



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación

Trabajo Fin de Grado

Consumo voluntario de ansiolítico en ratas Wistar: un estudio de dosis

Estudiante: Juana María Gámez Cabrera

Tutorizado por: Carmen Torres Bares
Departamento: Psicología

Mayo, 2017

INDICE.

1. Resumen.....	3
2. Abstract.....	3
3. Introducción.....	5
4. Metodología.....	16
4.1. Sujetos.....	16
4.2. Aparatos.....	16
4.3. Procedimiento.....	17
4.4. Fármacos.....	18
4.5. Variables dependientes.....	18
4.6. Análisis estadísticos.....	18
4.7. Resultados.....	18
5. Discusión.....	22
6. Conclusiones.....	26
7. Bibliografía.....	28
8. Anexos.....	31

1. RESUMEN

Este TFG es un estudio de carácter exploratorio dirigido a analizar los patrones de consumo voluntario de clordiazepóxido (CDP) en ratas Wistar, con el objetivo de comprobar si los mismos están determinados por la dosis presentada. Para ello los animales tuvieron acceso diario a este ansiolítico mediante un procedimiento de libre elección CDP-agua con una duración de dos horas cada día. La mitad de animales en este estudio solo tuvieron acceso a agua durante las sesiones experimentales, para así comprobar comparando ambos grupos, si los animales expuestos al fármaco preferían este fármaco frente a agua, y si dicha preferencia dependía de la dosis. Los resultados mostraron que los sujetos del grupo experimental mostraron un mayor consumo del fármaco que de agua y un consumo superior al grupo control, un hallazgo que no estuvo influido por la dosis.

Aunque como este estudio fue exploratorio y además no se estableció una predicción precisa sobre la influencia de la dosis en el consumo del fármaco, se esperaba encontrar que dosis muy bajas o muy altas redujeran el consumo en los animales, debido a la ausencia de efectos farmacológicos (en el caso de las dosis bajas) o la aparición de efectos aversivos o sedantes (en relación con las dosis elevadas). Sin embargo, sólo las dosis muy bajas o muy altas promovieron un mayor consumo del fármaco, si bien el apoyo estadístico a esta afirmación fue parcial (al no obtenerse la interacción significativa entre los grupos y la dosis). Por tanto, aunque los resultados indican que el CDP es un fármaco por el que los animales muestran preferencia, no nos dan claves acerca de cuál es la dosis idónea a utilizar en futuros estudios, lo cual era el objetivo de este TFG.

Palabras clave: Modelos animales, auto-consumo, benzodiazepinas, clordiazepóxido.

2. ABSTRACT

This study is aimed at analyzing the patterns of voluntary consumption of CDP in Wistar rats to verify if they are determined by the quantity of the dose. The animals had daily access to this anxiolytic using a free-choice procedure where animals could choose between CDP or water during two hours. Half of the animals that were included only had access to water during the experimental sessions, to verify the comparison of both groups, if the animals exposed to CDP preferred this drug against water and that the preference depended on the dose. The results indicated that the animals who received

CDP had more consumption of the bottle containing it than the one of the water bottle and a consumption higher than the W-group, finding that was not influenced by the dose.

Although this study was exploratory and there was no prediction of the influence of dose on CDP consumption, it was expected that very low or very high doses would reduce consumption in animals, due to the absence of pharmacological effects (in the case of low doses) or the appearance of aversive or sedative effects (in relation to high doses). However, only very low or very high doses promoted a higher consumption of the drug, although the statistical support for this assertion was partial (because of no significant interaction between the groups and the dose was obtained). Therefore, although the results indicate that CDP is a drug for which animals show preference, they do not give us clues about which dose is suitable for use in future studies, which was the objective of this study.

Keywords: Animal models, voluntary consumption, benzodiazepines, chlordiacepoxide.

3. INTRODUCCIÓN

La ansiedad es una emoción natural, un estado fisiológico resultante de la activación del sistema nervioso ante situaciones de amenaza, que permite al organismo prepararse y reaccionar ante situaciones que pongan en peligro su integridad física. Se trata de una respuesta que está presente en una gran variedad de seres vivos, y que, en condiciones normales, les permite reaccionar al peligro de una forma adaptativa. La ansiedad se torna patológica, sin embargo, cuando alcanza una elevada intensidad o es desproporcionada con respecto a la situación en la que se manifiesta, provocando una gran variedad de síntomas fisiológicos, conductuales y cognitivos y un deterioro generalizado en el funcionamiento normal de los individuos (Martínez, Sáiz, García-Portilla 2008; Navas y Vargas, 2012). Un ejemplo muy recurrente de ansiedad patológica sería, por ejemplo, hablar en público o hacer un examen; aunque en ninguna de estas situaciones hay un peligro real para la vida de la persona, quien padece ansiedad intensa será incapaz de controlar su estado mental, emocional y fisiológico, lo que resultará muy incapacitante. En el ámbito clínico, los trastornos de ansiedad han sido clasificados mediante diferentes criterios, siendo el más aceptado el propuesto en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-V, 2013). Si bien son numerosos los trastornos de ansiedad incluidos en esta clasificación, todos tienen un elemento en común: la respuesta desproporcionada al suceso que la origina, siendo esto último un indicador importante de su carácter patológico.

En la siguiente tabla se encuentra la clasificación de los trastornos de ansiedad definidos de forma breve:

Trastorno de ansiedad por separación	Ansiedad propiciada ante la separación de una persona con la que se mantiene un vínculo afectivo
Trastorno de ansiedad generalizada	Ansiedad de carácter persistente y excesivo otorgando a la persona bastantes problemas para controlarla
Mutismo selectivo	Incapacidad persistente para hablar en un contexto específico
Fobia específica	Aparición de un grado alto de ansiedad y miedo persistente ante la presencia de un estímulo que desencadena la reacción
trastorno de ansiedad social	Miedo o ansiedad intenso que aparece en situaciones de carácter social donde el desencadenante del miedo es el pensamiento de estar siendo observado por los presentes
Trastorno de angustia	Presencia de crisis de angustia de carácter inesperado y recurrente.
Agorafobia	Miedo y ansiedad en ciertas situaciones como lugares abiertos, donde la persona teme sufrir una crisis de ansiedad y no poder controlarla

Trastorno de ansiedad inducido por sustancias/medicación	Presencia de crisis de angustia desencadenadas por la intoxicación producida por el consumo de una sustancia
Trastorno de ansiedad debido a otra enfermedad médica	El desencadenante de la ansiedad aparece como consecuencia de otro tipo de patología o enfermedad
Otros trastornos de ansiedad especificados pero que no cumplen con criterios de carácter temporal	Trastornos que tienen sintomatología clínicamente significativa pero que por alguna razón, no llegan a cumplir los criterios necesarios para diagnosticar un trastorno de ansiedad en concreto
Trastorno de ansiedad no especificado.	

(Tortella-Feliú, 2014)

Revisada la clasificación de los trastornos de ansiedad, podemos mencionar la situación en España, donde los trastornos de ansiedad tienen una alta prevalencia entre la población. Por ejemplo, el trastorno de ansiedad generalizada (TAG) afecta a entre un 5% y un 13% de la población. Asimismo, el porcentaje de personas que sufre cualquier otro trastorno de ansiedad en nuestro país se estima en torno a un 28,7% (Martínez, Sáiz y García-Portilla, 2008). Debido al gran porcentaje de casos, los estados de ansiedad patológica suponen una gran parte de la demanda de atención psiquiátrica y psicológica. En este contexto, son numerosos los tratamientos farmacológicos desarrollados para aliviar los síntomas de ansiedad, destacando los ansiolíticos pertenecientes a la familia de las benzodiazepinas. Estos fármacos de prescripción médica se caracterizan por tener gran potencial de abuso, inducir el desarrollo de tolerancia a las pocas semanas de uso, y provocar numerosos efectos secundarios, tales como hipersedación, aumento de peso, sequedad de boca, trastornos de memoria o relajación muscular excesiva. Los datos proporcionados en la última encuesta publicada por el Observatorio Español de las Drogas y las Toxicomanías, realizada en 2013, sitúan a este tipo de compuestos entre las sustancias más consumidas: un 22% de personas con edades comprendidas entre 15 a 64 años manifiesta haberlos consumido alguna vez, situándose la media de edad de inicio de consumo en torno a los 35 años. Por lo general el consumo que las mujeres hacen de estos fármacos duplica al de los hombres, a diferencia del resto de drogas estudiadas, donde los hombres tienen un consumo mayor de drogas que las mujeres (OEDT, 2015).

Las primeras benzodiazepinas fueron descubiertas en 1930 por Leo Sternback, aunque hasta 1960 no empezaron a ser prescritas de forma habitual, siendo los sucesores de los barbitúricos. Estos tenían como indicaciones iniciales el tratamiento de pacientes esquizofrénicos y maníacos, así como casos de autismo, trastornos afectivos y estados

de ansiedad graves, pero casi se ha prescindido de ellos debido a la peligrosidad que los caracteriza. En la actualidad, las benzodiacepinas se utilizan para el tratamiento del insomnio, los cuadros de ansiedad, la epilepsia y algunas alteraciones musculares (López-Muñoz, Álamo, Ucha-Udabe y Cuenca, 2004; Rosas-Gutierrez, Simón-Arceo y Mercado, 2013). No obstante, debido al carácter crónico de muchos trastornos de ansiedad, a menudo se recurre a otro arsenal terapéutico con menos potencial de abuso, como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina o los antidepresivos tricíclicos, entre otros (Navas y Vargas, 2012).

