

## FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

# Modificación de la conducta adictiva mediante la aplicación de estímulos inhibitorios en un modelo animal de autoadministración operante de alcohol

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2015

**Autor: Adrián Viudez Martínez**

Modalidad: Experimental

Tutor/es: María Salud García Gutiérrez y Jorge Manzanares Robles



ÍNDICE

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen.....	4
Antecedentes .....	6
Objetivos .....	11
Materiales y métodos .....	13
Análisis estadísticos .....	21
Resultados .....	22
Discusión.....	29
Conclusiones.....	32
Bibliografía .....	34





## RESUMEN

Los trastornos por consumo problemático de alcohol (abuso y dependencia) suponen un serio problema socio-sanitario y económico en la sociedad actual. La limitada eficacia de las terapias empleadas en el tratamiento de estas patologías hace necesario hallar nuevas dianas terapéuticas que solas o combinadas con las ya existentes supongan una mejoría en el abordaje terapéutico de los pacientes con trastornos por consumo problemático de alcohol.

En la actualidad, las adicciones se han relacionado con alteraciones en los patrones de activación cerebral, siendo el deterioro en la conducta inhibitoria un factor de riesgo para el desarrollo de trastornos por consumo problemático de alcohol.

El principal objetivo de este estudio es evaluar la eficacia de la modulación de la conducta inhibitoria en el tratamiento de la dependencia alcohólica. Para ello se evaluó 1) la eficacia de la modulación de la conducta disuasoria en la reducción del consumo de alcohol en la prueba de autoadministración oral de etanol (AOE) en ratones machos C57BL/6J y, 2) la eficacia de la modulación de la conducta inhibitoria (procedimiento de actualización-extinción-reconsolidación) en la recaída después de la AOE en ratones machos C57BL/6J.

La modulación de la conducta aversiva (asociación de estimulación eléctrica de baja intensidad (0.1 mA, 2 segundos) con activación de la palanca activa) reduce la motivación (número de veces que los ratones presionan la palanca activa) y el consumo de ratones expuestos a AOE. Asimismo, el procedimiento de actualización-extinción/reconsolidación presenta una tendencia a reducir las recaídas en ratones expuestos a AOE. Conjuntamente, estos resultados sugieren que la modulación de los procesos inhibitorios podría ser útil como herramienta terapéutica en el tratamiento de la dependencia alcohólica.



## ANTECEDENTES

Los trastornos por consumo problemático de alcohol (abuso y dependencia) constituyen un importante problema en la sociedad actual, siendo la tercera causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial<sup>[1]</sup>. Este consumo problemático causa múltiples problemas médicos, psicológicos, personales y sociales, que se asocian con un elevado coste socio-sanitario<sup>[2]</sup>.

Actualmente se dispone de dos tipos de herramientas terapéuticas para el manejo del alcoholismo, éstas se basan en el empleo de diversos fármacos y en la asociación de terapias cognitivo-conductuales que ayudan al paciente a reducir y finalmente cesar el consumo de alcohol, y además evitar que se produzcan recaídas. Dentro de las estrategias farmacoterapéuticas empleadas normalmente en las Unidades de Conductas Adictivas (UCAs) se pueden distinguir tres tipos de fármacos: 1) aquéllos (disulfiram) que producen un efecto aversivo cuando el paciente consume alcohol por interferir en su metabolismo y producir efectos desagradables; 2) fármacos que disminuyen el deseo o ansia de consumo como la naltrexona, cuyo mecanismo de acción es bloquear receptores de tipo  $\mu$ -opioide a nivel del sistema mesocorticolímbico que participan en la producción del efecto reforzante del alcohol a nivel cerebral<sup>[3, 4]</sup>, y 3) fármacos que disminuyen el nivel de impulsividad entre los que destaca el anticonvulsivante topiramato cuyo mecanismo de acción no se conoce aun totalmente aunque se ha propuesto que estaría relacionado con un aumento de la neurotransmisión gabaérgica y una disminución de la glutamatérgica<sup>[5]</sup>

Además del tratamiento farmacológico, es importante asociar una terapia cognitivo-conductual que se centra en la asistencia por parte del paciente a reuniones de grupos de autoayuda, y en visitas periódicas al clínico responsable (psiquiatra o psicólogo).

Uno de los principales inconvenientes del abordaje terapéutico de los pacientes alcohólicos es la limitada eficacia de los tratamientos disponibles en la prevención de las recaídas, pues la gran mayoría de los pacientes dependientes de alcohol recaen en los primeros meses de tratamiento<sup>[6]</sup>. Existen múltiples factores que contribuyen a esta limitada eficacia entre los que destacan la elevada variedad fenotípica de los pacientes y la incompleta caracterización de las alteraciones neurobiológicas que subyacen a la elevada vulnerabilidad por la dependencia alcohólica. Consecuentemente, se hace

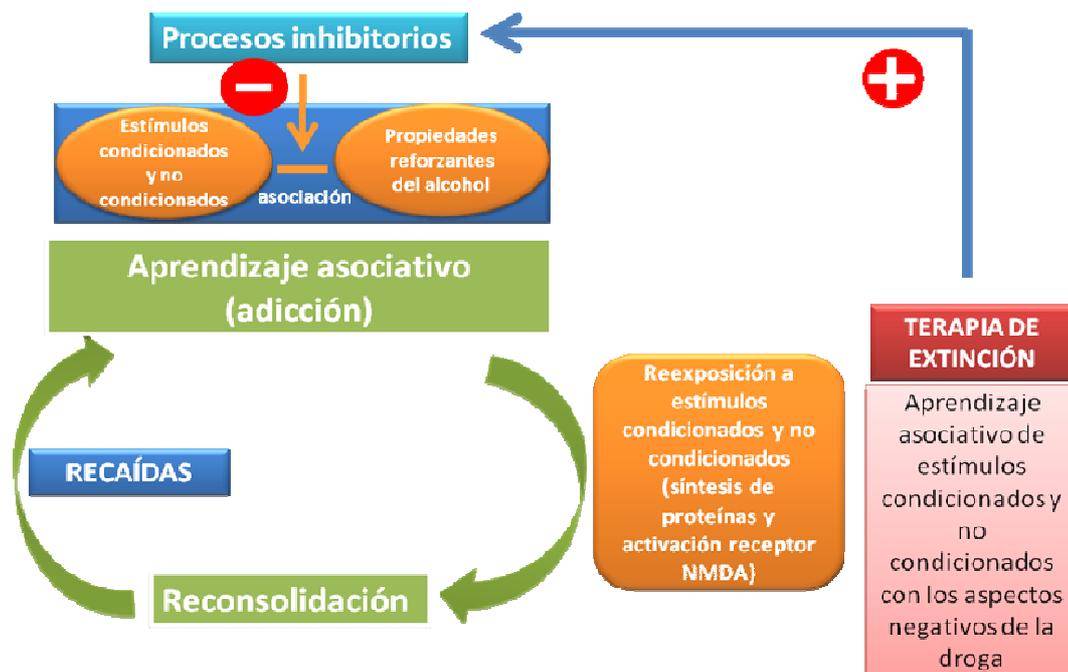
necesario explorar otras alternativas terapéuticas que, por sí mismas o combinadas con las ya existentes, supongan una mejoría en el tratamiento y contribuyan a la caracterización de las alteraciones neuroquímicas de la dependencia alcohólica.

