



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación

Trabajo Fin de Grado

Consumo voluntario de ansiolíticos en ratas Wistar: Efectos de la administración intermitente

Alumna: Ana Gaitán Moyar

Tutora: Carmen Torres Bares

Dpto: Psicología

Mayo, 2017

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
MÉTODO.....	15
Sujetos	15
Aparatos	15
Procedimiento	16
Variables dependientes.....	17
Análisis estadísticos	17
Resultados	18
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES.....	25
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
ANEXOS	30

RESUMEN

En el presente TFG el objetivo principal ha sido analizar los patrones de consumo voluntario del ansiolítico benzodiazepínico clordiazepóxido (CDP), tratando de ver el análisis de si dichos patrones podían diferir en función de que el fármaco se presentara de forma continua vs. intermitente/ alterna. Para lo que, los animales (ratas Wistar) fueron expuestos a una prueba de preferencia diaria de dos horas en la que tuvieron acceso a una botella con agua y a otra con CDP (en dosis de 2 mg/kg). La mitad de los animales recibieron el fármaco todos los días (grupo CDP/C), mientras que la otra mitad fue expuesta al mismo en días alternos, y por tanto en la mitad de las sesiones (grupo CDP/I). Se tomaron medidas de consumo de ambas botellas y se calculó un índice de preferencia, que indicaba si el animal prefería beber de la botella que contenía el fármaco más que de la que tenía el agua. Los resultados indicaron que la manipulación realizada (continua vs intermitente) no produjo los resultados esperados, dado que no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos en ninguna de las sesiones de la prueba de preferencia. Además, no se obtuvieron valores de preferencia que indicaran que los animales mostraran una tendencia más acusada a beber de la botella que contenía el CDP (valores de preferencia superiores a 0.5), lo que indica que, o bien los animales no detectaron las propiedades farmacológicas de este ansiolítico, o bien que dichas propiedades no fueron reforzantes y por tanto preferidas en comparación con el agua.

Palabras clave: clordiazepóxido, ansiolítico, consumo voluntario, prueba de preferencia, adicción, modelos animales, presentación continua, presentación intermitente.

ABSTRACT

In this TFG the main objective is to analyze the voluntary consumption patterns of the benzodiazepine anxiolytic chlordiazepoxide (CDP), trying to demonstrate whether these patterns could differ from each other or not according to how the drug was presented: continuous or flashing form. This explains why animals (wistar rats) were exposed to a daily preference test which lasted two hours. During this short time, they had access to a bottle filled with water and another bottle with CDP (in doses of 2 mg / kg). Half of the animals received the drug every day (CDP / C group), while the other half were intaking the drug on alternate days, and consequently in approximately half of the sessions (CDP / I group). Consumption measures were taken from both bottles and a preference index indicated if the animal preferred drinking from the bottle with the drug rather than from the one containing just water. The results reflected that the manipulation (continuous vs intermittent) did not performed as expected, since no significant differences were got among the groups of any session of the preference test. In addition, there were no preference values demonstrating that the animals tended to drink from the bottle containing the CDP (preference values higher than 0.5). This indicates that either the animals did not realize the pharmacological properties of this anxiolytic, or those properties did not reinforce the analysis so nor preferred among those wistar rats in comparison with water.

Key words: chlordiazepoxide, anxiolytic, voluntary consumption, preference test, addiction, animal models, continuous presentation, intermittent presentation.

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, el ser humano ha descubierto en su medio natural sustancias psicoactivas con efectos diversos, dándoles un uso terapéutico o recreativo, de acuerdo a factores culturales que han ido evolucionando con el tiempo. Es sabido que los animales también tienen experiencias con estas sustancias de forma cotidiana. Por ejemplo, tanto los animales vertebrados como algunos invertebrados son capaces de identificar en qué plantas, semillas y otras fuentes nutritivas pueden encontrar compuestos capaces de aliviar su malestar físico (Huffman, 2001; 2003). Al mismo tiempo, ciertos mamíferos consumen de forma voluntaria sustancias naturales tales como vegetales ricos en azúcares fermentados y alcohol (el néctar, la savia, la fruta), con capacidad para modificar funcionalmente sus cerebros y por tanto su comportamiento. Esto se puede ver ejemplificado gracias a un descubrimiento que se hizo en la selva tropical primaria de Malasia Occidental: las musarañas consumen frecuentemente cantidades intoxicantes de alcohol provenientes de los árboles (Spanagel, 2009). Más aún: Dudley (2000) propuso la “Hipótesis del mono borracho”, hipotetizando que puede haber un posible vínculo entre la ingesta de fruta fermentada y el consumo de alcohol en primates, lo puede llevarnos a pensar que el gusto por el alcohol puede ser una cuestión evolutiva, ya que desde hace 45 millones de años ha formado parte de la dieta de los primates. Aunque nuestros antepasados más recientes presentaban una dieta basada en carne, siempre han continuado comiendo fruta. En 2000 y 2004 se publicaron estudios en los que Dudley informaba sobre el contenido de alcohol en frutos silvestres de la palma de *Astrocaryum*; los frutos de esta planta pueden contener entre un 0.6 y un 4.5% de alcohol. Otros primates, como los orangutanes, también consumen frutas, por lo que el alcohol puede haber tenido repercusión en la evolución de la conducta ingestiva de los primates.

La conducta de consumo de sustancias psicoactivas se puede estudiar de forma sistemática en el laboratorio a través del empleo de modelos animales, que nos ayudan a comprender un problema de gran calado en nuestra sociedad actual: la adicción. En efecto, la adicción ha sido y continúa siendo un problema para la salud en general, si tenemos en cuenta los aspectos médicos, psicológicos y sociales asociados con la misma. En muchos países se consumen grandes cantidades de alcohol, café, té, etc. Estas sustancias son incentivos diarios, y su ingesta constituye una práctica común y un hábito aceptado socialmente. En el caso del alcohol, muchas personas lo ingieren para

conseguir estados de ánimo positivos, o bien para aliviar el estrés. No obstante, su consumo excesivo conduce a patrones conductuales patológicos, tal y como lo demuestran estudios clínicos y trabajos de laboratorio. Algo similar sucede en el caso de los ansiolíticos de prescripción médica, como las benzodiazepinas, que se consumen en ciertas ocasiones para enfrentar situaciones adversas y reducir estados emocionales negativos (Duffing, Mathias y Dougherty, 2014; Spanagel, Noori y Heilig, 2014).

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2004) define la adicción como una enfermedad física y psicoemocional, caracterizada por la necesidad de una sustancia, que se acompaña de un conjunto de signos y síntomas que dependen de factores biológicos, genéticos, psicológicos y sociales. Se trata, así, de un trastorno neuroconductual dependiente de complejas interacciones entre la genética y el ambiente, lo que explica su heterogeneidad clínica.

La conducta adictiva es definida por diferentes autores como el deseo o ansia por consumir sustancias, lo que se denomina *craving* (Castillo y Corcuera-Bilbao, 2008). Se trata de un trastorno crónico y recurrente caracterizado por la conducta compulsiva de buscar y consumir la sustancia adictiva, la pérdida de control del sujeto en relación con su conducta, y la aparición de un estado negativo cuando la sustancia no está disponible (Koob y Volkow, 2010).

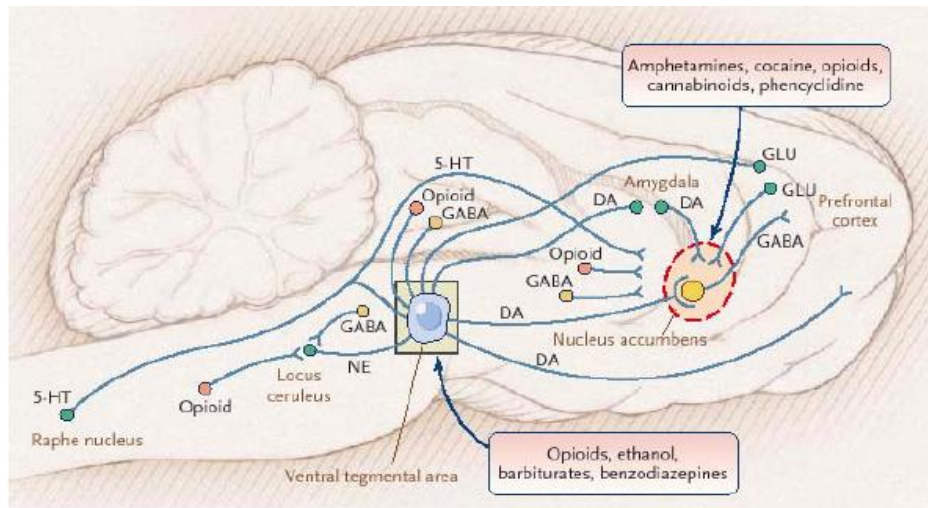
Según el DSM-V (2013), los trastornos relacionados con sustancias abarcan diez clases de drogas, entre las que se encuentran: alcohol, cafeína, cannabis, alucinógenos, inhalantes, opiáceos, sedantes, hipnóticos y ansiolíticos, estimulantes, tabaco y otras sustancias (o sustancias desconocidas).

Los trastornos relacionados con sustancias y los trastornos adictivos se manifiestan cuando aparece dos de los siguientes síntomas en un periodo de 12 meses:

- 1- Consumo frecuente de la sustancia.
- 2- Deseo persistente por la sustancia adictiva o esfuerzos fallidos de abandono.
- 3- Más inversión de tiempo necesario en la obtención, consumo o recuperación de los efectos de la sustancia.
- 4- Ansia por consumir la sustancia.
- 5- Consumo recurrente que impide hacer las tareas diarias.
- 6- Consumo continuado a pesar de producir problemas.

