

Condicionamiento de lugar en ratas y etanol

Giselle Vanesa Kamenetzky*, Lucas Cuenya, Valeria Pedrón, y

Alba Elisabeth Mustaca

Universidad de Buenos Aires, Argentina

RESUMEN

Uno de los procedimientos usados con animales no humanos para conocer el valor hedónico de las drogas es el condicionamiento de lugar (CL) en el cual se evalúa la preferencia o aversión hacia un contexto asociado previamente con una droga, inferido por el tiempo de permanencia en ese lugar, en comparación con otro asociado a un vehículo (salina). En este trabajo informaremos sobre distintos aparatos, procedimientos, medidas dependientes utilizadas en el CL y los resultados principales hallados con el uso de etanol. Finalmente se presenta un experimento de CL con ratas en el cual se utilizó un diseño intra-intersujeto. Consistió en tres fases: (1) pre-test, preferencia de las ratas hacia dos contextos: lugar negro (LN) y lugar blanco (LB); (2) condicionamiento, cada animal del grupo experimental recibió ensayos alternados de etanol (dosis 0.5 g/kg) asociados al contexto no preferido y solución salina al preferido; los del grupo control, recibieron salina asociado a ambos contextos; (3) post-test igual al pre-test. En ambas pruebas se midió el tiempo de permanencia de las ratas en cada contexto. Los animales tratados con etanol revirtieron la preferencia de lugar, mientras los del grupo salina no la modificaron. De este estudio se infiere que bajo la dosis utilizada, el etanol tiene un valor hedónico positivo.

Palabras clave: condicionamiento de lugar, etanol, ratas.

ABSTRACT

Place conditioning in rats and ethanol. One of the most common procedures used to assess the hedonic value of a drug is the conditioned place (CP) which explores the preference or the aversion towards a previously drug paired context. In this paper we report on the different apparatus, procedures and dependant measures used on CP and the main results found using ethanol. Finally we present a CP between-within subjects experiment on rats. The experiment consisted in three phases: (1) Pre-Test, we measured the animal's preference towards both contexts black place (BP) and white place (WP); (2) Conditioning, each animal received ethanol (dose: 0.5g/kg, i.p.) paired with the non preferred context and saline paired with the preferred context on alternate trials. A control group received vehicle in both contexts; (3) Post-Test same as pre-test. In both tests the time spent in each context was measured. The ethanol treated group reversed its place preference, whereas the saline group kept its initial preference. From this study we inferred that under this dose, ethanol has a positive hedonic value.

Key words: place conditioning, ethanol, rats.

*La correspondencia sobre este artículo puede ser enviada a Giselle Vanesa Kamenetzky y Alba Mustaca, Laboratorio de Psicología Experimental y Aplicada (PSEA), Instituto de Investigaciones Médicas, CONICET, Universidad de Buenos Aires, Combatientes de Malvinas 3150, 1428 Capital Federal, Argentina. Email: yoselevich@hotmail.com, albamustaca@gmail.com. Agradecimientos: este estudio fue parcialmente financiado por un proyecto de CONICET y de la Agencia de Promoción y Desarrollo dirigidos por Alba E. Mustaca.

El consumo desmedido de alcohol incrementa considerablemente el riesgo de padecer desequilibrios en la salud, los cuales incluyen pérdida de control normal del comportamiento, desordenes neurológicos y cardiovasculares, hepatitis, pancreatitis, cáncer, síndrome de alcoholismo fetal, etcétera (Spanagel, 2003). Se desarrollaron numerosos procedimientos con animales no humanos que permiten estudiar los mecanismos que subyacen a esta patología (para revisiones ver Kamenetzky y Mustaca, 2005; Kamenetzky y Mustaca, 2006). Uno de ellos es el condicionamiento de lugar (CL). Se trata de un paradigma de condicionamiento clásico que permite evaluar el valor hedónico de una droga en roedores (Roma y Riley, 2005). Consiste en estudiar las asociaciones que se producen entre ciertos estímulos contextuales y los efectos de una droga. También se utiliza para evaluar el valor de otros reforzadores, como por ejemplo la estimulación cerebral, los alimentos, la cópula y la rueda de actividad (Cunningham, Ferree y Howard, 2003).