Recientemente, las adicciones se han relacionado con alteraciones en los patrones de activación cerebral. En este sentido, déficits en los procesos de inhibición conductual en determinadas regiones cerebrales, como la corteza prefrontal dorsolateral, se han asociado con el deseo irrefrenable de consumo de alcohol característico de los pacientes con dependencia por esta sustancia y por lo tanto, con un mayor aumento de recaídas durante el periodo de abstinencia<sup>[7]</sup>. Cabe destacar que un deterioro en la conducta inhibitoria constituye un factor de riesgo para el desarrollo de trastornos por consumo problemático de alcohol. Asimismo, el propio consumo crónico de alcohol, induce alteraciones en el control de los procesos inhibitorios. Por ello, la potenciación de los procesos de inhibición conductual podría resultar útil en reducir el consumo de alcohol y evitar las recaídas. De hecho, la mayoría de las terapias cognitivo-conductuales que han demostrado cierta eficacia en el manejo del paciente con dependencia alcohólica mejoran la capacidad de inhibición conductual hacia los estímulos asociados al alcohol<sup>[8]</sup>.

Con el objetivo de explorar la potencial utilidad terapéutica de la mejoría de la conducta inhibitoria, en este estudio se han planteado dos tipos de modelos de modificación conductual:

- 1) Inducción de la conducta disuasoria utilizando un estímulo aversivo (estimulación eléctrica) para inhibir la motivación aprendida en el modelo de autoadministración oral de alcohol. La aplicación de una descarga eléctrica de baja intensidad (0.1 mA, 2 segundos) cuando el ratón presiona la palanca activa, con la que ya se ha motivado previamente, podría reducir el consumo de alcohol. Los cambios producidos en el cerebro asociados a la disminución del consumo de alcohol mediante el uso de la aplicación de esta metodología conductual no se conocen todavía.
- 2) Potenciación de los mecanismos que mejoran los procesos inhibitorios. La adicción alcohólica, se considera un proceso de aprendizaje en el que el sujeto aprende a relacionar una serie de estímulos condicionados y no condicionados con las propiedades reforzantes del alcohol. El consumo

persistente de alcohol implica fenómenos de reconsolidación de este aprendizaje<sup>[9, 10]</sup>. En cada exposición a los estímulos condicionados se produce una reactivación de la memoria (actualización) y posteriormente una reconsolidación de la misma, que contribuye a reforzar la conducta adictiva. Tras la reactivación de la memoria se produce un periodo de desestabilización de la misma en el que se activan fenómenos de potenciación a largo plazo susceptibles de ser modificados. Investigaciones recientes han demostrado que sería posible mejorar la eficacia de las actuales terapias cognitivo-conductuales (procedimiento de extinción) si cada sesión va precedida de una breve sesión en la que el paciente es expuesto a estímulos condicionados por el alcohol (procedimiento de actualización-reconsolidación) <sup>[11]</sup>. La exposición a los estímulos condicionados por el alcohol produciría una reactivación de la memoria que desencadenaría una serie de procesos de potenciación a largo plazo (síntesis de proteínas) encaminados a reconsolidar esta memoria. Si las sesiones de extinción (terapias cognitivo-conductuales en las que se refuerza la conducta inhibitoria) se desarrollan durante este periodo ventana se podría mejorar la eficacia de dichas terapias. Este abordaje se basa en la idea de sustituir un aprendizaje (asociación estímulos condicionados con propiedades reforzantes del alcohol) por otro<sup>[12]</sup> (asociación de estímulos condicionados con las consecuencias negativas del consumo de alcohol) (Figura 1).



**Figura 1.** Relación entre procesos inhibitorios, aprendizaje asociativo y extinción.

La utilización de este procedimiento para tratar los trastornos por uso de sustancias se basa en la eficacia que ha demostrado en suprimir las recaídas en roedores y en humanos<sup>[11]</sup>. Estudios preliminares sugieren que este método reduce el número de recaídas inducidas por el contexto en un modelo animal de alcohol<sup>[13]</sup>. Para comprobar la efectividad de este procedimiento experimental, se evaluó la eficacia del proceso de actualización-extinción/reconsolidación en prevenir las recaídas en la prueba de autoadministración oral de etanol en roedores. Previamente a las sesiones de extinción, los ratones serán expuestos a una sesión de actualización, que consistirá en la exposición del roedor a la caja de autoadministración durante 10 minutos. Transcurridos 70 minutos los ratones recibirán la sesión correspondiente de extinción.

Estos estudios permitirán evaluar la potencial utilidad terapéutica de la modulación de la conducta inhibitoria en la dependencia alcohólica. Además, la realización paralela de estudios neuroquímicos permitirá caracterizar los cambios neuroplásticos que subyacen, lo que ayudará a poder identificar nuevas potenciales dianas terapéuticas en el tratamiento de los trastornos por consumo problemático de alcohol.



OBJETIVOS

### **Objetivo general**

Evaluar la eficacia de la modulación de la conducta disuasoria/inhibitoria en el tratamiento de la dependencia alcohólica.

### **Objetivos específicos**

- 1) Evaluar la eficacia de la modulación de la conducta disuasoria en la reducción del consumo de alcohol en la prueba de autoadministración oral de etanol en ratones.
- 2) Evaluar la eficacia de la modulación de la conducta inhibitoria (procedimiento de actualización-extinción/reconsolidación) en la recaída en la autoadministración oral de etanol en ratones.





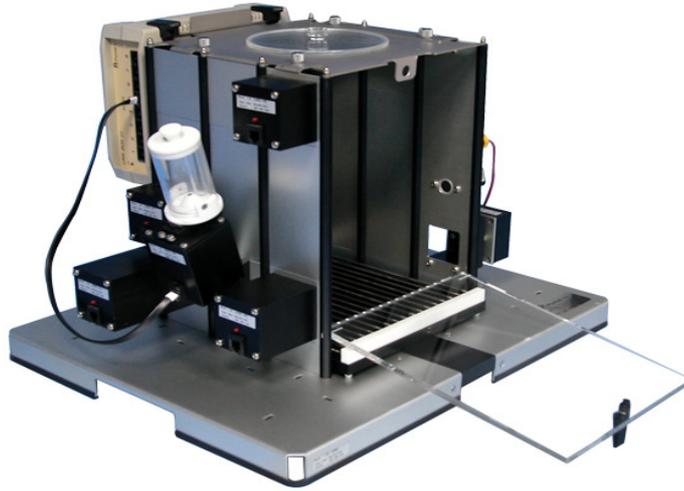
## MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Ratones

