

Evaluaciones Conductuales en un modelo de bebedor social en ratas Wistar.

Behavioral assessments in a social drinker model in Wistar rats.

Alicia de la Caridad Duquesne Chávez^a, María Teresa Díaz Soto^b.

^a Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

^b Instituto de Farmacia y Alimentos

Recibido: 2 de diciembre de 2019;

Aceptado: 23 de mayo de 2020;

RESUMEN

En los últimos años se ha señalado la importancia del estudio de las características inherentes a las etapas que conllevan al alcoholismo. La escasez de estos estudios es un factor controvertido ya que el desarrollo de modelos que abarquen la relevancia de estas etapas podrían ser sumamente importantes en la búsqueda del "punto crítico" en que se puede identificar el momento en que un individuo en etapas avanzadas de la adicción pueda desarrollar alcoholismo, o en el que un bebedor social se convierta en un bebedor de riesgo, meramente basándose en la particularidad de los cambios conductuales que presente. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar las afectaciones conductuales relacionadas con el estado neuronal en un modelo de bebedor social en ratas Wistar, las cuales fueron distribuidas en 2 grupos Control (Agua) y grupo Etanol que fue administrado por el método caja-hogar "ad libitum" a diferentes concentraciones (5%, 10%, 15% y 20%.) 2 veces por semana durante siete semanas. Fueron aplicados el Laberinto Acuático de Morris, el Laberinto Elevado en Cruz y el Test de Irwin. El modelo desarrollado mimetiza el comportamiento de bebedor social en humanos en cuanto al consumo de etanol. Se concluyó que existieron afectaciones relacionadas con el estado de ansiedad en el Laberinto Elevado en Cruz además de una afectación incipiente de la transmisión dopaminérgica mediante el test de Irwin y el consumo de etanol no existiendo afectación de la memoria medida en el laberinto Acuático de Morris. Estos resultados señalan el incipiente desequilibrio neuronal que caracteriza al bebedor social.

Palabras claves: etanol, bebedor social, test conductuales.

ABSTRACT

In recent years the importance of the study of the characteristics inherent to the stages that lead to alcoholism has been pointed out. The scarcity of these studies is a controversial factor since the development of models that encompass the relevance of these stages could be extremely important in the search for the "critical point" in which the moment in which an individual in advanced stages of the process can be identified addiction can develop alcoholism, or in which a social drinker becomes a risky drinker, merely based on the particularity of the behavioral changes that he presents. The present work has as objective to evaluate the behavioral affectations related to the neuronal state in a model of social drinker in Wistar rats which were distributed in 2 Control groups (Water) and Ethanol group that was administered by the cash-home method "ad libitum" At different concentrations (5%, 10%, 15% and 20%.) 2 times a week for seven weeks. The Morris Water Labyrinth, the Elevated Cross Labyrinth and the Irwin Test were applied. The model developed mimics the behavior of social drinkers in humans in terms of ethanol consumption. It was concluded that there were affectations related to the state of anxiety in the Elevated Labyrinth in Cruz in addition to an incipient affectation of the dopaminergic transmission by means of the Irwin test and the consumption of ethanol, there being no affectation of the memory measured in the Aquatic labyrinth of Morris. These results indicate the incipient neuronal imbalance that characterizes the social drinker.

Keywords: ethanol, social drinker, behavioral test.

INTRODUCCION

En los últimos años los altos índices de consumo de alcohol a nivel mundial han dado como resultado el auge del estudio de su explotación como droga de abuso, ya que su uso como sustancia asociada al júbilo ha derivado en su utilización como recurso "indispensable" en casi todos los eventos sociales. De esta forma, el incremento de los problemas asociados al consumo excesivo de alcohol se ha traducido en una amplia gama de consecuencias sanitarias y sociales, entre las que destacan más de sesenta enfermedades y una gran carga social cuya magnitud puede variar dependiendo del patrón y la frecuencia de consumo de/los individuo(s). Anualmente estos problemas causan 3 millones de muertes principalmente en la población de 15-29 años, por lo que en los últimos años se ha ganado el tercer lugar entre los factores de riesgo de morbilidad a nivel mundial y el primer lugar en el Pacífico Occidental y las Américas (Pilatti *et al.*, 2010; González, 1993; Herrera y Avilés, 2000; Room *et al.*, (2005); Murray y López, 2006; Organización Mundial de la Salud (OMS), 2005; Organización Mundial de la Salud (OMS), 2011).