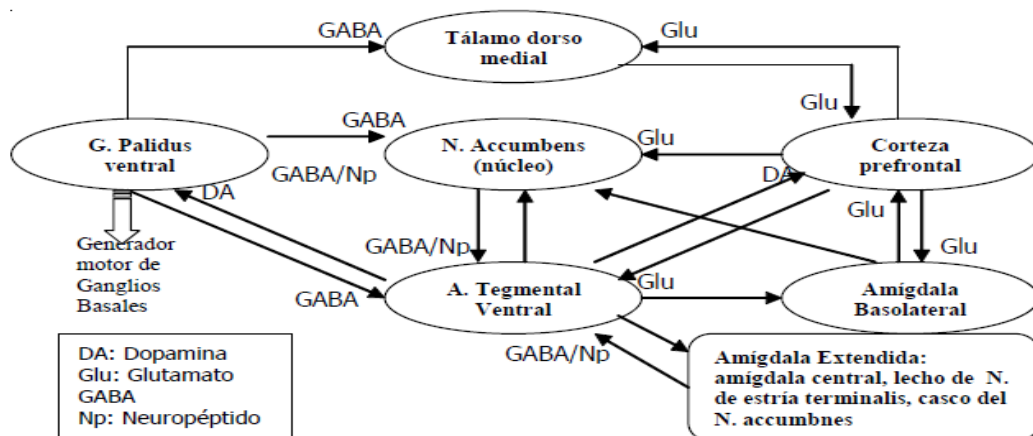
- 7- Abandono o reducción de actividades sociales, profesionales o de ocio.
- 8- Como recurrente en situaciones de elevado riesgo físico.
- 9- Consumo continuado a pesar de saber los riesgos que conlleva.
- 10- Tolerancia
- 11- Abstinencia.

¿Por qué consumimos sustancias de abuso? Un efecto común a todas ellas, que podría explicar su uso extendido en los seres humanos, es su capacidad para provocar euforia y aumentar nuestros sentimientos de bienestar subjetivo. En este sentido, es sabido que las drogas son poderosos reforzadores. Tales efectos dependen de la acción de estas sustancias en un conjunto de estructuras cerebrales y circuitos neuroquímicos entre los que destacan las vías y sistemas dopaminérgico, opioide y GABAérgico, entre otros (Koob, 1992). Estas regiones constituyen el llamado circuito o sistema de recompensa cerebral, lugar de acción de las recompensas naturales y de regulación de las conductas motivadas. Este circuito se origina en el mesencéfalo y proyecta sobre la base del prosencéfalo (Koob y Volkow, 2010). Su activación, derivada del consumo de sustancias de abuso, provoca un intenso efecto placentero, aumentando la probabilidad de que la conducta de consumo vuelva a emitirse debido las consecuencias reforzantes derivadas de la misma. El mecanismo de acción que parece subyacer a este fenómeno es el aumento en la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Di Chiara y North, 1992). Por consiguiente, una razón por la que se comienzan a consumir sustancias psicoactivas es por esta búsqueda de placer.



Tomado de: Vidal, A. (2006). Neurobiología de las adicciones: más allá del circuito de la recompensa. *Revista de psiquiatría y salud mental*, 7(2), 73-80.

No obstante, en esta conducta de activación se ven implicadas otras regiones además del núcleo accumbens, como el cuerpo amigdalino (que regula conductas motivadas por miedo y estrés) o la corteza prefrontal (que regula la importancia motivacional global atribuida y determina la intensidad de la respuesta; Kalivas y Volkow, 2005).



Tomado de: Vidal, A. (2006). Neurobiología de las adicciones: más allá del circuito de la recompensa. *Revista de psiquiatría y salud mental*, 7(2), 73-80.

Describamos brevemente este circuito, cuya activación se inicia en el área tegmental ventral, que libera dopamina en respuesta a un evento motivacionalmente relevante (McClure *et al.*, 2003). La liberación de dopamina conduce al inicio de una respuesta adaptativa apropiada al evento motivacional (Vidal, 2006). El cuerpo

amigdalino se encarga de establecer asociaciones entre eventos motivacionalmente relevantes y estímulos inicialmente neutros, pero que acaban convirtiéndose en pronosticadores del evento (Everitt *et al.*, 1999). Por su parte, la corteza prefrontal (incluyendo el giro cingulado anterior y la región orbital) contribuye a emitir o no la respuesta conductual, regulando además la intensidad de ésta. El núcleo accumbens se compone de dos divisiones: el casco (*shell*) y el núcleo (*core*). El área tegmental ventral envía las proyecciones dopaminérgicas a la división *shell*, modulando la importancia motivacional y estableciendo asociaciones aprendidas entre eventos motivacionales y percepciones concurrentes ambientales (Vidal, 2006).

A pesar de que todas las sustancias de abuso tienen efectos potenciadores de la transmisión dopaminérgica en el circuito de la recompensa comentado previamente, cada droga tiene también mecanismos de acción específicos en el sistema nervioso central. Dado que el presente Trabajo de Fin de Grado (TFG) se interesa por las benzodiacepinas, a continuación se revisan sus principales características.

El descubrimiento de las benzodiacepinas comenzó con la síntesis de clordiacepóxido (Cardoner y Segalàs, 2003), el primero de una familia de fármacos ampliamente utilizados para el tratamiento de la ansiedad, si bien también tienen otras indicaciones clínicas debido a sus efectos hipnóticos, miorrelajantes y anticonvulsivantes (López-Muñoz, Álamo y Cuenca, 1999). Estas propiedades farmacológicas dependen de la capacidad de estos compuestos para potenciar la acción del neurotransmisor inhibitorio GABA. El ácido gamma amino butírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central en mamíferos. El GABA puede activar a dos tipos de receptores: uno metabotrópico (GABA B), que va acoplado a proteína G, con función presináptica y postsináptica; y otro ionotrópico (GABA A), con función sináptica localizada en la membrana postsináptica. El GABA A es el receptor inhibitorio que está acoplado a un canal iónico, cuyo poro conductor es selectivo para los iones de cloro (Cl⁻). Este canal está modulado alostéricamente por benzodiacepinas, entre otras sustancias (como el etanol, los barbitúricos o los esteroides). Este receptor es una glicoproteína heteropentamérica que está formada por la combinación de múltiples subunidades polipeptídicas. Se conocen siete clases de subunidades formadoras de poro y diversas isoformas para cada clase (Medel, Cortijo, Gasca, Tepetlan, Pérez y Ramos, 2011).

El sitio de unión específico en el receptor GABA A para las benzodiazepinas es llamado sitio de unión benzodiazepínico, y está constituido principalmente por histidina en la posición 101 de una de las subunidades y en sitios homólogos de las demás subunidades. La substitución de este aminoácido por algún otro en esta posición evita el efecto farmacológico de las benzodiazepinas. Los ligandos de estos sitios no están limitados a los fármacos con estructuras benzodiazepínicas. El acoplamiento en el receptor GABA A de las benzodiazepinas aumenta la frecuencia de apertura del canal iónico, potenciando el efecto del neurotransmisor GABA sobre sus receptores ionotrópicos, y favoreciendo así la hiperpolarización de la membrana, gracias a la entrada del ión Cl⁻; es por esto que la neurona se vuelve menos susceptible a los estímulos activadores (es decir, menos excitable). Este efecto producido por las benzodiazepinas se conoce como modulación alostérica, ya que modifica la disposición tridimensional del receptor. La acción farmacológica que llevan a cabo las benzodiazepinas depende del tipo de subunidad que presente el receptor GABA A (Rosas, Simón y Mercado, 2013).

Los receptores GABAérgicos se distribuyen en torno al 30% en las neuronas corticales y talámicas. La concentración del GABA es máxima en el hipotálamo, la sustancia negra y el globo pálido, así como en área tegmental ventral. No obstante, la amígdala es el lugar en el que hay una mayor densidad de receptores de benzodiazepinas (Cardoner y Segalàs, 2003). En el circuito de la recompensa se ha observado que las benzodiazepinas aumentan la acción del GABA, y que este aumento tiene como consecuencia una mayor liberación de dopamina en el núcleo accumbens. Este efecto puede llegar a producir dependencia física, adicción y efectos secundarios como amnesia y sedación (Rosas, Simón y Mercado, 2013).

Además de buscar placer, a través de la activación del circuito cerebral previamente comentado, los organismos consumen drogas de abuso debido a la capacidad de éstas para reducir estados negativos de diversa índole: dolor físico, estados depresivos, ansiedad, estrés, etc. (Torres y Papini, 2016). Esta utilidad terapéutica que tienen las drogas de abuso en humanos ha derivado en un modelo explicativo conocido como la hipótesis de la automedicación (Khantzian, 1985), la cual plantea que ante un estado afectivo/emocional negativo puntual, o un trastorno psicopatológico crónico, los seres humanos tienden a buscar y consumir sustancias que mejoren o normalicen dichos estados de desequilibrio psicoemocional. En diferentes investigaciones se corrobora que

los comportamientos adictivos se originan y mantienen a través de este mecanismo de reforzamiento; más aún, la sustancia elegida por cada persona depende de qué síntomas específicos sufra, y de qué propiedades psicoactivas tenga la sustancia en cuestión, existiendo por tanto una especie de especificidad farmacológica en relación con la conducta de consumo (Li, Lu y Miller 2013). La hipótesis de la automedicación ha sido también puesta a prueba en el laboratorio con animales no humanos, comprobándose que cuando éstos son expuestos a situaciones generadoras de estrés emocional aumentan su consumo voluntario de sustancias ansiolíticas (véase, por ejemplo, Manzo *et al.*, 2015). En su conjunto, estas evidencias sugieren que el mecanismo de reforzamiento derivado del alivio de estados negativos constituye un factor crucial en el origen, desarrollo y mantenimiento de la conducta adictiva (Torres y Papini, 2016).