Una vez realizada esta breve presentación de las benzodiacepinas, es conveniente indagar en la naturaleza de estos fármacos, dado que tienen una especial relevancia para el presente Trabajo de Fin de Grado (TFG). En referencia a la farmacocinética de las benzodiacepinas, existen cuatro vías de administración principales: oral, sublingual, intramuscular e intravenosa (Parra y Muñoz, 2009). Sin embargo, por una serie de razones, no todas las vías de administración son adecuadas para todos los tipos de benzodiacepinas; el tiempo de absorción no es siempre el mismo para todas ellas y en ocasiones de urgencia (un ataque de pánico, por ejemplo), es necesario que hagan su efecto en el individuo lo antes posible. Algunas benzodiacepinas, como el diazepam o el lorazepam, tienden a tener buena absorción cuando se administran por vía oral o sublingual, aunque también es posible encontrar casos donde se administran por vía intravenosa; algo similar ocurre con el midazolam, cuya primera vía de administración es de ese tipo, aunque su inicio es más lento y bastante más peligroso, ya que puede causar depresión respiratoria si no se controla como es debido. La vía de administración menos recomendada en el caso de las benzodiacepinas se trata, sin duda alguna, de la intramuscular, ya que la absorción es bastante irregular y lenta, y cuenta con el riesgo de irritación local a causa de acumulaciones y de la precipitación del fármaco. Los factores que varían la concentración o dificultan la absorción son dos: las diferencias en relación con la estructura química de los compuestos, y su grado de liposolubilidad. Este último factor es de gran importancia, ya que la liposolubilidad está muy relacionada con la velocidad de absorción, distribución y la de eliminación (Gámez y Irala, 1997).

Las benzodiazepinas normalmente se clasifican en función de su tiempo de vida medio (Fernández, González y Peña, 2003). Así, las de acción prolongada son aquellas cuyo tiempo de vida media supera las 12 horas; las de acción corta son las que tiene un

tiempo de vida media inferior a las 12 horas. Una clasificación más detallada la encontramos en Parra y Muñoz (2009), quienes recomiendan dividir las en cuatro tipos, tal y como se muestra en la siguiente tabla:

Tiempo de vida media de las benzodiacepinas:

Benzodiacepinas de acción ultra corta	0 – 6 horas
Benzodiacepinas de acción corta	6 – 12 horas
Benzodiacepinas de acción intermedia	12 – 24 horas
Benzodiacepinas de acción prolongada	Más de 24 horas

(Parra y Muñoz, 2009)

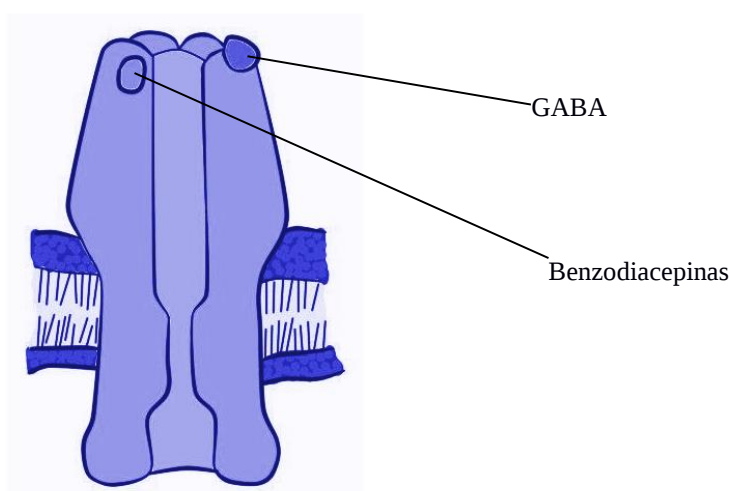
Durante la acción de las benzodiacepinas en el organismo se lleva a cabo su distribución y metabolización, que tienen lugar en dos fases. Durante la fase α aumenta gradualmente la cantidad de fármaco en el organismo, pero con el transcurso del tiempo la concentración disminuye considerablemente, pasando a la fase β , durante la que acontece el proceso de metabolización. Las benzodiacepinas se metabolizan en gran medida en el hígado. Durante este proceso se forman metabolitos activos, que se transforman a un ritmo más lento que la benzodiacepina por la que estaban formados. Los metabolitos, finalmente y tras una serie de reacciones químicas, se eliminan por medio de la excreción a través de los riñones, o sea, de la orina (Gámez e Irala, 1997).

El conocimiento del mecanismo de acción de las benzodiacepinas en el sistema nervioso central contribuye a comprender sus efectos farmacológicos. En efecto, se trata de fármacos que potencian la acción del GABA, un neurotransmisor de carácter inhibitorio relacionado con la disminución de la excitación producida en situaciones que propician la aparición de ansiedad (Parra y Muñoz, 2009). Esta modulación alostérica positiva la llevan a cabo a través de los receptores ionotrópicos GABA-A, localizados básicamente en la membrana postsináptica. Los sitios de unión benzodiacepínica en este complejo receptor contienen un aminoácido llamado histidina, que determina la capacidad de las benzodiacepinas para interaccionar con él. Es importante también

destacar la existencia de otros ligandos que también interactúan con este lugar de unión, como el zolpidem y la zopliclona (ambos análogos a las benzodiazepinas), que son capaces de activar el receptor GABA-A sin llegar a ser propiamente benzodiazepinas.

Cuando una benzodiazepina se acopla al receptor GABA-A, se potencia el efecto del GABA sobre su propio lugar de reconocimiento, lo que conduce a un aumento en la frecuencia de apertura del canal de cloro y a una hiperpolarización de la neurona postsináptica (Rosas-Gutiérrez, Simón-Arceo y Mercado, 2013). Dada su naturaleza ionotrópica, los receptores GABA-A están formados por 5 tipos de subunidades, que se pueden combinar de forma diversa. Esta combinación también es crucial, dado que va a determinar la afinidad de los diferentes agonistas por los distintos lugares de reconocimiento que posee este receptor, incluyendo el sitio de unión para benzodiazepinas. Así, por ejemplo, la subunidad 1 tiene como función regular los síntomas de carácter hipnótico, anticonvulsivo y sedante producidos por el consumo de un ansiolítico. La subunidad 2 posee la función de regular la ansiedad del individuo: su acción está causada por la distribución estratégica de la misma en el sistema nervioso central. En concreto, estos receptores se encuentran especialmente localizados en zonas del cerebro cuya función está relacionada con la ansiedad: la amígdala, el hipocampo y el cuerpo estriado. El resto de subunidades, hasta cinco, guardan relación con otros efectos que causan las benzodiazepinas en el organismo (Medel-Matus, Cortijo-Palacios, Gasca-Pérez, Susan-Tepetlan, Pérez-Palacios y Ramos-Morales, 2011).

Receptor GABA-A



(Adaptado de: Purves et al., 2007)

Como se ha comentado con anterioridad, el consumo de benzodiacepinas puede conducir al desarrollo de comportamientos y sintomatologías que definen los trastornos por abuso de sustancias. Un indicador característico sería la aparición de un estado afectivo negativo cuando el fármaco no está disponible, lo que induciría conductas de búsqueda de la droga, *craving* (ansia o dependencia psicológica) y recaídas (con el consiguiente riesgo de sobredosis). Cuando una persona se encuentre en este estado consumirá el ansiolítico sin un adecuado control médico, recurriendo con frecuencia a la automedicación. El síndrome de abstinencia producido por benzodiazepinas incluye ansiedad, disforia, irritabilidad, temblores, palpitaciones, vértigos, insomnio y sudoración, entre otros síntomas; en casos más graves, se pueden manifestar crisis de pánico, alteraciones sensorio-perceptivas, paranoias, delirios y confusión (Koob, Arends y LeMoal, 2014). Al mismo tiempo que el individuo progresa en su ciclo de adicción, se observa una importante reducción en la realización de actividades de tipo social o recreativo, lo que parece estar relacionado con un marcado déficit motivacional (Mustaca y Kamenetzky, 2005). Tal déficit, junto con la emergencia de un estado afectivo negativo, aumenta la probabilidad de que el sujeto vuelva a consumir el fármaco para reducir ambos estados negativos; es decir, como mecanismo de automedicación emocional. Como puede comprobarse, el consumo continuado de estos fármacos puede desembocar en un trastorno por abuso de sustancias similar al descrito para otras drogas de abuso. Así, en el DSM-V (2013) se indica que el trastorno sería diagnosticado cuando aparezcan dos o más de los siguientes síntomas durante un periodo continuado de 12 meses:

- Se consumen sedantes, hipnóticos o ansiolítico con frecuencia en cantidades superiores o durante un tiempo más prolongado del previsto.
- Deseo persistente o esfuerzos fracasados de abandonar o controlar el consumo de sedantes, hipnóticos o ansiolíticos
- Se invierte mucho tiempo en actividades necesarias para conseguir estos fármacos.
- Necesidad imperante de consumir ansiolíticos.
- Consumo recurrente de ansiolíticos llevando al incumplimiento de deberes fundamentales en el trabajo, en el hogar o en el entorno escolar.

- Consumo continuado de estos fármacos a pesar de sufrir problemas de tipo social o interpersonal provocados o agravados por los efectos provocados.
- Su consumo provoca el abandono o la reducción de una serie de actividades importantes para la persona.
- Consumo recurrente en situaciones donde se pone en peligro la vida de la persona por el hecho de tomarlos.
- Consumo continuado de los mismos pese a la consciencia de que existe un problema físico o psicológico causado por el consumo de estos fármacos.
- Tolerancia definida por el aumento gradual del consumo o el consumo continuado del mismo.
- Abstinencia manifestada por la presencia del síndrome de abstinencia característico por el consumo de sedantes o el consumo de los mismos para evitar o aliviar los síntomas del s. de abstinencia.