El desarrollo de la conducta adictiva al etanol transita por etapas que constituyen un proceso caracterizado por desequilibrios neuronales y conductuales que conllevan al establecimiento de enfermedades crónicas que afectan la calidad de vida. Estos desórdenes constituyen centro de atención para la búsqueda de soluciones terapéuticas más eficaces y seguras (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2011; Ministerio de la Protección Social de la República de Colombia, 2013).

Sin embargo, existen numerosos estudios clínicos que intentan comprender los factores de riesgo que pueden explicar el consumo nocivo de alcohol, así como la tan aclamada y difusa clasificación de los tipos de bebedores, que incluye desde comportamientos leves (dígase: bebedores sociales y moderados) hasta comportamientos de riesgo (bebedor excesivo y alcohólicos), cuyo uso ha arrojado mejores resultados en cuanto a la prescripción de tratamientos. De hecho, es importante señalar que, en la actualidad, si bien se dispone de demostraciones experimentales, sobre la transmisión química, durante la ingesta crónica de alcohol, y otras drogas adictivas, existen aún muchas interrogantes de cómo estos mecanismos se expresan durante las etapas iniciales como es la de bebedor social. Sin embargo, la realización de estudios pre clínicos en estas etapas previas no es un elemento que haya sido ampliamente tenido en cuenta a pesar de que, con la elaboración de este tipo de modelos se podría establecer un "punto crítico" que marcara un antes y un después en el diagnóstico de la adicción, el cual sería decisivo en caso de abogar por la prevención del proceso adictivo en sí mismo.

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo: evaluar las afectaciones conductuales relacionadas con el estado neuronal en un modelo de bebedor social en Ratas Wistar, a través:

Del desarrollo de un modelo preclínico de bebedor social en ratas Wistar.

Detectar presencia o no de afectaciones en el SNA y/o SNC mediante la realización de un test de Irwin.

Evaluar estados conductuales relacionados con transmisión de GABAérgica mediante un test de Laberinto Elevado en Cruz en grupos experimentales.

Evaluar conducta relacionada con transmisión dopaminérgica mediante el test del Laberinto Acuático de Morris.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Todos los procedimientos con los animales se realizaron según lo establecido por los Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico de Seguridad Sanitaria y Medioambiental (Regulación No.39/04 del CECMED), así como fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso De Animales de Laboratorio (CICUAL). Se utilizaron ratas machos de la línea Wistar, clínicamente sanas, con intervalo de peso entre 250-300g provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB; Mayabeque, Cuba). Los animales después del periodo de cuarentena se mantuvieron en una habitación climatizada (20 ± 2 °C) expuestos a un ciclo de luz / oscuridad de 12h y recibieron agua (grupo control) o Etanol (grupo etanol) así como pienso, ambos de forma controlada en las siguientes cantidades (60ml y 45g respectivamente)

Modelo de administración

En el estudio se desarrolló un modelo que mimetizó el consumo de etanol en bebedores sociales humanos, por lo que la administración de etanol tuvo en cuenta lo planteado por Pascual y Guardia (2012) en cuanto a la cantidad, concentración y frecuencia de exposición al etanol descrito para humanos, teniendo en cuenta que el consumo regular de estos oscila entre 1-7 tragos semanales y que todas las consumiciones que se suelen servir suelen tener la misma cantidad de etanol (entre 0-12 gr. de etanol puro) (Pascual y Guardia, 2012; Guerra de Andrade, García de Oliveira, 2010), por lo cual se empleó un ajuste de dosis para la administración de los roedores basado en la siguiente fórmula, descrita por Pascual y Guardia (2012) :

$$\text{Gramos de alcohol puro} = \frac{\text{Centímetros cúbicos} \times \text{graduación alcohólica} \times 0,8}{100}$$

Para el cálculo se valoró que 1 ml de etanol tiene una masa de 0,7964 g.