Como se desprende de lo revisado en estas líneas, los conocimientos relativos a las bases biológicas de la adicción han sido posibles gracias, en gran medida, al empleo de modelos animales de comportamiento humano (Camí, McGeary y Swift, 2005). Estos modelos permiten estudiar conductas cuyo estudio científico en seres humanos se ve limitado por razones éticas y/o dificultades metodológicas. En el caso que nos ocupa, (la adicción) se recurre a diferentes preparaciones experimentales, que se clasifican en función de si la exposición a la droga depende de la conducta intencional del animal (modelos de autoadministración), o si por el contrario la exposición a la droga es controlada por el experimentador (modelos de administración forzada). El comportamiento adictivo evoluciona sólo sobre la base de la ingesta voluntaria de drogas (Spanagel, 2003), de modo que sólo en el primer caso estaríamos reproduciendo los patrones de consumo que definen la adicción humana.

Los modelos de autoadministración pueden ser diferenciados en tareas de condicionamiento operante, o procedimientos de jaula-hogar. En las pruebas operantes se pide al animal que emita una respuesta instrumental (por ejemplo, presionar una palanca) para conseguir la droga, considerándose esta respuesta como una conducta de búsqueda de la misma. Por el contrario, en las tareas que se llevan a cabo en la jaula-hogar el animal tiene acceso a la droga (ilimitado o limitado), y la puede consumir de forma voluntaria mediante ingesta oral. Se trabaja así con la conducta consumatoria del animal, registrando la cantidad ingerida de la droga en un intervalo de tiempo determinado. Se suelen emplear pruebas de preferencia, en las cuales los animales disponen de una solución con agua y de otra solución con la sustancia psicoactiva en

estudio. Registrando el volumen consumido de cada solución, se puede calcular el índice de preferencia por la droga, obtenido al dividir el volumen de consumo de la misma por la suma de la ingesta de las dos soluciones presentadas. De este modo, la preferencia aparece cuando, del volumen total del fluido ingerido, más del 50% corresponde a la solución que contiene la sustancia en cuestión. Otra opción es presentar únicamente la solución de la droga por periodos limitados de tiempo, obligando al animal a que tenga un consumo forzado que influirá en los procesos de elección y preferencia posteriores (Kamenetzky y Mustaca, 2004). Bajo estas condiciones experimentales se observa repetidamente que los animales son capaces de consumir sustancias de abuso de forma espontánea y voluntaria; que las tasas de consumo se relacionan directamente con los efectos farmacológicos de la droga presentada (dependiendo, por ejemplo, de la dosis), y que los patrones de consumo se regulan en función de los efectos psicoactivos que el animal busca conseguir. Asimismo, un acceso prolongado a la sustancia bajo estas condiciones desemboca en la aparición de comportamientos y fenómenos similares a los observados en seres humanos, tales como tolerancia, pérdida de control, consumo compulsivo y recaídas (Spanagel, 2003). En el caso del alcohol, por ejemplo, su consumo voluntario pasa por tres fases o estadios de desarrollo. En primer lugar se encuentra la fase de adquisición, que se desarrolla a lo largo de las dos primeras semanas; en este estadio la ingesta de alcohol es inestable y a su vez pueden aparecer fenómenos de aversión debido a un mecanismo conocido como neofobia o tendencia a evitar estímulos novedosos. Esta primera fase va seguida de una fase de consumo controlado, que puede mantenerse algunos meses y en la que el consumo está regulado por factores externos e internos. Por último, a partir del sexto mes aproximadamente comienza una fase de pérdida de control en la que los factores externos e internos ya no influyen en el consumo de la droga, sino que éste parece automatizarse. El comportamiento de los animales se caracteriza ahora por una alta preferencia por la droga y por una transición del consumo controlado al no controlado, en un “punto de no retorno” (Spanagel, 2000).

En los estudios de consumo voluntario de alcohol se ha comprobado en repetidas ocasiones que existe una gran variabilidad entre los individuos en sus tasas de preferencia por el alcohol, y estas diferencias pueden determinar la susceptibilidad de los sujetos a desarrollar patrones anormales de consumo. De hecho, es complicado en ciertas ocasiones lograr un consumo estable en los animales. Para lograrlo se recurre a

diversos procedimientos, por ejemplo: presentar dosis gradualmente crecientes de alcohol; dar la opción de beber diferentes concentraciones de forma simultánea; mezclar la solución etílica con alguna sustancia con alta palatabilidad, como sacarosa o sacarina; recompensar la conducta de consumo con comida; etc. (Kamenetzky y Mustaca, 2004). Este último procedimiento pretende enmascarar el sabor (tal vez aversivo) del alcohol y alentar así a los animales a beber, lo que es más fácil de lograr cuando al animal está sujeto a un procedimiento de privación de comida, sobre todo si la sustancia se presenta diluida en una dieta líquida y ésta es su única opción alimenticia (Wise, 1975). Hay que tener en cuenta, además, que estos factores interaccionan de forma notable con determinantes genéticos, existiendo importantes diferencias individuales y de cepa en los patrones de consumo voluntario de alcohol (Carnicella, 2014). Así, algunas cepas de animales desarrollan rápidamente pérdida de control y patrones de consumo compulsivo, muestran altas tasas de preferencia con dosis muy bajas, o no requieren de procedimientos de presentación gradual, enmascaramiento con comida, etc. (véase, por ejemplo, Manzo *et al.*, 2012).

Un procedimiento que parece exitoso a la hora de conseguir un consumo voluntario creciente de etanol consiste en su presentación intermitente, ya que cuando los animales son expuestos a periodos de presentación de etanol breves, en periodos cortos de tiempo, presentando continuamente agua, los animales consumen mayores cantidades de alcohol, mostrando una gran dependencia tras los periodos de privación (Pinel y Huang, 1976). Es más, cuando la dosis de alcohol se va aumentando progresivamente (aclimatación) tienden a consumir mucha más cantidad de alcohol, a pesar del aumento de la dosis (Wayner y Greenberg, 1972). Se ha comprobado que cuando se compara el consumo de alcohol en animales que han sido expuestos a éste por diferentes procedimientos, ya sea: aclimatación, programa continuo, programa intermitente, o programa de libre elección, los animales que han sido expuestos a un consumo intermitente desarrollan una mayor preferencia por el alcohol, lo que se comprueba tras finalizar el entrenamiento y someter a los animales a una prueba de libre acceso a la droga (Wise, 1973). Estos resultados sugieren que la presentación intermitente del alcohol constituye un procedimiento experimental efectivo para conseguir patrones elevados, estables o crecientes de consumo voluntario en los animales, reproduciendo con éxito el modo en que algunos seres humanos consumen alcohol, es decir, de forma abusiva.

El presente TFG se enmarca en este contexto teórico experimental, y tuvo como objetivo principal analizar si el consumo voluntario de un tipo de benzodiacepina, el CDP, depende de su presentación intermitente vs. continua, tal y como se comprueba en el caso del alcohol. Las razones para realizar esta investigación fueron las siguientes. En primer lugar, las benzodiacepinas son una familia de sustancias cuyo mecanismo de acción es similar a drogas de abuso como el alcohol. Se trata de uno de los fármacos de prescripción médica más recetados y consumidos, derivando a menudo en problemas de adicción (Monras, Mondon y Jou, 2010). En segundo lugar, numerosas investigaciones clínicas sugieren que el consumo abusivo de estos fármacos se relaciona con conductas de automedicación, es decir, con un intento deliberado de reducir estados emocionales negativos inducidos por diversas experiencias ambientales aversivas (Konopka *et al.*, 2013). En tercer lugar, muy pocos estudios han investigado en el laboratorio si los animales son capaces de ingerir espontáneamente y de forma oral estos fármacos, y cuáles son las condiciones experimentales idóneas para lograr patrones de consumo comparables a los descritos en nuestra especie. Destacan en este sentido estudios recientes llevados a cabo en la Universidad de Jaén. En 2015, Manzo y colaboradores analizaron el efecto de una experiencia emocional negativa de pérdida sobre el consumo voluntario del ansiolítico CDP. Se comprobó que la reducción repentina en la concentración de una solución de sacarosa (del 32% al 4%) produjo un aumento en el consumo de CDP (1 mg/kg) en los animales sometidos a esta experiencia, en contraposición a lo hallado en los sujetos del grupo control -no devaluados- (Manzo *et al.*, 2015). Estos resultados han sido replicados de forma parcial en el laboratorio en otros estudios realizados posteriormente, comprobado que, a diferencia del alcohol, la preferencia por CDP no siempre se observa en condiciones de consumo oral. Una de las razones de estas inconsistencias podría estar relacionada con la dosis elegida, que suele oscilar entre 0,1 y 2 mg/kg. Sin embargo, la manipulación sistemática de la dosis tampoco ha arrojado resultados concluyentes, dado que, con independencia de la dosis, en algunos estudios se obtiene preferencia y en otros no. Por todo ello, en este TFG se analizó si el consumo oral de CDP está influido por las condiciones de presentación (intermitente vs continua) en una prueba de preferencia estándar. Sobre la base de la revisión de la literatura especializada, se establecieron dos hipótesis y sus correspondientes predicciones: (1) el CDP es una sustancia ansiolítica cuyos efectos reforzantes inducirán a los animales a consumirlo de forma espontánea, mostrando preferencia por la solución que lo contenga en relación con el agua; (2) la presentación

intermitente de una droga favorece un aumento en el consumo de la misma en las sesiones en las que ésta está disponible, por lo que los animales sometidos a una presentación intermitente de CDP consumirán más el fármaco que los que tengan condiciones de presentación continua.