El procedimiento tiene muchas variaciones, pero esencialmente consiste en administrar al animal una dosis de la droga a evaluar (estímulo incondicionado, EI) y colocarlo en uno de dos contextos que se diferencian a nivel perceptual (estímulos visuales, táctiles, olfativos, luminosidad, etc.), separados por una pared removible (estímulo condicionado positivo, EC+), durante un tiempo determinado. En ensayos alternados, al mismo animal se le administra vehículo, generalmente salina (estímulo neutro, control del EI) y se lo coloca en el otro contexto (EC neutro, EC-). Luego de varios ensayos de condicionamiento, a cada animal se lo somete a un test de preferencia de lugar. Durante el mismo se retira el tabique que separa a ambos contextos, se coloca al sujeto en el centro de la caja y se mide la cantidad de tiempo que permanece en cada uno de ellos. Si el animal se queda más tiempo en el contexto asociado previamente a la droga, se infiere que la misma provoca un estado placentero, y que adquiere *preferencia de lugar condicionada* (PLC, Risinger y Oakes, 1996). Si, en cambio, permanece más tiempo en el contexto asociado con el vehículo, se infiere que la droga provoca displacer y que adquiere *aversión de lugar condicionada* (ALC). Dado que el método es relativamente sencillo y poco costoso, se utiliza con frecuencia para medir el valor hedónico de las drogas, en función de la dosis, edad, cepas, estado motivacional, nivel de estrés de los animales, experiencias previas, etc. Entre las drogas más utilizadas se encuentran la cocaína, la nicotina, la morfina y el etanol. En este trabajo presentaremos una breve revisión del CL en relación a las clases de aparatos utilizados, procedimientos, medidas dependientes y los resultados principales con el uso de etanol. Finalmente, ilustraremos la revisión con un experimento típico de CL en ratas realizado en nuestro laboratorio con el uso de una dosis de etanol en cajas de condicionamiento con características contextuales diferentes a las usadas en los experimentos revisados.

Para el CL se utilizan dos tipos de aparatos en función de la preferencia previa a la fase de condicionamiento que exhiben los animales: sesgados (*biased*) y no sesgados (*unbiased*). Los primeros presentan un contexto con características que la mayoría de los roedores prefieren naturalmente: oscuro, con paredes negras y/o poco luminosos; y otro que tienden a evitar: paredes blancas y/o son muy luminosos. Los aparatos no sesgados poseen contextos con estímulos equivalentes en cuanto a la preferencia del animal. El sesgo de un aparato se determina por el tipo de contexto y/o por un test de

preferencia previo a la fase de condicionamiento (pre-test). En los aparatos sesgados la mayoría de los animales permanecen más tiempo en el contexto oscuro; en los no sesgados, el tiempo que permanecen los animales en cada contexto se distribuye al azar.

En los aparatos sesgados, la administración de la droga durante la fase de condicionamiento se asocia al contexto menos preferido, para evaluar si los animales revierten la preferencia innata hacia los lugares oscuros. En ocasiones no se realiza un pre-test porque se presume que todos los sujetos elegirán el mismo contexto. Sin embargo, Cunningham (2003) mostró que existe un bajo porcentaje de animales que eligen inicialmente el contexto blanco, por lo cual sugiere que siempre se realice un pre-test para establecer la preferencia previa al condicionamiento, y si se quiere homogeneizar la muestra se puede eliminar a los que prefieren el lugar blanco, o bien condicionarlos en el contexto menos preferido. Sobre este tema, los resultados de un experimento preliminar no publicado obtenidos en nuestro laboratorio, mostraron que, efectivamente, con la utilización de un aparato sesgado, durante el pre-test, hubo un 8% de animales que prefirieron el lugar blanco.

Otra situación que puede ocurrir en los aparatos sesgados es que el contexto blanco resulte demasiado aversivo, que se evidencia cuando los animales tienen una marcada preferencia inicial hacia el lugar negro. Esta situación puede ser muy difícil de revertir, aún cuando la droga pueda tener potencialmente un valor hedónico positivo. Debido a esas dificultades, algunos autores deciden eliminar del experimento a los sujetos que durante el pre-test permanecen más del 80% del tiempo en el lugar negro (Asin, Wirtshafter y Tabakoff, 1985). Es por ello que sería conveniente que los contextos de las cajas de condicionamiento no presenten un sesgo tan fuerte para evitar una alta preferencia antes del condicionamiento.

Respecto a los grupos controles utilizados, en algunas investigaciones, en especial en aquellas que utilizan aparatos sesgados, no se utiliza un grupo control vehículo, en el cual a los sujetos se les administra durante el condicionamiento una sustancia neutra, por ejemplo salina, apareada a los dos contextos. Sin embargo la omisión de ese grupo no permite controlar la posibilidad de que el transcurso del tiempo y la exposición continua a los dos contextos durante el condicionamiento pueda provocar *per se* los cambios de preferencia, dificultando la interpretación de los resultados. En ese sentido, los diseños que no tienen ese grupo control son incompletos, a excepción que el aparato haya sido probado y validado en otros experimentos similares y se justifique su omisión por razones de economía.

Los términos “sesgado” y “no sesgado” también se emplean para describir el método utilizado para la asignación de los sujetos a cada contexto durante el condicionamiento. Si la droga se asocia con el contexto menos preferido (considerando los resultados del pre-test) se define como un procedimiento sesgado; si se asocia mediante una asignación al azar, sin tener en cuenta la preferencia inicial, se trata de uno no sesgado (Cunningham, Ferree y Howard, 2005). En los métodos no sesgados se corre el riesgo de no hallar CL debido a un posible efecto de techo, ya que si la droga se asocia con el contexto inicialmente preferido, resultará difícil detectar un incremento significativo en el tiempo de permanencia en dicho contexto durante el post-test. Es por ello que quizá sea conveniente homogeneizar la muestra seleccionando animales que

tengan preferencias equivalentes, y asignarlos al azar a las condiciones experimentales.