Se utilizaron veinte (20) ratas Wistar machos que se dividieron en dos grupos de diez animales cada uno para su administración en función de los objetivos del ensayo (grupo control y grupo tratado). Al primer grupo se le proveyó de agua mientras que el otro fue puesto en contacto con las soluciones hidro-alcohólicas, en las cuales se les proporcionó el equivalente a 2 tragos por semana en humanos, de bebidas a diferentes concentraciones (comportamiento de bebedor social) de la siguiente manera:

Etanol al 5% _____ dos veces a la semana durante 2 semanas

Etanol al 10% _____ dos veces a la semana durante una semana

Etanol al 15% _____ dos veces a la semana durante una semana

Etanol al 20% _____ dos veces a la semana durante 3 semanas

Esto fue llevado a cabo utilizando el modelo de "caja hogar" descrito por Celis et al., 2010 donde se le ofreció al animal la posibilidad de consumir alcohol libremente durante 24 h. Como medida se tomó el volumen consumido de cada botella y la preferencia por el alcohol y se transfirió por la proporción de alcohol consumida en relación al volumen total de líquido consumido. La medición del consumo de agua/etanol por caja, de los animales, fue realizada (A partir del día cero) en días alternos a lo largo del estudio (15 semanas), siguiendo lo planteado por Pritchett-Corning et al., (2011).

Procedimiento

El estudio fue dividido en cuatro etapas fundamentales donde, primeramente, ambos grupos fueron entrenados en el Laberinto Acuático de Morris para la realización de las evaluaciones conductuales previas y posteriores al consumo de alcohol (0-7 días). Posteriormente se realizó la evaluación en los de Test de Irwin, del Laberinto Acuático de Morris (LAM) y del Laberinto Elevado en Cruz (LEC), cuyos resultados se utilizaron para establecer los valores iniciales a utilizar como referencia en la etapa 4.

Ya en la tercera etapa se procedió a la administración de los ejemplares como se detalló anteriormente, suministrando “ad libitum” al grupo tratado con etanol a diferentes concentraciones durante 7 semanas (desde el día 15 hasta el 49), procurando mantener una rigurosa observación del comportamiento de ambos grupos al momento de la administración. Después, se le retiró abruptamente el suministro de etanol durante 2 semanas (desde el día 50 hasta el día 65) y a continuación, se sometieron a una re-exposición de etanol al 20% por 2 días durante una semana siguiendo las condiciones previamente mencionadas con el objetivo de demostrar el estado de bebedor social en los animales.

Por último, en la cuarta y última etapa, finalmente se pudo comprobar la necesidad o no que presentaron las ratas alcoholizadas de consumir etanol, lo cual es evaluado mediante los ensayos conductuales ya mencionados para estudiar los posibles cambios a nivel de Sistema Nervioso, gracias a lo cual se corroboraron los resultados obtenidos durante las observaciones efectuadas a lo largo de la administración.

Análisis Estadístico

Los datos experimentales obtenidos fueron sometidos a un análisis exploratorio donde se detectaron puntos aberrantes (outliers). Además, se estimaron parámetros descriptivos como media y desviación estándar. Para determinar diferencias entre grupos en una variable en cuestión se utilizó un ANOVA de clasificación simple, seguido de un ensayo de comparación de medias (Student-Newman-Keuls) y el test “t” de Student. El nivel de significación estadístico empleado en todos los casos fue como mínimo de $p < 0.05$.

Para el análisis de los resultados del laberinto acuático de Morris se utilizó un ANOVA bidireccional, seguido de una prueba de Bonferroni con un nivel de significación de $p < 0.0001$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 representa el consumo de etanol durante el tiempo del estudio.

Letras diferentes representan diferencias significativas en el consumo de etanol con respecto a la semana anterior para los tratados. Letras iguales representan comportamientos similares del mismo modo. $P < 0.05$. Test estadísticos utilizados: ANOVA de clasificación simple, seguido de un ensayo de comparación de medias (Student-Newman-Keuls) y el test “t” de Student.

En ella se evidencia que el consumo de etanol se comportó de forma inestable, no existiendo una diferencia significativa entre la cantidad consumida al 5% en la segunda semana y la consumida al 20 % en la primera semana, lo cual coincide con la posterior a la deprivación, comportamiento que se repite con las concentraciones de 10% y 15%. Esto se traduce como que el consumo inicial (5%) manifiesta la aceptación por la solución etanólica mientras que la disminución posterior del consumo se debe simplemente al método intencionalmente empleado (para asemejarlo al bebedor social) en la administración de etanol, lo cual evidencia el gusto por el etanol pero no la adquisición de conducta adictiva. Por otra parte, al analizar el consumo a partir de la concentración al 20% se observan dos comportamientos:

En la primera semana el consumo fue semejante al inicio del experimento lo que indica la aceptación a dicho consumo, y en la segunda semana de la exposición, a esta misma concentración, el consumo disminuyó, dato que demuestra la no necesidad del consumo. Dichos resultados coinciden con los reportados en humanos para bebedores sociales (De la Fuente y Kershenovich, 1992), y con lo planteado por la Organización Mundial de la Salud (2018) al afirmar que la sensibilización suele desarrollarse cuando la droga se consume intermitentemente, y puede manifestarse incluso meses después del último contacto con ésta, ya que esta etapa se caracteriza por la aceptación al consumo de etanol pero sólo de forma intermitente y a determinadas concentraciones, lo cual afecta ciertos parámetros relacionados con la conducta, de forma más significativa aquellos en los que interviene la transmisión GABAérgica, lo que da paso a una amplia sintomatología asociada con la ansiedad.

La Figura 2 muestra los resultados correspondientes al Test de Irwin al inicio y al final del experimento, donde se observa un comportamiento semejante entre ambos grupos al inicio del estudio. Sin embargo, después del consumo de etanol existieron diferencias significativas entre ellos, siendo especialmente llamativas la disminución de acicalamiento y el aumento de sobresalto, ambas manifestaciones conductuales se relacionan con el Sistema Nervioso Central.

Letras diferentes representan diferencias significativas en los resultados obtenidos en el test de Irwin entre grupos al final del estudio. $P < 0.05$. Test estadísticos utilizados: ANOVA de clasificación simple, seguido de un ensayo de comparación de medias (Student-Newman-Keuls) y el test "t" de Student.

Estos resultados aparentemente contradictorios se deben a la facilitación que el alcohol hace a nivel agudo sobre el receptor del ácido gamma-aminobutírico-A (GABA-A), lo cual está relacionado con sus propiedades sedantes, ansiolíticas, relajantes e hipnóticas, propiedades que el etanol potencia al aumentar la acción inhibitoria de dicho receptor, actuando como antagonista no competitivo del receptor del Ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) de los aminoácidos excitadores (glutamato y aspartato). Por otra parte, el etanol activa la vía dopaminérgica mesolímbica actuando como estimulante a bajas dosis, lo cual provoca un aumento de la liberación de dopamina esencialmente en el nucleus accumbens (Nac) (Goodman y Gilman, 2011).

La Tabla 1 evidencia los resultados relacionados con el estado de ansiedad medida mediante el LEC, donde se observó un mayor número de ingresos en brazos cerrados (133.00 ± 38.30) con respecto al número de ingresos en los brazos abiertos (14.00 ± 14.00) del grupo que consumió etanol, y se obtuvieron diferencias significativas entre ambos parámetros al comparar este grupo con el grupo control (57.71 ± 16.15 y 26.63 ± 4.45).

Letras diferentes representan diferencias significativas entre el número de ingresos en los brazos (a y b para los brazos cerrados y c y d para los abiertos) entre grupos al final del estudio. $P < 0.05$. Test estadísticos utilizados: ANOVA de clasificación simple, seguido de un ensayo de comparación de medias (Student-Newman-Keuls) y el test "t" de Student.

El tiempo de permanencia en ambos brazos para los grupos experimentales antes y después del consumo de etanol se representa en la Figura 3, donde observa mayor tiempo de permanencia en los brazos cerrados del LEC con respecto al tiempo de permanencia en los brazos abiertos entre el grupo que consumió etanol (1459 seg. en brazos cerrados y 28 seg. en brazos abiertos) y el grupo control (981 seg. en brazos cerrados y 426 seg. en brazos abiertos)

Letras diferentes representan diferencias significativas entre el tiempo de permanencia en los brazos (a y b para los brazos cerrados y c y d para los abiertos) para el mismo grupo (tratados) al inicio y al final del estudio. $P < 0.05$. Test estadísticos utilizados: ANOVA de

clasificación simple, seguido de un ensayo de comparación de medias (Student-Newman-Keuls) y el test "t" de Student.

Las latencias de la primera entrada a los brazos, mostraron que las ratas que entraron primero a los Brazos Cerrados (BC) deciden mucho más rápido a cuál entrar que las que lo hicieron a los Brazos Abiertos (BA). Esta rapidez en la decisión pone en evidencia una ausencia de conflicto en las ratas que entraron a los BC mientras que las ratas que entraron a los BA, al presentar una mayor preferencia a arriesgarse a explorar los BA, sin dejar de lado la atracción por permanecer en una zona segura (BC), les toma un poco más de tiempo decidir a cuál de los brazos entrar primero, dando como consecuencia la elección de los BA (Celis *et al.*, 2010) El comportamiento en cuanto a este parámetro después del consumo de etanol se observa en la Figura 4.