MÉTODO

1.- Sujetos

Para este estudio se utilizaron 20 ratas Wistar macho de unos 90 días de edad procedentes de Charles River (Barcelona, España). Al comienzo de experimento, los animales tenían una media de peso aproximada de 333,75 gr y una desviación típica de 14,26 gr). Los animales fueron alojados en jaulas individuales con libre acceso a agua durante todo el experimento, y una semana después de su llegada al estabulario se inició un procedimiento de privación de comida para mantenerlos al 82-85% de su peso *ad libitum*. Dicho peso fue utilizado para la asignación pseudo-aleatoria de los sujetos a dos grupos, con el objetivo de que el promedio y la variabilidad intra-grupos fuese similar entre estos grupos. La temperatura del estabulario se mantuvo constante y osciló entre 18° y 20°, con una humedad relativa de entre 50-60%, y con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, encendiéndose las luces gradualmente a las 7:30 de la mañana y apagándose del mismo modo a las 19:30.

El experimento fue realizado en el Centro de Producción y Experimentación Animal (CPEA) de la Universidad de Jaén, contando con el visto bueno del Comité de Bioética de la Universidad de Jaén. Además, este estudio siguió las directrices de la Unión Europea para el uso de animales en Investigación (2010/63/EU) y la Ley española (6/2013; RD. 53/2013) (véase Anexo I).

2.- Aparatos

Se utilizaron 20 jaulas hogar de plexiglás de 32 cm de largo, 15 cm de alto y 30 cm de ancho. Estas cajas tenían el suelo cubierto con serrín y estaban cubiertas por una rejilla metálica, sobre la cual se colocaban las botellas de agua, los bebederos con el fármaco y el agua, y la comida (pellets). Las botellas que se usaron para suministrarles el agua a los animales tenían una capacidad de 500 ml, mientras que los bebederos utilizados para la prueba de preferencia fueron botellas con boquilla con una capacidad

de 150 ml. Las boquillas disponían de una bolita metálica en su interior que facilitaba el consumo de la solución por parte del animal y evitaba que el líquido se pudiera derramar. Los bebederos que contenían el compuesto farmacológico fueron forrados con cinta adhesiva negra, debido a la fotosensibilidad del fármaco y la posibilidad de que éste perdiera eficacia por efecto de la luz. Para evitar el efecto que esta variable (la botella con la cinta adhesiva negra) pudiera tener en el experimento, todos los animales tuvieron un bebedero forrado y el otro no.

La sustancia farmacológica que se utilizó para llevar a cabo el estudio fue el ansiolítico CDP, suministrado por Sigma Aldrich (Madrid, España). La solución se preparó disolviendo 2 mg/kg del fármaco en 12 ml de agua del grifo (Manzo *et al.*, 2012).

Se utilizó una báscula digital de precisión Adam para pesar a los animales, una báscula Cobos CBComplet C-220CBS para pesar los bebederos utilizados en la prueba de preferencia, y una báscula precisa 125A para pesar el CDP.

Los datos de consumo de las soluciones de agua y CDP fueron anotados en unas hojas de registro, en las cuales se anotaba el peso de cada bebedero antes y después de la prueba de preferencia. Todos los datos fueron introducidos y ordenados diariamente en un fichero Excel, utilizado para calcular las variables dependientes utilizadas en este estudio (véase Anexo II).

3.- Procedimiento

Los animales fueron pesados diariamente antes de comenzar cada sesión. Del mismo modo, los bebederos con las soluciones correspondientes (agua vs CDP) fueron preparados cada día y pesados antes del comienzo de la sesión. El experimento se realizó en dos fases: una primera fase de habituación que duró cuatro sesiones, que comenzaron coincidiendo con el cuarto día de privación de comida; y una fase experimental que duró 25 sesiones, comenzando tras la cuarta sesión de habituación. Durante la fase de habituación los dos bebederos se rellenaron con agua y fueron colocados en la jaula hogar de los animales durante dos horas, dejando que éstos eligieran libremente uno u otro para beber (prueba de preferencia de libre elección). El primer día el bebedero negro se colocó a la derecha y el transparente a la izquierda, alternándose la posición de los bebederos cada dos días durante todo el experimento.

Una vez transcurridas las dos horas de la prueba de preferencia los bebederos fueron retirados y pesados, con el objetivo de calcular el consumo del líquido correspondiente a cada botella mediante el fichero Excel. Finalizada la prueba de preferencia se colocó la botella de agua habitual en la jaula hogar, así como la comida correspondiente para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso *ad libitum*.

La fase experimental fue similar a la de habituación, excepto en lo siguiente: los animales del grupo *continuo* (CDP/C) recibieron una botella con CDP (2 mg/kg) y otra con agua durante 25 sesiones; los sujetos del grupo *intermitente* (CDP/I) recibieron CDP vs agua los días impares, y agua vs agua los días pares, siendo por tanto expuestos a un procedimiento de presentación intermitente del ansiolítico.

4.- Variables dependientes

Las variables dependientes utilizadas en este estudio fueron las siguientes: (1) consumo de CDP; (2) consumo de agua; (3) consumo total (consumo de CDP + consumo de agua); y (d) razón de preferencia (consumo de CDP/consumo total). Para interpretar esta razón, los valores que están por encima de 0,5 indican que los animales prefieren el CDP y valores por debajo de 0,5 nos dicen que los animales rechazan el CDP. Valores cercanos a 0,5 indicarían que el animal no muestra una preferencia clara por ninguna de las dos soluciones.

5.- Análisis estadísticos

Los valores obtenidos en cada sesión experimental para cada una de las variables dependientes fueron sometidos a un análisis de varianza con dos factores. Un primer factor (Sesión) fue manipulado intra sujeto con 25 niveles, correspondiendo cada nivel a las sesiones de la prueba de preferencia por CDP vs agua. El segundo factor (Grupo) fue manipulado entre grupos a dos niveles: continuo (grupo CDP/C) vs intermitente (grupo CDP/I). Se comparó el consumo de CDP entre los grupos CDP/C y CDP/I en todas las sesiones, y también sólo en aquellas en las que los animales del grupo CDP/I recibieron el ansiolítico (sesiones impares). Asimismo se comparó, en el grupo CDP/I, el consumo medio de la solución de la botella negra entre los días en que ésta tenía agua y los días en que contenía CDP, con el objetivo de estudiar si los animales eran capaces de detectar la presencia del ansiolítico en la solución suministrada. Para todos los análisis

realizados se estableció un nivel de significación estadística de $p < 0.05$. Para realizar estos análisis se utilizó el programa estadístico SPSS.19.0.

6.-Resultados

La Figura 1 representa los datos correspondientes al consumo de la solución que contenía CDP en las sesiones de entrenamiento en los grupos CDP/C y CDP/I. La Figura 2 representa los valores correspondientes a la preferencia por dicha solución. Como se comentó anteriormente, el grupo CDP/I recibió el fármaco en las sesiones impares.

Figura 1

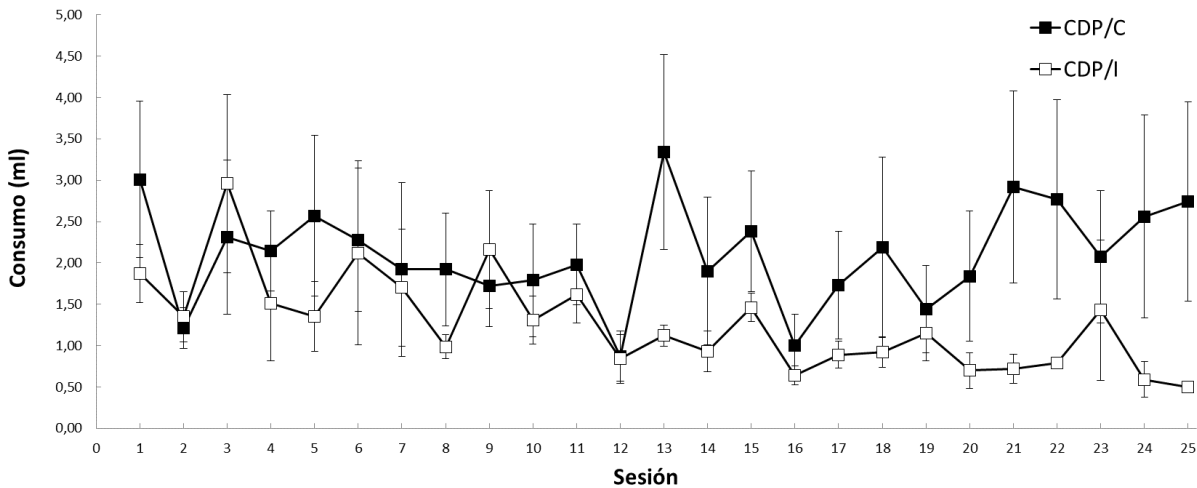
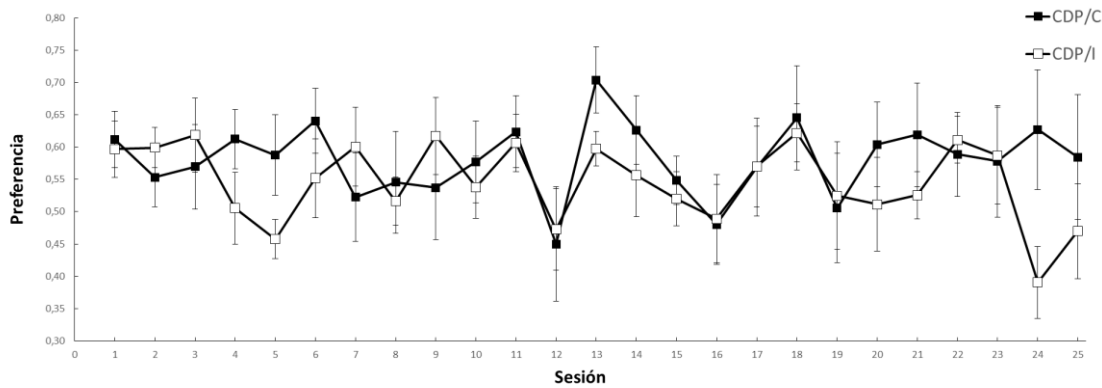


Figura 2



Los análisis estadísticos realizados con la variable consumo de CDP no arrojaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la variable grupo, sesión, ni tampoco en relación con la interacción entre ambas ($F_s < 2,181$, ns). Cuando se comparó el consumo de CDP entre los grupos CDP/C y CDP/I sólo los días en que estos últimos tenían acceso al fármaco, los resultados no arrojaron tampoco diferencias significativas en relación con la variable sesión, grupo, ni tampoco para la interacción entre ambos factores ($F_s < 2.463$, ns). Por su parte, el análisis realizado para comparar, en el grupo CDP/I, el consumo de la botella negra los días que tenía agua frente a los días que tenía CDP arrojó un efecto marginalmente significativo, $F(1, 9) = 4,014$, $p < 0,076$.

