

## Aprendizaje durante la ontogenia temprana: implicancias del sistema opiáceo en la modulación de aprendizajes mediados por el etanol

**Resumen.** Fetos e infantes altriciales procesan atributos sensoriales y/o tóxicos etílicos. Los efectos reforzantes de esta droga estarían mediados por el sistema opiáceo. Se analizan los mecanismos intervinientes en la generación de memorias prenatales y/o infantiles, mediadas por el etanol y sus efectos sobre la autoadministración etílica en ratas neonato e infantes. Se realizaron manipulaciones prenatales con alcohol en combinación con un antagonista opiáceo. Los neonatos fueron evaluados en un esquema de condicionamiento instrumental donde etanol obraba como reforzador. Otro grupo fue evaluado durante la infancia en términos de consumo etílico. Los neonatos con experiencia prenatal etílica, y reforzados con etanol, respondieron significativamente más y exhibieron una resistencia a la extinción mayor que los grupos controles. Aquellos neonatos prenatalmente expuestos al etanol junto con un antagonista opiáceo no selectivo, no mostraron este aumento en la respuesta instrumental al etanol. Los niveles de consumo etílico infantil aumentaron significativamente si los sujetos tenían experiencia prenatal con la droga, excepto que sus madres hubieran sido administradas prenatalmente también con el antagonista opiáceo. Experiencias etílicas prenatales promueven la respuesta instrumental en neonatos, reforzada por etanol. A su vez, el sistema opiáceo endógeno está involucrado en los procesos de adquisición de esta memoria prenatal. Por otra parte, la presencia de la droga en el ambiente prenatal promueve el consumo infantil de la misma, así como también el sistema opiáceo está implicado en la adquisición y la expresión a largo plazo de esta memoria. En conjunto, el sistema opiáceo endógeno participa en la adquisición de memorias prenatales etílicas, modulando la respuesta posterior a cualidades reforzantes de la droga, tanto en neonatos como en ratas infantes.

**Abstract.** The main goal of this study was to analyze the involvement of the opioid system in the acquisition and expression of prenatal and infantile ethanol-related memories. We evaluated how prenatal experiences modulate ethanol self-administration in newborn rats, and infantile ingestion of the drug. During GDs 17-20, dams received ethanol or water and immediately after they receive a non-selective opioid antagonist (naloxone) or saline injection; a fifth prenatal group received naloxone 20-min before ethanol administration. On PD 1, pups were evaluated in an operant learning procedure. Neonates were trained to obtain a given reward (milk or 3% EtOH v/v). Yoked controls received the reinforcer each time the experimental pup was rewarded. During the extinction session, reinforcer was not available. During PDs14-15, were evaluated in an intake test with infusions of ethanol (5%) or water. At PD 1, pups rapidly acquired an operant response to gain access to milk. Neonates prenatal treated with ethanol, and immediately after exposed to maternal naloxone or saline injection, increased operant responses, to gain access to ethanol. This profile was similar during acquisition and extinction session. Intake during infancy showed that pups prenatal exposed to ethanol and then injected with naloxone or saline, consumed higher levels of ethanol, in comparison with the remaining groups. Prenatal naloxone treatment, injected before ethanol administration, significantly reduced ethanol consumption during infancy. Ethanol prenatal experiences promote neonatal operant learning, supported by reinforcing attributes of the drug. The endogenous opioid system is involved in the acquisition of this prenatal ethanol-related memory, particularly when this system is blocked 20-min before ethanol presentation. Results from infantile intake test indicate long-term retention of a prenatal ethanol-related memory. Finally, it seems clear that the endogenous opioid system is involved in the acquisition of prenatal ethanol memories, and this experience modulates reinforcing attributes of the drug in neonate and infant rats.