Letras diferentes (a y b) representan diferencias significativas entre las entradas a los brazos cerrados de ambos grupos. $P < 0.05$. Test estadísticos utilizados: ANOVA de clasificación simple, seguido de un ensayo de comparación de medias (Student-Newman-Keuls) y el test "t" de Student.

A partir de lo planteado por Salum *et al.*, (2000) el resultado anterior evidencia que la preferencia de algunas ratas en entrar primero a los BA que a los BC sería el resultado de un nivel de motivación por explorar estas zonas mayor que la aversión percibida por el animal y mayor que la motivación por explorar los BC en un primer instante. El tiempo de permanencia en los brazos abiertos, menor que el tiempo de permanencia en los brazos cerrados manifestado en el grupo etanol constituye un importante indicador del aumento de ansiedad en los animales.

Los resultados medidos a través de LEC evidenciaron un mayor grado de ansiedad cuando las ratas que consumieron etanol enfrentaron un entorno desconocido con respecto al grupo control, lo cual desde el punto de vista neurológico se puede asociar con la afectación de las neuronas prefrontales GABAérgicas (Davis, 2003).

La Tabla 2 muestra el comportamiento de los grupos experimentales en el LAM al inicio y al final del estudio. Se ha demostrado que las conductas de autoadministración dependen críticamente de la integridad funcional de la neurotransmisión de los sistemas mesotelencefálicos, especialmente del sistema dopaminérgico mesolímbico y que este se integra dentro de los sistemas que contribuyen a la conducta de búsqueda (Reid *et al.*, 2012; Guyton y Hall, 2016; Trezza *et al.*, 2012). No existieron diferencias significativas al comparar ambos grupos en ambas etapas, este resultado demuestra que en el modelo de bebedor social desarrollado en nuestras condiciones de trabajo no existió afectación de la capacidad de aprendizaje y memoria, lo que está relacionado con la adecuada función dopaminérgica según lo referido por Weafer *et al.*, (2012) quienes afirman el papel cognitivo de la dopamina cuando plantean que "...la señal dopaminérgica puede facilitar o no el reconocimiento de eventos, el aprendizaje de las respuestas conductuales y en algunos casos la repetición de éstas".

Estos resultados demuestran la interconexión que existe entre la transmisión GABAérgica y la dopaminérgica durante la etapa inicial del consumo de etanol, siendo capaz de provocar desensibilización del receptor inhibitorio al provocar la despolarización de las membranas de las neuronas dopaminérgicas, estimulando así la liberación del neurotransmisor, lo que conlleva a manifestarse aceptación al consumo que se evidenció en el presente estudio.

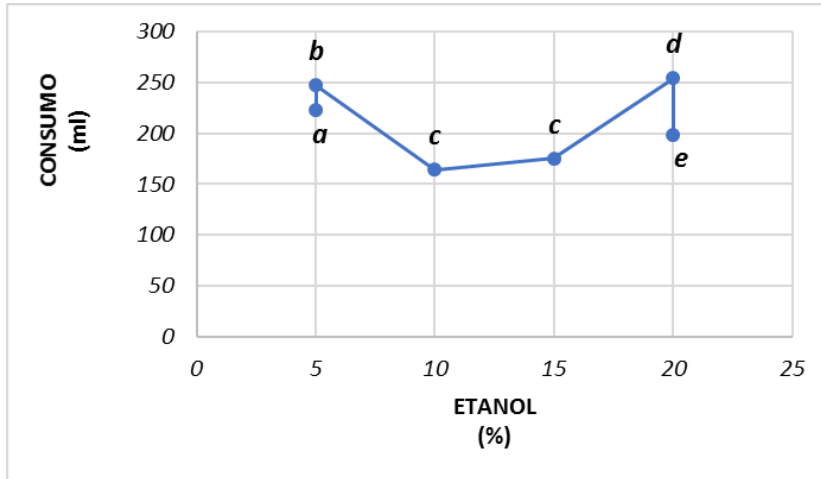


Fig. 1. Análisis del consumo de etanol.