Los resultados obtenidos con la variable razón de preferencia fueron similares, no hallándose diferencias entre los grupos con respecto a la preferencia por CDP en ninguna de las sesiones analizadas ($F < 1.355$, ns). Tampoco se obtuvieron resultados significativos cuando se compararon los valores de preferencia por CDP mostrados por los grupos CDP/C y CDP/I en los días en que ambos tenían acceso al fármaco ($F < 1$, ns), y del mismo modo el grupo CDP/I no mostró diferencias en su preferencia por la solución de la botella negra cuando se compararon los valores obtenidos en los días en que ésta tenía agua en relación con los días en que contenía CDP ($F < 1$, ns).

Estos resultados indican que la administración intermitente de CDP en condiciones de preferencia no produce mayores tasas de consumo del fármaco ni tampoco de preferencia por el mismo en comparación con condiciones de presentación continua. Más aún, el hecho de que ninguno de los grupos mostrara valores de preferencia significativamente superiores a 0.5 (0.58 en el grupo CDP/C promediando las 25 sesiones, y 0.56 en el grupo CDP/I promediando las sesiones en las que este grupo recibió el compuesto) sugiere que ambos grupos no prefirieron beber de la botella en la que estaba contenida la sustancia ansiolítica. Esta conclusión se puede observar también comparando los datos de consumo de la botella negra y de la blanca o transparente para cada grupo por separado (Figuras 3 y 4). Si bien el grupo que recibió CDP de forma continua (CDP/C) parece beber más de la botella que contenía el fármaco (negra) que de la que contenía agua (blanca), los análisis estadísticos no arrojaron ninguna diferencia significativa, como tampoco se obtuvo al realizar la misma comparación en el grupo CDP/I.

Figura 3

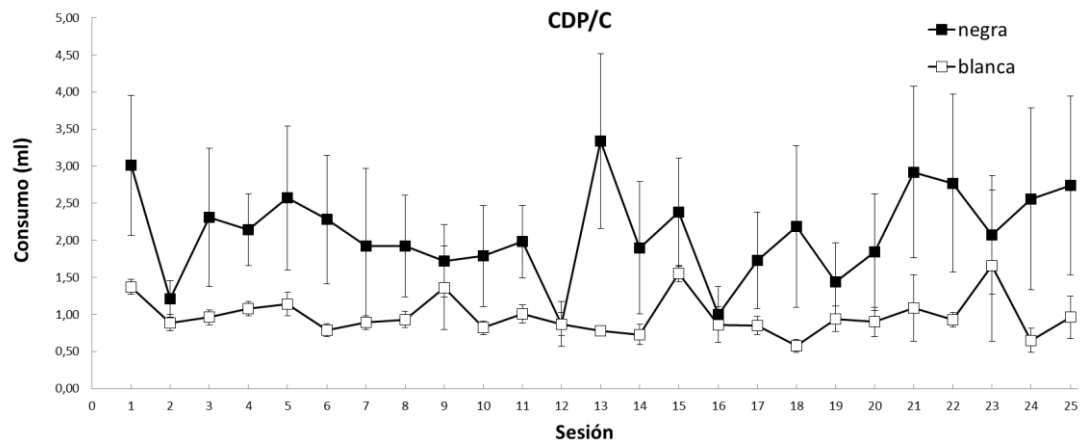
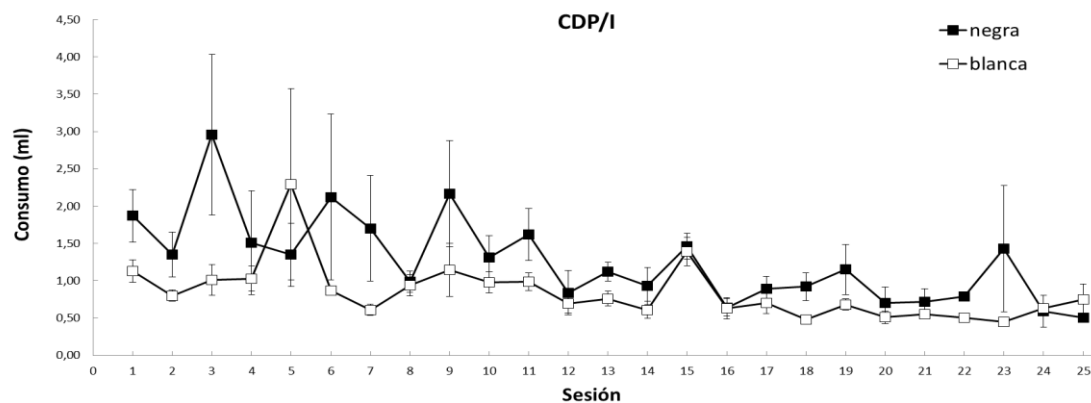


Figura 4



DISCUSIÓN

El objetivo del presente TFG fue analizar los patrones de consumo voluntario del ansiolítico benzodiazepínico CDP, tratando de analizar si dichos patrones podían diferir en función de que el fármaco se presentara de forma continua vs. intermitente/ alterna. Para ello, los animales (ratas Wistar) fueron expuestos a una prueba de preferencia diaria de dos horas en la que tuvieron acceso a una botella con agua y a otra con CDP (en dosis de 2 mg/kg). La mitad de los animales recibieron el fármaco todos los días (grupo CDP/C), mientras que la otra mitad fue expuesta al mismo en días

alternos, y por tanto en la mitad de las sesiones (grupo CDP/I). Se tomaron medidas de consumo de ambas botellas y se calculó un índice de preferencia, que indicaba si el animal prefería beber de la botella que contenía el fármaco más que de la que tenía el agua. Los resultados indicaron que la manipulación realizada (continua vs intermitente) no produjo los resultados esperados, dado que no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos en ninguna de las sesiones de la prueba de preferencia. Además, no se obtuvieron valores de preferencia que indicaran que los animales mostraran una tendencia más acusada a beber de la botella que contenía el CDP (valores de preferencia superiores a 0.5), lo que indica que, o bien los animales no detectaron las propiedades farmacológicas de este ansiolítico, o bien que dichas propiedades no fueron reforzantes y por tanto preferidas en comparación con el agua. Por consiguiente, no se logró conseguir el objetivo que perseguía el estudio, que no era otro que el de establecer unas condiciones experimentales adecuadas para conseguir una preferencia por CDP detectable y estable a lo largo de las sesiones de la prueba de preferencia. Tampoco se confirmaron las dos hipótesis de partida, a saber: (a) que el CDP es una sustancia ansiolítica cuyos efectos reforzantes inducirían a los animales a consumirlo de forma espontánea; y (b) que los animales sometidos a una presentación intermitente de CDP consumirían más el fármaco que los que tuvieran condiciones de presentación continua. Por tanto, la ausencia de resultados informativos obliga a continuar realizando estudios futuros que permitan identificar bajo qué condiciones precisas los animales consumen CDP de forma espontánea y lo prefieren al agua.

Varias pueden haber sido las razones que podrían explicar la ausencia de resultados. En primer lugar, la dosis utilizada (2 mg/kg, diluida en 12 ml) pudo haber sido muy baja, más aún teniendo en cuenta que los animales tuvieron un consumo muy reducido de líquidos. Si se observa la Figura 1 se puede comprobar que los sujetos bebieron entre 1 ml y 3.5 ml, una cantidad menor a la registrada en estudios anteriores (véase Manzo *et al.*, 2015). Siguiendo con este razonamiento, si un animal por ejemplo consume 2 ml, eso significa que dicho animal ha ingerido realmente 0,33 mg de CDP, una cantidad que claramente fue insuficiente para producir un efecto comportamental detectable (es decir, la preferencia por la botella que contenía el fármaco). En este sentido, un estudio previo realizado recientemente comprobó que los animales preferían CDP a agua cuando el fármaco era presentado en dosis de entre 0.1 mg y 1.4 mg/kg (Ortega, 2016). Este resultado contrasta con lo obtenido en el presente experimento, en

el que con una dosis de 2 mg/kg no se obtuvieron resultados de preferencia significativos. Una razón de estas divergencias pudo ser que en el experimento de Ortega (2016) los animales consumían más cantidad, llegando a superar los 5 ml en la mayoría de las sesiones. Del mismo modo, en otro experimento realizado recientemente no se obtuvo evidencia de que los sujetos tomaran CDP dependiendo de la dosis, que osciló entre 0.1 mg/kg y 60 mg/kg. De nuevo, los animales mostraron tasas de consumo muy bajas, que no superaron los 3 ml en casi ninguna de las sesiones. Sin duda alguna, se requieren estudios futuros que analicen con detenimiento esta cuestión, y que bien aumenten la dosis, o bien reduzcan el volumen de administración, para de este modo comprobar si esta variable pudo ser la responsable de los resultados negativos obtenidos en este experimento.

