



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación

Trabajo Fin de Grado

Automedicación inducida por pérdida: Análisis de la concentración de alcohol en sangre

Alumno: Martínez Nieto, Juan Ramón

Tutora: Prof. Dña. Carmen Torres Bares
Dpto.: Psicología

Mayo, 2019

Índice

1. Resumen.....	3
2. Introducción.....	5
3. Metodología.....	17
3.1. Sujetos.....	17
3.2. Aparatos.....	18
3.3. Procedimiento.....	19
4. Resultados.....	23
5. Discusión.....	26
6. Referencias.....	30
7. Anexos.....	33

1. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue analizar las concentraciones de alcohol en sangre que alcanzan animales sometidos a una experiencia en devaluación de la recompensa con acceso posterior a una solución de alcohol para su consumo voluntario. Dieciséis ratas Wistar hembra de seis meses de edad, privadas de alimento, fueron expuestas a 10 sesiones de 5 minutos cada una de acceso a una solución de sacarosa al 32%, y a 5 sesiones con soluciones al 4%. Inmediatamente después de cada sesión, los animales recibieron en su jaula hogar dos botellas durante 2 horas: una con agua y otra con alcohol al 2%. En las sesiones 11 y 12, los animales fueron colocados en el test de ansiedad Hole-Board después de la prueba de preferencia por el alcohol, con el objetivo de detectar los efectos conductuales derivados del consumo de la droga. La extracción de sangre de la cola del animal se realizó en las sesiones 10, 11 y 12 del estudio, analizándose las concentraciones de alcohol alcanzadas por el sujeto que más consumió mediante el Ethanol Assay Kit de abccam, utilizando procedimientos de medición basados en fluorescencia. El análisis de las muestras seleccionadas no permitió detectar concentración alguna de alcohol en la muestra seleccionada. Los resultados se analizan en el contexto de la investigación psicobiológica relativa al uso y abuso de alcohol, enfatizando la relevancia que tienen los modelos animales de consumo voluntario para comprender la adicción humana.

Palabras clave: Alcohol; Etanol; Pérdida; Hole-Board; Automedicación; Concentración de alcohol en la sangre (CAS)

Abstract

The aim of the present work was to analyze the concentrations of alcohol in animals' blood exposed to an experience in devaluation of the reward with subsequent access to an alcohol solution for voluntary consumption. Sixteen six-month-old female Wistar rats, deprived of food, were exposed to 10 sessions of 5 minutes each of access to a solution of sucrose at 32%, and to 5 sessions with solutions at 4%. Immediately after each session, the animals received two bottles in their home cage for 2 hours: one with water and another with 2% alcohol. In sessions 11 and 12, the animals were placed on the Hole-Board anxiety test after the alcohol preference test, in order to detect the behavioral effects derived from the consumption of the drug. The extraction of blood from the tail of the animal was carried out in sessions 10, 11 and 12 of the study, analyzing the alcohol concentrations reached by the subject that showed the highest alcohol intake after reward devaluation. Ethanol Assay Kit of abccam, using fluorescence-based measurement procedures, was used to this aim. The analysis of the selected samples did not allow us to detect any alcohol concentration in the selected sample. The results are analyzed in the context of the psychobiological research related to the use and abuse of alcohol, emphasizing the relevance of animal models of voluntary consumption to understand human addiction.

Key words: alcohol, ethanol, loss, hole-board, blood, self-medication, Blood Alcohol Concentration (BAC)

2. INTRODUCCIÓN

El consumo de bebidas alcohólicas está muy arraigado en nuestra cultura y relacionado con nuestras tradiciones y celebraciones. A menudo salir a beber, tomar una copas, ir de cañas, etc. constituye la principal fuente de ocio y el modo más frecuente de socializar (Díez, 2003). Sin embargo, este consumo no siempre está exento de riesgos: la ingesta de alcohol en grupo, de manera descontrolada y en forma de atracón es un problema de gravedad en los jóvenes, como lo es consumir en solitario altas cantidades de esta droga. Depender de una sustancia como esta lleva consigo una gran cantidad de problemas que pueden afectar muy gravemente nuestra salud, provocando trastornos neurológicos y cardiovasculares, hepatitis, pancreatitis, cáncer, etc., y poniendo también en riesgo el desarrollo del feto en madres consumidoras (Spanagel, 2003).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2019), se puede definir droga como:

“Toda sustancia que, introducida en el organismo por cualquier vía de administración, produce de algún modo una alteración del natural funcionamiento del sistema nervioso central del individuo y además es susceptible de crear dependencia, ya sea psicológica, física o ambas.”

Según la Real Academia Española (RAE, 2018), droga se define como “sustancia o preparado medicamentoso de efecto estimulante, deprimente, narcótico o alucinógeno”. El alcohol cumple muchas de las propiedades incluidas en estas dos definiciones, por lo que, a pesar de ser legal, se considera una droga con alto potencial adictivo. Prueba de esta afirmación es que el ser humano ha consumido bebidas alcohólicas desde tiempos remotos. En efecto, existen evidencias sobre el consumo de cerveza en algunos textos egipcios, de vino en la Biblia, y de bebidas destiladas en la cultura árabe (Mustaca y Kamenetzky, 2006). Los alquimistas árabes fueron los descubridores de la destilación del alcohol en el siglo X, ya que los griegos y romanos tenían conocimiento exclusivamente de la creación del vino. Bien es cierto que el auge de la destilación se produjo a partir del siglo XVI. Las primeras elaboraciones se realizaron a partir de alcohol con una gran cantidad de azúcar junto a plantas aromáticas, conocidos actualmente como licores. Uno de los métodos pioneros en el desarrollo de la destilación fue mediante el calentamiento del alcohol en un envase y recogiendo los vapores condensados en una superficie fría, con el objetivo de que se vuelva a

convertir el vapor en líquido, trasladándolo a un nuevo recipiente. En el año 1512 H. Braunschwick desarrolló una nueva manera de destilar el alcohol, separando el proceso de evaporación y el proceso de condensación, a fin de conseguir una mayor separación de vapores. Gracias a este desarrollo, en 1832, Albert Stein creó un nuevo proceso de destilación que, hoy en día, se conoce con el nombre de *Columnas Coffee*; a pesar de haberse introducido varias mejoras a lo largo de la historia, sigue siendo el más usado para la elaboración del alcohol. Este proceso consiste en crear dos columnas, una para el proceso de evaporación y otra para la condensación. El vapor de la bebida entraría por la primera columna, y subiría hasta encontrarse con la segunda columna, donde se condensaría y se crearía el alcohol. El vapor de la bebida que sea vapor de agua se quedaría en la primera columna. Esta idea fue patentada por Ateneas Coffee (Muñoz, 2010).

Según la Encuesta de Alcohol y Drogas (EDADES) elaborada por el Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (2017), el alcohol es la sustancia más consumida en la población española de entre 15 y 64 años. Esta encuesta indica que el 77,6% ha consumido alcohol en los últimos 12 meses, el 62,1% en los últimos 30 días, y el 9,3% lo hace diariamente. La edad de inicio está siendo progresivamente menor, llegando a ser actualmente de entre los 14 y 15 años. En cuanto al género, no existen diferencias significativas entre hombres y mujeres en cuanto a la cantidad de ingesta, ambos presentan un porcentaje parecido. Sin embargo, sí existen diferencias en cuanto a los rangos de edad en relación al consumo. El 14,6% de los jóvenes entre 15 y 24 años afirman ser consumidores de alcohol. El 18,7% de la población consumidora corresponde al rango de edad entre 25 y 34 años. A continuación, los adultos comprendidos entre 35 y 44 años que son bebedores habituales presentan el 24,5% de la población. El porcentaje restante corresponde al estrato de 45 y 64 años. Además, el consumo de alcohol en forma de atracón está aumentando de forma progresiva, de manera que, en mayor medida los jóvenes, deciden salir exclusivamente para beber cantidades muy elevadas de esta droga para mantener un estado de embriaguez constante, lo cual tiene en numerosas ocasiones consecuencias nefastas (Anderson y Bamberg, 2006).