### Introducción

Experiencias tempranas con el etanol resultan en un marcado incremento en la afinidad por la búsqueda y/o consumo posterior de la droga, tanto en humanos como en modelos animales (Chotro et al., 2007; Molina et al., 2007; Spear and Molina, 2005). Si se considera que las experiencias tempranas

**Abate, Paula\* y Miranda Morales, Sebastián\***

\*Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC-CONICET); Facultad de Psicología, UNC

**Grupo de investigación al que pertenece el trabajo:**  
Laboratorio de Alcohol, Ontogenia y Aprendizaje.

**Palabras claves:**  
Aprendizaje, Ontogenia temprano, Sistema opiáceo, Reforzamiento etílico

**Keywords:**  
Learning, Early ontogeny, Opioid system, Ethanol reinforcement

**Enviar correspondencia a:**  
Paula Abate  
E-mail: pabate@immf.uncor.edu

con el etanol, pueden promover el consumo posterior de la droga -e incluso, el abuso de la misma en humanos (Baer et al., 1998; 2003; Spear and Molina, 2005; Yates et al., 1998)-, conocer entonces los mecanismos responsables de estos efectos, observados durante la temprana infancia, cobra relevancia.

Estudios realizados con neonatos de rata, han observado que éstos son altamente sensibles a las propiedades reforzantes de la droga. Asimismo, presentan una clara predisposición a consumir concentraciones bajas o moderadas de etanol, sin la necesidad de realizar previamente procedimientos de iniciación al consumo (Cheslock et al., 2001; Petrov et al., 2001; Varlinskaya et al., 1999).

Un posible mecanismo por el cual experiencias tempranas con el etanol resultan en un incremento en los niveles de consumo de la droga, sería el aprendizaje asociativo (Pautassi et al., 2009). Distintos trabajos indican que el organismo joven puede asociar las consecuencias reforzantes del etanol con estímulos presentes durante la presentación de la droga (Abate et al., 2008; Chotro et al., 2007, Spear and Molina, 2005). Este proceso podría resultar en una mayor preferencia por la droga y/o por los estímulos que predicen sus consecuencias positivas. En este sentido, cuando neonatos de rata recibieron una pequeña dosis de etanol (administración i.p.; 0.125-0.25 g/kg Petrov et al., 2003; Nizhnikov et al., 2006a) en contingencia con un pezón artificial que liberaba agua (fluido no reforzante), exhibieron posteriormente un marcado aumento en los tiempos de prensión a este dispositivo artificial. Adicionalmente, se observó una marcada preferencia hacia este dispositivo cuando el mismo fue previamente asociado a una inyección de etanol, directamente a nivel de sistema nervioso central (Nizhnikov et al., 2007).

Un grupo abundante de evidencias, involucra al sistema opiáceo endógeno (péptidos y receptores opiáceos) con los procesos de recompensa y reforzamiento. Independientemente del sitio de acción inicial que poseen distintas sustancias neuroactivas (morfina, nicotina, anfetamina e incluso etanol), un mecanismo común estaría dado por el incremento en la concentración extracelular de dopamina a nivel de núcleo accumbens, que resulta como consecuencia de la acción de estas drogas a nivel de receptores opiáceos (Gianoulakis, 2009). Durante las primeras etapas del desarrollo ontogénico, si bien el sistema opiáceo no ha completado aún su madurez, algunos subtipos de receptores  $\mu$  y  $\kappa$  son funcionales y capaces de modular aprendizajes, incluso, durante el último periodo gestacional de la rata (Arnold et al, 1993; Robinson et al., 1993; Smotherman et al., 1993). El sistema opiáceo parece tener un rol facilitador en la adquisición de preferencias olfatorias y en la asociación condicionada entre el pezón materno y la liberación de leche. Ambos procesos son altamente relevantes para el normal desarrollo de la interacción madre-cría, interacción social que es crítica para la supervivencia (Roth & Sullivan, 2003). En lo que respecta particularmente a aprendizajes prenatales mediados por el etanol, el sistema opiáceo jugaría un rol importante tanto en el incremento del consumo infantil, como en la expresión de respuestas positivas hacia las propiedades gustativas de la droga (Arias & Chotro, 2005; 2006; Chotro & Arias, 2003). En este sentido, a través de un modelo de condicionamiento clásico neonatal, se ha observado que los efectos reforzantes étlicos también

estarían mediados por la activación de receptores opiáceos –particularmente,  $\mu$  y  $\kappa$ - (Nizhnikov et al., 2006b).