Respecto de los aparatos no sesgados se pueden hallar diversas variaciones con relación al diseño que se utiliza. El mismo puede incluir una fase de pre-test que permite que la droga se asocie generalmente al contexto menos preferido. En otras investigaciones se presupone que los animales no tienen preferencia hacia ninguno de los dos contextos, por lo cual se omite el pre-test y se asigna al azar a los sujetos que se aparearán a cada contexto con la droga (Patkina y Zvartau, 1998; Dickinson y Cunningham, 1998; Busse y Riley, 2004; Cunningham y Noble, 1992). En estos últimos diseños necesariamente debe existir un grupo control vehículo para controlar los efectos de la exposición *per se* a ambos contextos, aunque no pueden controlar los potenciales efectos de techo que se consideraron en los párrafos anteriores.

Algunas investigaciones incorporan al procedimiento una fase inicial de habituación, para reducir la novedad hacia el aparato y el estrés asociado a la manipulación. Los animales se exponen a los contextos durante algunas sesiones previas al pre-test. Sin embargo, este método tiene la desventaja que potencialmente puede ocasionar una disminución de la adquisición por un proceso de aprendizaje latente. Por lo tanto, si se realizan preexposiciones a cada contexto, éstas deberían ser suficientemente cortas como para evitar ese problema.

Generalmente la fase de condicionamiento se lleva a cabo durante 8 días, administrando un ensayo diario, aunque también se pueden hallar variaciones, como por ejemplo una duración de 4 días, con 2 ensayos diarios de 30 minutos, separados por un período de 2 horas (Patkina y Zvartau, 1998). La medida dependiente más directa utilizada es el tiempo de permanencia en cada uno de los contextos. También se usa el tiempo de permanencia medido en segundos en el lugar asociado a la droga durante el post-test, versus el pre-test (Matsuzawa, Suzuki y Misawa, 1998), o bien estas medidas transformadas en porcentajes o proporción de tiempo que los animales están en cada contexto. Otra transformación de las medidas de tiempo es usar la fórmula: $(EC- / [EC- + EC+]) \times 100$ para el análisis del pre test y el post test. El EC- es igual al tiempo que cada animal permaneció en el contexto menos preferido durante el pre-test, y EC+ es el tiempo que permaneció en el contexto más preferido durante el pre-test. La ventaja de esta medida es que evalúa la tasa de cambio entre el pre-test y el post-test de cada animal. Cunningham *et al.* (2003), realizaron dos experimentos de condicionamiento de lugar usando etanol como EI, ratones como sujetos y cajas de condicionamiento no sesgadas (Experimento 1) y sesgadas (Experimento 2). Analizaron el desarrollo de PLC en función de los aparatos utilizados, del procedimiento (sesgados o no sesgados) y evaluaron los resultados utilizando diferentes medidas dependientes. Estas fueron: diferencia en las medidas de tiempo entre los subgrupos tratados con etanol durante el condicionamiento, diferencias en las medidas de tiempo entre los grupos tratados con etanol y salina, diferencia en el porcentaje de tiempo en EC+ entre los grupos tratados con etanol y salina, diferencia entre el tiempo en EC+ durante el post-test menos el tiempo en EC- durante el post-test entre los grupos etanol y salina, y por último, diferencia entre post-test EC+ menos pre-test EC+ entre los grupos etanol y salina. Los resultados mostraron que en el desarrollo de PLC el sesgo del aparato influía sobre el sesgo en el procedimiento. Cuando el aparato era no sesgado, independientemente del

sesgo o no del procedimiento, se halló PLC. Sin embargo, cuando el aparato era sesgado, sólo se halló PLC cuando el procedimiento también fue sesgado, es decir, cuando la droga se apareó con el contexto inicialmente menos preferido. Con respecto a las variables dependientes, las conclusiones fueron similares en ambos tipos de aparatos, independientemente de la medida utilizada.

De todo lo expuesto se puede concluir que el diseño que resulta más completo en el CL es el que incluye un pre-test, luego la etapa de condicionamiento y finalmente un post-test, con un grupo control vehículo, ya sea en aparatos sesgados o no sesgados. Este diseño nos permite establecer una medida intrasujeto (comparación entre pre-test y post-test), y otra intersujeto (comparación entre sujetos condicionados y controles vehículo). En cuanto al procedimiento, en los aparatos sesgados conviene usar un procedimiento también sesgado; en los aparatos no sesgados, se pueden asignar sujetos al azar a las condiciones experimentales, pero puede haber riesgo de que un efecto de techo ensombrezca una posible PLC. Por otra parte, para homogeneizar las muestras, conviene eliminar los sujetos que expresen una preferencia de lugar muy intensa (más del 80% del tiempo del test permanecen en el lugar preferido) y en aparatos sesgados, eliminar a sujetos que eligen el blanco, por posibles diferencias individuales marcadas que pueden ensombrecer el fenómeno a estudiar.