Actualmente se ha avanzado bastante en el conocimiento de los mecanismos neurobiológicos implicados en los trastornos adictivos, incluidos los referentes a la adicción a las benzodiacepinas. Una región clave en la explicación de estos trastornos es el núcleo accumbens, localizado en la zona ventral del cuerpo estriado, formando parte de los ganglios basales. Se trata de un núcleo que tiene una gran importancia en la percepción del placer y del refuerzo, ya que forma parte del circuito de la recompensa, encargado de integrar aspectos de tipo cognitivo, motivacional, emocional y motor relacionados con el procesamiento y búsqueda de estímulos placenteros. Cuando se introduce una droga en el organismo, ésta provoca la liberación masiva de dopamina en este circuito (y más en concreto en el núcleo accumbens), a un nivel nunca alcanzado por reforzadores naturales. Al igual que con el resto de drogas de abuso, el consumo continuado de benzodiacepinas provoca cambios adaptativos en este circuito cerebral, el cual acabará por funcionar de manera deficitaria, impidiendo al individuo experimentar placer con reforzadores naturales que antes del consumo tenían un mayor valor incentivo (Fernández-Espejo, 2000). El circuito de la recompensa se compone de conexiones neuroquímicas que involucran al sistema opioide endógeno, el sistema serotoninérgico, el GABAérgico y el glutamatérgico, entre otros. Estas conexiones pueden regular tanto los efectos reforzantes agudos derivados del consumo de drogas, como la adaptación por plasticidad cerebral que acontece cuando el consumo es crónico

(Guardia, Surkov y Cardús, 2010). En el caso de las benzodiazepinas cobran un especial interés las interneuronas GABAérgicas localizadas en el área tegmental ventral, cuya actividad resulta regulada por estos fármacos, dando lugar al aumento dopaminérgico mencionado anteriormente, y que subyace en ocasiones a la perpetuación del consumo, la pérdida de control, tolerancia y dependencia (Nomura, Nakao, Sato y Yano, 2006; Rosas-Gutiérrez, Simón-Arceo y Mercado, 2013). No obstante, cabe indicar que dentro de las benzodiazepinas comercializadas no todas tienen el mismo potencial de adicción, lo cual depende en gran medida de su vía y patrón de administración, y de sus propiedades farmacocinéticas (Gámez e Irala, 1997).

El estudio de la conducta adictiva desde una perspectiva psicobiológica ha sido posible, en gran medida, gracias al empleo de modelos animales. Algunos de estos modelos reproducen con gran precisión las condiciones y patrones de consumo de sustancias de abuso de los seres humanos. Tal es el caso de los modelos de consumo oral, voluntario, de sustancias que se consumen de esta manera en nuestra especie. Estos modelos han sido muy utilizados para estudiar la adicción a sustancias como el alcohol (Mustaca y Kamenetzky, 2005; Spanagel, 2003). El carácter experimental de estos modelos posibilita estudiar ciertos comportamientos cuya investigación en seres humanos no es posible por cuestiones éticas o limitaciones metodológicas. En las páginas siguientes se revisan los modelos animales que tienen una especial relevancia para el presente TFG.

El primer tipo engloba aquellos experimentos de administración forzada, en los que es el experimentador quien selecciona la dosis y la administra directamente al animal. Este tipo de procedimientos suelen inducir más efectos aversivos que apetitivos, siendo infrecuente que los animales desarrollen adicción a la sustancia así administrada. Por otro lado, en los modelos de auto-administración, el animal tiene el control sobre la dosis que consume, dado que él mismo se la administra de forma intencional y voluntaria (Mustaca y Kamenetzky, 2005; Spanagel, 2003).

Un primer tipo de modelos son aquellos de condicionamiento operante, donde se trabaja con respuestas de tipo instrumental para que el animal obtenga la recompensa deseada (por ejemplo, la respuesta de presión de palanca en una caja de Skinner). En otros casos, se realizan las tareas en la jaula-hogar donde reside el animal de forma permanente: se presenta en una botella una solución que contiene la sustancia en estudio y se da un tiempo de acceso limitado, o ilimitado, para que el sujeto la pueda consumir.

Es habitual presentar simultáneamente otra botella con agua, de modo se trataría de pruebas de libre elección droga-agua. No obstante, también se utilizan procedimientos de consumo forzado en los que el animal no tiene otra fuente de ingestión de líquidos, más que la solución que contiene la droga (Mustaca y Kamenetzky, 2005). Los procedimientos de jaula-hogar son los más adecuados para estudiar el comportamiento relacionado con el consumo de drogas ansiolíticas, ya que de las formas de experimentación es la que más se asemeja al consumo en humanos. Con este procedimiento se pueden obtener interesantes datos, tales como la preferencia por una sustancia u otra en base a la cantidad consumo, si desarrollan tolerancia o no en función de si aumenta la cantidad de consumo o se mantiene estable, etc. (Spanagel, 2003).

Otro método interesante para estudiar la conducta de consumo de drogas consiste en el desarrollo de cepas especiales de roedores, creadas especialmente para estudiar conductas relacionadas con el consumo de drogas y sus posibles bases genéticas. Un ejemplo son las cepas de ratas Romanas de Alta (RHA) y Baja Evitación (RLA); aunque estos animales fueron inicialmente seleccionados por sus diferencias extremas en el aprendizaje de evitación, también muestran divergencias en su tendencia a consumir sustancias con potencial de abuso. Las ratas RLA por lo general manifiestan mayor ansiedad que su grupo homólogo, mostrando mayor cantidad de comportamientos de evitación ante situaciones de carácter novedoso o amenazante. Por el contrario, la cepa RHA tiende a un mayor consumo de alcohol y otras drogas, tanto en situaciones de libre elección como en procedimientos operantes, estando estas diferencias determinadas por la dosis empleada en el estudio (Manzo et al., 2012). Otro tipo de aproximación genética son los ratones *knock-out* (Green y Grahame, 2008), basada en la supresión de ciertos genes y la obtención de datos relativos a si ello propicia una clara preferencia por el consumo de alcohol frente a sujetos análogos sin esta modificación (*wild-type* o controles).

Un aspecto clave en el estudio del consumo oral de drogas se relaciona con la palatabilidad de la sustancia; cuando se estudia esta variable se analiza si en condiciones de alimentación *ad libitum*, o en casos de privación de comida, el comportamiento de consumición varía o no dependiendo del sabor de la sustancia. Gracias a este procedimiento se han podido encontrar interesantes datos; por ejemplo, en situaciones de privación la palatabilidad de la sustancia no afecta a la cantidad de alcohol consumido (Spanagel, 2003).

En otros casos, el foco de atención es analizar si el consumo de la droga se ve influido por su forma de presentación. Por ejemplo, a veces se presenta de forma gradual, en dosis crecientes; en otras se opta por presentarla sola durante los primeros ensayos, para pasar después a presentarla de forma conjunta con agua; y en ocasiones se hace de manera intermitente. El objetivo de todos estos procedimientos es aumentar la preferencia por la droga presentada, llegando a inducir en ciertos casos un consumo de forma de atracón cuando la sustancia está disponible por periodos limitados (Mahía, 2009; Spanagel, 2003).

A pesar de los muchos estudios que se han realizado en relación con el consumo voluntario de etanol en animales, no hay trabajos que empleen este procedimiento experimental con las benzodicepinas, lo cual sorprende por dos razones. En primer lugar, se trata de fármacos con mecanismos de acción similares al alcohol, de ahí su potencial de abuso; en segundo lugar, el modo en que los seres humanos consumen y abusan de estos compuestos suele ser a través de su ingestión oral, lo que pone de manifiesto la validez ecológica que podrían tener los modelos de consumo voluntario oral de ansiolíticos, y su utilidad para comprender el abuso de estos fármacos de prescripción médica.

Recientemente, se ha desarrollado una línea de investigación en la Universidad de Jaén interesada por esta cuestión. Su objetivo es analizar de qué manera determinadas experiencias emocionales negativas inducen el consumo de ansiolíticos, a través de un mecanismo de automedicación. En concreto, Manzo et al. (2015) analizaron la relación entre la frustración (inducida mediante la devaluación de una recompensa) y el consumo oral de dos ansiolíticos: el alcohol, y la benzodicepina clordicepóxido (CDP). El experimento constó de dos fases y el procedimiento que se realizó fue de contraste sucesivo negativo consumatorio. Durante la primera fase del estudio (que duró 10 sesiones, cada una de 5 minutos) ambos grupos recibieron una solución azucarada, con diferencias de concentración de la solución intergrupar. Es decir, al primer grupo se le ofreció una concentración de azúcar del 32%, y al segundo una solución al 4%. Sin embargo, en la segunda fase (5 sesiones) a todos los grupos se les ofreció una solución al 4%. Después de cada sesión de ambas fases, los animales fueron expuestos durante dos horas a una prueba de preferencia con dos botellas: en algunos grupos ambas botellas contenían agua; en otros casos una botella tenía agua y la otra contenía alcohol (al 2%); y por último algunos animales tuvieron acceso a una

botella rellena de agua y otra que contenía CDP (que se presentó en dosis que iban aumentando cada dos días, desde 0.1 mg/kg hasta 1 mg/kg). Los resultados mostraron que los grupos que sufrieron una reducción en la concentración de azúcar del 32% al 4% consumieron más alcohol y CDP que aquellos que recibieron la solución al 4% en ambas fases, sin que en modo alguno se viera afectado el consumo de agua. Este efecto tuvo una duración de tres sesiones, y fue interpretado por los autores argumentando que la devaluación de la recompensa indujo en los sujetos una reacción emocional negativa de frustración, consecuencia de la cual los animales aumentaron su consumo de las soluciones capaces de reducirla; es decir, como un fenómeno de automedicación emocional.

A pesar de estos resultados, los intentos por replicar el fenómeno se han topado con muchas dificultades para conseguir patrones estables de preferencia por CDP en los animales, tanto en procedimientos simples de preferencia como en estudios de automedicación inducida por frustración. Estas inconsistencias contrastan con los hallazgos relativos al alcohol, que siempre es consumido de forma preferencial por los animales, sobre todo tras experiencias de devaluación o de omisión del reforzador (p.ej., Manzo et al., 2014). Una explicación de estas inconsistencias relativas al CDP podría ser la elección de la dosis a presentar. En la mayoría de los trabajos no ha sido superior al 2.5 mg/kg, siguiendo un procedimiento de transformación de la dosis entre especies que toma en cuenta la superficie de área corporal (Reagan-Shaw et al., 2007). Dado que las dosis estudiadas no han permitido obtener resultados concluyentes, en este TFG se presenta un estudio de dosis dependencia con CDP dirigido a analizar el rango de dosis en el cual los animales muestran un consumo significativo y preferencia por el fármaco. Si bien se trata de un trabajo preliminar y exploratorio, los resultados pueden ser muy relevantes para establecer las condiciones idóneas de consumo voluntario de CDP en animales, las cuales posibiliten en el futuro estudios de automedicación inducida por frustración.