Es cierto que en la actualidad existe una gran preocupación a nivel general sobre el excesivo consumo de alcohol, especialmente en la población joven, pero ¿Cuándo se considera la ingesta de alcohol un cuadro adictivo? Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1994) la adicción “es una enfermedad física y psicoemocional que crea una

dependencia o necesidad hacia una sustancia, actividad o relación. Se caracteriza por un conjunto de signos y síntomas, en los que se involucran factores biológicos, genéticos, psicológicos y sociales”. Según el DSM-V (2013), para hacer un diagnóstico de trastorno por consumo de alcohol deben aparecer lo siguientes síntomas:

- A. Un modelo problemático de consumo de alcohol que provoca un deterioro o malestar clínicamente significativo y que se manifiesta al menos por dos de los hechos siguientes en un plazo de 12 meses:
 - 1. Se consume alcohol con frecuencia en cantidades superiores o durante un tiempo más prolongado del previsto.
 - 2. Existe un deseo persistente o esfuerzos fracasados de abandonar o controlar el consumo de alcohol.
 - 3. Se invierte mucho tiempo en las actividades necesarias para conseguir alcohol, consumirlo o recuperarse de sus efectos.
 - 4. Ansias o un poderoso deseo o necesidad de consumir alcohol.
 - 5. Consumo recurrente de alcohol que lleva al incumplimiento de los deberes fundamentales en el trabajo, la escuela o el hogar.
 - 6. Consumo continuado de alcohol a pesar de sufrir problemas sociales o interpersonales persistentes o recurrentes, provocados o exacerbados por los efectos del alcohol.
 - 7. El consumo de alcohol provoca el abandono o la reducción de importantes actividades sociales, profesionales o de ocio.
 - 8. Consumo recurrente de alcohol en situaciones en las que provoca un riesgo físico.
 - 9. Se continúa con el consumo de alcohol a pesar de saber que se sufre un problema físico o psicológico persistente o recurrente probablemente causado o exacerbado por el alcohol.
 - 10. Tolerancia, definida por alguno de los siguientes hechos:
 - a. Una necesidad de consumir cantidades cada vez mayores de alcohol para conseguir la intoxicación o el efecto deseado.
 - b. Un efecto notablemente reducido tras el consumo continuado de la misma cantidad de alcohol.
 - 11. Abstinencia, manifestada por alguno de los siguientes hechos:
 - a. Presencia del síndrome de abstinencia característico del alcohol.

- b. Se consume alcohol (o alguna sustancia muy similar, como una benzodiazepina) para aliviar o evitar los síntomas de abstinencia.

Como previamente se ha mencionado, lo más preocupante que resulta hoy en día es la ingesta de alcohol en forma de atracón, o lo que es lo mismo, la ingesta del mismo en grandes cantidades y de manera concentrada en el tiempo. Se han realizado estudios en los que se muestra cómo, a medida que avanzan los años, se produce un aumento en el consumo de alcohol hasta cantidades que producen embriaguez. Así, si bien la ingesta de éste, diaria y/o semanalmente, se ha reducido considerablemente desde el año 2002 hasta el 2010, el hecho preocupante es que en este mismo período ha aumentado el número de estados de embriaguez de la población. Este hecho es más frecuente en la población comprendida en el rango de edad de 17-18 años (Sánchez-Queija, Moreno, Rivera y Ramos, 2015).

El principal motivo por el que los jóvenes consumen grandes cantidades de alcohol parece ser la expectativa que tienen sobre sus efectos psicoactivos, tales como euforia, capacidad de tener comportamientos más arriesgados, relajación, desinhibición o pérdida de la noción del tiempo (Pons y Buelga, 2011). Sin embargo, el alcohol no solo tiene este tipo de efectos “positivos”, sino que cuando se consume en grandes cantidades tiende a inducir sedación y a tener un efecto depresor del sistema nervioso que puede ser peligroso (Goldman y Darkes 2004). En definitiva, los jóvenes consumen alcohol buscando sus efectos reforzantes, a pesar de que a menudo el resultado de un consumo desorbitado conduce a una intoxicación con importantes efectos aversivos (Canning, Millward y Raj, 2003).

Revisemos los aspectos más relevantes de la farmacología del alcohol para entender sus efectos. El recorrido del alcohol por el cuerpo comienza con la absorción. El etanol es consumido, de forma prácticamente exclusiva, por vía oral, por lo que su absorción se produce fundamentalmente a través del tracto digestivo. Ya que el etanol es una molécula que no puede ser ionizada, el pH de ninguno de los compartimentos del tracto digestivo parece presentar influencia alguna en este proceso. En el organismo, el alcohol se distribuye con mayor facilidad en los medios acuosos que en los lipídicos y puede acceder al torrente sanguíneo desde la cavidad oral, el esófago, el estómago, y los intestinos (especialmente el intestino delgado). En cualquier caso, a nivel cuantitativo parece que el etanol se absorbe fundamentalmente en el intestino delgado, debido a que en este órgano la presencia de microvellosidades aumenta de forma notable la superficie que posibilita dicha absorción. Sin embargo, una pequeña cantidad de alcohol se absorbe en el estómago (Aragón, Miquel,

Correa y Sanchís-Segura, 2002). El proceso dura aproximadamente 2 minutos, aunque existen diferencias en función del tiempo que permanezca el alcohol en el estómago, las diferencias en cuanto a la metabolización, la concentración de alcohol de la bebida consumida, la circulación de la sangre, y el consumo del tabaco.

Finalizado el proceso de absorción, comienza la distribución. Como ya se ha mencionado previamente, el alcohol se disuelve mejor en agua, por lo que la distribución del mismo se desarrolla en función de la cantidad de agua que cada persona presente en su cuerpo. Es por esto que dos personas que ingieran la misma cantidad de alcohol pueden tener diferentes cantidades del mismo en sangre, ya que variará en función de la cantidad de agua y del contenido graso del cuerpo de cada persona (Aragón et al. 2002).

En cuanto a la eliminación del etanol, ésta se realiza principalmente a través de la metabolización, mediante oxidación. Este proceso tiene lugar sobre todo en el hígado, gracias a la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH). El porcentaje restante se elimina a través de la orina, de las heces, del sudor, el aire espirado, las lágrimas o la leche materna (Mosquera y Menéndez, 2006).

Como consecuencia del consumo de alcohol, se desarrollan una serie de efectos agudos y a largo plazo. Dicha droga, a corto plazo, tiene un efecto depresor, produciendo somnolencia, sedación y relajación. A largo plazo, se desarrolla principalmente el efecto de tolerancia y abstinencia, efectos comunes a otras drogas adictivas como el tabaco. Así, cuando una persona consume regularmente alcohol, los efectos del mismo se ven reducidos paulatinamente, por lo que, para poder conseguir los mismos efectos, el consumidor aumenta la cantidad de la droga. Por su parte, la abstinencia aparece cuando aumenta la actividad simpática del sistema nervioso, vinculada a su vez con la sobreactividad del locus coeruleus (Regal et al., 2014).

¿A qué se deben estos efectos? El etanol produce una serie de alteraciones en varios circuitos neuronales, principalmente en el circuito de recompensa, conocido como sistema dopaminérgico mesotelencefálico. El circuito básico se origina en el área tegmental ventral (ATV) y proyecta al sistema límbico, concretamente al núcleo accumbens. La evidencia empírica ha demostrado la existencia de receptores μ en la membrana del área tegmental ventral. Con la ingesta de alcohol, aumenta la liberación de los opioides endógenos. Dichos opioides actúan sobre los receptores μ y provocan un aumento en la acción de la dopamina en

el núcleo Accumbens, dando lugar a los efectos placenteros de la droga. Asimismo, el alcohol también produce un efecto sobre la acción del GABA, en concreto: el consumo de dicha droga facilita la acción inhibitoria del GABA, que da lugar a un enlentecimiento en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Regal et al., 2014).

Además de sus efectos sobre las vías dopaminérgicas, el alcohol modula la acción de otros neurotransmisores. En este sentido es importante destacar el glutamato, ya que es el principal neurotransmisor excitatorio del Sistema Nervioso Central (SNC). El alcohol parece interactuar directamente sobre el receptor NMDA (véase figura 1). Este receptor controla la entrada y salida de calcio en la célula. Se ha comprobado que el consumo de alcohol, ya sea en altas o bajas concentraciones, bloquea la entrada de calcio en las células, afectando en gran medida al hipocampo y al colículo inferior, y en menor medida al septum lateral. Esto provoca una serie de efectos a largo plazo en el ser humano como son la pérdida de memoria y efectos negativos en el aprendizaje (Guerri, 2000).

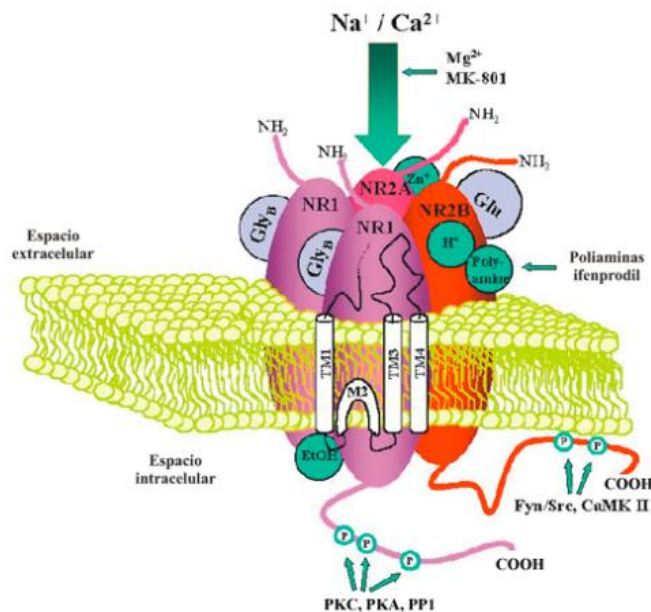


Figura 1. Modelo esquemático del receptor NMDA (Tomado de Nagy, 2004).