El etanol provoca tanto efectos aversivos como apetitivos y neutros y eso se refleja también en los experimentos de CL. Las condiciones bajo las cuales los animales desarrollan PLC o ALC dependen de muchos factores, tales como la vía de administración (intaperitoneal -i.p.-, intragástrica, consumo forzado, intravenoso, etc.), cepa o línea de rata empleada, experiencia previa con la droga previa al condicionamiento (Busse, Lawrence y Riley, 2005; Cunningham y Gremel, 2006), el tipo de aparato y de procedimiento usado (Fidler, Bakner y Cunningham, 2004), y la temperatura a la cual están expuestos los animales, ya que diversos estudios sugieren que los efectos térmicos del etanol podrían ser importantes en la modulación de sus efectos motivacionales. Por ejemplo, Dickinson y Cunningham (1998), hallaron que exponiendo a ratones a diversas temperaturas durante la fase de condicionamiento (frío 10°C, normal 21°C y cálido 34°C) y luego probando el CL en la misma o en diferente temperatura del condicionamiento, solamente desarrollaron PLC los animales condicionados y probados en un contexto con temperatura normal.

Otro factor que incide en el desarrollo de PLC o ALC es la edad de los sujetos. Los procesos del desarrollo durante la adolescencia influyen en la respuesta general al alcohol. En un estudio con ratas cuyas edades variaron entre 25, 35, 45 y 60 días, y fueron inyectadas con 0.0, 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 g/kg de etanol, se halló que los animales más jóvenes mostraron PLC en la dosis más baja y ALC en dosis altas. Las ratas adolescentes (45 días) mostraron PLC con dos dosis moderadas y ALC con la dosis alta, los animales de 35 y 60 días no mostraron PLC bajo ninguna dosis, y los animales de 60 días mostraron una aversión creciente a medida que se aumentaba la dosis (Philpot, Badanich y Kirstein, 2003). Estos resultados sugieren que los animales jóvenes son más propensos a desarrollar PLC que los adultos.

El intervalo que media entre la administración de la droga y la exposición al contexto también incide en hallar PLC o ALC. Cunningham y cols. (2002) hallaron que

la administración intragástrica de 4 g/kg de etanol inmediatamente antes de la exposición al EC+ produjo ALC en ratones. En cambio, cuando se impuso un intervalo de 5 minutos entre la administración y la exposición al EC+, se halló PLC. Estos datos muestran la complejidad del valor hedónico del etanol.

El CL sirvió además para determinar el valor hedónico del etanol en líneas de ratas criadas en forma selectiva con alta (P) y baja (NP) preferencia hacia el alcohol (ver Kamenetzky y Mustaca, 2005). En una investigación, los grupos de ambas líneas recibieron inyecciones i.p. de 0.0 (controles salina) y 0.5, 1.0 y 1.5 g/kg de etanol. Se halló ALC en ambas líneas con las dosis de 1.0 y 1.5 g/kg de etanol, pero la magnitud de la ALC fue menor en las ratas P, con respecto a las NP. Esto indica que el etanol en dichas dosis fue menos aversivo para las ratas P, sugiriendo diferencias innatas en la sensibilidad hacia los efectos aversivos del etanol (Stewart, Murphy, McBride, Lumeng y Li, 1996). Grahame y cols. (2001) estudiaron el CL en líneas de ratones con alta (HAP) y baja (LAP) preferencia hacia el alcohol, teniendo en cuenta su consumo voluntario. A distintos grupos de animales les inyectaron 0.0, 1.5, 3 y 4 g/kg de etanol. HAP y LAP mostraron una preferencia moderada de lugar equivalente con dosis de 1.5 y 3.0 g/kg de alcohol. Los ratones LAP, pero no los HAP, tuvieron un incremento en la PLC bajo la dosis alta de 4 g/kg de alcohol. Esto sugiere una mayor eficacia para hallar PLC en los ratones LAP. Estos últimos resultados podrían resultar contradictorios. Sugieren que no existe una correlación lineal entre el consumo voluntario de etanol y el CL, al menos en esta línea de ratones.

El objetivo del siguiente estudio fue evaluar la existencia de PLC en ratas machos adultas usando una dosis de etanol de 0.5 g/kg (15% p/v), en el cual las cajas de condicionamiento presentaban algunas modificaciones respecto de las utilizadas en la bibliografía. Las mismas poseían dos compartimentos con diversos estímulos visuales y táctiles, de tal manera que uno de los contextos tenía más componentes negros que el otro, con el objetivo de producir un sesgo en la preferencia de los animales hacia ese lugar, durante el pre-test. Por lo tanto las cajas se pueden considerar sesgadas, lo mismo que la asignación de los sujetos a las condiciones experimentales. Teniendo en cuenta los datos de la revisión presentada, se empleó un diseño mixto intra-intersujeto, con pre y post- test. Si la dosis de etanol administrada produce un valor hedónico positivo, se espera que los animales del grupo experimental revirtieran su preferencia innata hacia los lugares oscuros, es decir que después del condicionamiento permanezcan más tiempo en el contexto asociado al etanol.