En términos generales, los estudios que se han mencionado hasta ahora emplean técnicas de condicionamiento clásico para evaluar aspectos motivacionales del etanol. Estas técnicas son realmente valiosas por el poder de análisis que presentan. Permiten realizar variaciones sistemáticas en términos de dosis, tiempos postadministración e intensidad de los estímulos (Rescorla, 1988). Sin embargo, no permiten modelar el patrón consumo humano, que implica la auto-administración de la droga. Para esto, se han desarrollado modelos animales de autoadministración mediante el uso de diversos esquemas de condicionamiento instrumental. Estos procedimientos operantes son importantes para conocer los comportamientos de búsqueda asociados a las disponibilidad de la droga y el verdadero patrón de auto-administración de la misma (Pautassi et al., 2009). No obstante, los modelos de condicionamiento operante utilizados con animales adultos, no pueden ser directamente aplicados en ratas infantiles. Esto se atribuye a la rapidez con que ocurren cambios madurativos, así como las limitadas habilidades motoras y sensoriales, durante las primeras etapas del desarrollo ontogénico. Recientemente, se han desarrollado técnicas de condicionamiento instrumental adaptadas a las capacidades motoras de neonatos (Pautassi et al., 2009) y de ratas infantiles (Pautassi et al., 2008; Ponce et al., 2008) para analizar las propiedades reforzantes el etanol.

Un estudio reciente ha sido conducido para evaluar la participación del sistema opiáceo en los mecanismos de adquisición de una memoria etílica prenatal y cómo esta experiencia fetal modula patrones de búsqueda y auto-administración de la droga en el neonato de rata. Para ello, ratas hembra fueron administradas con etanol y con un antagonista no específico de receptores opiáceos (naloxona), durante los últimos cuatro días gestacionales. Al día postnatal 1, los neonatos fueron evaluados mediante un esquema de condicionamiento instrumental, frente a la estimulación intraoral de agua, leche o etanol al 3% o al 0.22%. En este estudio no se observaron cambios en la respuesta instrumental en función de la experiencia prenatal con etanol y/o con naloxona. Sin embargo, cuando se evaluaron neonatos sin ningún tipo de manipulación prenatal, los mismos mostraron significativamente mayores niveles de respuesta operante, en relación al grupo control no apareado cuando fueron reforzados con leche o con etanol al 0.22%. Asimismo, durante la fase de extinción, tanto los animales previamente reforzados con leche y ambas soluciones etílicas, desplegaron mayores niveles de respuesta (Miranda Morales et al., 2007).

En este primer experimento no fue posible entonces, observar cambios en la respuesta instrumental en función de la experiencia prenatal con etanol y/o con naloxona. Es por ello que posteriormente se condujo un segundo estudio en el que se generaron las siguientes condiciones prenatales: hembras preñadas administradas con etanol e inmediatamente después inyectadas con naloxona; hembras administradas con la droga e inyectadas con agua; otros dos grupos controles recibieron una administración de agua y fueron inyectados con naloxona o agua, respectivamente. En

este experimento, se sumó un quinto grupo de hembras a las cuales se les inyectó la naloxona 20 minutos previos a la administración etflica, durante los DGs 17-20. Este quinto grupo prenatal fue incorporado de acuerdo a bibliografía que indica que, farmacológicamente, la naloxona alcanza valores máximos de concentración durante los 60 y 120 minutos post-administración (Goodman&Gilman, 1996). Por otra parte, se sabe que el etanol alcanza niveles máximos de concentración entre los 30 a 60 minutos postadministración (Abate et al., 2000; Domínguez et al., 1996). Posiblemente entonces, sea necesario que el antagonista sea presentado previo a la administración etflica para ejercer su efecto silenciador del sistema opiáceo. Estos neonatos fueron evaluados al DP 1 en el esquema de condicionamiento operante y se utilizaron como reforzadores, etanol (3% v/v) o leche. Al igual que en el estudio previo, se incluyeron una sesión de evaluación y una sesión de extinción (Miranda Morales et al., enviado a publicación).