4. METODOLOGÍA

4.1. Sujetos

Se utilizaron 20 ratas Wistar macho, provenientes de Charles Rives (Barcelona, España), que fueron alojadas en el Centro de Producción y Experimentación Animal (CPEA) de la Universidad de Jaén. Las ratas tenían un peso medio de 345 gramos a su llegada a las instalaciones, y fueron distribuidas aleatoriamente en función del mismo en dos grupos de 10 sujetos cada uno: el experimental (CDP) y el control (W). Los animales fueron privados de alimento a partir de la primera semana, con el objetivo de mantenerlos en torno al 81-84% de su peso *ad libitum*, teniendo siempre libre acceso a agua. El experimento propiamente dicho se realizó en el laboratorio convencional 2 del Centro de Producción y Experimentación Animal (CPEA) de la Universidad de Jaén, con condiciones estándar de luz (ciclo de 12 h comenzando a las 7:00), temperatura (20° C) y humedad (50%). El procedimiento experimental fue aprobado por el comité de Bioética de la Universidad de Jaén, y 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)

4.2. Aparatos

El estudio se llevó a cabo en las jaulas-hogar de los animales, 20 unidades de policarbonato con dimensiones de 30 cm x 15 cm x 30 cm (largo x ancho x alto). Las jaulas tenían una rejilla metálica cubriéndolas, donde se colocaban las botellas y la comida. El suelo se cubrió con serrín. (Anexo I)

Las botellas utilizadas para el consumo de agua tuvieron una capacidad de 500 ml, mientras que las empleadas para la prueba de preferencia fueron botellas de policarbonato de 150 ml, cubiertas con una boquilla metálica. Todos los animales fueron expuestos a dos botellas, una de las cuales estaba forrada con cinta aislante negra para proteger la solución del ansiolítico de la luz. Aunque los animales del grupo control recibieron dos botellas con agua, una de ellas también estuvo forrada de negro, para igualar las condiciones del grupo experimental respecto del modo de presentación de las soluciones que iban a beber. (Anexo II)

Para el cálculo de lo que habían bebido los animales, así como el pesaje de la comida diaria, se utilizó una báscula digital (Cobos, JT-300C, Barcelona, España). Para la medición de los miligramos utilizados en las soluciones que contenían el ansiolítico

(CDP) se utilizó una balanza de precisión (Cobos, Precisa 125A, Barcelona, España). Las ratas fueron pesadas diariamente con una báscula digital (Baxtram, Model BS3, Girona, España). (Anexo III)

4.3. Procedimiento

Como se ha comentado previamente, los animales fueron alojados en el CPEA, donde, tras pasar el correspondiente período de cuarentena, fueron sometidos al procedimiento experimental. Este comenzó pesando a los animales cada día e introduciendo el procedimiento de privación de comida, seguido cuatro días después por una fase de habituación a la prueba de preferencia que duró cuatro días. En esta fase los animales tuvieron acceso a dos botellas rellenas con agua durante un período de dos horas. Finalizada esta fase dio comienzo la fase en la que se llevó a cabo la prueba de preferencia propiamente dicha. En la misma los animales del grupo CDP tuvieron acceso a una botella (la negra) que contenía una solución con CDP, mientras que la otra botella (la transparente) contenía agua. Los animales del grupo W siguieron recibiendo las dos botellas con agua. Cada día se cambió el lugar de colocación de las botellas (derecha-izquierda), para evitar así efectos relacionados con preferencias por el lugar. La solución de CDP era preparada diariamente, así como las 40 botellas utilizadas en este estudio, que eran pesadas antes y después de realizar el test de preferencia, de manera tal que se pudiera obtener un registro (en ml) del consumo del animal relativo a cada botella. El peso diario de cada botella fue anotado en una tabla similar a la del anexo VI

Debido a que este estudio fue exploratorio y dirigido a identificar patrones de preferencia dependientes de la dosis, la exposición al CDP se realizó de forma creciente, comenzando con una dosis de 0.1 mg/kg hasta llegar a una dosis de 60 mg/kg (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.8, 2, 2.2, 2.4, 3, 4, 8, 16, 24, 36 y 60 mg/kg). Este aumento gradual se hizo cada dos días, promediando el consumo correspondiente a las sesiones en la cuales los sujetos recibieron una dosis similar. (Anexo IV)

Finalizada la prueba, las botellas fueron retiradas y pesadas, se obtuvieron los valores correspondientes a las variables dependientes de interés, se colocó la botella de 500 ml con agua, y se alimentó a todos los animales. Cada dos días se procedió a la limpieza de cada jaula hogar y al cambio de serrín. Este procedimiento se realizó cada día, entre las 9:00 y las 13:00, durante 40 días consecutivos (incluyendo la fase de habituación).

4.4 Fármacos

El fármaco ansiolítico utilizado en este estudio fue el clordiazepóxido (CDP, chlordiazepoxide hydrochloride, Sigma Aldrich, Madrid, Spain).(Anexo V) El volumen de presentación del fármaco fue de 12 ml (el vehículo fue agua del grifo). Este volumen se estableció en función de registros previos realizados en nuestro laboratorio en relación con la cantidad de líquido que suele beber un animal en un período de 2 h (Manzo et al., 2012), así como de los patrones de consumo oral de este fármaco obtenidos en estudios de automedicación (Manzo et al., 2015). La dosis administrada al animal se calculó en función del peso corporal medio de los animales participantes en el estudio (mg/kg).

4.5. Variables dependientes

Las variables dependientes registradas en este experimento fueron las siguientes: (1) consumo de agua; (2) consumo del fármaco (CDP en el grupo experimental; consumo de la botella negra en el grupo W); (3) consumo total (consumo del fármaco + consumo de agua); y (d) razón de preferencia (consumo de CDP (botella negra)/consumo total de líquidos).

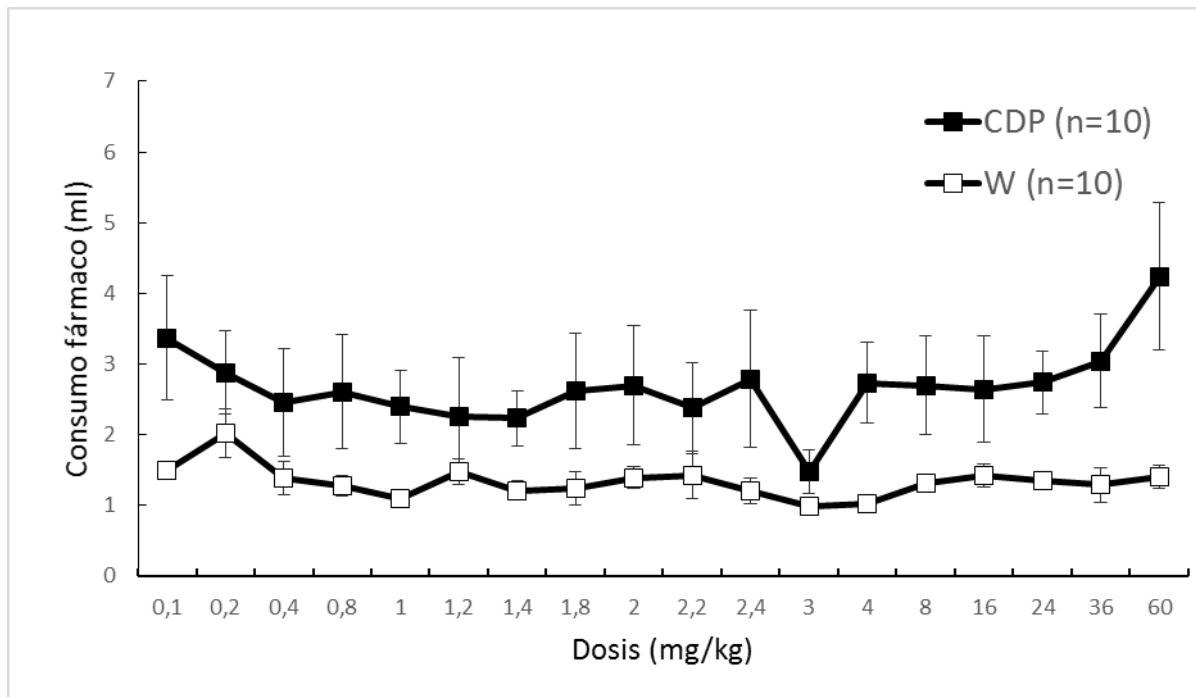
4.6. Análisis estadísticos

Los datos registrados para cada una de las variables dependientes fueron sometidos a un análisis de variancia con dos factores: grupo (CDP, W) y dosis (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.8, 2, 2.2, 2.4, 3, 4, 8, 16, 24, 36 y 60). Los datos correspondientes al consumo de las diferentes dosis se obtuvieron a partir del cálculo del promedio del consumo de las dos sesiones en las que los animales recibieron dicha dosis. Para todos los análisis estadísticos, el nivel de significación estadística se estableció en $p < 0.05$. Estos análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS (IBM SPSS Statistics v.20).

4.7. Resultados

Consumo del fármaco. La Figura 1 muestra el volumen de fármaco consumido por los grupos CDP y W (botella negra), dependiendo de las dosis utilizadas. Puede observarse que, a excepción de la dosis de 3 mg/kg, el grupo que recibió CDP consumió más de dicha solución que el expuesto a agua.