Otra posible explicación de los resultados se relaciona con una variable extraña que hemos detectado que podría afectar a la conducta del animal. Dicha variable se refiere al hecho de forrar las botellas que contienen el fármaco con cinta aislante. Algunos animales tienden a morder la cinta, y esa conducta podría ser reforzante para ellos y conducirlos a acercarse más a esta botella frente a la transparente, con un aumento concomitante en el consumo con independencia de la sustancia contenida en la misma (CDP o agua). Si se observa la Figura 4, que representa el consumo de las botellas negra y blanca en el grupo CDP/I, parece haber una tendencia a consumir de la botella negra, que es independiente de la sesión en la que dicha botella contenía CDP. Si bien no disponemos de resultados estadísticos que avalen esta suposición (probablemente por los bajos niveles de consumo registrados en este experimento), el hecho de que esta tendencia la observemos una y otra vez en los experimentos que se realizan en el laboratorio obliga a controlar esta variable en futuros estudios, optando por pintar las botellas de negro, en lugar de forrarlas.

Una aproximación alternativa a la discusión del presente experimento se refiere a la siguiente cuestión: ¿En qué condiciones debe encontrarse un animal para consumir un ansiolítico de forma espontánea? Es sabido que el alcohol es una sustancia que no siempre es preferida por los sujetos, y que a menudo requiere de manipulaciones experimentales complejas para conseguir patrones de preferencia estables: consumo forzado, presentación gradual, asociación con comida, adulteración con sabores o comida, presentación intermitente, etc. (Kamenetzky y Mustaca, 2004; Spanagel, 2009; Wise, 1973). Al mismo tiempo, se comprueba que la tendencia de un animal a consumir

un ansiolítico como el alcohol o el CDP no sólo está determinada por este tipo de variables, sino también por su estado emocional interno. En efecto, son numerosas las evidencias indicativas de que la presentación de estímulos aversivos, o la retirada de apetitivos, genera en los sujetos una reacción emocional negativa que intentan corregir con el consumo de sustancias ansiolíticas. Se trata de la hipótesis de la automedicación emocional, la cual ha recibido un claro apoyo empírico (Torres y Papini, 2016). En estudio llevado a cabo por este grupo de investigación se comprobó que, si un animal es sometido a una prueba de inducción consistente en devaluar la magnitud de una recompensa esperada, se observa justo después de la misma un aumento significativo en el consumo de alcohol (2%) y de CDP (1 mg/kg; Manzo *et al.*, 2015). Este aumento no es tangible si el animal no ha recibido esta experiencia frustrante. Poniendo en relación estos hallazgos con los resultados obtenidos en este TFG, se podría argumentar que los animales no consumieron CDP porque no estaban en una “situación emocional” propicia para hacerlo. En este sentido, algunos experimentos realizados recientemente indican, repetidamente, que los sujetos no consumen dosis apreciables de ansiolíticos (alcohol a bajas dosis y CDP) a no ser que estén emocionalmente activos (Donaire *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta esta evidencia, en estudios futuros podría combinarse la manipulación intermitente/continua empleada en este trabajo con una prueba de inducción previa, ansiogénica, que promueva un consumo mayor de CDP y permita ver si hay diferencias dependiendo del tipo de presentación del compuesto.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo pueden ponerse en relación con estudios previos realizados con presentación intermitente de alcohol en pruebas de consumo voluntario (dada la inexistencia de trabajos similares realizados con benzodiacepinas, incluido el CDP). El estudio más conocido realizado al respecto es el de Wise (1973), quien sometió a ratas Wistar a varios procedimientos de exposición a una dosis de alcohol al 20%. Algunos de estos animales recibían una presentación gradualmente creciente de la droga (un procedimiento denominado de aclimatación al alcohol). Otros grupos recibían la presentación abrupta de la dosis elevada. En otros casos los sujetos recibían la droga en todas las sesiones (programa continuo), mientras que un último grupo, el más relevante para el presente TFG, recibió la solución de etanol en días alternos. Los resultados indicaron que, tras 30 días de entrenamiento, los animales expuestos al programa intermitente desarrollaron una ligera preferencia por la solución de alcohol, llegando a beber una media de 9 g/kg/día de alcohol cuando se les

sometió a un test de elección libre agua/alcohol. La aclimatación previa a la dosis del 20% no afectó a los resultados, que fueron similares con independencia de que los sujetos hubieran recibido la droga en condiciones de presentación forzada (una sola botella disponible) o de libre elección (dos botellas).

Estudios más recientes arrojan resultados similares, si bien en estos casos no se incluyen grupos de comparación expuestos al alcohol de forma continua. Por ejemplo, Smutek et al., (2014) expusieron a animales alojados en grupo a un programa de presentación intermitente de alcohol: acceso 24 horas a la droga (presentada en dosis de 4%, 8% y 12%) tres días a la semana. Tras cuatro semanas sometidos a estas condiciones de acceso a la droga se obtuvo una alta proporción de lametones dirigidos hacia las botellas que contenían alcohol, tanto en machos como en hembras. La manipulación de la solución de alcohol mediante la adulteración de su sabor con una sustancia amarga (quinina) no pareció afectar al patrón de consumo, al menos con dosis bajas (0.01%). Finalmente, cuando los animales fueron entrenados para realizar un número progresivamente creciente de respuestas instrumentales para tener acceso a la botella con alcohol (programa de razón progresiva), alcanzaron un máximo de 21 respuestas consecutivas, siendo este número 10 veces superior al obtenido para conseguir acceso a agua.

Por su parte, Momeni y Roman (2014) utilizaron animales seleccionados en función de sus diferencias extremas en consumo de alcohol para desarrollar un procedimiento de consumo voluntario basado en el acceso intermitente a la droga. Los animales tenían acceso a alcohol (20%) y a agua durante tres días consecutivos por semana, y continuaron con este régimen de presentación durante siete semanas. Los resultados mostraron un aumento paulatino y estable en el consumo de alcohol a lo largo de las semanas, el cual fue especialmente patente en los animales catalogados como altos bebedores (*high drinking rats*). Este grupo de sujetos presentó, además, un efecto de privación de alcohol, en el sentido de que consumieron más alcohol el primer día de la semana en que tenían acceso a la droga (martes) que los siguientes (miércoles y jueves). Los autores concluyeron que este paradigma de presentación intermitente puede ser de utilidad para analizar la vulnerabilidad al consumo excesivo de alcohol.

Es evidente que estos resultados contrastan claramente con los obtenidos en este TFG, por lo que deberá estudiarse en un futuro si, controlando las variables comentadas previamente, se puede desarrollar un patrón de abuso a benzodiazepinas en animales similar al observado en seres humanos. Si se consigue se habrá dado un paso de gigante para la comprensión, la prevención y el tratamiento de la adicción a ansiolíticos de prescripción médica.

CONCLUSIONES

La realización del presente TFG me ha sido de gran utilidad e interés para poder conocer cómo y de qué manera se lleva a cabo el trabajo dentro del laboratorio, incluyendo el aprendizaje de los diferentes protocolos a seguir, la indumentaria necesaria para poder acceder al mismo, la coordinación llevada a cabo junto con el equipo encargado de la realización del experimento, al igual que la coordinación, con el resto de los equipos de trabajo presentes en el laboratorio, consiguiendo de forma adecuada llevar a cabo cada uno de los distintos procedimientos, de las diferentes líneas de investigación, sin influenciar al resto de experimentos. Todo esto ha sido de gran interés y ayuda para poder desarrollar este TFG, ya que a lo largo del proceso se me brindó la oportunidad de participar en las tareas realizadas en el laboratorio, como son: el registro de peso de los animales, del peso de las botellas que contenían el fármaco (CDP), o de las botellas que contenían el agua (y posterior registro de las mismas), cosa que requiere gran concentración para no cometer errores a la hora de pasar los datos al ordenador, puesto que un fallo en la medición de la cantidad de fármaco o de agua consumida por el animal puede ser determinante para la obtención de los resultados; otra de las tareas a realizar a diario era la asignación de los pellets, que era única y concreta para cada animal, dependiendo del peso que tuviese cada uno de ellos, y cada día, con lo que se llevaba a cabo el proceso de privación; la medición y administración del fármaco, en cada botella; etc. Todo esto siempre era realizado bajo supervisión, con la ayuda y paciencia de la experimentadora y del equipo de experimentación. Finalmente, cuando finalizaba el proceso de cada día, se introducían los datos obtenidos en el ordenador, para así más adelante poder realizar los análisis estadísticos. Todas estas actividades me han sido de gran ayuda para recordar los conocimientos adquiridos en la asignatura de psicofarmacología, al igual que me han sido de gran utilidad para poder desempeñar la redacción del presente TFG, y por supuesto para aprender y saber

la dinámica que se desempeña en un laboratorio, concretamente en el de la Universidad de Jaén.

Este TFG está enmarcado dentro de un contexto de gran utilidad para poder comprender la adicción de los humanos, basándose en los modelos animales de adicción, por lo tanto forma parte de uno de los pasos a seguir para conseguir avanzar en los procesos derivados de la adicción en humanos. Las hipótesis iniciales que se plantearon en este TFG no se han cumplido, cosa que podría deberse a la cantidad de dosis de CDP utilizada, que probablemente sería demasiado baja, y los animales podrían no apreciar la presencia del fármaco, también los resultados obtenidos pueden deberse a algún fallo en la privación de la comida administrada, etc.