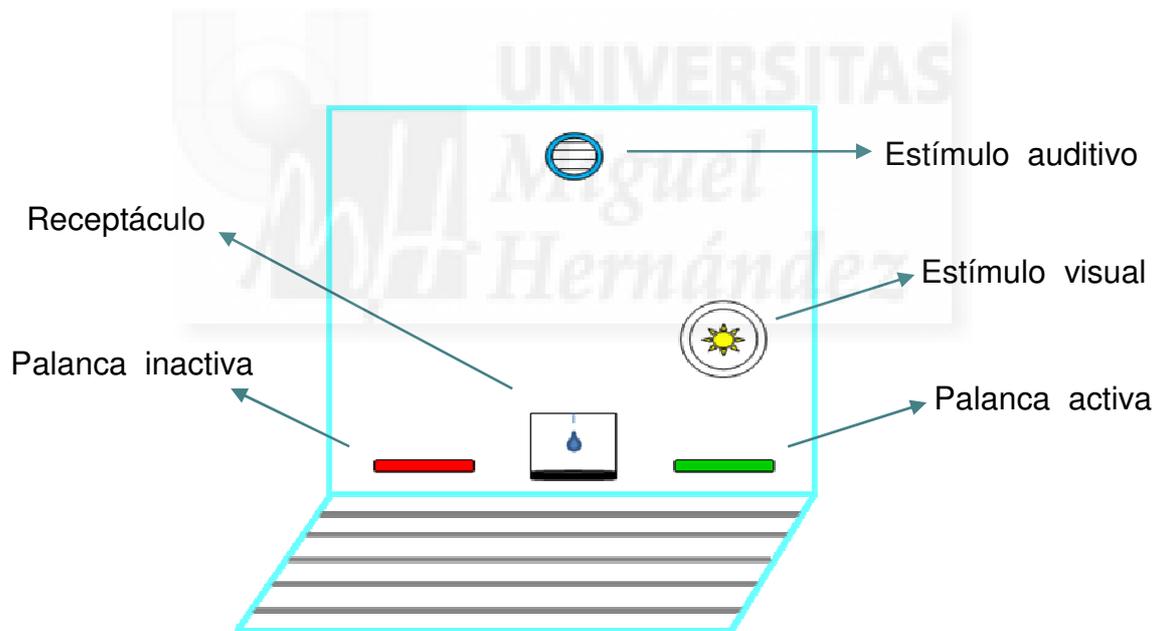
Se utilizaron ratones machos adultos de 6 semanas de edad de la cepa C57BL/6J por su elevada vulnerabilidad hacia el consumo de etanol, que se obtuvieron de los laboratorios Harlan (Barcelona, España). Los animales se estabularon en el animalario del campus de San Juan de Alicante de la Universidad Miguel Hernández donde se controló la temperatura ( $21 \pm 1$  °C), la humedad ( $65 \pm 10\%$ ) y el ciclo de luz-oscuridad (8:00h a 20:00h luces encendidas). Las pruebas de conducta y el cuidado de los animales se llevó a cabo cumpliendo los aspectos éticos recogidos en el Real Decreto 53/2013 de 8 de febrero (BOE-A-2013-1337), y siendo previamente aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Miguel Hernández.

## 2. Autoadministración oral de etanol (AOE)

El condicionamiento operante es uno de los paradigmas más utilizados en experimentación animal para evaluar las acciones reforzantes y la motivación por el consumo de drogas de abuso<sup>[14]</sup>. Su principal ventaja radica en que el animal ha de realizar un esfuerzo voluntario para conseguir la droga<sup>[15]</sup>. En el presente estudio se utilizaron 12 cajas modulares o “cajas Skinner” (*ver figura 2*) (Panlab, Barcelona, España) contenidas en habitáculos insonorizados y equipadas con una luz para iluminar la estancia, dos palancas (una de ellas retráctil), una luz (estímulo visual), un emisor de sonido y un receptáculo con dispensador de soluciones líquidas conectado a una bomba de infusión de alta precisión (motor de 3,33 rpm; infusión de 0,36 ml tras 2 segundos de activación) (*ver figura 3*). Las palancas retráctiles estaban colocadas de forma alterna (6 a la izquierda y 6 a la derecha) para evitar un sesgo de preferencia de lugar. El funcionamiento de las cajas estuvo controlado mediante ordenador con el programa Packwin 1.2.14 RS (Panlab, Barcelona, España) que monitorizó la conducta del roedor de forma que se pudo conocer con exactitud el número de veces que el animal presionaba cada una de las palancas en las diferentes fases de la prueba.



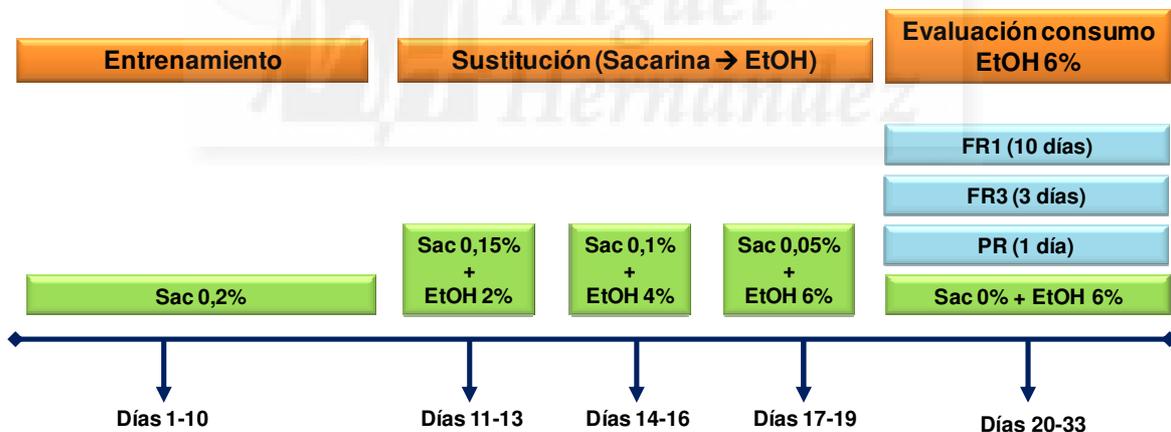
**Figura 2.** Caja Skinner



**Figura 3.** Dibujo explicativo de la caja de Skinner

El inicio y finalización de cada sesión de 60 min viene marcado por la salida y retracción de la palanca activa, respectivamente. En primer lugar se comienza con el período ITI (intervalo entre ensayos), momento en el que el animal puede activar cualquiera de las dos palancas. La activación de la palanca activa durante este periodo, denominada respuesta efectiva, activa la luz de estímulo (0,5 s) y el emisor de sonido (0,5s, 2850 Hz y 85 dB), y acciona la liberación de 36  $\mu$ l de solución por parte de la bomba de infusión, dando lugar finalmente a un período de espera de 6 segundos. Durante este período se registran las activaciones de ambas palancas pero no tienen consecuencia alguna. Tras el tiempo de espera, el sistema vuelve al ITI. Por el contrario, la activación de la palanca inactiva no tiene ninguna consecuencia. En el caso de que el ratón no responda durante un período superior a 10 minutos durante las sesiones de la fase de entrenamiento, el sistema libera de forma automática un refuerzo para estimular la respuesta del animal.

El procedimiento de autoadministración se realiza en varias fases tal y como se detalla en el siguiente esquema:



**Figura 4.** Diagrama temporal de la autoadministración oral de alcohol.

Fase de entrenamiento (días 1-10): para que los ratones estén motivados y accionen la palanca activa, durante los 2 días previos los ratones sólo tienen acceso a la comida durante 1 h cada día. También se restringe el acceso al agua 24 h antes de la primera sesión.

Una vez transcurridos estos dos días, se inicia la primera parte de la fase de entrenamiento (días 1-5), en la cual el ratón puede comer durante 1 h antes de la sesión, sin tener acceso al biberón. Con este protocolo postprandial se consigue que el animal entre en la caja con sed y tenga una alta motivación hacia la consecución de refuerzos líquidos (solución de sacarina 0,2%, porcentaje expresado en peso/volumen). Tras la finalización de la prueba se coloca el biberón de agua hasta el día siguiente.

En una segunda parte del entrenamiento (días 6-10), el ratón tiene acceso ad libitum al agua y continúa la restricción de comida teniendo acceso a ésta durante 1 hora después de la prueba. Este otro protocolo preprandial tiene como finalidad que el ratón accione la palanca porque lo asocie a un refuerzo positivo no relacionado con su nivel de hidratación.

La fase de entrenamiento se realiza hasta alcanzar los criterios de aprendizaje que se detallan a continuación:

- 1) preferencia por la palanca activa igual o superior al 70%,
- 2) consecución de al menos 10 refuerzos en cada sesión, y
- 3) desviación en el número de respuestas durante los 3 últimos días igual o inferior a un 30%.

Una vez alcanzados estos criterios, los ratones pasaron a la siguiente fase del experimento:

Fase de sustitución (días 11-19): cada tres días y durante un total de nueve, se va disminuyendo la concentración de sacarina (de 0,15% a 0,05%), y aumentando la de etanol (de 2% a 6% p/v). Los tres primeros días de la fase de sustitución, la solución administrada contiene sacarina 0,15% y etanol 2%, los tres siguientes, la solución contiene sacarina 0,1% y etanol 4%, y los tres últimos, la solución contiene sacarina 0,05% y etanol 6%.