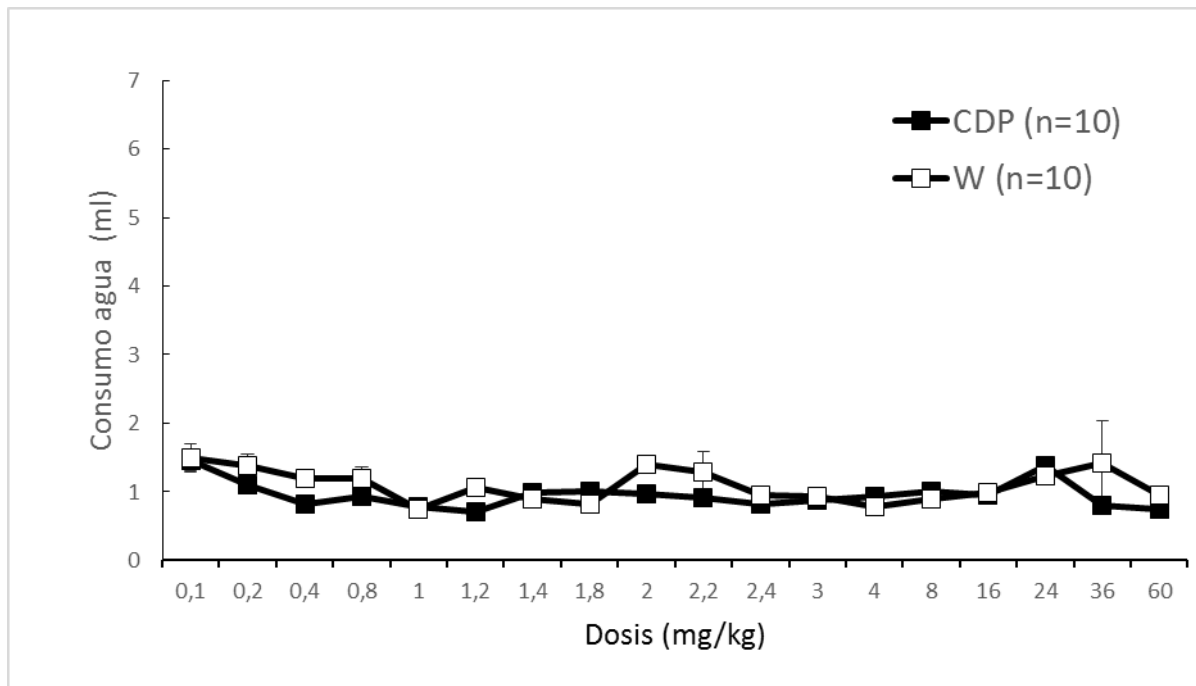
Figura 1



Los análisis estadísticos confirmaron esta suposición, dado que apareció un efecto significativo de la variable grupo, $F(1, 18) = 7,924$, $p < 0.011$, indicando que los grupos expuestos a CDP consumieron más del mismo que los que recibieron agua en la botella negra. Aunque la interacción entre esta variable y la dosis no fue significativa, el análisis de la misma parece indicar que las diferencias entre los grupos CDP y W aparecieron sobre todo con dosis muy bajas (0.1, 1 y 1.4 mg/kg) o muy altas (24, 36 y 60 mg/kg), lo que sugiere un patrón de dosis dependencia en forma de U.

Consumo de agua. Los datos correspondientes al consumo de agua aparecen representados en la Figura 2, que no parece indicar que hubiera diferencias entre los grupos.

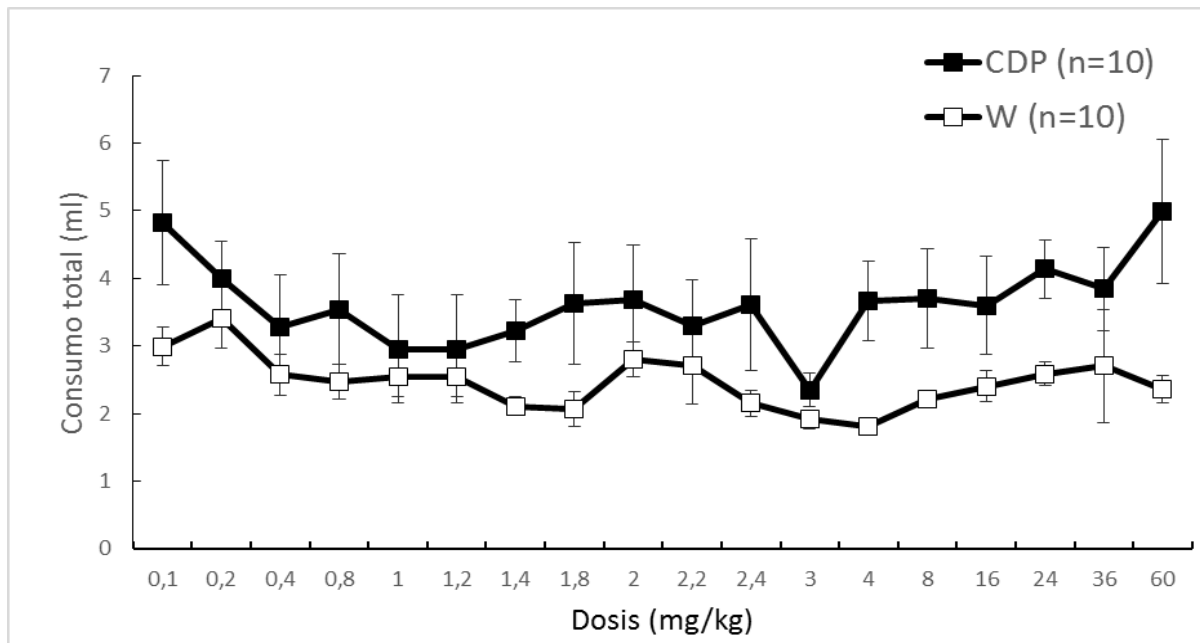
Figura 2



El análisis estadístico confirmó la ausencia de diferencias entre los grupos CDP y W con respecto a esta variable dependiente, $F(1, 18) = 2,342$, n.s., si bien se obtuvo un efecto de la variable dosis que sugiere que, con independencia de recibir o no CDP, el consumo de agua fue modificándose a lo largo de las sesiones, $F(17, 306) = 3,496$, $p < 0.0001$.

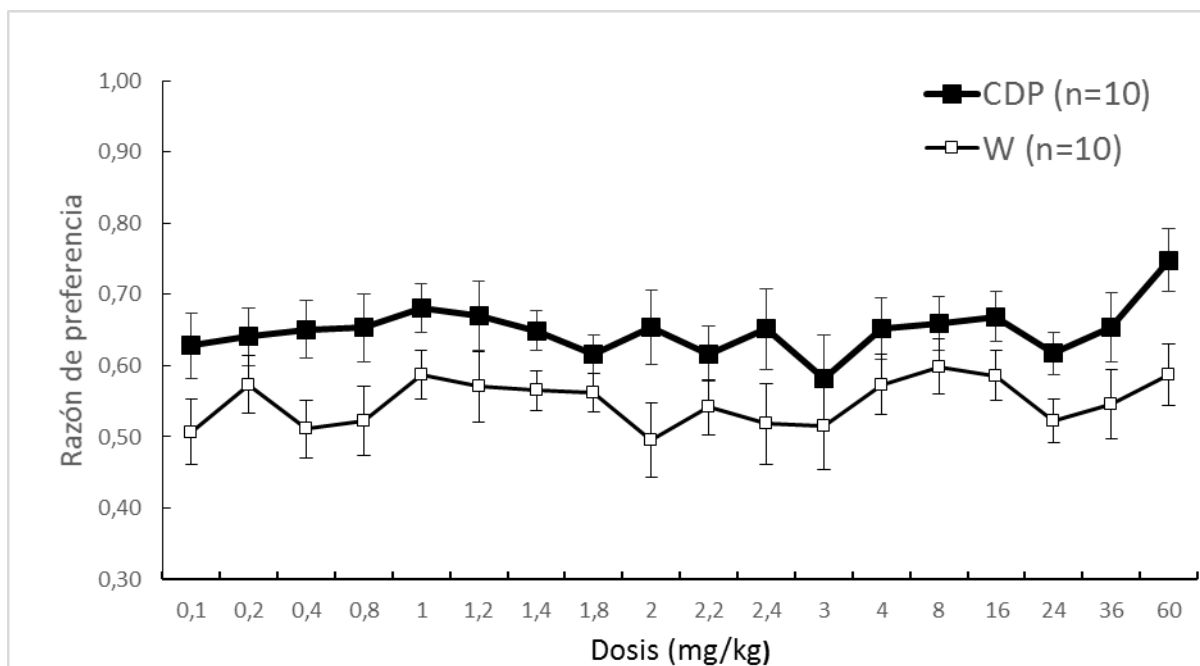
Consumo total. La Figura 3 muestra el volumen total de líquido consumido por los grupos expuestos al ansiolítico y a agua. Como puede observarse, el consumo total del grupo de CDP parece mayor que el consumo del grupo W, una suposición que fue confirmada por los análisis estadísticos, que mostraron un efecto de dosis, $F(17, 306) = 1.835$, $p < 0.023$ y de grupo, $F(1,18) = 4,679$, $p < 0.044$, pero no de interacción entre ambos.

Figura 3



Preferencia. La Figura 4 muestra los datos que corresponden a la preferencia por el CDP o por el agua contenida en la botella negra en el grupo W. Como puede observarse, los valores de preferencia parecen ser mayores en el grupo CDP que en el W, sin que estas diferencias parezcan estar afectadas por la dosis de CDP utilizada.

Figura 4



Los análisis estadísticos realizados con esta variable arrojaron un efecto significativo de la variable grupo, $F(1, 18) = 10,293$, $p < 0.005$, indicando que los animales expuestos al fármaco mostraron índices de preferencia superiores a los expuestos a agua. Ningún otro efecto principal ni interacción fue significativo. Si bien la interacción entre grupo y dosis no fue significativa, el análisis de la misma sugiere, al igual que con respecto a la variable consumo del fármaco, que fueron las dosis muy bajas y muy altas de CDP las que arrojaron diferencias con respecto al grupo W (0.1, 0.4, 0.8, 1 y 2; 16, 24 y 60 mg/kg).