Recuperado de: <http://www.siicsalud.com/des/expertoimpreso.php/86896>

Otro receptor muy destacable en relación con el mecanismo de acción del alcohol es el receptor GABA-A (véase figura 2). El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC, y actúa modulando la entrada y salida del cloro en las células. El efecto que tiene el alcohol en este receptor es el de modulador alostérico positivo; es decir, potencia la acción del GABA, aumentando la carga negativa en las células, dando lugar a los efectos depresores del alcohol en las personas (León et al., 2014). También se ha pensado que el GABA puede estar relacionado con los efectos motores a largo plazo asociados con el consumo de esta droga (Guerri, 2000).

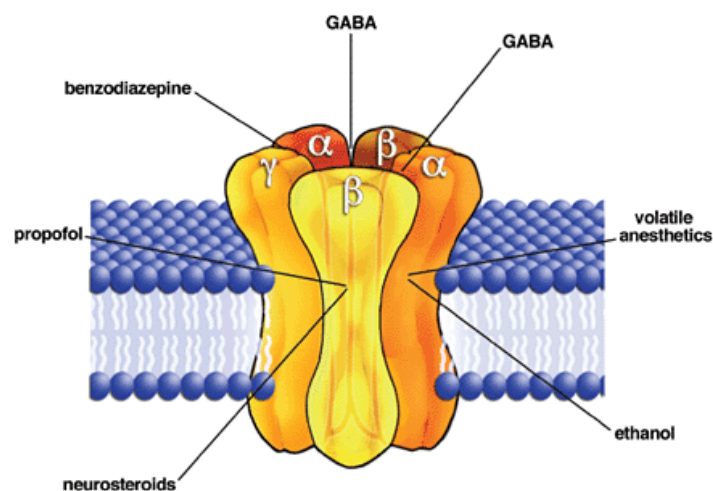


Figura 2. Dibujo esquemático del complejo de canales iónicos ligados al receptor GABA (Tomado de Sanger, 2004). Recuperado de:

<https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh313/196-214.htm>

Los fenómenos de tolerancia y abstinencia se relacionan con cambios adaptativos tanto en el receptor NMDA como en el GABA-A, previamente descritos. Así, el consumo continuado de la droga induce una regulación al alza del receptor NMDA y a la baja del GABA-A, fenómenos relacionados con el síndrome de abstinencia que aparece cuando la droga deja de consumirse de forma abrupta. Asimismo, la hipodopaminergia que acompaña al consumo crónico de la droga podría contribuir a los estados de “*craving*” o deseo de la misma que perpetúan el consumo en sujetos adictos (Pérez, Rial, Ortiz y Manzanares, 2003).

A través de los mecanismo de acción previamente comentados, el alcohol es capaz de producir una gran variedad de efectos farmacológicos, los cuales están directamente

relacionados con la cantidad de sustancia consumida y los niveles de la misma que se alcanzan en sangre. Algunos estudios indican la ausencia de efectos significativos cuando la tasa de alcohol en sangre no supera los 0,4 g/l (Morales, 2015), exceptuando, como señala Aragón et al. (2002), aquellas situaciones en las que se han llevado a cabo tareas que requieren un alto nivel de atención, como por ejemplo tareas de atención dividida. Esta situación tendría lugar en el caso de que el alcohol en sangre de la persona se encontrara entre el 0,1 y 0,3 g/l. Sin embargo, es a partir de esta cantidad cuando los problemas y signos físicos comienzan a aparecer. Una persona que presenta un nivel de alcohol de entre 0,3 y 0,8 g/l en sangre se caracteriza por empezar a tener fallos ópticos, además de regular de manera equívoca la distancia y la velocidad; comienza a acelerarse su ritmo cardíaco, aumenta el sueño y el rendimiento general se ve afectado. Asimismo, cabe destacar la sensación de euforia que se alcanza cuando la tasa de alcohol en sangre es la mencionada, concretamente, entre 0,3 y 0,6 g/l (Aragón et al. 2002). Si la persona alcanza una tasa de entre 0,8 y 1,5 g/l, empezará a sentir, por un lado, falta de control de sí mismo y, por otro lado, cierto estado de embriaguez, sus reflejos se verán disminuidos y aumentará su tiempo de reacción. En esta etapa pueden aparecer en algunas personas ciertas conductas violentas y agresividad. Una tasa de alcohol entre 1,5 y 3 g/l suele producir diplopía o “visión doble”, momento en que los signos de embriaguez se hacen claramente evidentes, dificultando la coordinación de movimientos y el sentido del equilibrio. Estos síntomas se acentúan si se alcanza una concentración en sangre de entre 3,5 y 5 g/l. Por último, las personas con niveles de alcohol en sangre iguales o superiores a 5 g/l, entran en un estado de coma que en ocasiones puede provocar la muerte (Morales, 2015).

La relación entre los niveles de alcohol en sangre y sus efectos farmacológicos han sido estudiados con cierto detalle en relación con la capacidad de conducción, dada la frecuencia con la que se conduce en nuestro país bajo los efectos del alcohol. En España hay un mínimo de alcohol en sangre permitido con el que se puede conducir, que es de 0,5 g/l en conductores generales y 0,3 g/l en noveles y profesionales (Dirección General de Tráfico, DGT, 2017). Según datos recogidos en 2017 por el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses (2018), el 42,1% de los 651 fallecidos en accidente de coche ese año habían consumido alcohol u otras drogas. Y es que, a pesar de que la cantidad de alcohol que haya en el cuerpo sea mínima, existe el riesgo de que la droga interfiera con la conducta y el funcionamiento cognitivo.

¿Qué efectos se producen cuando se bebe y se conduce después? Todo comienza con la lentitud en los movimientos oculares y con un mal procesamiento de las señales viales y de las distancias. La alteración en la capacidad para acomodarse a los cambios de luz produce deslumbramientos con más frecuencia. Aparece también la conocida como “visión túnel”, relacionada con una importante reducción de nuestro campo visual. En relación con la atención, se altera de manera relevante la atención dividida, lo que dificulta nuestra capacidad para resolver de forma rápida situaciones complejas imprevistas. También se altera la atención sostenida, lo que aumenta nuestra fatigabilidad. Por último, los efectos del alcohol sobre la función psicomotriz alteran el rendimiento muscular y el equilibrio, dificultan la capacidad para coordinar movimientos y para integrar la información sensorial y motora (DGT, 2017).

Dado que los efectos psicoactivos previamente comentados son dependientes de la dosis, en la actualidad se realizan esfuerzos considerables para establecer qué concentraciones de alcohol en sangre dan lugar a efectos farmacológicos detectables y relevantes. Muchos de estos trabajos se realizan con animales no humanos, los cuales posibilitan un control más preciso de las variables determinantes del consumo de alcohol y sus efectos (Mustaca y Kamenetzky, 2006; Spanagel, 2000). En este contexto, se recurre a menudo a exponer a los sujetos a condiciones experimentales de consumo voluntario o de libre elección. Existen diferentes formas de presentarles el alcohol a los mismos. Por un lado, se les puede ofrecer una cantidad de alcohol que incorpore una cantidad de azúcar, la cual se reduce progresivamente en el líquido mencionado (Samson, Sharpe y Denning, 1999). Por otro lado, el animal puede tener acceso a dos botellas, una de etanol a dosis bajas y otra de agua, que podrá consumir libremente durante un periodo de 24 horas; en sesiones sucesivas se va aumentando la concentración de alcohol para promover su consumo. También se recurre a colocar varias botellas con alcohol a diferentes concentraciones y otra con agua para observar la preferencia del sujeto experimental para dichas dosis (Wolffgramm y Heyne, 1995).