Fase de razón fija 1 (FR1) (días 20-29): después del proceso de sustitución de sacarina por etanol, el animal se auto-administra durante un total de 5 días

la solución de etanol al 6%. Al igual que en las fases previas, un accionamiento de la palanca activa da lugar a un refuerzo (FR1).

Fase de razón fija 3 (FR3) (días 30-32): después de la fase FR1, todos los ratones pasan a la fase FR3 (5 días) en la que tienen que presionar 3 veces la palanca activa para conseguir un refuerzo.

Fase de razón progresiva (PR) (día 33): tras las fases de razón fija, se evalúa la motivación del animal hacia la consecución de la solución de etanol 6%. Para ello se aplica un incremento gradual del número de activaciones necesario para conseguir un refuerzo siguiendo esta progresión: 1-2-3-5-12-18-27-40-60-90-135-200-300-450-675-1000. En esta fase la duración de cada sesión es de 2 horas y se evalúa el punto de corte que alcanza cada ratón, que equivale al número de veces que es capaz de accionar la palanca de forma consecutiva para conseguir un refuerzo (ver figura 5).

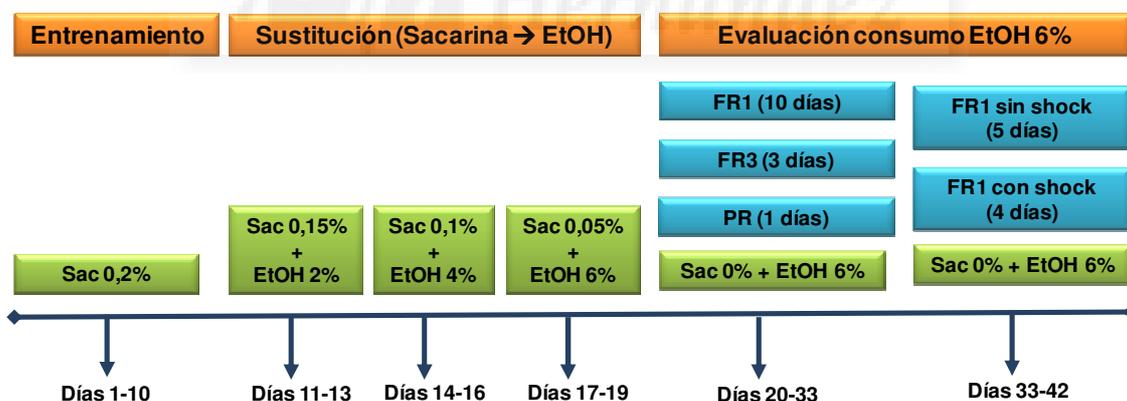
Respuestas efectivas	PR asignado	Nº refuerzos conseguidos
1 a 2	PR1	1
3 a 5	PR2	2
6 a 10	PR3	3
11 a 22	PR5	4
23 a 40	PR12	5
41 a 67	PR18	6
68 a 107	PR27	7
108 a 167	PR40	8
168 a 257	PR 60	9
258 a 392	PR 90	10
393	PR 135	11

**Figura 5.** Equivalencias de la fase PR.

Criterios de selección: una vez realizadas las fases necesarias del paradigma de autoadministración oral de alcohol, se pueden seleccionar los sujetos necesarios para el pertinente experimento, siempre y cuando tenga un número de respuestas activas superior o igual a 20, así como un consumo superior o igual a 500 µl.

### 3. Terapia disuasoria/inhibitoria

La asociación de estímulos negativos relacionados con el consumo de alcohol es una de las aproximaciones psicoterapéuticas para el manejo de pacientes que se encuentran en tratamiento de deshabituación. El objetivo principal es modular los procesos inhibitorios relacionados con la motivación por el consumo de alcohol [8]. Para poder modelizar este paradigma y que tenga la mayor capacidad traslacional posible, se realizará un procedimiento de AOE como el descrito anteriormente, con la peculiaridad de que una vez terminada la fase de razón progresiva (PR), se volverá a una fase FR1 sin shock disuasorio durante 5 días, seguida de una fase FR1 con shock disuasorio durante otros 4 días, estos estímulos eléctricos serán de baja intensidad (0,1 mA, 2s) tras la pulsación de la palanca activa en la autoadministración oral de alcohol durante la última fase FR1 (Figura 6). Para ello se utilizarán estimuladores eléctricos conectados a las rejillas de las cajas modulares y controlados por el programa informático Packwin. El objetivo es asociar la búsqueda del alcohol con un estímulo disuasorio que dé lugar a una respuesta aversiva leve, sin llegar a producir que el ratón expuesto salte o vocalice.



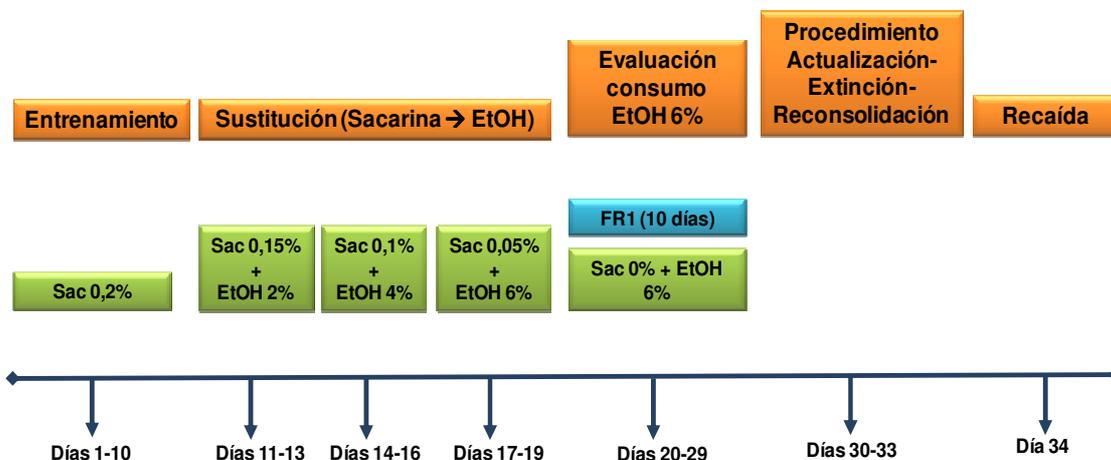
**Figura 6.** Diagrama temporal de la autoadministración oral de alcohol seguida de la terapia disuasoria/inhibitoria.

#### 4. Procedimiento de actualización- extinción/reconsolidación

Con el objetivo de modular la conducta inhibitoria para evitar la recaída en el consumo de alcohol, se utilizará el protocolo de extinción descrito por Xue y cols. (2012)<sup>[11]</sup> en el paradigma de la AOE.

Los ratones son expuestos al paradigma AOE siguiendo el esquema descrito previamente. Este procedimiento se lleva a cabo en una caja modular “A” hasta que se alcanza un consumo estable de alcohol en FR1. Una vez conseguido dicho objetivo, comenzará la fase de extinción que se realizará en una caja modular “B”, que difiere de la caja “A” en la textura y/o color del suelo y de las paredes, entre otros. Durante los 4 días que dura la extinción, el accionamiento de la palanca activa libera agua favoreciendo que el animal deje de buscar dicha droga (Figura 7). Antes de iniciar esta fase de extinción y como ya se ha descrito brevemente con anterioridad, los ratones se dividen en dos grupos según vayan a ser sometidos al procedimiento de extinción o no:

- **Grupo 1:** 10 minutos de exposición en la caja modular B (actualización), seguido de 70 minutos en los que los ratones son devueltos a su jaula (reconsolidación), y después 50 minutos de extinción también en la caja modular B.
- **Grupo 2:** 60 minutos de extinción en la caja modular B. Tras los 4 días de extinción, se evalúa la recaída en la caja modular A ante la exposición a estímulos relacionados con el alcohol (entre estos las características ambientales de la caja A junto con los estímulos auditivos/visuales que se asociaron a la liberación de alcohol).