5. DISCUSIÓN

Este TFG es un estudio exploratorio dirigido a analizar los patrones de consumo voluntario de CDP en ratas Wistar, con el objetivo de comprobar si los mismos están determinados por la dosis presentada. Para ello los animales tuvieron acceso cada día a este ansiolítico mediante un procedimiento de libre elección CDP-agua que duró dos horas. Se incluyeron animales que solo tuvieron acceso a agua durante las sesiones experimentales, para comprobar, mediante la comparación de ambos grupos, si los animales expuestos a CDP preferían este fármaco frente a agua, y si dicha preferencia dependía de la dosis. Los resultados indicaron que los sujetos que recibieron CDP mostraron un mayor consumo de la botella que lo contenía que de la botella de agua y un consumo superior al grupo control, un hallazgo que no estuvo influido por la dosis. Si bien este estudio fue exploratorio y no se estableció una predicción precisa sobre la influencia de la dosis en el consumo de CDP (dado que no hay estudios previos realizados con este rango de dosis), se esperaba encontrar que dosis muy bajas o muy altas redujeran el consumo en los animales, debido a la ausencia de efectos farmacológicos (en el caso de las dosis bajas) o la aparición de efectos aversivos o sedantes (en relación con las dosis elevadas). Por el contrario, se obtuvo una evidencia de que sólo las dosis muy bajas o muy altas promovieron un mayor consumo del fármaco, si bien el apoyo estadístico a esta afirmación fue parcial (al no obtenerse la interacción significativa entre los grupos y la dosis). Por tanto, aunque los resultados indican que el CDP es un fármaco por el que los animales muestran preferencia, no nos dan claves acerca de cuál es la dosis idónea a utilizar en futuros estudios, lo cual era el objetivo de este TFG.

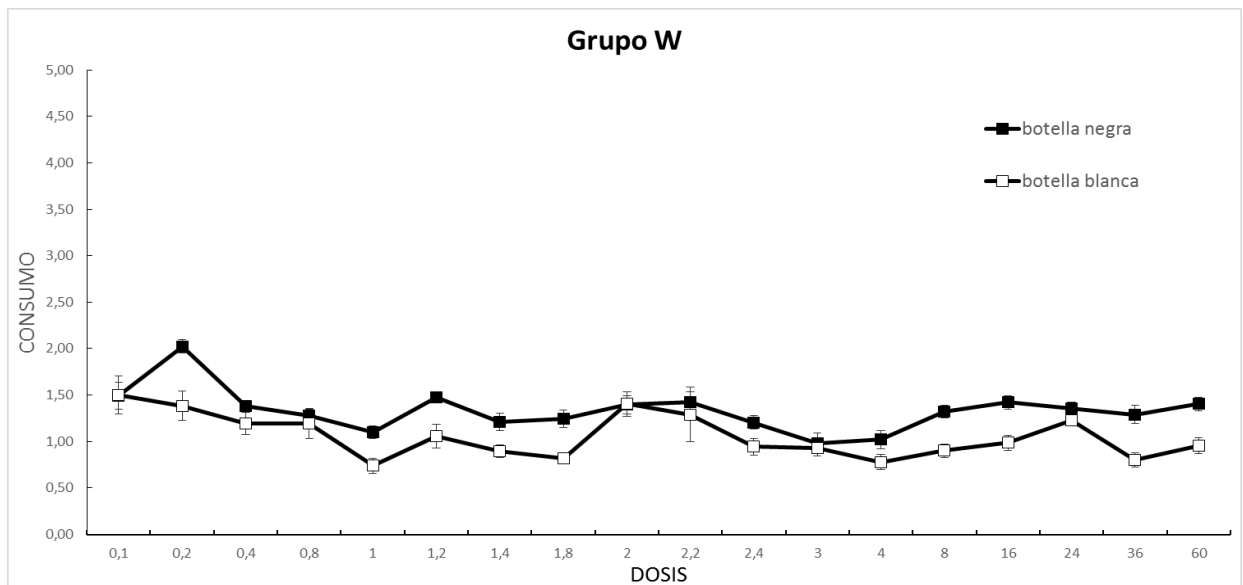
Como ya se ha comentado en el apartado anterior, no existen estudios previos que hayan utilizado esta benzodiacepina para su consumo de forma oral y voluntaria en

animales. Sólo se puede citar el trabajo de Manzo *et al.* (2015), quienes trabajaron con dosis de 1 mg/kg (mediante presentación gradual) en condiciones de automedicación inducida por frustración. Otros estudios no publicados también ponen de manifiesto inconsistencias relativas a los patrones de preferencia por esta sustancia que se obtienen en ratas Wistar. Por ejemplo, en estudios anteriores se han obtenido patrones de preferencia significativos con dosis que oscilaban entre 0,1 mg/kg y 1,4 mg/kg, sin que la conducta de los animales dependiera de la dosis suministrada (Ortega, 2016). Por el contrario, cuando el fármaco se presenta de forma intermitente (2 mg/kg) no se obtienen diferencias en el consumo entre los días en que el fármaco está disponible y los días en que se presenta agua. Por otro lado, en situaciones de automedicación inducida por frustración no siempre aumenta el consumo de CDP (2 mg/kg), un dato que contrasta con el aumento en el consumo de alcohol, que se obtiene de forma muy consistente. En su conjunto, estos resultados no permiten llegar a una conclusión precisa acerca de la preferencia por el consumo de CDP en ratas Wistar, y obligan a realizar estudios futuros que permitan ahondar en las causas responsables de estos resultados tan inconsistentes.

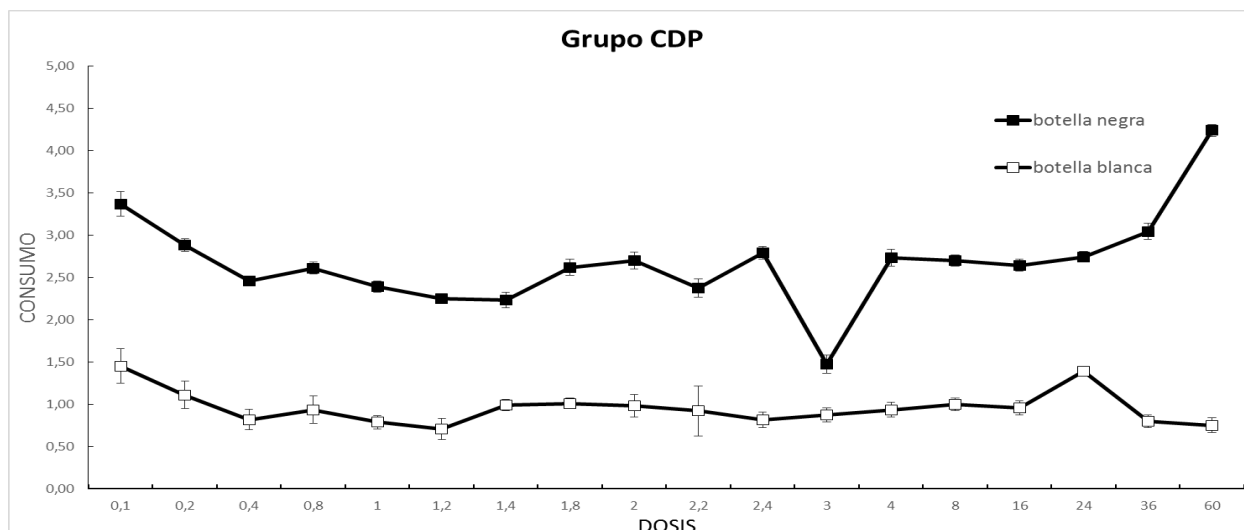
Varias podrían ser las variables extrañas responsable de los resultados obtenidos en este trabajo. La primera de ellas podría ser la palatabilidad, definida por la Real Academia de la Lengua Española como la cualidad de ser grato al paladar un alimento. La palatabilidad se estima a través de las respuestas aversivas y apetitivas que se obtienen en pruebas de reacción al sabor, lo que refleja de forma fiable la palatabilidad de la sustancia en estudio. En el caso del alcohol, por ejemplo, se ha comprobado que su palatabilidad está relacionada con el grado de familiaridad que tienen los sujetos con el mismo, observándose una reducción en las respuestas apetitivas sin afectación de las tasas de consumo en crías (Díaz-Cenzano y Chotro, 2010). Si bien el CDP no tiene contenido calórico, cabría la posibilidad de que tuviera un sabor o un olor distinguible por el animal que lo hiciera preferible frente a agua, y que dichos componentes ensombrecieran sus efectos farmacológicos, impidiendo ver un efecto dependiente de la dosis. En futuros estudios deberá analizarse esta cuestión realizando pruebas de reacción al sabor con CDP.