Bajo estas condiciones experimentales se observó que, tanto durante la fase de adquisición como la fase de extinción, los neonatos del grupo apareado entrenados para recibir leche como reforzador incrementaron sensiblemente el número total de respuestas operantes, independientemente de la experiencia prenatal recibida. Sin embargo, cuando el etanol fue utilizado como reforzador de la conducta, se observó que aquellos neonatos prenatalmente expuestos al etanol, con excepción del grupo que recibió la naloxona 20 min. previos a la intoxicación etflica materno-fetal, aumentaron significativamente los niveles de respuesta instrumental. Este efecto fue observado tanto durante la fase de adquisición como la sesión de extinción.

Este resultado sugiere que una memoria etflica prenatal promueve el aumento en los niveles de respuesta instrumental cuando el etanol actúa como reforzador, durante las primeras 24 horas de vida postnatal. Por otra parte, cuando el sistema opiáceo es silenciado utilizando un antagonista no selectivo, este aumento en la respuesta operante no se observa. Lo que indica que este sistema neurobiológico estaría modulando aspectos relacionados con la adquisición de experiencias prenatales con el etanol (Figuras 1 y 2).

Por otra parte, crías representativas de los 5 grupos prenatales fueron evaluadas en términos de niveles de consumo etflico infantil (DPs 14 y 15). Este experimento indicó que aquellas crías prenatalmente expuestas al etanol (independientemente si, posteriormente fueron administradas con naloxona o agua) consumieron significativamente mayores niveles de una solución etflica (5 % v/v), en relación a crías cuyas madres fueron administradas prenatalmente con agua. En concordancia con los resultados observados en neonatos, crías derivadas de madres prenatalmente administradas con etanol, pero que 20 minutos antes recibieron una inyección de naloxona, no mostraron este incremento en los niveles de consumo etflico (Figura 3). En conjunto, estos resultados estarían indicando que, efectivamente, si el sistema opiáceo es silenciado minutos previos a la administración prenatal etflica, no es posible observar respuestas positivas hacia la droga, ya sea en un esquema de condicionamiento

instrumental neonatal, o bien, en términos de consumo étlico infantil (Miranda Morales et al., enviado a publicación).

Se condujeron luego, experimentos para determinar el valor reforzante del etanol, durante la infancia de la rata (DPs 14-18). Para ello, los estudios desarrollados se valieron del esquema de condicionamiento instrumental infantil recientemente generado por Pautassi et al (2008) y Ponce et al (2008). Este esquema de aprendizaje operante resulta sensible para evaluar los atributos reforzantes del etanol y la posible implicancia del sistema opiáceo, en la modulación de estas experiencias infantiles con la droga. Se ha desarrollado una serie experimental la cual ha intentado responder, de manera secuencial, los siguientes interrogantes: i) ¿Es posible que la rata infante se autoadministrarse etanol?; ii) Las propiedades reforzantes del etanol, en un esquema de autoadministración infantil de la droga, ¿están moduladas por el sistema opiáceo? Estudios previos indican que ratas infantiles son capaces aprender rápidamente (DPs 14-18) una respuesta instrumental (conducta de hociqueo ó nose-spoke), para recibir directamente en la cavidad oral una solución azucarada (sacarosa 5% p/v; Culleré et al., 2009). Asimismo, infantes de estas edades aprenden a realizar la conducta de hociqueo, cuando reciben como refuerzo una solución étlica. En este estudio fue necesario pre-exponer a la droga (DP 13) para observar el efecto reforzante de la misma (Ponce et al., 2008).