**Figura 7.** Diagrama temporal de la autoadministración oral de alcohol seguida del procedimiento de actualización-extinción-reconsolidación.

## **5. Análisis estadístico**

Se realizarán mediante el programa informatizado Sigmaplot 11, utilizando el test de la t de Student cuando se comparen dos grupos, o ANOVA de una o de dos vías seguido del test Student-Newman-Keul cuando se comparen tres o más grupos. Las diferencias se considerarán significativas cuando la probabilidad de error sea menor del 5%.



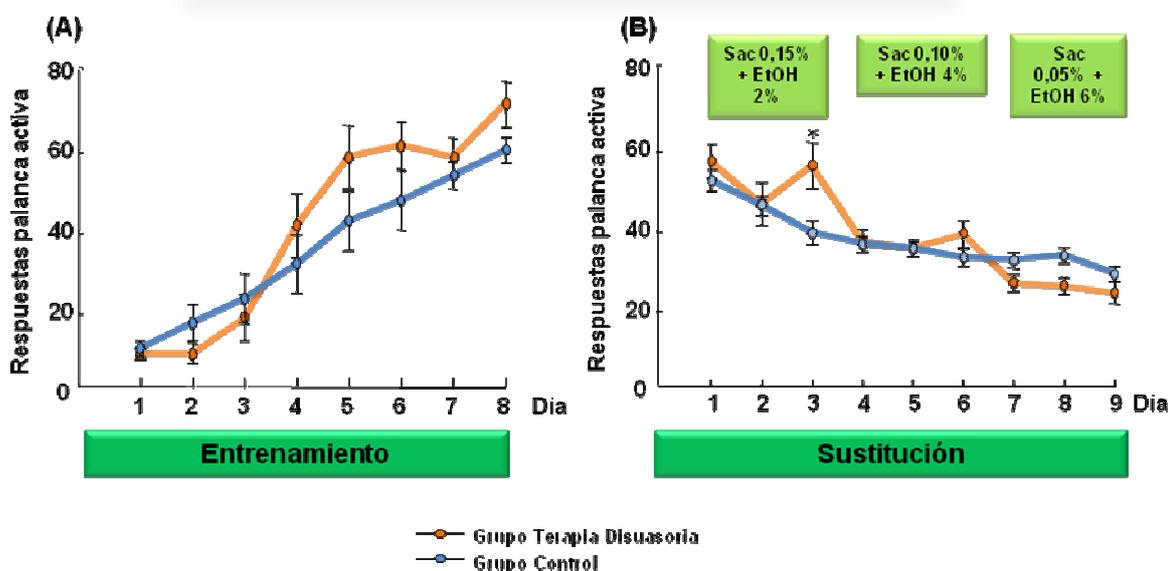


## RESULTADOS

## 1. Efectos de la terapia disuasoria sobre la motivación y el consumo de alcohol en la autoadministración oral de etanol en roedores.

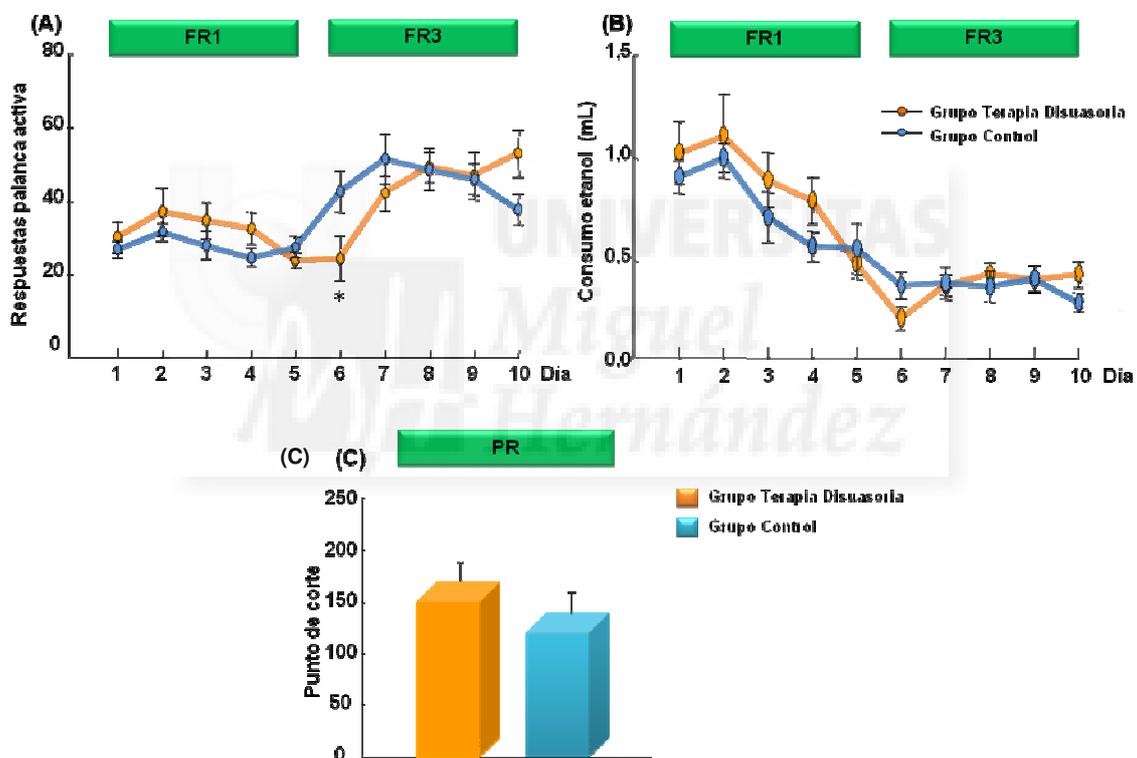
De los 40 ratones de la cepa C57BL/6 de partida, todos cumplían los criterios de aprendizaje una vez superada la fase de entrenamiento. Una vez realizadas las fases FR1, FR3, PR y FR1 previa a la terapia disuasoria, se seleccionaron los ratones que cumplieron los siguientes criterios de selección: número de respuestas activas superior o igual a 20 y consumo superior o igual a 500  $\mu$ l. Los 25 seleccionados fueron asignados aleatoriamente al grupo tratamiento o al grupo control, siendo un total de 13 ratones en el grupo tratamiento (terapia disuasoria) y 12 en el grupo control.

No se encontraron diferencias significativas en el número de respuestas efectivas durante la fase de entrenamiento (Figura 8(A): ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguido del método Student-Newman-Keul's: terapia disuasoria  $F_{(1,199)}=0,280$ ,  $p=0,602$ , día  $F_{(7,199)}=49,127$ ,  $p<0,001$ , día x terapia disuasoria  $F_{(7,199)}= 1,753$ ,  $p=0,100$ ) ni durante la fase de sustitución (Figura 8(B): ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguido del método Student-Newman-Keul's: terapia disuasoria  $F_{(1,223)}= 0,134$ ,  $p=0,717$ , día  $F_{(8,223)}= 25,424$ ,  $p<0,001$ , día x terapia disuasoria  $F_{(8,223)}= 3,102$ ,  $p<0,003$ ).



**Figura 8.** Número de respuestas efectivas durante los días del periodo de entrenamiento (A) y fase de sustitución (B).