MÉTODO

Sujetos

Se utilizaron 25 ratas adultas, macho, cepa Wistar, criadas en el bioterio del Instituto de Investigaciones Médicas, «Dr. Alfredo Lanari». Los animales fueron alojados individualmente y recibieron agua y comida ad libitum en el transcurso del experimento. La iluminación se mantenía con un ciclo de 12 hs de luz y 12 hs. de oscuridad. La temperatura se mantuvo constante a 23 °C.

Aparatos

Se emplearon 4 cajas de condicionamiento de lugar, construidas con acrílico. Cada caja tenía dos compartimientos de 35 cm de ancho, 40 cm de longitud y 30 cm de altura, separados entre sí por un tabique de acrílico negro removible, que se extraía cuando se administraban los tests de preferencia. El espacio donde se colocaba el tabique estaba marcado con una línea negra para facilitar la evaluación durante los tests de preferencia. Las puertas de las cajas se abrían desde la pared frontal, y eran de acrílico transparente. A través de las mismas se podía observar la conducta del animal. Un contexto, lugar negro (LN), tenía paredes negras con rayas verticales de color blanco de 18 mm de ancho, separadas entre sí por 6 cm. El piso era negro y liso, del mismo material de las cajas. El otro compartimiento, lugar blanco (LB) tenía una pared lateral blanca y otra negra; la pared del fondo era también negra. El piso estaba cubierto con una malla de alambre. Ambos contextos tenían una luz blanca en el centro de 15 wats. Las cajas estaban colocadas en un cuarto que durante el experimento se iluminaba con una luz roja central, la cual evitaba que los animales observaran a los experimentadores. Para la medición del tiempo de permanencia de los animales en cada contexto se utilizaron cronómetros de mano.

Procedimiento

Los animales se dividieron al azar en dos grupos independientes: Experimental etanol, (GE, $n = 16$), cuyos sujetos fueron condicionados con etanol durante la fase de condicionamiento y Control salina (GS, $n = 9$), quienes recibieron el mismo tratamiento que el GE, excepto que fueron inyectados con solución salina durante todos los ensayos de condicionamiento. El experimento tuvo tres fases:

Pre-test. Se retiró el tabique de la caja de condicionamiento que separaba a ambos contextos. Cada animal se colocaba en el centro del aparato, mirando hacia la pared del fondo de la caja. El ensayo duró 15 minutos, comenzando a partir del momento que se cerraba la caja. Dos observadores independientes registraron el tiempo (en segundos) que cada sujeto permanecía en cada uno de los compartimientos. Se consideró que un animal cruzaba de un contexto a otro en el instante que colocaba sus cuatro patas en el lugar. Para lograr una mayor homogeneidad en los grupos, se eliminaron del experimento los sujetos que permanecieron más tiempo en el LB que en el LN durante el pre-test (4 animales del GE y 1 del GS).

Condicionamiento. El entrenamiento comenzó al día siguiente del pre-test. Se colocaron los tabiques en las cajas de condicionamiento y se administró un ensayo diario durante 8 días. Las ratas del GE ($n = 12$) recibieron 4 inyecciones de etanol (0.5 g/kg, 15% p/v de etanol, vía i.p.) y 4 de la misma dosis de solución salina en días alternados. Los animales del GS ($n = 8$) recibieron la dosis de solución salina en todos los ensayos. Las inyecciones se administraron en un cuarto distinto al del condicionamiento. Luego de cada administración, los animales se colocaban en sus cajas-hogares y permanecían 15 minutos en el mismo cuarto. Al cabo de ese tiempo se los trasladaba con la caja-hogar al cuarto de condicionamiento. Los animales del GE se colocaban durante

15 minutos en el lugar menos preferido (LB) luego de las inyecciones de etanol, y en el lugar preferido (LN) luego de las inyecciones de salina. A los animales del GS se los colocó en ambos contextos, en días alternados. Se contrabalanceó el orden de administración de los ensayos con y sin droga.

Post-test. Exactamente igual al pre-test de preferencia.

El experimento se realizó entre las 14 y las 17 horas. Para el análisis estadístico se utilizó un análisis de varianza mixto intra-intersujetos, con un factor independiente: Droga (etanol vs. salina) y un factor de medidas repetidas: Test (pre-test vs post-test). Para la comparación de medias se presentarán los datos arrojados por el test LSD de Fisher, aunque los demás tests (ej., Scheffé y Duncan) arrojaron los mismos resultados. El nivel de significación se determinó para una $p < 0.05$. El programa que se usó fue el *Statistics*. La tabla 1 resume el diseño experimental utilizado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar la confiabilidad de los registros se sumaron todas las medidas de cada observador por separado y se estableció su porcentaje de acuerdos. Se obtuvo una confiabilidad entre observadores del 99%.

La figura 1 muestra el promedio del porcentaje del tiempo de permanencia en el LB de los grupos, en función del pre-tests y el post-test. Se observa que los animales de ambos grupos durante el pre-test mostraron una respuesta similar, con preferencia hacia el LN. Durante el post-test, los animales del GE revirtieron la preferencia inicial y permanecieron más tiempo en el lugar blanco que estuvo asociado al etanol durante el condicionamiento; en cambio, los del GS tuvieron una respuesta similar al pre-test.