Ora variable que también podría ser relevante es el hecho de forrar con cinta aislante negra la botella que contenía el CDP. Observaciones no sistemáticas realizadas en el laboratorio han permitido apreciar que los animales tienen a morder la cinta, incluso en ocasiones llegan a destruirla y obligan a forrar las botellas otra vez. Esta

conducta puede ser reforzante en un roedor como la rata, lo que haría que los animales prefirieran esa botella con independencia de su contenido; de esta manera, esta preferencia podría “diluir conductualmente” la preferencia por CDP, haciéndola difícil de observar en relación con la dosis. Para averiguar si este factor es relevante hay que hacer tres comparaciones: (a) el consumo de las botellas transparente y negra en el grupo W; (b) su comparación con el consumo de las botellas transparente y negra en el grupo CDP; y (c) el consumo de la botella negra en ambos grupos (CDP y W). En el primer caso, se puede observar en la siguiente gráfica que los animales parecen beber más agua de la botella negra que de la transparente:



Por el contrario, en el grupo CDP las diferencias entre el consumo de ambas botellas fue mucho mayor, por lo que de nuevo se puede concluir que los animales detectaron la presencia de la droga en la botella negra. De hecho, la comparación entre las mismas arrojó diferencias significativas para todas las dosis utilizadas excepto la de 3 mg/kg:



Para averiguar si efectivamente los animales mostraron una preferencia por la botella negra se realizó un análisis estadístico incluyendo la variable “botella”, además de la dosis y el grupo, obteniéndose un efecto de botella, $F(1, 306) = 16,657$, $p < 0.001$, así como la interacción botella x grupo, $F(1, 306) = 9,422$, $p < 0.007$. Esta interacción sugiere que las diferencias entre el consumo de la botella negra y de la transparente dependieron de que la primera contuviera el fármaco o no, por lo que no se puede establecer una conclusión precisa acerca de la influencia del tipo de botella en este experimento. En este sentido, el hecho de que el grupo CDP consuma más de la botella negra que el grupo W (Figura 1) sugiere que los animales detectaron la presencia de la droga, cuyos efectos farmacológicos reforzantes podrían haberse sumado a los relacionados con la posibilidad de morder la cinta que cubría las botellas. En cualquier caso, en futuros trabajos se utilizarán botellas pintadas de negro para evitar la influencia de esta variable extraña en los resultados obtenidos.

Debido a la ausencia de estudios previos de consumo oral de CDP en animales, es difícil poner en relación los resultados obtenidos en este trabajo con la literatura especializada. Es sabido que, cuando se administra de forma sistémica (forzada), el CDP tiene un efecto ansiolítico dosis-dependiente en numerosas pruebas conductuales de ansiedad (véase por ejemplo Flaherty, 1996). Del mismo modo, estudios de consumo voluntario de etanol ponen de manifiesto que la preferencia por esta droga de abuso depende de la dosis, entre otras variables. Cabe citar en este sentido el trabajo realizado por Manzo *et al.* (2012), quienes observaron que mientras las ratas RHA-I prefieren dosis de alcohol al 2%, 4% y 6% frente a agua, la preferencia en las ratas RLA-I sólo aparece con la dosis del 2%. En ambas cepas las dosis de 8% y 10% fueron

rechazadas, con independencia de su presentación abrupta o gradual. Una influencia comparable de la dosis sería esperable encontrar en estudios que se realicen en un futuro con CDP, una vez que se identifiquen y controlen variables extrañas que puedan haber influido en los resultados obtenidos en este TFG.

En cualquier caso, no es tarde para mencionar nuevamente, y para finalizar, la importancia de los modelos animales de consumo voluntario para estudiar los comportamientos de adicción a las drogas, ya que con ellos se pueden estudiar fenómenos que aparecen en la conducta de los seres humanos. No obstante, aunque notables sus ventajas, no se puede ignorar el hecho de que el estudio de procesos psicológicos en un laboratorio se no ajusta perfectamente a la conducta humana, pero nos puede dar claves relevantes para comprenderla y, quizás, explicarla.

6. CONCLUSIONES

Gracias a la realización de TFG, he tenido la oportunidad de conocer en parte el modo de trabajo y algunas de las actividades que se realizan en laboratorios de psicología animal, así como observar la gran coordinación entre profesionales que requiere este trabajo para que resulte exitoso; lo cual, previo a la realización del mismo, me hacía bastante ilusión experimentar. Las actividades que he realizado me han parecido bastante entretenidas e interesantes, ya que me dejaron participar en muchas tareas como pesar botellas y anotarlo, pesar los pellets para cada animal en función al peso que tenían cada día y además, introducir algunos días los datos obtenidos de las mediciones en el ordenador del laboratorio para una vez llenada la tabla, realizar los análisis estadísticos, observando cada día la evolución de los animales y de la cantidad de agua y CDP consumida comentando los datos diariamente.

En resumen: la realización del experimento me ha ayudado a acercarme a la sacrificada labor profesional de los investigadores en un laboratorio que, aunque considero que es bastante laborioso, me ha abierto las puertas hacia el futuro en el sentido de que lo considero como una posible salida laboral de cara al futuro, ya que me ha resultado bastante gratificante.

Finalmente, hay que hacer nuevamente alusión a que el estudio realizado para este TFG pone de manifiesto la importancia de utilizar modelos animales a la hora de realizar avances científicos, como es éste, relacionado con la adicción a las drogas. Gracias a ellos, podemos avanzar a pasos agigantados en el estudio de los procesos

neurológicos en la adicción en humanos y, a raíz de ello, poder algún día superar ciertos obstáculos que a día de hoy constituyen grandes problemas. Considero que, en relación a nuestro trabajo, será un gran paso cuando gracias al avance de la ciencia, se consigan benzodiazepinas que sean tan específicas con los receptores a los que se acoplan que no tengan tanto potencial de adicción como ahora en el presente. Solventar este obstáculo se consideraría un gran avance tanto para la ciencia como para la sociedad.

Respecto a nuestro experimento, las hipótesis iniciales no se han cumplido como se esperaban en un principio, ya que se esperaba que los sujetos aumentasen su consumo gradualmente; comportamiento que ha resultado ser inconsistente durante el tiempo en el cual se realizó el experimento, manteniéndose independientemente de la dosis utilizada. Creemos firmemente que los resultados obtenidos se deben en gran parte a la presencia de variables extrañas. De esta forma, en el futuro sería conveniente que se replicase este experimento, o uno de características similares, pero solventando este sencillo problema que ha supuesto el fracaso del original para ver si así, finalmente se cumple la hipótesis inicial.

7. BIBLIOGRAFÍA

- American Psychiatric Association, (2013). DSM-V. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, 5th ed. Author, Washington, DC.
- Díaz-Cenzano, E. y Chotro, M. G. (2010). The effect of taste familiarity on intake and taste reactivity in infant rats. *Developmental psychobiology*, 52(2), 109-120.
- Fernández, A, González, A, & Peña, M. A. (2003). Bases científicas para el uso de las benzodiazepinas. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 19(1) Recuperado en 18 de mayo de 2017, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252003000100014&lng=es&tlng=es.
- Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus accumbens?. *Revista de Neurología*, 30 (9), 845-849.
- Flaherty, C. F. (1996). *Incentive relativity*. New York: Cambridge University Press.
- Gámez, M. e Irala, C. (1997). Selección de benzodiazepinas. Bases para su utilización en el hospital. *Farmacia Hospitalaria*, 2(1), 117-122.
- Green, A. S. y Grahame, N. J. (2008). Ethanol drinking in rodents: is free-choice drinking related to the reinforcing effects of ethanol? *Alcohol*, 42(1), 1-11.
- Guardia, J., Surkov, S. I. y Cardús, M. (2011). Bases neurobiológicas de la adicción. *Trastornos adictivos*, (pp. 27-36) [https://dependencias.pt/ficheiros/conteudos/files/d_pro_44_87\(1\).pdf#page=28](https://dependencias.pt/ficheiros/conteudos/files/d_pro_44_87(1).pdf#page=28)
- Kamenetzky, G. V. y Mustaca, A. E. (2005). Modelos Animales para el Estudio del Alcoholismo. *Terapia Psicológica*, 23(1), 65-72.
- Koob, F. G, Arends, M. A. y Le Moal, M. (2014). What is Addiction?. En F. G. Koob (Ed.), *Drugs, Addiction, and the Brain*, (pp. 1-27). San Diego: Academic Press.
- López-Muñoz, F., Alamo, C., Ucha-Udabe, R. y Cuenca, E. (2004). El papel histórico de los barbitúricos en las “curas de sueño” de los trastornos psicóticos y maníacos. *Psiquiatría Biológica*, 11(6), 242-251.
- Mahía, F. C. (2009). Alcohol y cerebro adolescente. *Adicciones*, 21(1), 09-14.
- 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.
- 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.
- Martinez Barrondo, S., Sáiz Martínez P.A y García-Portilla González, M. P. (2008). Trastornos de ansiedad en atención primaria. *Jano: medicina y humanidades*, 1714, 9-14.
- 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 (Mex)*, 16(1), 40-45.
- Navas Orozco, W., & Vargas Baldares, M. J., (2012). Trastornos de ansiedad: revisión dirigida para atención primaria. *Revista médica de costa rica y Centroamérica*, (604) 497-507.
- Nomura, K., Nakao, M., Sato, M. y Yano, E. (2006). Regular prescriptions for benzodiazepines: a cross-sectional study of outpatients at a university hospital. *Internal Medicine*, 45(22), 1279-1283.
- Observatorio nacional sobre drogas (2015). *Informe y estadísticas*. Ministerio de sanidad, servicios sociales e igualdad. Madrid.
- Ortega, J. (2016). *Consumo espontáneo de ansiolíticos y cafeína en ratas Wistar: un estudio preliminar*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Jaén.
- Parra, C. y Muñoz, D. (2009). Sedantes. *Manual de Analgesia y Sedación en Urgencias de Pediatría*. Sociedad Española de Urgencias de Pediatría. Madrid. (pp. 100-110.)
- Purves, D. A., Fitzpatrick, G. J., Hall, D., Lamantia, W. C., Mcnamara, A. S. y Williams, J. O.. (2007). *Neurociencia*. Madrid: Panamericana.

- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., & Ahmad, N. (2007). Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal*, 22(3), 659-661.
- 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.
- Spanagel, R. (2003). Alcohol addiction research: from animal models to clinics. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 17(4), 507-518.
- Tortella-Feliú, M. (2014). Los Trastornos de Ansiedad en el DSM-5. *Cuadernos de medicina psicosomática y psiquiatría de enlace*, (110), 62-69.