Tampoco se hallaron diferencias significativas entre los dos grupos en el número de respuestas efectivas (Figura 9(A): ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguido del método Student-Newman-Keul's: terapia disuasoria  $F_{(1,249)}=0,0426$ ,  $p=0,838$ , día  $F_{(9,249)}=10,604$ ,  $p<0,001$ , terapia disuasoria x día  $F_{(9,249)}=2,934$ ,  $p=0,003$ ) ni en el consumo de etanol durante las fases FR1 y FR3 (Figura 9(B): ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguido del método Student-Newman-Keul's: terapia disuasoria  $F_{(1,249)}=0,483$ ,  $p=0,494$ , día  $F_{(9,249)}=22,013$ ,  $p<0,001$ , terapia disuasoria x día  $F_{(9,249)}=1,057$ ,  $p=0,396$ ). No se hallaron diferencias significativas en el punto de corte (Figura 9(C) Student's t-test:  $t = 1,162$ , 23 df,  $p=0,257$ ).

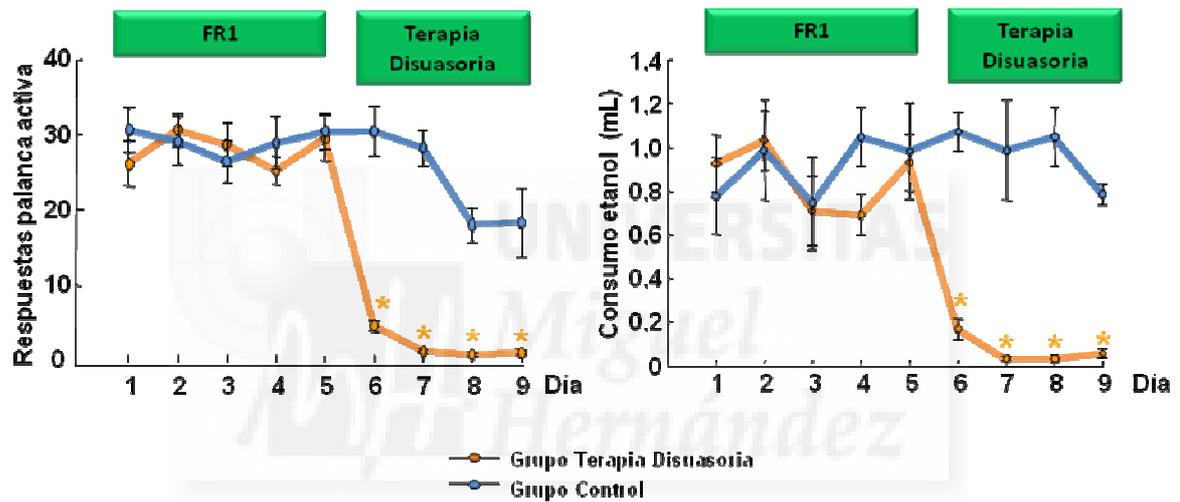


**Figura 9.** Número de respuestas efectivas durante los días del periodo de FR1 y FR3 (A), consumo de etanol durante las fases FR1, FR3 y PR (B) y punto de corte de la fase PR (C).

Conjuntamente, estos resultados muestran que no había diferencias basales entre los ratones que posteriormente conformarán los grupos tratamiento (terapia disuasoria) y control que pudieran enmascarar los resultados obtenidos.

Antes de iniciar el tratamiento, los ratones fueron expuestos nuevamente a la fase FR1 hasta que alcanzaron criterios (respuesta palanca activa y

consumo de etanol) estables sin observarse diferencias significativas entre los grupos (Figura 10(A) y 10(B)). Los resultados muestran una reducción significativa en el número de respuestas activas (Figura 10(A): ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguido del método Student-Newman-Keul's: terapia disuasoria  $F_{(1,224)}=19,458$ ,  $p<0,001$ , día  $F_{(8,224)}=34,178$ ,  $p<0,001$ , terapia x día  $F_{(8,224)}=15,231$ ,  $p<0,001$ ) y en el consumo de etanol (Figura 10 (B): ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguido del método Student-Newman-Keul's: terapia disuasoria  $F_{(1,224)}=7,687$ ,  $p=0,011$ , día  $F_{(8,224)}=19,515$ ,  $p<0,001$ , terapia x día  $F_{(8,224)}=5,837$ ,  $p<0,001$ ) tras la exposición a la terapia disuasoria.



**Figura 10.** Número de respuestas efectivas durante los días del período de FR1 pre-tratamiento con terapia disuasoria y durante los días de terapia disuasoria (A) y consumo de etanol durante ambas fases (B).

## 2. Efectos de la terapia de actualización-extinción/reconsolidación sobre la motivación y el consumo de alcohol en la autoadministración oral de etanol en roedores.

De los 40 ratones de la cepa C57BL/6 de partida, todos cumplían los criterios de aprendizaje una vez superada la fase de entrenamiento. Una vez realizada la fase de razón fija 1 ó FR1, se seleccionaron los ratones que cumplieron los siguientes criterios de selección: número de respuestas activas superior o igual a 20 y consumo superior o igual a 500  $\mu$ l; y fueron asignados aleatoriamente al grupo tratamiento o al grupo control, siendo un total de 9 ratones en el grupo tratamiento y 8 en el grupo control. No se encontraron diferencias significativas en el número de respuestas efectivas durante la fase de entrenamiento (Figura 11(A): ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguido del método Student-Newman-Keul's: terapia AER  $F_{(1,135)}=0,328$ ,  $p=0,575$ , día  $F_{(8,135)}=35,042$ ,  $p<0,001$ , terapia AER x día  $F_{(8,135)}= 1,043$ ,  $p=0,409$ ) ni durante la fase de sustitución (Figura 11(B): ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguido del método Student-Newman-Keul's: terapia AER  $F_{(1,152)}= 5,569$ ,  $p=0,032$ , día  $F_{(8,152)}= 55,597$ ,  $p<0,001$ , terapia AER x día  $F_{(8,152)}= 0,782$ ,  $p=0,619$ ).