Los análisis estadísticos confirman las observaciones de las figuras. Durante el pre-test el promedio del porcentaje de tiempo de permanencia de los animales del GE en el LB fue de 28.46% y del GS 20.5%. Un Análisis de Varianza con el factor Droga y tiempo que cada animal permanecía en cada contexto confirma que los animales prefirieron el LN, $F(1,16) = 79.64$, $p < 0.00001$, independientemente del factor droga, $F(1,16) = 0$.

Tabla 1. Esquema del diseño experimental.

Grupo	Fase 1 Pre-test	Fase 2 Condicionamiento (Ensayos 1 a 8)	Fase 3 Post-test
Experimental (GE)	15 minutos de acceso libre a ambos contextos.	Administración de etanol (0.5 g/kg, 15% p/v) y de salina en ensayos alternados. La droga se apareaba con el LB y el vehículo con el LN.	15 minutos de acceso libre a ambos contextos.
Salina (GS)	15 minutos de acceso libre a ambos contextos	Administración de solución salina en todos los ensayos y se apareaba con el LB y LN en días alternados.	15 minutos de acceso libre a ambos contextos.

Notas: LB: contexto blanco; LN: contexto negro. Ver el texto para mayor información.

Durante el post-test los sujetos del GE permanecieron un promedio del 75.71% del tiempo en el LB mientras que los del GS lo hicieron un 32.77%. Si bien con un análisis de varianza tomando medidas directas de tiempo de permanencia en cada contexto se obtienen los mismos resultados, se presentan los de proporción de tiempo de cada sujeto en función de los tests, porque se considera que refleja mejor el condicionamiento de cada sujeto. Para ello, a las medidas de tiempo que cada sujeto permanecía en los contextos, se les aplicó la siguiente fórmula: $EC-/ (EC-+EC+) \times 100$ para el pre-test y el post-test, en el cual EC- es igual al tiempo que cada animal permaneció en el contexto menos preferido durante el pre-test (en este caso fue el LB), y EC+ es el tiempo que permaneció en el contexto más preferido durante el pre-test (el LN). El análisis de varianza confirma lo observado. Se hallaron diferencias significativas en el factor principal Droga, $F(1,18)= 10.51, p < 0.004$; en el factor Test, $F(1,18)= 16.94, p < 0.0006$, y en el factor interacción Droga x Test, $F(1,18)= 5.85, p < 0.03$. La comparación de cada test, arrojó diferencias no significativas en el pre-test, $F(1,18)= 0.98$, y significativa en el post test, $F(1,18)= 11.31, p < 0.003$. De estos resultados se infiere que los animales del GE adquirieron PLC.

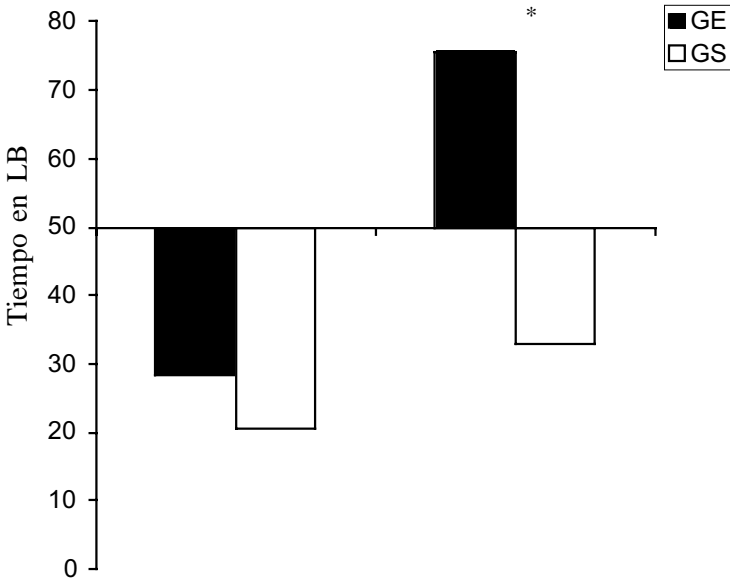


Figura 1. Promedio del porcentaje del tiempo de permanencia en el contexto asociado al etanol (LB) durante el pre-test (izquierda) y el post-test (derecha). Las barras negras corresponden al Grupo etanol (GE) y las blancas corresponden al Grupo salina (GS). La fórmula utilizada fue la siguiente: $(EC-/ [EC-+EC+]) \times 100$ para el pre-test y el post-test, en el cual EC- es igual al tiempo que cada animal permaneció en el contexto menos preferido durante el pre-test (en este caso siempre fue el LB), y EC+ es el tiempo que permaneció en el contexto más preferido durante el pre-test (siempre el LN). * $p < 0.003$.

CONCLUSIONES

En función de los resultados hallados en la bibliografía, el CL usando etanol como droga mostró diferentes resultados: a veces se halló PLC, otras ACL y en otros casos ninguna diferencia entre grupos, dependiendo de diversos factores, como se indicó en la introducción.