Para concluir, es necesario destacar la gran importancia de la realización de este experimento, a pesar de los resultados no estadísticamente significativos obtenidos, para tener en cuenta la posibilidad de desarrollar otro tipo de trabajos y experimentos, similares a éste, que puedan surgir a partir de la realización del mismo, variando el tipo de dosis de CDP administrada, aumentando la cantidad de fármaco, para conseguir así una cantidad adecuada y que los animales sean capaces de distinguir la presencia de fármaco.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, N. C. y Cosí, J. S. (2003). Fármacos ansiolíticos. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 8(104), 5612-5619. Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(03\)71036-1](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(03)71036-1)
- Carnicella, S., Ron, D. y Barak, S. (2014). Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse. *Alcohol*, 48(3), 243-252. Recuperado de: doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.01.006>
- Castillo, I. I. y Bilbao, N. C. (2008). Craving: concepto, medición y terapéutica. *Norte de Salud Mental*, 7(32), 1.
- Di Chiara, G. y North, R. A. (1992). Neurobiology of opiate abuse. *Trends in Pharmacological Sciences*, 13, 185-193. Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(92\)90062-B](https://doi.org/10.1016/0165-6147(92)90062-B)
- Donaire, R., Conrad, S.E., Thompson, J., Papini, M.R. y Torres C. (2017). Testing the emotional self-medication hypothesis: Effects of voluntary oral consumption of ethanol on behavior in anxiety tests. *Learning & Motivation* (en revisión).
- Duffing, T. M., Greiner, S. G., Mathias, C. W. y Dougherty, D. M. (2014). Stress, substance abuse, and addiction. In *Behavioral neurobiology of stress-related disorders* (pp. 237-263). Springer Berlin Heidelberg. Recuperado de: doi:10.1007/7854_2014_276
- Huffman, M. A. (2001). Self-Medicative Behavior in the African Great Apes: An Evolutionary Perspective into the Origins of Human Traditional Medicine. *BioScience*, 51(8), 651-661. Recuperado de: [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0651:SMBITA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0651:SMBITA]2.0.CO;2)
- Huffman, M. A. (2003). Animal self-medication and ethno-medicine: exploration and exploitation of the medicinal properties of plants. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(02), 371-381.
- Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C. y Leiserson, M. D. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer

types. *Nature*, 502(7471), 333-339.

Kamenetzky, G. V. y Mustaca, A. E. (2004). Modelos animales para el estudio del alcoholismo. *Terapia Psicológica*, 23(1), 65-72.

Khantzian, E. J. y Treece, C. (1985). DSM-III psychiatric diagnosis of narcotic addicts: Recent findings. *Archives of General Psychiatry*, 42(11), 1067-1071.

Koob, G. F. (1992). Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends in pharmacological sciences*, 13, 177-184. Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(92\)90060-J](https://doi.org/10.1016/0165-6147(92)90060-J)

Koob, G. F. y Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217-238. Recuperado de: [doi:10.1038/npp.2009.110](https://doi.org/10.1038/npp.2009.110)

López-Muñoz, F., Álamo, C. y Cuenca, E. (1999). Agresividad y psicofármacos reguladores e inductores de conductas agresivas. *Psiquiatría. com*, 3(2).

Manzo, L., Donaire, R., Sabariego, M., Papini, M. R. y Torres, C. (2015). Anti-anxiety self-medication in rats: oral consumption of chlordiazepoxide and ethanol after reward devaluation. *Behavioural brain research*, 278, 90-97. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.017>

Manzo, L., Gómez, M. J., Callejas-Aguilera, J. E., Fernández-Teruel, A., Papini, M. R. y Torres, C. (2012). Oral ethanol self-administration in inbred roman high- and low-avoidance rats: Gradual versus abrupt ethanol presentation. *Physiology & Behavior*, 108, 1-5.

Manzo, L., Gómez, M. J., Callejas-Aguilera, J. E., Fernández-Teruel, A., Papini, M. R. y Torres, C. (2014). Anti-anxiety self-medication induced by incentive loss in rats. *Physiology & behavior*, 123, 86-92. Recuperado de : <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.10.002>

Manzo, L., Gómez, M., Callejas-Aguilera, J. E., Fernández-Teruel, A., Papini, M. R. y Torres, C. (2015). Partial reinforcement reduces vulnerability to anti-anxiety self-medication during appetitive extinction. *International Journal of*

- Comparative Psychology*, 28(1), 1-8. Recuperado de: <https://escholarship.org/uc/item/84q3n86v>
- McClure, S. M., Berns, G. S. y Montague, P. R. (2003). Temporal prediction errors in a passive learning task activate human striatum. *Neuron*, 38(2), 339-346. Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00154-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00154-5)
- Medel-Matus, J. S., Cortijo-Palacios, L. X., Gasca-Pérez, E., Susan-Tepetlan, P. V., Pérez-Palacios, A. y Ramos-Morales, F. R. (2011). Receptor GABA. *Archivos de Neurociencia (México)*, 16(1), 40-45.
- Momeni, S. y Roman, E. (2014). Subgroup-dependent effects of voluntary alcohol intake on behavioral profiles in outbred Wistar rats. *Behavioural brain research*, 275, 288-296. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.058>
- Navarro, M. y de Fonseca, F. R. (2000). Cannabinoides y conducta adictiva. *Adicciones*, 12(5), 97-108. Recuperado de: [doi:http://dx.doi.org/10.20882/adicciones.674](http://dx.doi.org/10.20882/adicciones.674)
- Oliveira, R. M. (2016). *Prevalência e perfil epidemiológico do uso de tabaco da população psiquiátrica dos níveis secundário e terciário de atenção comparados à população geral da rede básica de saúde*. Doctoral Thesis, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto. Recuperado de: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/22/22131/tde-24012017-161236/>
- Ortega, J. (2016). *Consumo espontáneo de ansiolíticos y cafeína en ratas Wistar: un estudio preliminar*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Jaén.
- Ortiz, M. F. B. (2008). *Psicofarmacología para psicólogos*. Síntesis. Madrid.
- Papini, S., Galatzer-Levy, I. R. y Papini, M. R. (2014). Identifying profiles of recovery from reward devaluation in rats. *Behavioural brain research*, 275, 212-218. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.006>
- Pinel, J. P. y Huang, E. (1976). Effects of periodic withdrawal on ethanol and saccharin

- selection in rats. *Physiology & behavior*, 16(6), 693-698. Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(76\)90238-9](https://doi.org/10.1016/0031-9384(76)90238-9)
- Planeta, C. S. (2013). Animal models of alcohol and drug dependence. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 35, S140-S146. Recuperado de: <https://dx.doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1149>
- Rogers, R. D., Everitt, B. J., Baldacchino, A., Blackshaw, A. J., Swainson, R., Wynne, K. y London, M. (1999). Dissociable deficits in the decision-making cognition of chronic amphetamine abusers, opiate abusers, patients with focal damage to prefrontal cortex, and tryptophan-depleted normal volunteers: evidence for monoaminergic mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 20(4), 322-339.
- Rosas-Gutiérrez, I., Simón-Arceo, K. y Mercado, F. (2013). Mecanismo celular y molecular de la adicción a benzodiacepinas. *Salud mental*, 36(4), 325-329. Recuperado en 17 de mayo de 2017, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018533252013000400007&lng=es&tlng=es.
- Smutek, M., Turbasa, M., Sikora, M., Piechota, M., Zajdel, J., Przewlocki, R. y Parkitna, J. R. (2014). A model of alcohol drinking under an intermittent access schedule using group-housed mice. *PloS one*, 9(5), e96787. Recuperado de: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096787>
- Spanagel, R. (2003). Alcohol addiction research: from animal models to clinics. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 17(4), 507-518. Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/S1521-6918\(03\)00031-3](https://doi.org/10.1016/S1521-6918(03)00031-3)
- Spanagel, R. (2000). Recent animal models of alcoholism. *Alcohol Research & Health*, 24(2), 124-124.
- Spanagel, R. (2009). Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiological reviews*, 89(2), 649-705.
- Spanagel, R., Durstewitz, D., Hansson, A., Heinz, A., Kiefer, F., Köhr, G. y Rietschel, M. (2013). A systems medicine research approach for studying alcohol addiction. *Addiction biology*, 18(6), 883-896. Recuperado de:

doi: 10.1111/adb.12109

Spanagel, R., Noori, H. R. y Heilig, M. (2014). Stress and alcohol interactions: animal studies and clinical significance. *Trends in neurosciences*, 37(4), 219-227.

Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.02.006>

Swift, R. M., Camí, M. J. y Mcgeary, J. (2005). Drogadicción. *RET: revista de toxicomanías*, (42), 3-14.

Vidal, A. (2006, diciembre). Neurobiología de las adicciones: más allá del circuito de la recompensa. *Revista de psiquiatría y salud mental*, 7(2), 73-80.