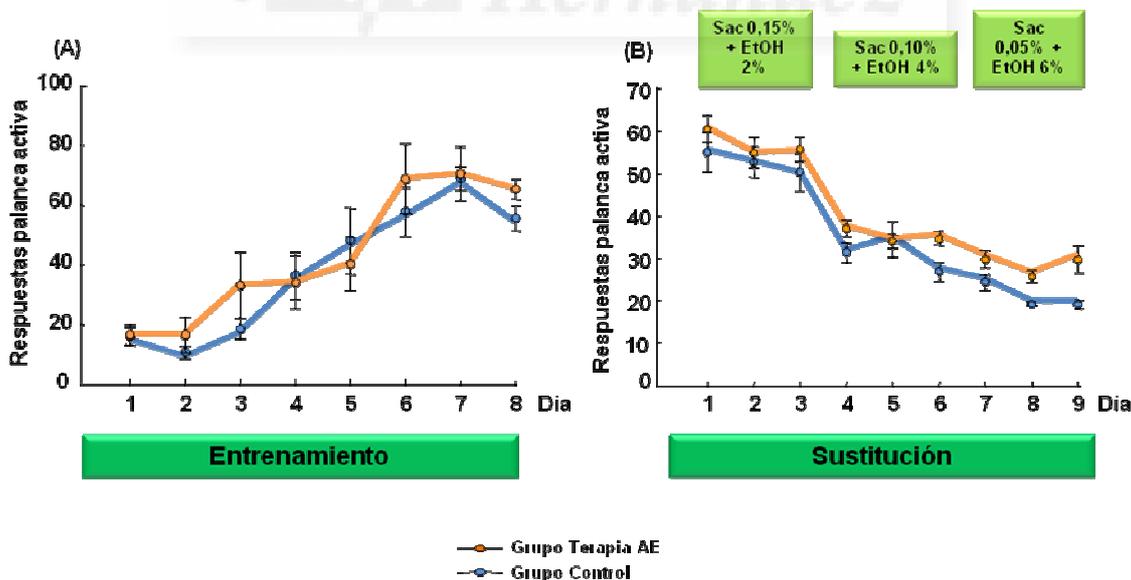
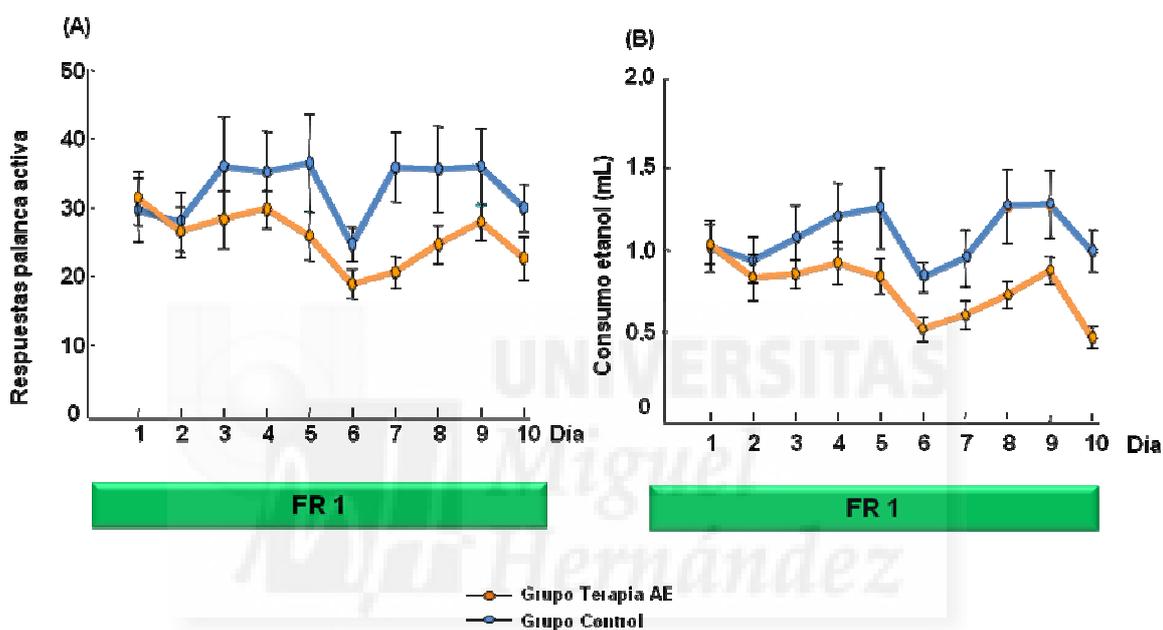


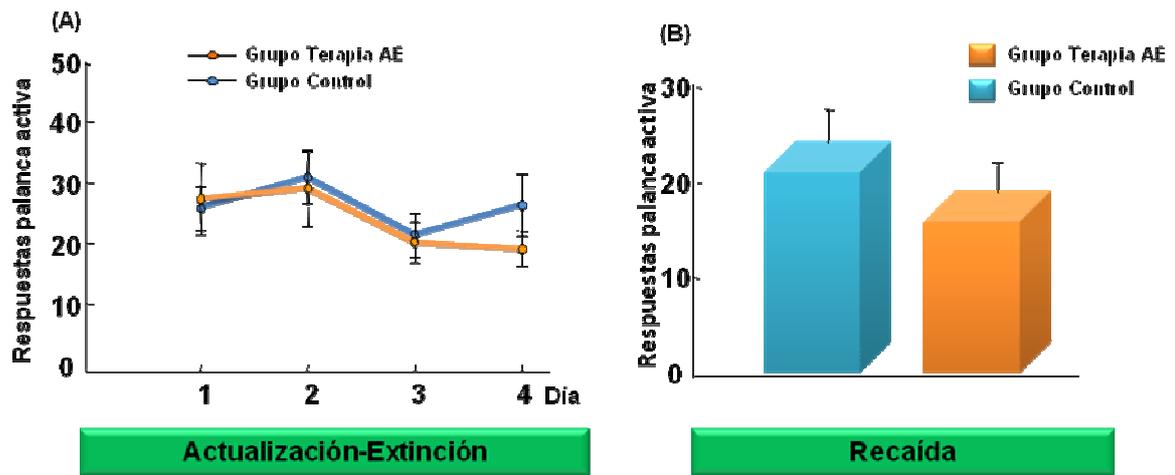
Figura 11. Número de respuestas efectivas durante los días del periodo de entrenamiento (A) y fase de sustitución (B).

Tampoco se hallaron diferencias significativas entre los dos grupos en el número de respuestas efectivas (Figura 12(A): ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguido del método Student-Newman-Keul's: terapia AER  $F_{(1,159)}=2,741$ ,  $p=0,117$ , día  $F_{(9,159)}=2,621$ ,  $p=0,008$ , terapia AER x día  $F_{(9,159)}=1,379$ ,  $p=0,204$ ) ni en el consumo de etanol durante FR1 (Figura 12(B): ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguido del método Student-Newman-Keul's: terapia AER  $F_{(1,143)}=4,207$ ,  $p=0,059$ , día  $F_{(8,143)}=2,783$ ,  $p=<0,008$ , terapia AER x día  $F_{(8,143)}=0,958$ ,  $p=0,473$ ).



**Figura 12.** Número de respuestas efectivas durante los días del período de FR1 (A) y consumo de etanol durante FR1 (B).

Después de la fase FR1 y una vez seleccionados los ratones en función de los criterios de consumo, se inició el procedimiento de AER. Los resultados muestran que no hay diferencias significativas durante los cuatro días en los que se realizó el procedimiento de AER entre los diferentes grupos (Figura 13 (A): ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguido del método Student-Newman-Keul's: terapia AER  $F_{(1,67)}=0,193$ ,  $p=0,667$ , día  $F_{(3,67)}=3,067$ ,  $p=0,037$ , terapia AER x día  $F_{(3,67)}=0,564$ ,  $p=0,622$ ). Se observó una reducción del número de respuestas activas durante la recaída en el grupo AER (Figura 13 (B) Student's t-test:  $t = 1,091$ , 15 df,  $p=0,293$ ).



**Figura 13.** Número de respuestas efectivas durante los días de la terapia de actualización-extinción (A) y respuestas efectivas durante el día de recaída (B).





## DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio sugieren la potencial utilidad terapéutica de la modulación de la conducta inhibitoria en el tratamiento de la dependencia alcohólica y en la prevención de las recaídas. Esta afirmación se basa en: 1) la reducción de la motivación y del consumo de etanol tras la aplicación de la terapia disuasoria (estimulación eléctrica de baja intensidad), y 2) la tendencia a disminuir las recaídas de la terapia de actualización-extinción/reconsolidación (AER).

El proceso de recaída parece involucrar diferentes etapas, en las que participan diferentes mecanismos<sup>[16]</sup>: a) en un primer momento, cuando los sujetos con dependencia del alcohol están expuestos a las señales asociadas al alcohol, éstas dirigen la atención del sujeto (sesgo atencional) de forma que, son detectadas antes de lo que lo harían individuos sin dependencia, pudiendo dirigir y controlar la conducta de búsqueda de alcohol del individuo<sup>[17]</sup>; b) estas señales tienen un elevado valor motivacional en sujetos dependientes del alcohol que en los no dependientes, lo que se traduce en un mayor deseo de consumo<sup>[18][19]</sup>; c) por último, en función de su capacidad para resistir el control de las señales sobre la conducta de búsqueda de alcohol, el sujeto podrá ingerir el alcohol o no, en función de sus mecanismos inhibitorios<sup>[7]</sup>, es por ello que las alteraciones en la conducta inhibitoria se relacionan con una mayor dependencia alcohólica, así como con una mayor tasa de recaídas. Aunque en la división descrita anteriormente la inhibición conductual parece desempeñar un papel fundamental en la última etapa de la recaída, se ha demostrado que los procesos inhibitorios se relacionan también con los mecanismos implicados en el sesgo atencional<sup>[20]</sup> y con el deseo de consumo. Por lo tanto, diferentes evidencias sugieren que la modulación de los procesos inhibitorios podría presentar utilidad terapéutica en el tratamiento de la dependencia alcohólica.