Hoy en día se continúa avanzando sobre otros procedimientos que también se pueden emplear para aumentar el consumo de alcohol de las ratas y conseguir que se alcancen niveles significativos de la droga en sangre. Dentro de estos procedimientos se puede destacar la selección genética, que se basa en la utilización de animales que presentan una preferencia innata por consumir alcohol sin mostrar signos evidentes de intoxicación, a pesar de alcanzar concentraciones significativas en sangre (Schuckit, 2014). Otro procedimiento exitoso para

aumentar el consumo de etanol consiste en presentar durante un tiempo y días limitados la botella de alcohol (presentación intermitente), lo que aumenta el consumo de la droga durante los períodos en que ésta está disponible. Este fenómeno es conocido como “efecto de privación de alcohol” (Becker y Ron, 2014). Resulta relevante citar, a modo de ejemplo, un estudio realizado por Wise (1973), quien midió el consumo voluntario de etanol en ratas tras someterlas a diferentes programas. Todos los animales recibieron dosis de alcohol al 20%, con la salvedad de que fueron divididos en cinco grupos y cada uno tenía una condición experimental diferente. El primer grupo obtuvo libre elección de alcohol y agua en días alternos. El segundo grupo recibió el alcohol como único líquido en días alternos, y agua en los días intermedios al tratamiento. El tercer grupo recibió una libre elección entre etanol y agua durante todos los días. A su vez, el cuarto grupo recibió exclusivamente alcohol durante todos los días que duró la investigación y, por último, el quinto grupo recibió de forma intermitente y de libre elección el alcohol. Este grupo, además, recibió previo al experimento un periodo de adaptación en el que le presentaron concentraciones crecientes de la solución del etanol, comenzando por un 3% y aumentando de manera progresiva hasta llegar al 20% de concentración. Los resultados fueron los siguientes: el quinto grupo (el que recibió el período de adaptación) y los grupos que tuvieron una elección hacia el etanol bebieron más de 3 gramos de etanol por día, mientras que el grupo intermitente lo rechazó los primeros días hasta que, progresivamente, fue ingiriéndolo hasta llegar al nivel de los grupos anteriores. Sin embargo, el grupo que había mantenido una elección libre durante todo el experimento no bebió de manera significativa.

Una vez revisados los procedimientos más utilizados para elevar el consumo de alcohol en animales no humanos, se deduce que, al igual que el ser humano, dichos animales consumen alcohol de manera voluntaria. Sin embargo, a menudo es necesario incorporar ciertas manipulaciones experimentales para lograr un consumo estable y alto de la droga que se asemeje a los patrones de abuso frecuentemente observados en nuestra especie. Cuando esto se consigue se pueden alcanzar concentraciones de alcohol en sangre relevantes. El procedimiento de acceso intermitente a alcohol (20%) ha sido uno de los más utilizados para analizar la relación entre los niveles de alcohol en sangre alcanzados dependiendo del consumo. Carnicella, Ron y Barak (2014) realizaron una revisión para estudiar dicha relación, hallando que en la primera parte del procedimiento, las ratas ingieren unos niveles de alcohol bajos. En cambio, en la fase de entrenamiento, de una duración aproximada de 3 a 4 semanas, el consumo aumenta progresivamente, alcanzando cantidades significativas. Este paso de un

consumo bajo a un consumo muy elevado se refleja de la misma manera en los humanos, que pasan a menudo de un consumo moderado a uno excesivo. Además, encontraron que el alcohol ingerido en la fase de 24 horas es similar al que muestra una persona que ha consumido alcohol en exceso, según el Instituto Nacional sobre el Abuso de Alcohol y Alcoholismo (2004). Cabe destacar, además, que las ratas bebían más etanol durante el período oscuro del ciclo de luz-oscuridad.

A pesar de su relevancia, este trabajo no tiene en cuenta que a menudo los animales no desarrollan un patrón de consumo de alcohol “patológico”, sino que muestran una ingesta controlada, de bajas dosis, mantenida a lo largo del tiempo. Esta modalidad de ingesta también tiene su importancia, dado que en seres humanos es frecuente observar un patrón similar, sobre todo al inicio del consumo de la droga.

En la Universidad de Jaén se iniciado recientemente una línea de investigación que utiliza un modelo de consumo voluntario de alcohol a bajas dosis (2%), dirigido a analizar el impacto de las emociones negativas sobre el consumo voluntario de ansiolíticos. Como experiencia inductora de afecto negativo (en este caso frustración) se utilizó la pérdida inesperada de reforzamiento (Papini, Fuchs y Torres, 2015). Los resultados más relevantes de esta línea se comentan brevemente a continuación.

En primer lugar, Manzo, Gómez, Callejas-Aguilera, Fernández-Teruel, Papini, y Torres (2014) analizaron si la omisión de una recompensa producía cambios en la preferencia posterior por una solución de alcohol al 2%. Utilizaron con este objetivo ratas Romanas de Alta (RHA-I) y Baja (RLA-I) Evitación, con claras diferencias entre ellas en relación con su reactividad emocional y reactividad a la frustración (baja en la cepa RHA-I, alta en la RLA-I). Los animales fueron sometidos a dos tareas de extinción u omisión de recompensa: una consumatoria (en la que recibían una solución de sacarosa al 22% que después era sustituida por agua), y otra instrumental (presentando 12 pellets en el extremo distal de un laberinto recto que después eran retirados). Los animales tuvieron acceso libre a alcohol vs. agua, durante dos horas, inmediatamente después de cada una de las sesiones de entrenamiento. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que la cepa RLA-I mostró un consumo y preferencia por alcohol mayor al registrado en la cepa RHA-I cuando las recompensas (sacarosa y pellets, respectivamente) fueron omitidas. Este efecto fue transitorio, igualándose los grupos una vez que la respuesta correspondiente se extinguió.

En segundo lugar, Manzo, Donaire, Sabariego, Papini y Torres (2015) analizaron el efecto de la devaluación de una recompensa esperada (una reducción en la concentración de una solución de sacarosa –de 32% al 4%–) sobre el consumo voluntario de alcohol y de una benzodiacepina de prescripción médica (clordiacepóxido –CDP–, 1 mg/kg). Los resultados pusieron de manifiesto un aumento transitorio en el consumo voluntario de ambos ansiolíticos tras la experiencia de pérdida del incentivo, un aumento que no apareció en los animales que sólo recibieron agua durante la prueba de preferencia, ni en aquellos no sometidos a la devaluación del reforzador. Datos similares han sido obtenidos en estudios más recientes, que demuestran, además, que el consumo de alcohol bajo estas condiciones experimentales tiene efectos conductuales detectables en pruebas de ansiedad como el laberinto elevado (Donaire, Conrad, Thompson, Papini y Torres, 2018).

Si bien los resultados de esta línea de investigación son consistentes y relevantes para analizar en qué medida las emociones negativas promueven el consumo de alcohol, hasta el momento no se ha analizado si con las cantidades de consumo de alcohol que muestran los animales en las condiciones experimentales previamente comentadas se alcanzan concentraciones de alcohol en sangre farmacológicamente relevantes.

El análisis de los niveles de alcohol en sangre ha sido considerado una medida más precisa que el registro de los gramos por kilogramo ingeridos por el animal en un período de tiempo determinado. Sin embargo, esta variable no está exenta de limitaciones que merecen destacarse. Bajo condiciones de acceso continuo (por ejemplo, 24 horas) los sujetos suelen beber en brotes o picos que suelen tener lugar durante la fase de oscuridad, metabolizando la droga muy rápidamente. Ello complica la obtención de información fiable sobre las concentraciones de alcohol en sangre y su relación con el consumo cuando se toma una sola medida diaria. Una solución a este problema es utilizar un paradigma de acceso limitado a la droga (como el utilizado en los estudios comentados anteriormente –2h–), lo que permite obtener una mayor sincronía entre los patrones de consumo y las concentraciones de alcohol en sangre alcanzadas. Sin embargo, se argumenta que esta estrategia limita el tiempo de exposición del cerebro al alcohol, reduciendo la aplicabilidad de estos estudios en relación con el consumo humano. Utilizar una modalidad de acceso continuo a la droga con monitorización del patrón temporal de consumo ha sido otra alternativa de gran utilidad, dado que permite extraer las muestras de sangre para su análisis justo después de los períodos de mayor consumo. También se han desarrollado programas informáticos capaces de estimar las