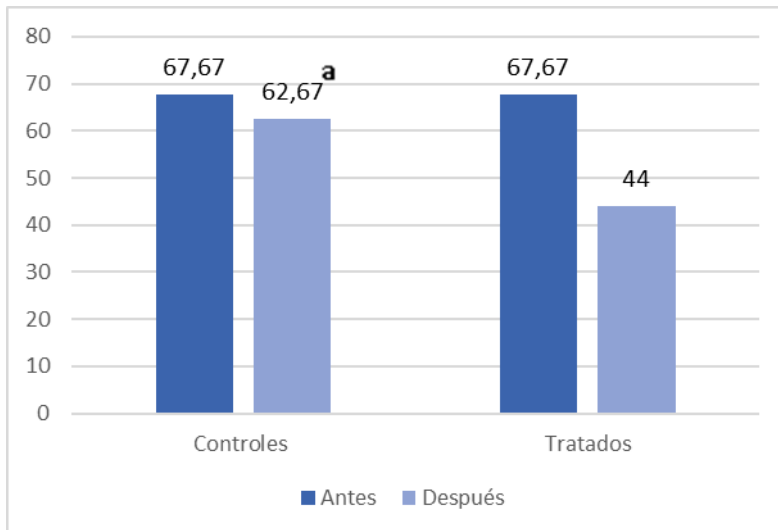


Fig. 2. Resultados generales del Test de Irwin.

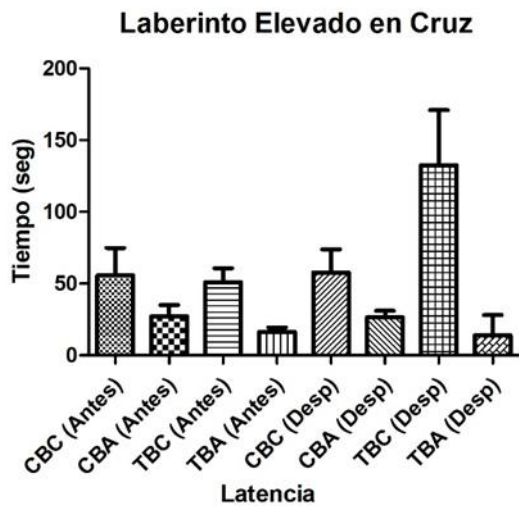


Fig 3. Tiempo de permanencia en ambos brazos para ambos grupos al inicio y al final del estudio. CBC y CBA: Tiempos de permanencia de los controles en los brazos cerrados y brazos abiertos respectivamente. TBC y TBA: Tiempos de permanencia de los controles en los brazos cerrados y brazos abiertos respectivamente.

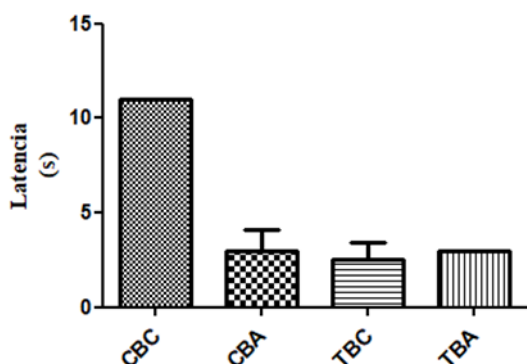


Fig. 4. Primera entrada en ambos brazos de ambos grupos al final del estudio. CBC y CBA: Primera entrada de los controles a los brazos cerrados y brazos abiertos respectivamente. TBC y TBA: Primera entrada de los tratados a los brazos cerrados y brazos abiertos respectivamente.

Tabla 1. Evaluación de la ansiedad mediante el Laberinto Elevado en Cruz en las ratas bajo estudio.

Grupos de Ensayo		Número de Ingresos en Brazos Cerrados	Número de Ingresos en Brazos Abiertos
INICIO	Controles (Agua)	55.80 ± 19.04	27.23 ± 7.79
	Tratados (Etanol)	51.00 ± 9.65	16.50 ± 2.99
FINAL	Controles (Agua)	57.71 ± 16.15 ^a	26.63 ± 4.45 ^c
	Tratados (Etanol)	133.00 ± 38.30 ^b	14.00 ± 14.00 ^d

Tabla 2. Latencia de escape, según Laberinto Acuático de Morris "Antes" y "Después" de la administración.