Para el primer experimento de esta serie se utilizaron crías de 14 días de edad (6 crías por camada). Adicionalmente, se utilizó una cría más por camada para medir niveles de alcohol en sangre. Durante los DPs 14, 15, 16 y 17 los infantes fueron entrenados en un esquema de condicionamiento instrumental (razón fija 1), para recibir diferentes reforzadores. Al DP 18, las crías fueron evaluadas en un ensayo de extinción en la cual, el reforzador estaba ausente. Al momento de comenzar la evaluación, se dividió a los animales en parejas (excepto unos que formaron un trío) y, cada uno de los 3 grupos así formados fue evaluado con un reforzador diferente. Los reforzadores utilizados fueron: una solución de sacarosa al 5% p/v [SACAROSA]; agua destilada [AGUA]; el grupo formado por tres animales fue reforzado por una solución de etanol equivalente a 3.75 % v/v [ETANOL]. Para cada reforzador, se trabajó con un sujeto experimental (apareado [P]) y un control (acoplado [Y]). El tercer animal empleado en el grupo ETANOL, al terminar el entrenamiento del DP16, fue sacrificado para medir los niveles de etanol en sangre.

Durante el entrenamiento, las crías se entrenaron en cajas operantes individuales. Cada caja presenta en una de sus paredes laterales un orificio en el que se encontraba adherida una placa sensible al tacto que genera una señal visual (luz roja) y auditiva, cada vez que es presionada. La conducta natural del repertorio del infante reforzada fue el acto de hociqueo (conducta típica de exploración del ambiente), mediante la cual el animal presionaba con el hocico la placa. Se observó también que, durante los días subsiguientes de entrenamiento, los animales aprenden a utilizar los miembros anteriores para presionar la placa y ser reforzados. Entre los DPs 14-17, las crías fueron evaluadas en un ensayo diario de condicionamiento instrumental. Los infantes apareados fueron entrenados en la

conducta de hociqueo para recibir como recompensa, cada vez que el sujeto tocara la placa, un pulso (5µl) de un reforzador determinado, a través de una bomba de infusión conectada a la cánula de la mejilla del animal (duración del pulso: 1.5 s). Paralelamente, el sujeto acoplado recibió una infusión intraoral del reforzador en función de la conducta desplegada por el sujeto apareado, e independientemente de su propio patrón conductual. La inclusión de este grupo responde a la necesidad de controlar potenciales efectos activadores de la conducta que resultan independientes del esquema de aprendizaje instrumental. Al DP18 los sujetos fueron evaluados en una sesión de extinción en ausencia del reforzador previamente apareado a su conducta instrumental.

Se tomó como variables dependientes la frecuencia total de respuestas operantes desplegadas por los sujetos, durante los 15 min de evaluación, en cada día. Además se consideró como variable estimada del consumo, el porcentaje de peso ganado (%BWG) durante cada sesión de evaluación. Una de las crías reforzada con etanol, durante las sesiones los días 14, 15 y 16, fue utilizada para medir los niveles de etanol en sangre, en función de lo consumido al DP16. Las muestras fueron tomadas a los 5 min post-evaluación. Los niveles de alcohol en sangre fueron determinados por medio de cromatografía de fase gaseosa.

Los resultados obtenidos en este experimento indicaron que, independientemente del día de entrenamiento, los sujetos reforzados con sacarosa -en contingencia con su conducta, (P)-, realizaron un número mayor de respuestas que las crías correspondientes a los demás grupos. Al mismo tiempo, los sujetos P que trabajaron para recibir etanol desplegaron un número de respuestas significativamente mayor que los sujetos P reforzados con agua. Cabe mencionar que todos los sujetos se diferenciaron significativamente en el número de respuestas realizadas por sus respectivos controles (Figura 4). Durante la fase de extinción -DP 18-, los sujetos P reforzados previamente con sacarosa o etanol, realizaron un número significativamente mayor de respuestas operantes que sus controles Y, y que los reforzados previamente con agua. Además, los sujetos P que anteriormente trabajaron por agua, no se diferenciaron significativamente de sus controles Y (Figura 4).

En lo que respecta a los niveles de consumo, en función del reforzador, no se observaron cambios en esta variable durante el DP14. Durante los DPs 15 y 16 se observó que, independientemente de la condición de los sujetos, los animales infundidos con sacarosa consumieron significativamente un mayor volumen del reforzador, que los infundidos con agua; los niveles de consumo de etanol no difirieron significativamente de ninguno de los otros dos reforzadores. Para el último día de entrenamiento (DP17), los animales infundidos con sacarosa consumieron significativamente un mayor volumen del reforzador, que los infundidos con agua o con etanol. Los niveles de alcohol en sangre obtenidos al finalizar el entrenamiento del DP 16, se promediaron y se calculó su desviación estándar y el error. Los niveles de etanol en sangre para estos sujetos fue de  $16.97 \pm 2.23$  mg%.