concentraciones de alcohol en sangre a partir del análisis microestructural simultáneo de la ingesta de alcohol y fluidos por parte del animal (Leeman et al., 2010). Con independencia del procedimiento elegido, estos autores argumentan que, en la rata, un consumo inferior a 2-2.5g/kg/24h puede considerarse muy bajo y relacionado con las propiedades calóricas y el sabor de la droga, más que con sus efectos reforzantes. Este argumento, sin embargo, no podría explicar (1) por qué los animales consumen más alcohol sólo cuando están frustrados; (2) por qué aumentan el consumo de clordiazepóxido, un fármaco sin contenido calórico ni sabor alguno; y (3) por qué el aumento en el consumo voluntario de alcohol incrementa la actividad locomotora general registrada en el laberinto elevado. No obstante, para llegar a una conclusión definitiva acerca de esta cuestión se requiere analizar las concentraciones de alcohol en sangre que alcanzan los animales cuando son expuestos a una experiencia emocional vinculada con pérdida, lo cual constituye el objetivo fundamental del presente Trabajo de Fin de Grado (TFG). Con este objetivo, los animales (ratas Wistar hembra) fueron expuestos a una reducción repentina en la concentración de una solución de sacarosa (del 32% al 4%), seguida después de cada sesión por una prueba de preferencia por agua vs. alcohol (2%) en el grupo experimental, o por agua vs. agua en el grupo control. En los dos primeros días posteriores a la devaluación de la recompensa, los animales fueron expuestos a la prueba de ansiedad de la tabla de agujeros (Hole Board, HB) después del test de acceso a alcohol. Se esperaba encontrar que los sujetos redujeran drásticamente el consumo de la solución de sacarosa tras ser devaluada, y que este deterioro de la conducta consumatoria se acompañara de un aumento en el consumo voluntario de alcohol. Dicho aumento debería manifestarse en la reducción de las conductas de ansiedad registradas en el HB. Estos resultados comportamentales deberían tener su correspondencia con los niveles de alcohol detectados en sangre. De este modo, se esperaba encontrar una concentración de alcohol menor antes de la devaluación (sesión 10) en comparación lo hallado después de la misma (sesiones 11 y 12), un hallazgo que indicaría que los cambios en el consumo voluntario de alcohol que acontecen ante experiencias de pérdida producen modificaciones farmacológicamente relevantes en la concentración de alcohol en sangre.

3. METODOLOGÍA

3.1. SUJETOS

Los sujetos empleados para este estudio fueron 16 ratas Wistar hembra de 6 meses de edad al inicio del experimento, procedentes de Charles River (Barcelona, España). Las ratas

se encontraban en el Centro de Producción y Experimentación Animal, dentro del cual se programaban ciclos de luz-oscuridad cada 12 horas, encendiéndose las luces a las 7.00 h de la mañana y apagándose las mismas a las 19.00 h. Los animales fueron alojados individualmente en jaulas de policarbonato de medidas 32x15x30 cm. Dentro de cada jaula, los sujetos tenían disponible una botella de agua las 24 horas del día excepto cuando eran sometidas a experimentación. La temperatura ambiente era de 20° C, y la humedad aproximadamente del 50%. Al comenzar el experimento, las ratas pesaban una media de 310,38 ($\pm 4,29$) gramos. Posteriormente, se privó a las mismas de alimento para mantenerlas en un peso medio de entre el 81 y 84% de su peso ad libitum. La comida se le administraba 30 minutos después de haber finalizado la sesión experimental.

Este experimento siguió las directrices de la UE para el uso de animales de investigación (2010/63/EU) y la Ley española (6/2013; R.D. 53/2013): “*Ley 32/2007, del 7 de Noviembre, para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio; Ley 6/2013, del 11 de Junio, de modificación de la Ley 32/2007; y Real Decreto 53/2013, de 1 de Febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos*”. De igual modo, fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Animal de la Universidad de Jaén.

3.2. APARATOS

La extracción de sangre se realizó mediante un pequeño corte en la cola del animal con hojas quirúrgicas del nº 24 (Nahita, Navarra, España). Para almacenar la sangre se utilizaron capilares sin anticoagulante (Microvette CB 300 μ L, Nümbrecht, Alemania; Anexo 1), que se almacenaban en una caja de porexpan con hielo picado. Una vez extraída la sangre en la sesión experimental correspondiente, se colocaban los capilares en una microcentrífuga de sobremesa (Sorvall Legend Micro 17 centrifuge, Thermo Scientific, Barcelona, España; Anexo 2). Concluida la centrifugación, se extraía el plasma con unas micropipetas de volumen variable de entre 10 μ L y 100 μ L (Nahita 6600 series, Valencia, España), y se vaciaba en eppendorfs con capacidad máxima de 1,5 ml (Deltalab, Barcelona, España; Anexo 3).

El análisis de las muestras de sangre se realizó usando un kit que medía las concentraciones de alcohol mediante fluorimetría (Ethanol Assay Kit, ab65343, Cambridge, Reino Unido). Se utilizó una placa multipocillo de 96 pocillos, de color negro, en la que se

depositaron las muestras con el kit de análisis (Anexo 4). Para la incubación de las muestras se utilizó una incubadora en agitación con una capacidad de calentamiento de 800W (Heidolph Inkubator 1000; Anexo 5). El análisis fluorométrico se realizó en un lector de microplacas de fluorescencia, con una capacidad de placas de 6 a 384 pocillos (Biotek, Synergy HT; Anexo 6).

3.3. PROCEDIMIENTO

Los animales utilizados en el presente estudio participaron en un experimento anterior en el que fueron expuestos a reforzamiento continuo o parcial en un laberinto recto, a entrenamiento en un laberinto T, y a una tarea operante en la caja de Skinner. La experiencia con reforzamiento continuo vs parcial fue contrabalanceada, de manera que la mitad de los sujetos fueron asignados a la condición “etanol” (grupo E), mientras que la otra mitad lo fueron a la condición de “agua” (grupo W). Antes de proceder a la extracción de sangre de la cola, los animales pasaron por tres pruebas conductuales. En primer lugar, las ratas fueron expuestas a una tarea consumatoria de devaluación en la que, durante 10 sesiones de 5 minutos, recibieron una solución de sacarosa al 32%. Concluida esta fase (de precambio), la concentración de sacarosa fue reducida al 4% durante 5 sesiones (fase de postcambio). Después de cada una de las sesiones de la prueba consumatoria, los animales tuvieron acceso durante dos horas, en su jaula hogar, a dos botellas: una con alcohol (2%) y otra con agua (grupo E); o las dos con agua (grupo W). En las sesiones 11 y 12 (correspondientes a la primera y segunda sesión de la fase de postcambio, respectivamente), los animales fueron expuestos durante 6 minutos al HB. La extracción de sangre se llevó a cabo en las sesiones 10, 11 y 12 del presente estudio, correspondientes a la última sesión de la fase de precambio, y a las dos primeras de la fase de postcambio. Para asegurar que el momento de la extracción de sangre fuera similar entre sesiones, ésta se realizó, en la sesión 10, 15 minutos después de haber concluido la prueba de preferencia, mientras que en las sesiones 11 y 12 se llevó a cabo inmediatamente después del test del HB.

La extracción de sangre de la cola para la medición de los niveles de alcohol en sangre se realizó del siguiente modo. Los animales fueron transportados desde su jaula hogar a una habitación distinta de donde se realizaban el resto de tareas conductuales. El sujeto fue extraído de su jaula e inmovilizado con un paño (Anexo 7). Se introdujo la cola en un vaso de precipitado con agua caliente (40° C aproximadamente) durante un minuto para conseguir dilatar y localizar la arteria. A continuación, se realizó un pequeño corte (de unos 2 mm) en la

cola, cerca del extremo distal. Se utilizó un capilar que, puesto en contacto con el corte, absorbió la sangre por capilaridad. Este procedimiento duró unos dos minutos, y una vez llenado el capilar se sumergió en hielo para su almacenamiento temporal. Concluida la sesión experimental, los capilares fueron centrifugados durante 20 minutos a 2000 revoluciones por minuto. Cinco minutos después de haber finalizado la centrifugación, los capilares fueron colocados de nuevo en hielo, se extrajo el plasma con micropipetas y éste se almacenó en tubos eppendorf a -20 ° C hasta que concluyó el experimento, momento en que las muestras fueron trasladadas y almacenadas en un congelador de -80 ° C hasta que se realizó el análisis de las concentraciones de alcohol.

Dicho análisis se realizó en el Centro de Instrumentación Científico-Técnico (CICT) de la Universidad de Jaén, utilizando el Ethanol Assay Kit de abccam. Este kit constituye un método simple, rápido y sensible para la cuantificación precisa de la concentración de etanol en una variedad de muestras biológicas como suero, plasma, otros fluidos corporales, alimentos, bebidas y medios de crecimiento, siendo el plasma la muestra de nuestra investigación. El alcohol oxidasa oxida el etanol para general H₂O₂, que reacciona con nuestra sonda para generar color y fluorescencia. En nuestro caso, el análisis del plasma se realizó a través de fluorescencia.

El paso previo a la realización del análisis es la preparación de la muestra, cuyo procedimiento de elaboración se desarrolla en apartados posteriores. Una vez preparada la muestra, se prepara la curva estándar, con el fin de compararla con los valores registrados en la sangre. A continuación, se añade el “reaction mix” y se incuba la mezcla a 37° C durante 30 minutos. Por último, se realiza el análisis de las muestras mediante fluorescencia.