Los hallazgos de este estudio evidencian la potencial eficacia terapéutica de la modulación de los procesos inhibitorios en la dependencia alcohólica. En el primer abordaje evaluado, terapia disuasoria, la exposición a un estímulo aversivo una vez se ha adquirido la conducta operante reduce la motivación (número de respuestas efectivas) y el consumo de alcohol. Estos resultados sugieren que la asociación del estímulo aversivo con la obtención de la droga potenciaría los efectos inhibitorios que conducen a reducir el deseo de consumo. En el segundo abordaje evaluado, los hallazgos evidencian la

potencial eficacia de la terapia de actualización-extinción en reducir la recaída. La exposición al contexto en el que se adquiere la conducta operante desencadenaría una reactivación de la memoria que se caracteriza por una fase de síntesis proteica que conllevaría en última instancia a la reconsolidación de la memoria. En base a los resultados se podría deducir que si la terapia de extinción se realiza durante esta fase de reactivación se alteraría la fase de síntesis proteica, y como consecuencia la reconsolidación de la memoria. En línea con estos resultados, otros estudios apoyan la eficacia de la terapia de actualización-extinción en reducir la recaída al alcohol y heroína en roedores. Asimismo, estudios farmacológicos han demostrado que la administración intracerebroventricular de antagonistas de la síntesis proteica (anisomicina) y de antagonistas del receptor NMDA (MK-801), principal receptor implicado en los procesos de memoria (potenciación a largo plazo), reducen el sesgo atencional en un modelo de AOE en ratas<sup>[21]</sup>.

A la vista de los datos extraídos de este trabajo se infiere que la modulación de los procesos inhibitorios podría ser eficaz en el tratamiento de la dependencia alcohólica y en la prevención de las recaídas. La principal limitación del presente trabajo es el reducido tamaño muestral, por lo que se hace necesaria la realización de nuevos estudios que refuercen los resultados obtenidos. Son necesarios futuros experimentos que permitan conocer los cambios neuroplásticos y neuroquímicos a corto y a largo plazo de los distintos abordajes terapéuticos empleados sobre diferentes marcadores moleculares y bioquímicos relacionados con el abuso de alcohol (tirosina hidroxilasa, receptor mu opioide, receptores cannabinoides CB1 y CB2) y plasticidad neuronal (factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), sinaptofisina, marcadores específicos de neuronas (NeuN), microtúbulos (MAP2) y neurofilamentos (NF200)) mediante PCR a tiempo real e inmunohistoquímica, permitiendo por lo tanto, el hallazgo de posibles dianas terapéuticas.



## CONCLUSIONES

1. La terapia disuasoria (estimulación eléctrica de baja intensidad) disminuye la motivación y el consumo de etanol en roedores.
2. La modulación de la conducta inhibitoria mediante la terapia de actualización-extinción tiende a disminuir el proceso de recaída.
3. Futuros estudios son necesarios para poder caracterizar los cambios neurobiológicos que se producen en estos modelos animales que permitirán identificar posibles dianas terapéuticas en el tratamiento de los trastornos por consumo problemático de alcohol.





## BIBLIOGRAFÍA

1. Grant, B.F., et al., *Prevalence and co-occurrence of substance use disorders and independent mood and anxiety disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions*. Arch Gen Psychiatry, 2004. **61**(8): p. 807-16.
2. Rehm, J., et al., *Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders*. Lancet, 2009. **373**(9682): p. 2223-33.
3. O'Brien, C.P., L.A. Volpicelli, and J.R. Volpicelli, *Naltrexone in the treatment of alcoholism: a clinical review*. Alcohol, 1996. **13**(1): p. 35-9.
4. Spanagel, R. and W. Zieglgansberger, *Anti-craving compounds for ethanol: new pharmacological tools to study addictive processes*. Trends Pharmacol Sci, 1997. **18**(2): p. 54-9.
5. De Sousa, A., *The role of topiramate and other anticonvulsants in the treatment of alcohol dependence: a clinical review*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2010. **9**(1): p. 45-9.
6. Heinz, A., et al., *Identifying the neural circuitry of alcohol craving and relapse vulnerability*. Addict Biol, 2009. **14**(1): p. 108-18.
7. Koob, G.F. and N.D. Volkow, *Neurocircuitry of addiction*. Neuropsychopharmacology, 2010. **35**(1): p. 217-38.
8. Berglund, M., et al., *Treatment of alcohol abuse: an evidence-based review*. Alcohol Clin Exp Res, 2003. **27**(10): p. 1645-56.
9. Milton, A.L. and B.J. Everitt, *The psychological and neurochemical mechanisms of drug memory reconsolidation: implications for the treatment of addiction*. Eur J Neurosci, 2010. **31**(12): p. 2308-19.
10. Tronson, N.C. and J.R. Taylor, *Molecular mechanisms of memory reconsolidation*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(4): p. 262-75.
11. Xue, Y.X., et al., *A memory retrieval-extinction procedure to prevent drug craving and relapse*. Science, 2012. **336**(6078): p. 241-5.
12. Gass, J.T. and L.J. Chandler, *The Plasticity of Extinction: Contribution of the Prefrontal Cortex in Treating Addiction through Inhibitory Learning*. Front Psychiatry, 2013. **4**: p. 46.
13. Millan, E.Z., J. Milligan-Saville, and G.P. McNally, *Memory retrieval, extinction, and reinstatement of alcohol seeking*. Neurobiol Learn Mem, 2013. **101**: p. 26-32.
14. Navarrete, F., G. Rubio, and J. Manzanares, *Effects of naltrexone plus topiramate on ethanol self-administration and tyrosine hydroxylase gene expression changes*. Addict Biol, 2014. **19**(5): p. 862-73.
15. Elmer, G.I., R.A. Meisch, and F.R. George, *Differential concentration-response curves for oral ethanol self-administration in C57BL/6J and BALB/cj mice*. Alcohol, 1987. **4**(1): p. 63-8.
16. Franken, I.H., *Drug craving and addiction: integrating psychological and neuropsychopharmacological approaches*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2003. **27**(4): p. 563-79.
17. Field, M., M.R. Munafo, and I.H. Franken, *A meta-analytic investigation of the relationship between attentional bias and subjective craving in substance abuse*. Psychol Bull, 2009. **135**(4): p. 589-607.
18. Vollstadt-Klein, S., et al., *Effects of cue-exposure treatment on neural cue reactivity in alcohol dependence: a randomized trial*. Biol Psychiatry, 2011. **69**(11): p. 1060-6.
19. Rubio G. Psychophysiological processes involved in alcohol dependence. Alcohol Alcohol 2013; 48 (suppl 1) 53.
20. Coskunpinar, A. and M.A. Cyders, *Impulsivity and substance-related attentional bias: a meta-analytic review*. Drug Alcohol Depend, 2013. **133**(1): p. 1-14.
21. von der Goltz, C., et al., *Cue-induced alcohol-seeking behaviour is reduced by disrupting the reconsolidation of alcohol-related memories*. Psychopharmacology (Berl), 2009. **205**(3): p. 389-97.