	INICIO	FINAL
CONTROL	3.4±0.89	2.6±1.34
ETANOL	3.00±0.79	2.4±1.14

CONCLUSIONES

Un análisis integrador de los resultados evidencia que el modelo experimental de bebedor social logró mimetizar el comportamiento del humano en cuanto al consumo de etanol. Asimismo, el consumo de etanol en el modelo desarrollado y los resultados del Test de Irwin se corresponden con la estimulación incipiente de la transmisión dopaminérgica. En el modelo de bebedor social estudiado no existe afectación de la capacidad de aprendizaje y memoria medidos mediante LAM y existió la presencia de ansiedad, indicador de afectación de la transmisión GABAérgica medida a través del test de Irwin y LEC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CECMED. Buró Regulatorio para la Protección de la Salud Pública, MINSAP (2004). Regulación No. 39-2004. Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico de Seguridad Sanitaria y Medio Ambiental.
- Celis, C. A., Martínez, D. P., Conde, C. A. (2010) La primera entrada en el laberinto en cruz elevado como predictor del nivel de ansiedad. *Revista de la Universidad Industrial de Santander*, 42(3), 220-228.
- Davis, M. (2003) The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J Psychiatry Neurosci.* 28(4), 263–274.
- De la Fuente, J.R., Kershenovich, D. (1992) El alcoholismo como problema médico, *Revista de la Facultad de Medicina.* 35(2), 47-51.
- González, R. (1993) El alcoholismo y su atención específica: una proposición para el Tercer Mundo. (pp. 16-24). La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
- Goodman, L., Gilman, A. (2011) Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12va ed. (pp. 629-648) *The McGraw-Hill Companies Inc.*
- Guerra de Andrade, A., Garcia de Oliveira, L. (2010). Principales consecuencias a largo plazo debidas al consumo moderado de alcohol.
- Guyton, A. C., Hall, J. E. (2016) *Textbook of Medical Physiology.* 13ra ed. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Herrera, P. M., Avilés, K.B. (2000) Factores familiares de riesgo en el intento suicida. *Rev Cubana Med Gen Integr.* 16(2), 134-137.
- Ministerio de la Protección Social, República de Colombia (2013). *Hacia una estrategia de respuesta integral al consumo de alcohol en Colombia: Simposio: El exceso de alcohol y el consumo moderado, implicaciones para la salud.* Disponible en: <http://www.udea.edu.co>.
- Murray, C. J. L., Lopez, A. D. (2006). *The global burden of disease.* (Ed.) Cambridge: Harvard University Press.
- Organización Mundial de la Salud (2011). Alcohol. Nota descriptiva No. 349. Organización Mundial de la Salud (2005). Guía internacional para vigilar el consumo de alcohol y sus consecuencias sanitarias.
- Pascual, F., Guardia, J (2012). Monografía sobre el alcoholismo. 121-132.
- Pilatti, A., Castillo, D., Martínez, M.V., Acuña, I. y Godoy, J. C., Brussino, S. (2010). Identificación de patrones de consumo de alcohol en adolescentes mediante análisis de clases latentes. *Quaderns De Psicologia.* 12(1), 59-73.
- Pritchett-Corning, K. R., Girod, A., Avellaneda, G., Fritz, P. E., Chou, S., Brown, M. J. (2011). *Manual de signos clínicos en roedores y conejos.* Charles River Laboratories. 1a Edición.
- Reid, A. G., Lingford-Hughes, A. R., Canela, L. M., Kalivas, P. W. (2012). Substance abuse disorders. *Handb Clin Neurol.* 106(1), 419-31.
- Room, R., Babor, T., Rehm, J. (2005). Alcohol and public health. *Lancet*, 365: 519-30.
- Salum, C., Morato, S., Roque-da-Silva, A. C. (2000). Anxiety-like behavior in rats: a computational model. *Neural Networks.* 13(1), 21-9
- Trezza, V., Damsteegt, R., Manduca, A., Petrosino, S., Van Kerkhof, L. W., Pasterkamp, R. J., et al. (2012). Endocannabinoids in amygdala and nucleus accumbens mediate social play reward in adolescent rats. *J Neurosci.* 32(43):14, 899-908.
- Weaver, J., Fillmore, M.T. (2012). Comparison of alcohol impairment of behavioral and attentional inhibition. *Drug Alcohol Depend.* 126, 176-182.
- World Health Organization (2018). *Global Status Report on Alcohol.*