Para la realización de dicho análisis, se necesitó, tal y como se indica en la tabla 1: en primer lugar, 25 µL de tampón de ensayo de etanol (ethanol essay buffer, EAB), conservado a -20°C antes de su utilización y posterior a la misma, 200 µL de etanol probe de una conservación de -20°C antes y después del empleo. Además, se requirió 1 vial de mezcla de enzimas de etanol (liofilizada), refrigeradas a -20°C antes de su aplicación y a + 4°C después de la misma. Por último, respecto al alcohol, se necesitó 500 µL de etanol estándar, cuya conservación era de -20°C antes y después de su utilización.

Tabla 1

Material necesario para realizar el análisis de sangre

Item	Amount	Storage Condition (Before Preparation)	Storage Condition (After Preparation)
Ethanol Assay Buffer	25 mL	-20°C	-20°C
Ethanol Probe (in DMSO, anhydrous)	200 µL	-20°C	-20°C
Ethanol Enzyme Mix (Lyophilized)	1 vial	-20°C	+4°C
Ethanol Standard (17.15 N)	500 µL	-20°C	-20°C

En primer lugar, se procedió a la dilución del EAB junto a etanol para conseguir una recta de fluorescencia que permitiera comparar los valores estándar de etanol que aporta el kit con los obtenidos en nuestras muestras de sangre. Al EAB se le añade el Enzyme Mix, una mezcla de enzimas alícuotas que se emplean para tener una cantidad suficiente de líquido y poder hacer así el número de ensayos que se desean. Para ello se mezcló el EAB y el estándar mediante un agitador vórtex. Una vez realizada la dilución, se extrajeron 808 microlitros (µL) de EAB y 50 microlitros (µL) del etanol estándar a través de una micropipeta y se colocaron en el primer eppendorf.

Para la preparación del ethanol standard en un ensayo de fluorimetría hay que seguir los siguientes pasos: en primer lugar se prepara el ethanol standard añadiendo 50 µL de ethanol standard puro a 808.7 µL de EAB, y se mezcla bien. A continuación, se preparan 10 nmol/µL de ethanol standard añadiendo 10 µL de la dilución a 990 µL de EAB. Más tarde, se prepara 1 mM de ethanol standard agregando 100 µL de la dilución de 10 nmol/µL en 900 µL de EAB. Por último, utilizando 1 mM, se prepara la dilución de la curva estándar como se describe en la tabla 2, en una microplaca o tubos de microcentrífuga:

Tabla 2

Cantidades de EAB que hay que añadir en el ethanol Standard.

Standard #	Volume of 0.1mM Standard (µL)	Assay Buffer (µL)	Final volume standard in well (µL)	End [Ethanol] in well
1	0	150	50	0 nmol/well
2	6	144	50	0.2 nmol/well
3	12	138	50	0.4 nmol/well
4	18	132	50	0.6 nmol/well
5	24	126	50	0.8 nmol/well
6	30	120	50	1.0 nmol/well

Se realizaron 6 diluciones del etanol estándar, siendo la concentración de 0,1µL la que se distribuyó a los pocillos del etanol estándar en la placa. Posteriormente, se extrajo el EAB y se colocó en los 6 pocillos, con las siguientes cantidades: 150, 144, 138, 132, 126 y 120 µL respectivamente, y, se le fue añadiendo a cada una la dilución que ya había sido previamente preparada de 0,1 µL.

La preparación de la muestra se llevó a cabo del modo que se describe a continuación. Por un lado, se preparó una mezcla de 50 µL de sonda, de EAB y de enzima para añadirlo a cada pocillo y, por otro lado, otra mezcla compuesta por 50 µL de la muestra y etanol assay buffer. El resultado final era la obtención de un total de 100 µL. Para ello, se realizó una prueba con la cantidad más baja y la más alta de nuestro estudio, 5 µL y 30 µL respectivamente, con el fin de comprobar qué cantidad de muestra era necesaria para obtener valores dentro de la recta de fluorescencia. Para obtener 50 µL de EAB, había que mezclar los 5 µL de muestra con los 45 µL de etanol assay buffer que, junto a los 50 µL de la mezcla previamente elaborada (de sonda, EAB y enzima) dio como resultado 100 µL totales. Con la muestra de 30 µL se repitió el mismo procedimiento: se mezcló dicha cantidad con 20 µL de etanol assay buffer, consiguiendo así los 50 µL que, junto a los 50 µL de la mezcla previamente realizada, constituyen los 100 µL de mezcla final.

Tanto la preparación del estándar como la de la muestra se realizó por duplicado, quedando la distribución de las diferentes concentraciones de alcohol (nmol) y de muestra en la placa organizada del modo que se indica en la tabla 3:

Tabla 3

Distribución de las concentraciones de alcohol duplicadas

	1	2	3
A	STD1 0	STD1 0	Muestra sangre 30 µl
B	STD2 0,2	STD2 0,2	
C	STD3 0,4	STD3 0,4	
D	STD4 0,6	STD4 0,6	
E	STD5 0,8	STD5 0,8	
F	STD6 1	STD6 1	
G	BLK	BLK	
H	Muestra sangre 5 µl	Muestra sangre 5 µl	

Como indica esta tabla, las muestras de sangre a analizar se colocaron en las posiciones H1, H2 (5 µl) y A3 (30 µl). La celda marcada en rojo corresponde al tampón de etanol. La columna 2 es el duplicado de la 1. Los valores indican la concentración de alcohol de cada pocillo (en nM -nanomoles-)

Concluida la preparación de la placa, ésta se cubrió con film adhesivo y se introdujo en una incubadora a 37°C durante 30 minutos para su agitación suave. Transcurrido este tiempo, la placa multipocillo se colocó en el equipo de lectura de fluorescencia para medir los valores obtenidos de cada pocillo (en unidades de fluorescencia), realizar los correspondientes cálculos e inferir, a partir de los mismos, los valores de concentración de alcohol de la muestra de nuestro estudio.

4. RESULTADOS

Debido a un error en el cálculo de las cantidades para la preparación del reaction mix, tras usar toda la ethanol probe, la cantidad resultante de reaction mix fue insuficiente para repartir en toda la placa, por lo que sólo se pudo realizar el análisis de las muestras correspondientes al animal que consumió la mayor cantidad de alcohol (60,85 mg/kg en la sesión 11).

Los valores obtenidos tras exponer la placa al lector de fluorescencia arrojaron datos anómalos en relación con el duplicado ubicado en la columna 2 de la placa, por lo que se trabajó únicamente con los datos obtenidos a partir de la primera duplicación, que fueron los presentados en la tabla 4 (en unidades relativas de fluorescencia):

Tabla 4

Resultados obtenidos tras haber expuesto el lector de fluorescencia.

	1	2	3
A	7715		1217
B	8248		
C	8247		
D	8209		
E	8474		
F	8520		
G	4891		
H	2164	2111	

Obtenidos estos valores, se procedió a restar cada uno de ellos con el correspondiente al EAB (marcado en rojo), obteniéndose los datos que se presentan en la tabla 5 (en unidades relativas de fluorescencia):

Tabla 5

Resultados obtenidos tras la resta del EAB

	1	2	3
A	2824		-3674
B	3357		
C	3356		
D	3318		
E	3583		
F	3629		
G	0		
H	-2727	-2780	

La curva de calibración quedó representada como se puede apreciar en el gráfico 1:

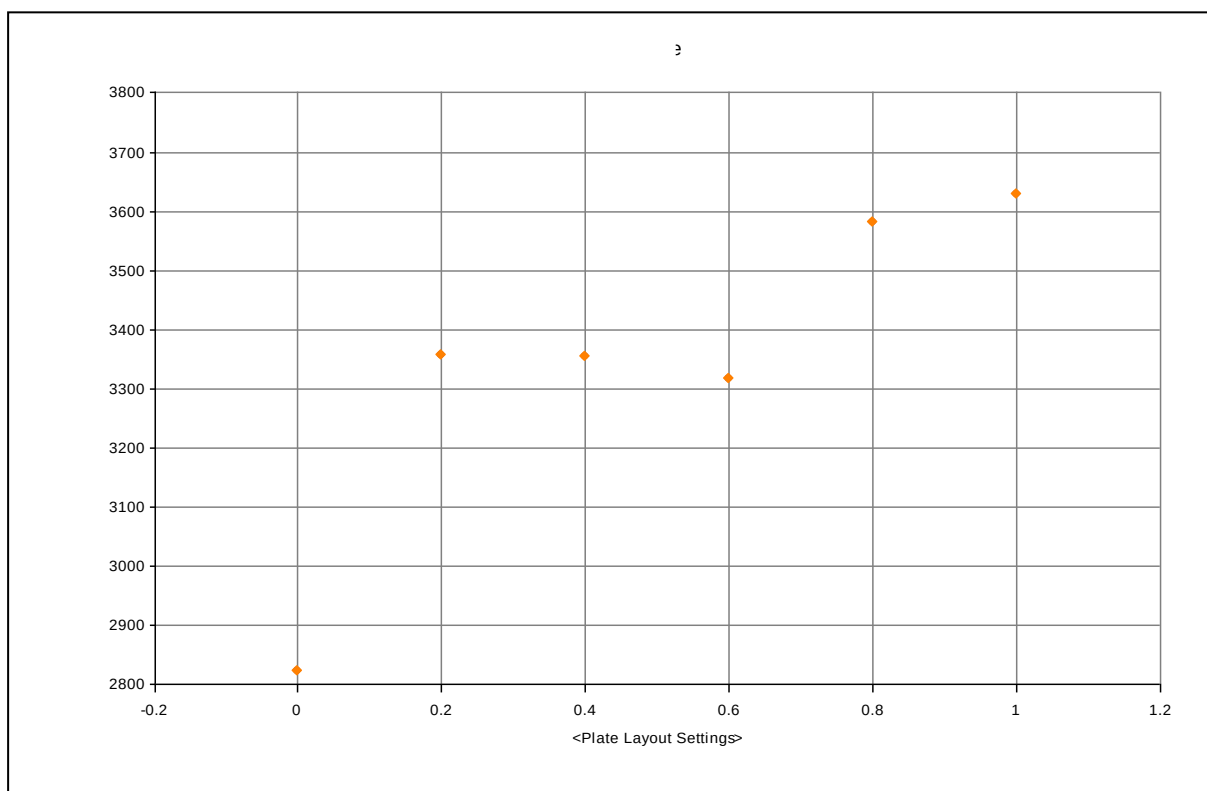


Gráfico 1. *Curva de calibración*

Por último, los valores de concentración de alcohol (en nanomoles) inferidos a partir de los resultados de fluorescencia no permitieron detectar concentración alguna de alcohol en las muestras de sangre extraídas del animal que más consumió, tal y como se detalla en la tabla 6.

Tabla 6

Resultados finales del análisis de fluorescencia que no detectaron ninguna concentración de alcohol significativa

	1	2	3
A	<0.000		<0.000
B	0,519		
C	0,517		
D	0,46		
E	0,858		
F	0,927		
G	<0.000		
H	<0.000	<0.000	

5. DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue analizar las concentraciones de alcohol en sangre registradas en animales expuestos a una prueba de preferencia por etanol (2%), tras ser expuestos a la devaluación en la magnitud de una recompensa esperada. Se esperaba encontrar concentraciones significativas de etanol que se relacionaran con la conducta del animal registrada en un test de ansiedad como el HB. Ello permitiría afirmar que, en condiciones de automedicación emocional, es decir, cuando el sujeto consume alcohol siendo su estado afectivo negativo, la cantidad consumida es farmacológicamente significativa y produce un efecto ansiolítico. Los resultados conductuales indicaron que los animales redujeron el consumo de la solución de sacarosa cuando ésta fue devaluada, aumentando el consumo voluntario de alcohol tras esta experiencia. Dicho aumento en el consumo se tradujo en un mayor número de respuestas de head-dipping (hundimiento de la cabeza en los agujeros del aparato) registrado en el HB, un hallazgo que sugiere que, a las dosis ingeridas, el etanol dio lugar a un efecto ansiolítico.

Aunque este estudio es preliminar, dado que sólo se pudo analizar la concentración de alcohol en sangre del animal cuyo consumo fue más elevado, no se detectó concentración alguna de la droga en la muestra relacionada, lo que genera dudas con respecto a que el alcohol alcance concentraciones farmacológicamente significativas en las condiciones experimentales utilizadas en el presente estudio. No obstante, en las páginas siguientes se revisan evidencias obtenidas en estudios con animales no humanos sobre la relación entre la concentración de alcohol en sangre y sus efectos farmacológicos, destacando la relevancia de este tipo de trabajos para ahondar en la comprensión de la adicción humana.

El 5 de febrero de 2004, el *National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism* aprobó la definición de “atracción” de alcohol en seres humanos, siendo ésta la ingesta que promueve que se alcance una concentración de la droga en sangre de 0,08 g%.

¿Es posible conseguir estas concentraciones en animales no humanos?

Bell et al. (2006) realizaron varias investigaciones con ratas seleccionadas por su alta preferencia por alcohol (P). Una de ellas consistió en presentar al grupo de ratas P una botella de agua y otra de etanol del 15% durante 22 horas, correspondiéndose 12 de estas horas al ciclo de oscuridad, y las 10 restantes al ciclo de luz. En este estudio emplearon un lickómetro para medir el total de lametones registrados en las botellas presentadas. Los resultados

obtenidos demostraron que las ratas bebían una cantidad más elevada de alcohol en episodios nocturnos, llegando a alcanzar una concentración de alcohol en sangre de 80 mg% (0,08 g%). La manipulación del tiempo cobró también relevancia en este estudio, ya que los animales que bebían una mayor cantidad de etanol lo hacían en menos episodios totales al día.

Las cantidades empleadas en las investigaciones sobre el etanol se encuentran aproximadamente entre el 2 y el 20 % del mismo y, realmente, sí influyen en el organismo de los animales no humanos. Bien es cierto que las concentraciones de la droga en la sangre pueden no ser significativas, como ha ocurrido en nuestra investigación, pero, a nivel conductual, sí se han podido observar cambios, ya que, una vez realizadas las pruebas pertinentes, se obtenían resultados significativamente diferentes en la conducta de los sujetos experimentales antes y después de consumir etanol.

Sin embargo, para que la investigación siga avanzando y, por consiguiente, se siga profundizando en un tema específico y de tal relevancia en la actualidad como es el alcohol y las consecuencias de su consumo, se deberían aumentar las concentraciones del mismo en los estudios realizados con ratas con el fin de estudiar la cantidad de etanol en sangre y observar los efectos producidos dependiendo de la cantidad de droga consumida. Una vez obtenidas las concentraciones en sangre, se podrán estudiar los efectos que provocan en el organismo, como descoordinación motora, lentitud psicomotora, visión doble, etc., para establecer una relación entre ambos. Además, estos porcentajes de etanol aumentados estarían controlados en todo momento por el personal profesional, el cual podrá tener en consideración las medidas necesarias del laboratorio para aumentar la precisión de las investigaciones y evitar variables extrañas.

El estudio descrito en estas páginas utilizó una concentración de alcohol reducida (2%), que fue presentada durante dos horas para su consumo voluntario. Bajo estas condiciones experimentales es posible que no se hayan alcanzado concentraciones significativas en sangre por varias razones. En primer lugar, solo analizamos una muestra de un animal, por lo que en estudios futuros sería conveniente analizar la concentración de alcohol en sangre de todos los sujetos y establecer una correlación entre los valores de consumo y las concentraciones de etanol en sangre de cada rata cada día. Por otro lado, la concentración de alcohol que se empleó para el desarrollo de la investigación fue muy baja, de un 2% del mismo, por lo que cabía esperar lo ocurrido, es decir, que las concentraciones en sangre no fueran significativas. Es de suma relevancia el hecho de que, a pesar de no haber

sido abundante la cantidad de alcohol ingerida, las ratas sí estuvieron bajo los efectos del etanol, ya que se observaron diferencias significativas en el Hole-Board antes y después de beber. Para estudios futuros, sería importante replantear la concentración de alcohol que se va a presentar a los sujetos experimentales, ya que se les pueden mostrar diferentes cantidades con un aumento progresivo en el porcentaje de alcohol para observar hasta qué nivel son capaces de ingerir la droga y preferirla frente a agua. A fin de conseguir una concentración significativa y así poder avanzar en investigaciones futuras, sería oportuno, además, aumentar la duración del test de preferencia (momento en el que los animales tienen presentes las dos botellas, una de etanol y otra de agua, y puede consumir libremente cualquiera de las dos); y por otro lado, se podría realizar un seguimiento de la cantidad consumida de cada animal, y sacar la sangre en el momento en el que está bebiendo.

A pesar del resultado obtenido en esta investigación, se debe tener presente una visión de progreso que nos permita seguir avanzando en el mundo de la experimentación, y para ello, es conveniente tener en cuenta las posibles propuestas de mejora de este estudio, con el fin de evitar estas variables extrañas en próximas investigaciones. Por ejemplo, una posible medida preventiva sería aumentar la concentración de alcohol en los animales en dos partes. Por un lado, como se ha propuesto previamente, se podría presentar al animal una concentración determinada de etanol y, progresivamente, se iría aumentando esa concentración para observar cuál es la máxima a la que es capaz de consumir; y, por otro lado, contemplaría el tiempo que es capaz de permanecer el animal bebiendo de la sustancia psicoactiva, ya que con estas medidas sería más factible la detección de alcohol en sangre. A su vez, otra opción válida podría ser aumentar el intervalo de tiempo entre ensayos. La fatiga es un efecto que influye en muchos aspectos de la vida, y que perjudica o interfiere en las actividades que realizamos cuando estamos cansados. Si las ratas se encuentran más descansadas entre ensayos, la ingesta de alcohol puede aumentar. Cabe destacar, por último, que la privación durante un tiempo de la droga aumenta su consumo en posteriores presentaciones de la misma, por lo que más adelante, en lugar de presentar durante un tiempo continuado el etanol al animal, se podría crear un grupo de sujetos a los que se les prive del alcohol durante un determinado tiempo, y comparar la cantidad ingerida junto al grupo de sujetos a los que se les ha presentado la prueba de preferencia con normalidad.