Nuestros resultados mostraron que las ratas machos adultas adquirieron PLC usando una dosis moderada de etanol, un aparato levemente sesgado y otras condiciones detalladas en el procedimiento. En el post-test, los sujetos del GE revirtieron la preferencia hacia el contexto LB, apareado a la droga durante la fase de condicionamiento. En cambio, los animales del GS mantuvieron su aversión por el LB. Este estudio logra una validación adecuada de los aparatos utilizados, los cuales presentaban ciertas características novedosas con respecto a la bibliografía, en cuanto a su tamaño y los estímulos sensoriales usados.

Estos resultados replican otros trabajos que también hallaron PLC en ratas, utilizando la misma dosis, cepa de ratas (Wistar), vía de administración (i.p.) y tipo de aparato (sesgado) (p. ej., Biala y Kotlinska, 1999; Bienkowski *et al.*, 1995 y Bienkowski *et al.*, 1996).

El cambio de preferencia de lugar de los sujetos del GE sólo puede adjudicarse al apareamiento del contexto con el etanol, ya que los animales del GS permanecieron sin cambios. Se puede inferir que el etanol provocó un valor hedónico positivo, revirtiendo una preferencia innata de los animales por los lugares oscuros. Otra interpretación posible es que los animales condicionados revirtieron el miedo innato por los lugares claros porque la dosis de etanol fue ansiolítica y durante el condicionamiento el contexto dejó de ser aversivo. No se puede descartar totalmente esta interpretación. Sin embargo, de ser cierta esta última inferencia, se podría esperar que los animales experimentales después del condicionamiento debieran haber elegido indistintamente el LB (por haberse asociado a un estado ansiolítico) o el LN (porque seguiría siendo preferido), comparados con los grupos controles. La comparación intrasujeto entre el pre-test y el post-test muestra una reversión de la preferencia. Este dato sugiere que el estado que provoca el etanol es apetitivo, aunque puede también tener aditivamente un efecto ansiolítico. En ese sentido, otros experimentos mostraron que bajo condiciones de estrés psicológico se aumentan las probabilidades de que los animales elijan el lugar asociado al etanol (Matsuzawa *et al.*, 1999). Matsuzawa, Suzuki y Misawa (1998) hallaron que la administración de 300 mg/kg i.p. de etanol a ratas, produjo PLC bajo la condición de estrés por miedo condicionado (exposición a un ambiente previamente apareado con descargas eléctricas en las patas de los animales). Sin embargo, utilizando la misma dosis, pero sin estar expuestos a estrés, los animales no mostraron PLC, ni tampoco ALC. Estos datos son apoyados por los estudios neurobiológicos que muestran que el efecto reforzante condicionado del etanol se expresa a través de mecanismos dependientes del área tegmental ventral que involucran receptores de opioides y GABA_B (Bechtholt y Cunningham, 2005) y del sistema dopaminérgico. En ratones con deficiencias en los receptores dopaminérgicos D₂, se halló una reducción en la PLC por el etanol, sugiriendo la existencia de una disminución del valor reforzante del etanol, o de

la capacidad de aprender sobre los efectos reforzantes de la droga por ese tratamiento (Cunningham *et al.*, 2002).

Las implicancias de estos estudios para las intervenciones en adicciones son inapreciables. Los tratamientos para estas patologías deben considerar no sólo el efecto incondicionado de una droga, sino también las asociaciones que ocurren entre ella y los estímulos exteroceptivos e intraceptivos que están presentes al momento de consumirla. Un tratamiento integral debe considerar la extinción a las claves contextuales y a los posibles estados emocionales asociados a la drogas. En este sentido, el modelo bioconductual o biopsicosocial de abuso a sustancias descrito por Pormerleau y Pormerleau (1987) contempla al contexto (ambiente externo y ambiente interno) como uno de los factores que conducen a la conducta adictiva. Las listas de terapias con apoyo empírico clasifican a la terapia de exposición a pistas (CET) para el tratamiento de las adicciones como una intervención en la fase experimental (ver Secades Villa y Fernández Hermida, 2003). El procedimiento consiste en la exposición repetida a señales ambientales de preingestión de la droga en ausencia del consumo (prevención de la respuesta) acompañado con respuestas de afrontamiento en el momento de la exposición (Carter y Tiffany, 1999; Kadden, 2001) esperándose la extinción de las respuestas condicionadas. Otro tratamiento que se clasifica como altamente eficaz es el “entrenamiento en habilidades sociales y de afrontamiento” en el cual Drummond y Glautier, 1994) incluye en esas intervenciones la exposición a pistas.

