de la bomba de infusión y del calibre de la jeringa montada en ella para que entregue el volumen de fluido deseado.

Para finalizar hacer clic en el botón Globals, luego clic en Add Time Go To y configurar “AFTER X Minutes GO TO FIN”. Siendo X el número de minutos que durará la sesión. Finalmente presionar Finished w/ Globals y luego Resolve States.

Para crear nuevos protocolos para aumentar el FR, se puede usar un protocolo ya existente como plantilla. Para hacer esto ir al menú Files, luego Edit/Review Experiment Protocol y seleccionar el protocolo a copiar, presionar Copy.