En definitiva, en este TFG se ha intentado dar un paso más y avanzar en el campo de la investigación sobre un tema de vital importancia en la actualidad como es el consumo de

alcohol. Sería apropiado continuar profundizando y realizando mejoras, como las propuestas comentadas previamente en este apartado, para así alcanzar objetivos más precisos, como conocer las relaciones entre las concentraciones de alcohol en sangre y los efectos que éste produce sobre la conducta. Los estudios con animales no humanos nos permiten crear climas y escenas paralelas comparables a las que acontecen en la población humana, salvando muchos problemas éticos. Así se pueden conocer las causas y consecuencias del consumo de alcohol, concienciar a la sociedad y evitar el consumo excesivo de esta droga a la cual los jóvenes acceden cada vez con más facilidad. Actualmente, está socialmente aceptado ingerir esta droga de forma habitual y, lo que resulta de más gravedad, consumirla en forma de atracón, sin ser conscientes de los efectos negativos de dicha acción. Es por ello que todavía queda un campo muy abierto sobre el que investigar y sobre el que fijar multitud de objetivos distintos, para prevenir situaciones perjudiciales en la población humana como la adicción o las diferentes enfermedades que se puedan padecer a largo plazo causadas por el consumo excesivo de alcohol.

6. REFERENCIAS

- American Psychiatric Association (APA). (2013). *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales* (5ª Ed) (DSM-V). Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Anderson, P. y Baumberg, B. (2006). *Alcohol in Europe: A public health perspective*. Londres: Institute of Alcohol Studies.
- Aragón, C., Miquel, M., Correa, M., y Sanchís-Segura, C. (2002). Alcohol y metabolismo humano. *Adicciones*, 14(5), 184-189.
- Becker, H., y Ron, D. (2014). Animal models of excessive alcohol consumption: recent advances and future challenges. *Alcohol (Fayetteville, NY)*, 48(3), 205-208.
- Bell, R. L., Rodd, Z. A., Lumeng, L., Murphy, J. M., McBride, W. J. (2006). The alcohol-preferring P rat and animal models of excessive alcohol drinking. *Addiction Biology*, 11, 270–288.
- Calvo, H. (2003). Alcohol and neuropsychology. *Trastornos Adictivos*, 5(3), 256-268.
- Canning, U., Millward, L. y Raj, T. (2003). *Drug use prevention: A review of reviews*. Londres: Health Development Agency.
- 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.
- Guerri, C. (2000). Cómo actúa el alcohol en nuestro cerebro. *Trastornos Adictivos*, 2(1), 14-25.
- Díez, I. (2003). La influencia del alcohol en la sociedad. *Hospital Donostia. Servicio de Cuidados Intensivos Pediátricos*, 5, 177-190.
- Dirección General de Tráfico (2017). El alcohol y la Conducción. Recuperado de: http://www.dgt.es/PEVI/documentos/catalogo_recursos/didacticos/did_adultas/alcohol.pdf
- Kamenetzky, G., y Mustaca, A. (2006). Alcoholismo y ansiedad: modelos animales. *International journal of psychology and psychological therapy*, 6(3), 343-364.

- Landa, N., Fernández-Montalvo, J., y Ustarroz, J. T. (2004). Alteraciones neuropsicológicas en el alcoholismo: una revisión sobre la afectación de la memoria y las funciones ejecutivas. *Adicciones*, 16(1), 41-52.
- Leeman, R. F., Heilig, M., Cunningham, C. L., Stephens, D. N., Duka, T., y O'malley, S. S. (2010). Ethanol consumption: how should we measure it? Achieving consilience between human and animal phenotypes. *Addiction Biology*, 15(2), 109-124.
- Manzo, L., Gómez, M. J., Callejas-Aguilera, J. E., Donaire, R., Sabariego, M., Fernández-Teruel, A. y Torres, C. (2014). Relationship between ethanol preference and sensation/novelty seeking. *Physiology & Behavior*, 133, 53-60.
- 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.
- Morales, A. I. (2015). ¿Cuánto alcohol consumimos cuando decimos que bebemos “lo normal”? Determinación de la tasa de alcoholemia. *Educafarma*, 3, 37-41.
- Mosquera, J., y Menéndez, M. (2006). Alcohol étílico: un tóxico de alto riesgo para la salud humana socialmente aceptado. *Revista de la Facultad de Medicina*, 54(1), 32-47.
- Muñoz, J. (2010). Las bebidas alcohólicas en la historia de la humanidad. *AAPAUNAM. Academia Ciencia y Cultura*, 2, 42-52.
- Observatorio Español de las Droga y las Adicciones (OEDA) (2018). Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España: Recuperado de:
<http://www.pnsd.mscbs.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/informesEstadisticas/pdf/2018OEDA-INFORME.pdf>
- Pérez Rial, S., Ortiz, S. y Manzanares, J. (2003). Neurobiología de la dependencia alcohólica. *Trastornos adictivos*, 5, 4-12.
- Pons, J., y Buelga, S. (2011). Factores asociados al consumo juvenil de alcohol: una revisión desde una perspectiva psicosocial y ecológica. *Psychosocial Intervention*, 20(1), 75-94.

- Regal, M. L. L., Otero, L. H. G., Valdés, A. L., de Armas García, J. O., Hurtado, A. U., y Caña, G. R. (2014). Bases neurobiológicas de la adicción al alcohol. *Revista Finlay*, 4(1), 40-53.
- Rosselló, J., Munar, E., Justo, S., y Arias, R. (1998). Efectos del alcohol sobre la atención dividida y la precisión del cambio atencional. *Psicothema*, 10(1), 65-73.
- Sánchez-Queija, I., Moreno, C., Rivera, F., y Ramos, P. (2015). Tendencias en el consumo de alcohol en los adolescentes escolarizados españoles a lo largo de la primera década del siglo XXI. *Gaceta Sanitaria*, 29(3), 184-189.
- Samson, H., Sharpe, A., y Denning, C. (1999). Initiation of ethanol self-administration in the rat using sucrose substitution in a sipper-tube procedure. *Psychopharmacology*, 163, 157-165.
- Schuckit, M. A. (2014). A brief history of research on the genetics of alcohol and other drug use disorders. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs, Supplement* (s17), 59-67.
- Spanagel, R. (2000). Recent animal models of alcoholism. *Alcohol Research & Health*, 24, 124-131.
- Wolffgram, J., Heyne, A. (1995). From controlled drug intake to loss of control: The irreversible development of drug addiction in the rat. *Behavioral Brain Research*, 70, 77-94.
- Wise, R. A. (1973). Voluntary ethanol intake in rats following exposure to ethanol on various schedules. *Psychopharmacologia*, 29(3), 203-210.

7. ANEXOS

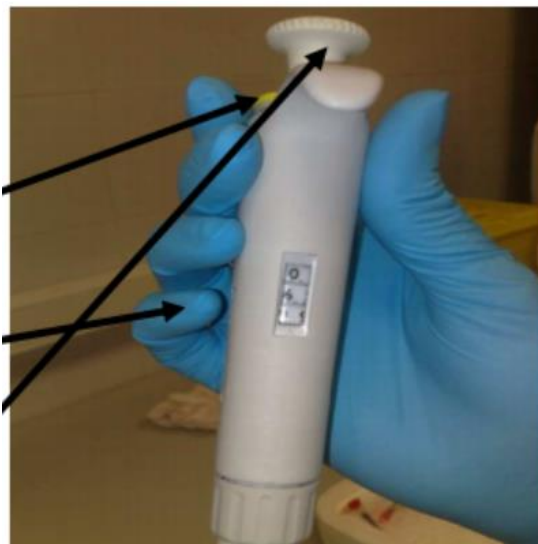
Anexo 1. Foto sobre el hielo picado en la caja de porexpan donde eran guardadas las muestras de sangre.



Anexo 2. Imagen de la centrífuga sobremesa.



Anexo 3. Pipeta mediante la cual se extraía el plasma de la sangre.



Anexo 4. Placa multipocillo con un total de 96 pocillos.



Anexo 5. Incubadora en agitación.



Anexo 6. Lector de microplacas de fluorescencia



Anexo 7. Inmovilización de una rata para proceder a la extracción de sangre.