REFERENCIAS

- Asin KE, Wirtshafter D y Tabakoff B (1985). Failure to establish a conditioned place preference with ethanol in rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 22, 169-173.
- Bechtholt AJ y Cunningham CL (2005). Ethanol induced conditioned place preference is expressed through a ventral tegmental area dependent mechanism. *Behavioral Neuroscience*, 19, 213-223.
- Biala G y Kotlinska J (1999). Blockade of the acquisition of ethanol-induced conditioned place preference by *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Alcohol*, 34, 175-182.
- Bienkowski P, Kuca P y Kotowski W (1995). Conditioned place preference after prolonged pre-exposure to ethanol. *Polish Journal of Pharmacology*, 47, 189-191.
- Bienkowski P, Kuca P, Piaceck J y Kotowski W (1996). Low dose of ethanol induces conditioned place preference in rats after repeated exposures to ethanol or saline injections. *Alcohol*, 3, 547-553.
- Bormann NM y Cunningham CL (1998). Ethanol-Induced Conditioned Place Aversion in Rats: Effect of Interstimulus Interval. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 59, 427-432.
- Busse GD Lawrence ET y Riley AL (2005). The effects of alcohol preexposure on cocaine, alcohol and cocaine/alcohol place conditioning. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 81, 459-465.
- Busse GD y Riley AL (2004). Cocaine, but not alcohol, reinstates cocaine-induced place preferences. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 78, 827-833.
- Carter B y Tiffany ST (1999). Meta-analysis of cue-reactivity in addiction research. *Addiction*, 94, 327
- Cunningham CL y Gremel CM (2006). Proximal ethanol pretreatment interferes with acquisition of ethanol-induced conditioned place preference. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 85, 612-619.

- Cunningham CL, Clemans JM y Fidler TL (2002). Injection timing determines whether intragastric ethanol produces conditioned place preference or aversion in mice. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 72, 659-668.
- Cunningham CL, Ferree NK y Howard, MA (2003). Apparatus bias and place conditioning with ethanol in mice. *Psychopharmacology*, 170, 409-422.
- Cunningham CL, Howard MA, Gill SJ, Rubinstein M, Low MJ y Randy DK (2000). Ethanol conditioned place preference is reduced in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 67, 693-699.
- Cunningham CL y Noble D (1992). Conditioned activation induced by ethanol: role in sensitization and conditioned place preference. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 43, 307-313.
- Dickinson SD y Cunningham CL (1998). Altered ambient temperature and ethanol-induced conditioned place preference in mice. *Alcohol*, 16, 13-18.
- Drummond DC y Glautier S (1994). A controlled trial of cue exposure treatment in alcohol dependence. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 62, 809-817.
- Fidler TL, Bakner L y Cunningham CL (2004). Conditioned place aversion induced by intragastric administration of ethanol in rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 77, 731-743.
- Grahame NJ, Hester JA, Rodd-Henricks K, Li TK y Lumeng L. (2001). Alcohol place preference conditioning in high- and low- alcohol preferring selected lines of mice. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 68, 805-814.
- Kadden RM (2001). Behavioral and cognitive-behavior treatments for alcoholims. *Addictive Behaviors*, 26, 489-507.
- Kamenetzky G y Mustaca A (2005). Modelos animales para el estudio del alcoholismo. *Terapia Psicológica*, 23, 65-72.
- Kamenetzky G y Mustaca A (2006). Alcoholismo y ansiedad: modelos animales. *International Journal of Psychology and Psychological Therapy*, 6, 343-364.
- Matsuzawa S, Suzuki T y Misawa M (1998). Conditioned fear stress induces ethanol-associated preference in rats. *European Neuro-psychopharmacology*, 341, 127-130.
- Matsuzawa S, Suzuki T, Misawa M y Nagase H (1999). Different roles of m-, d- and k- opioid receptors in ethanol-associated place preference in rats exposed to conditioned fear stress. *European Journal of Pharmacology*, 368, 9-16.
- Patkina NA y Zvartau EE (1998). Caffeine place conditioning in rats: comparison with cocaine and ethanol. *European Neuro-Psychopharmacology*, 8, 287-291.
- Philpot RM, Badanich KA y Kirstein CL (2003). Place conditioning: Age-related changes in the rewarding and aversive effects of alcohol. *Alcoholism clinical and experimental research*, 27, 593-599.
- Pormerleau OF y Pormerleau CS (1987). A biobehavioral view of substance abuse and addiction. *Journal of Drug Issues*, 17, 111-131.
- Risinger FO y Oakes RA (1996). Dose- and conditioning trial-dependent ethanol-induced conditioned place preference in Swiss-Webster mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 55, 117-123.
- Roma PG y Riley AL (2005). Apparatus bias and the use of light and texture in place conditioning. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 82, 163-169.
- Schechter MD (1995). Cocaethylene produces conditioned place preference in rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 51, 549-552.

- Secades Villa R y Fernández Hermida JR (2003). Guía de tratamientos psicológicos eficaces para la drogadicción: alcohol, cocaína y heroína. En: Pérez Alvarez M, Fernández Hermida JR, Fernández Rodríguez C y Amigo Vázquez I. *Guía de tratamientos psicológicos eficaces I, Adultos* (págs. 107-132). Madrid: Editorial Pirámide.
- Spanagel R (2003). Alcohol addiction research: from animal models to clinics. *Best Practice & Research*, 4, 507-518.
- Stewart RB, Murphy JM, McBride WJ, Lumeng L y Li TK (1996). Place conditioning with alcohol in alcohol-preferring and non-preferring rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 53, 487-491.

Recibido, 30 enero, 2007

Aceptado, 12 julio, 2007