8. ANEXOS

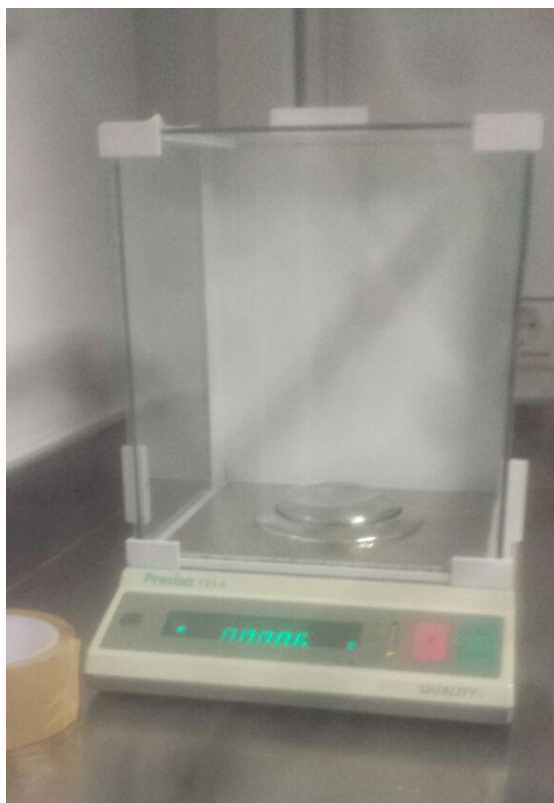
Anexo I: Jaulas-hogar.



Anexo II: Botellas.



Anexo III: Báscula para pesar el fármaco.



Anexo IV: Prueba de preferencia y el procedimiento que se utilizó cada día en el laboratorio.

LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES	SÁBADO	DOMINGO
	27	28	29 HABITUACIÓN 1	30 HABITUACIÓN 2	1 HABITUACIÓN 3	2 HABITUACIÓN 4
3 CDP 0.1mg/kg	4	5 CDP 0.2mg/kg	6	7 CDP 0.4mg/kg	8	9 CDP 0.8mg/kg
10	11 CDP 1mg/kg	12	13 CDP 1.2mg/kg	14	15 CDP 1.4mg/kg	16
17 CDP 1.4mg/kg	18	19 CDP 1.8mg/kg	20	21 CDP 2mg/kg	22	23 CDP 2.2mg/kg
24	25 CDP 2.4mg/kg	26	27 CDP 2.6mg/kg	28	29 CDP 2.8mg/kg	30
31 CDP 3mg/kg	1	2 CDP 4 mg/kg	3	4 CDP 8 mg/kg	5	6 CDP 16 mg/kg
7	8 CDP 24mg/kg	9	10 CDP 36mg/kg	11	12 CDP 60mg/kg	13

Procedimiento utilizado en cada sesión.

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. • PRUEBA DE PREFERENCIA. Las soluciones de CDP se prepararán diariamente mezclando la cantidad de agua del grifo y de CDP correspondientes. ○ Los animales del grupo de CDP/W recibirán las siguientes concentraciones (media del peso de los animales 345gr): • 0.1 mg/kg en 12 ml (03.10.16) □ 0.000345 mg de CDP en 120 ml de agua • 0.2 mg/kg en 12 ml (05.10.16) □ 0,00069 mg de CDP en 120 ml de agua • 0.4 mg/kg en 12 ml (07.10.16) □ 0,00138 mg de CDP en 120 ml de agua • 0.8 mg/kg en 12 ml (09.10.16) □ 0,00276 mg de CDP en 120 ml de agua • 1 mg/kg en 12 ml (11.10.16) □ 0,00345mg de CDP en 120 ml de agua • 1.2 mg/kg en 12 ml (13.10.16) □ 0,00414 mg de CDP en 120 ml de agua • 1.4 mg/kg en 12 ml (15.10.16) □ 0,00483 mg de CDP en 120 ml de agua • 1.8 mg/kg en 12 ml (17.10.16) □ 0,00621 mg de CDP en 120 ml de agua • 2 mg/kg en 12 ml (19.10.16) □ 0,0069 mg de CDP en 120 ml de agua • 2.2 mg/kg en 12 ml (21.10.16) □ 0,00759 mg de CDP en 120 ml de agua • 2.4 mg/kg en 12 ml (23.10.16) □ 0,00828 mg de CDP en 120 ml de agua • 2.6 mg/kg en 12 ml (25.10.16) □ 0,00897 mg de CDP en 120 ml de

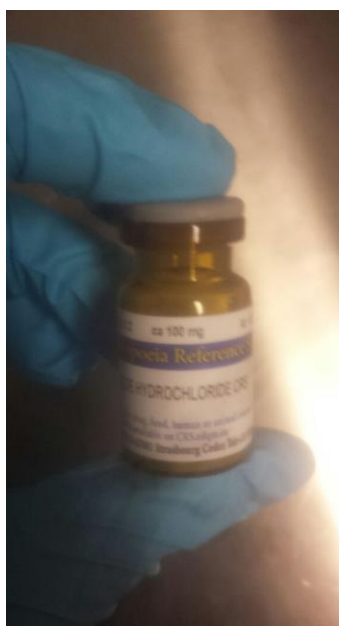
	agua • 2.8 mg/kg en 12 ml (27.10.16) □ 0,00966 mg de CDP en 120 ml de agua • 3 mg/kg en 12 ml (29.10.16) □ 0,01035 mg de CDP en 120 ml de agua • 3.2 mg/kg en 12 ml (31.10.16) □ 0,01104 mg de CDP en 120 ml de agua • 3.4 mg/kg en 12 ml (2.11.16) □ 0,01173 mg de CDP en 120 ml de agua • 3.6 mg/kg en 12 ml (04.11.16) □ 0,01242 mg de CDP en 120 ml de agua • 3.8 mg/kg en 12 ml (06.11.16) □ 0,01311 mg de CDP en 120 ml de agua • 4 mg/kg en 12 ml (08.11.16) □ 0,0138 mg de CDP en 120 ml de agua 1. 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>. 2. Las ratas del grupo de CDP/W serán marcadas en rojo. Las ratas del grupo W/W serán marcadas en azul. 3. Las botellas son numeradas con el número de cada animal, marcando en rojo la botella que contiene el CDP y en blanco la botella que contiene agua. Las botellas que contienen la droga deberán ser forradas de negro para proteger la solución de la luz. Para los dos grupos, habrá una botella forrada (CDP, W) y otra no (W). 4. La colocación de las botellas en la jaula hogar se cambiará diariamente para evitar preferencia por el lugar (también durante la habituación). Se tomarán diariamente medidas del peso del animal e ingesta de las dos botellas.
Habitución 1 29-09-2016	1. Se les retirará la botella grande a los animales y se pesarán. 2. Se prepararán las dos botellas con agua, se pesan, se retira la botella grande y se colocan en la jaula hogar de todos los animales durante dos horas. 3. 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 de la botella y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo (Excel). 4. 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

Habitación 2 30-09-2016	Igual que el día anterior. Se cambia el orden de las botellas con respecto al día anterior. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA
Habitación 3 01-10-2016	Igual que el día anterior. Se cambia el orden de las botellas con respecto al día anterior. BOTELLA NEGRA A LA DERECHA
Habitación 4 02-10-2016	Igual que el día anterior. Se cambia el orden de las botellas con respecto al día anterior. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA
Día 1 03-10-2016	1. Se les retirará la botella grande a los animales y se pesarán. 2. Se prepararán las soluciones de CDP. La botella roja contendrá la solución de CDP (0.1 mg/kg). La blanca continuará con agua. 3. 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 de la botella y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo (Excel). 4. 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 2 04-10-2016	Igual que el día anterior. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA
Día 3 05-10-2016	1. Se les retirará la botella grande a los animales y se pesarán. 2. Se prepararán las soluciones de CDP. La botella roja contendrá la solución de CDP (0.1 mg/kg). La blanca continuará con agua. 3. 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 de la botella y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo (Excel). 4. 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 06-10-2016	Igual que día anterior. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA
Día 5 07-10-2016	1. Se les retirará la botella grande a los animales y se pesarán. 2. Se prepararán las soluciones de CDP. La botella roja contendrá la solución de CDP (0.2 mg/kg). La blanca continuará con agua. 3. 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 de la botella y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo (Excel). 4. 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 6 08-10-2016	Igual que el día anterior. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA
Día 7 09-10-2016	1. Se les retirará la botella grande a los animales y se pesarán. 2. Se prepararán las soluciones de CDP. La botella roja contendrá la solución de CDP (0.4 mg/kg). La blanca continuará con agua. 3. 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 de la botella y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo (Excel). 4. 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 8 10-10-2016	Igual que el día anterior. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA
Día 9 11-10-2016	1. Se les retirará la botella grande a los animales y se pesarán. 2. Se prepararán las soluciones de CDP. La botella roja contendrá la solución de CDP (0.8 mg/kg). La blanca continuará con agua. 3. 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 de la botella y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo (Excel). 4. 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 10 12-10-2016	Igual que el día anterior. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA
Día 11 13-10-2016	1. Se les retirará la botella grande a los animales y se pesarán. 2. Se prepararán las soluciones de CDP. La botella roja contendrá la solución de CDP (1 mg/kg). La blanca continuará con agua. 3. 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 de la botella y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo (Excel). 4. 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 12 14-10 2016	Igual que el día anterior. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA

Día 13 15-10-2016	1. Se les retirará la botella grande a los animales y se pesarán. 2. Se prepararán las soluciones de CDP. La botella roja contendrá la solución de CDP (1.2 mg/kg). La blanca continuará con agua. 3. 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 de la botella y se resta del peso inicial de las botellas para calcular el consumo (Excel). 4. 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 14 16-10-2016	Igual que el día anterior. BOTELLA NEGRA A LA IZQUIERDA
...	... El resto de días se irá incrementando la dosis cada dos días y se alternará la botella negra de sitio

Anexo V: CDP.



Anexo VI: Tabla del registro diario del peso de las botellas/consumo.

FECHA: _____ **DÍA DE EXPERIMENTO:** _____

Grupo	Rata	Peso Agua	Peso Fármaco	Hora	2 Horas	
					Agua	Fármaco
CDP Rojo	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	8					
	9					
	10					
Water (W) Azul	11					
	12					
	13					
	14					
	15					
	16					
	17					
	18					
	19					
	20					
	21					
	22					