Wayner, M. J., Greenberg, I., Tartaglione, R., Nolley, D., Fraley, S. y Cott, A. (1972). A new factor affecting the consumption of ethyl alcohol and other sapid fluids. *Physiology & Behavior*, 8(2), 345-362. Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(72\)90383-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(72)90383-6)

Wayner, M. J. y Greenberg, I. (1972). Effects of hypothalamic stimulation, acclimation and periodic withdrawal on ethanol consumption. *Physiology & behavior*, 9(5), 737-740. Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(72\)90043-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(72)90043-1)

Wise, R. A. (1973). Voluntary ethanol intake in rats following exposure to ethanol on various schedules. *Psychopharmacology*, 29(3), 203-210. Recuperado de: [doi:10.1007/BF00414034](https://doi.org/10.1007/BF00414034)

Anexos

Anexo I

Sesión	Notas/procedimiento
Notas generales	• Las ratas serán alojadas en jaulas individuales con libre acceso a agua y privadas de alimento al 82-85% de su peso ad libitum. • Los animales serán asignados a los grupos (n=10) en función de su peso corporal, para que el promedio y la variabilidad intragrupos sea similar. • Las ratas serán pesadas cada día antes del comienzo de la sesión • PROCEDIMIENTO DE PRUEBA DE PREFERENCIA. La solución de CDP se preparará diariamente mezclando la cantidad de agua del grifo y CDP correspondiente. La habituación a la prueba de preferencia durará 4 días y en la misma se colocarán 2 botellas de agua en la jaula hogar del animal <u>durante dos horas</u>. La habituación se hará durante el proceso de privación de los animales a la comida. Esta privación comenzará tres días antes de la habituación (para que dure 7 días). Todas las ratas recibirán una dosis de 2mg/kg desde el inicio del experimento. Las ratas del grupo CONTINUO (CONT) recibirán la solución de CDP todos los días. Las ratas del grupo INTERMITENTE (INTER) recibirán la solución de CDP en días alternos (PESO MEDIO ANIMALES = 333) ○ CUANDO SÓLO LES TOQUE CDP A LAS RATAS DEL GRUPO CONTINUO, PESAR EN LA BALANZA DE PRECISIÓN 0.0066mg, para los 10 animales en 120ml de agua del grifo. ○ CUANDO LOS DOS GRUPOS TENGAN CDP, se pesa en la balanza de precisión 0,0133 en 240 ml de agua para 20 animales. 1. Las ratas del grupo CONTINUO serán marcadas con rotulador rojo. Las ratas del grupo INTERMITENTE serán marcadas con rotulador azul. Se marcará el rabo y las cajas. 2. Las botellas son numeradas con el número de cada animal, marcando en rojo las botellas del grupo CONTINUO y en amarillo las del grupo INTERMITENTE. Las botellas que contienen CDP deberán ser forradas de

	negro para proteger la solución de la luz. Para todos los grupos, habrá una botella forrada (CDP) y otra no (W). La colocación de las botellas en la jaula hogar se cambiará cada dos para evitar preferencia por el lugar (también durante la habituación). para que las ratas del grupo intermitente tengan alternancia, si se cambian cada día, la botella que tiene el CDP para este grupo estará siempre en el mismo lado. Se tomarán diariamente medidas del peso del animal e ingesta de las dos botellas
Día 1: Habitución	Se prepararán las dos botellas con agua, se pesan, se retira la botella grande y se pesan a los animales (se anota en la hoja de registro). Tras esto, se colocan las botellas en la jaula hogar de todos los animales durante dos horas. Después de dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso de las botellas y se restan del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA
Día 2 Habitución	Igual que el día anterior. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA
Día 3 Habitución	Igual que el día anterior. Se cambia el orden de las botellas con respecto al día anterior. BOTELLA NEGRA A LA DERECHA
Día 4 Habitución	Igual que el día anterior. BOTELLA NEGRA A LA DERECHA.
DÍA 1 27/06/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (TODOS LOS ANIMALES). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA. Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal

	en torno al 82%-85% de su peso ad libitum
DÍA 2 28/06/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (GRUPO CONTINUO). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Las ratas del grupo INTERMITENTE tienen agua en las dos botellas. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA. Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum.
DIA 3 29/06/2016	Se preparan las soluciones de CDP, CAF y Alcohol (2%). La botella roja contendrá la solución de CDP (0.2 mg/kg), La botella amarilla contendrá la solución de CAF (0.2 mg/kg) y la verde la de alcohol. La blanca continuará con agua. Se cambia el orden de las botellas con respecto al día anterior. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión, mientras se pesa el animal en la otra balanza. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. Se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 85-82% de su peso ad libitum. BOTELLA NEGRA A LA DERECHA
DÍA 4 30/06/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (GRUPO CONTINUO). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Las ratas del grupo INTERMITENTE tienen agua en las dos botellas. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA DERECHA. Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum.

DÍA 5 01/07/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (TODOS LOS ANIMALES). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA. Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum.
DÍA 6 02/07/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (GRUPO CONTINUO). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Las ratas del grupo INTERMITENTE tienen agua en las dos botellas. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA. Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum.
DÍA 7 03/06/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (TODOS LOS ANIMALES). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA DERECHA. Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum.
DÍA 8 04/07/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (GRUPO CONTINUO). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Las ratas del grupo INTERMITENTE tienen agua en las dos botellas. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA DERECHA. Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-

	85% de su peso ad libitum
DÍA 9 05/07/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (TODOS LOS ANIMALES). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA. Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum
DÍA 10 06/07/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (GRUPO CONTINUO). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Las ratas del grupo INTERMITENTE tienen agua en las dos botellas . Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA. Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum
DÍA 11 07/07/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (TODOS LOS ANIMALES). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA DERECHA Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum
DÍA 12 08/07/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (GRUPO CONTINUO). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Las ratas del grupo INTERMITENTE tienen agua en las dos botellas . Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA DERECHA. Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se

	colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum
DÍA 13 09/07/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (TODOS LOS ANIMALES). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA. Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum
DÍA 14 10/07/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (GRUPO CONTINUO). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Las ratas del grupo INTERMITENTE tienen agua en las dos botellas. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA. Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum
DÍA 15 11/07/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (TODOS LOS ANIMALES). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA DERECHA. Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum
DÍA 16 12/07/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (GRUPO CONTINUO). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Las ratas del grupo INTERMITENTE tienen agua en las dos botellas. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA DERECHA. Al terminar la sesión, se coloca

	la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum
DÍA 17 13/07/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (TODOS LOS ANIMALES). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA . Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum
DÍA 18 14/07/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (GRUPO CONTINUO). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Las ratas del grupo INTERMITENTE tienen agua en las dos botellas. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA . Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum.
DÍA 19 15/07/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (TODOS LOS ANIMALES). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA DERECHA . Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum
DÍA 20 16/07/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (GRUPO CONTINUO). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Las ratas del grupo INTERMITENTE tienen agua en las dos botellas. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para

	calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA DERECHA. Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum
DÍA 21 17/07/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (TODOS LOS ANIMALES). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA. Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum
DÍA 22 18/07/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (GRUPO CONTINUO). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Las ratas del grupo INTERMITENTE tienen agua en las dos botellas. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA. Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum
DÍA 23 19/07/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (TODOS LOS ANIMALES). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA DERECHA. Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum
DÍA 24 20/07/2016	Prueba de preferencia. Se preparan las soluciones de CDP (GRUPO CONTINUO). La botella NEGRA contendrá la solución de CDP (2 mg/kg). La botella transparente se llena de agua del grifo. Las ratas del grupo INTERMITENTE tienen agua en las dos botellas. Tras dos horas, se retiran de cada animal las dos botellas de agua, se pesan ambas en la

	balanza de precisión. Se anota el peso y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo. BOTELLA NEGRA A LA DERECHA. Al terminar la sesión, se coloca la botella de agua grande y se limpian las botellas pequeñas para el día siguiente. Se colocan en la jaula los pellets correspondientes para mantener al animal en torno al 82%-85% de su peso ad libitum
--	---

Anexo II

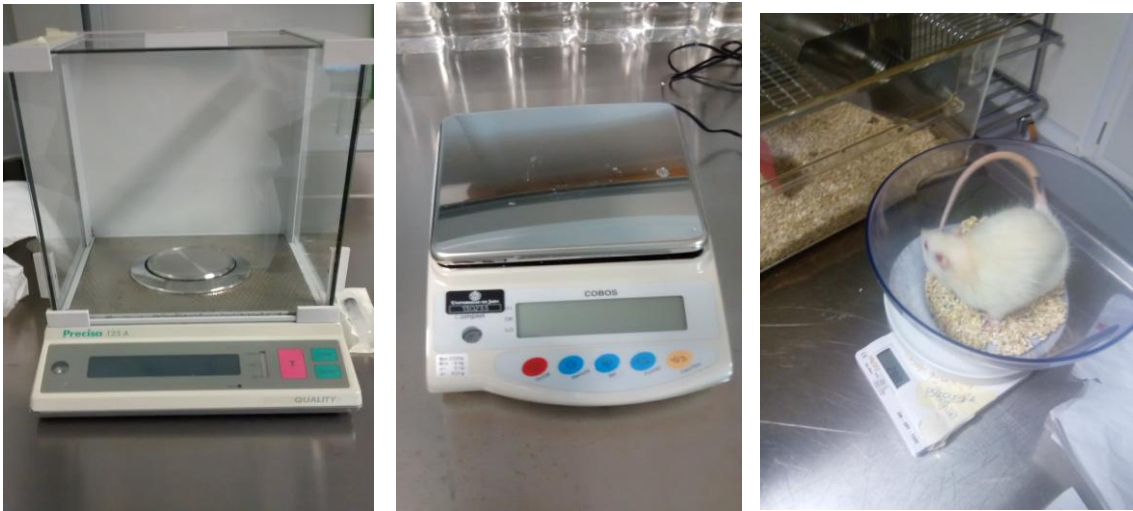
DÍA _____ SESIÓN _____

RATA	PRE FÁRMACO	POST FARMACO	TIEMPO	PRE AGUA	POST AGUA
1C					
2C					
3C					
4C					
5C					
6C					
7C					
8C					
9C					
10C					

RATA	PRE FÁRMACO	POST FARMACO	TIEMPO	PRE AGUA	POST AGUA
11I					
12I					
13I					
14I					

15I					
16I					
17I					
18I					
19I					
20I					

Anexo III



Anexo IV





Anexo VI