Estos resultados indican que, efectivamente, una solución azucarada es un potente reforzador positivo y organismos infantiles rápidamente aprenden una conducta instrumental para autoadministrarse este reforzador. A su vez, durante la fase de extinción, las crías expresan una tasa de respuesta sostenida, en comparación con sus controles acoplados. Aquellos sujetos que recibieron como refuerzo etanol, si bien no desplegaron niveles de respuesta operante equiparables a los alcanzados ante la sacarosa, mostraron una tasa de respuesta instrumental mayor a la alcanzada por las crías que recibieron agua como refuerzo. Asimismo, esta respuesta se mantuvo durante la fase de extinción. Este dato cobra relevancia si se tiene en cuenta que es una de las primeras evidencias que crías de rata, sin experiencia previa con la droga, se auto-administran etanol y expresan una elevada tasa de búsqueda hacia los atributos reforzantes etílicos.

Los perfiles de consumo, de los distintos reforzadores, son similares al patrón de respuestas operantes. A su vez, y como era esperable, el consumo fue similar independientemente de la condición de aprendizaje de las crías (P o Y). Los niveles de etanol en sangre encontrados al DP 16 (~ 17 mg%) son similares a los descritos en la bibliografía, como valores reforzantes en esquemas de autoadministración durante la temprana ontogenia (Bordner et al., 2008).

De acuerdo a estos resultados el estudio siguiente se condujo con el objeto de establecer si los aspectos reforzantes, tanto del etanol como de la sacarosa están modulados por el sistema opiáceo. Para esto se realizó un esquema experimental similar al descrito previamente. Durante los DPs 14-17 las crías fueron entrenadas para recibir un pulso directamente en la boca de sacarosa o etanol (en las concentraciones previamente descriptas), en contingencia con la ejecución de la conducta instrumental. En este caso también, se entrenaron simultáneamente un sujeto apareado y uno acoplado. Para evaluar la posible participación del sistema opiáceo en la modulación de los aspectos reforzantes etílicos, durante los DPs 16 y 17 (6 horas previas al evento de condicionamiento instrumental) las crías tuvieron la oportunidad de ser re-expuestas a mínimas cantidades de etanol o sacarosa cuando previamente recibieron un inyección subcutánea de naloxona (10 mg/kg), o salina. Al DP 18 las crías fueron evaluadas en un ensayo de extinción. Este evento de re-exposición, en el cual se presenta el antagonista opiáceo, fue incorporado para evitar que posibles alteraciones en el perfil locomotor, como consecuencia de la administración del antagonista opiáceo, interfieran en la emisión de la conducta instrumental requerida. El esquema ilustra el protocolo seguido en este experimento.

En este experimento se observó que, al igual que lo ocurrido en el experimento previo, las crías rápidamente adquieren una respuesta instrumental cuando son reforzadas con sacarosa o etanol (DPs 14 y 15). Es decir que los sujetos cuya conducta de hociqueo fue reforzada con uno de estos reforzadores, aumentaron los niveles de respuesta en comparación con sus controles acoplados.

Durante los DPs 16-17, aquellas crías reforzadas con etanol (grupo apareado) que fueron re-expuestas a la droga, bajo los efectos del antagonista opiáceo, desplegaron menores niveles de respuesta instrumental que los sujetos controles. Este resultado indica que, efectivamente, el sistema

opiáceo estaría modulando los aspectos reforzantes etílicos observados en un esquema de autoadministración infantil de la droga (Figura 5). En lo que respecta a sacarosa, si bien se observó un perfil de respuesta similar al descripto para etanol. El análisis estadístico no arrojó valores de significación indicativos que el antagonista opiáceo esté ejerciendo algún efecto en relación a los atributos reforzantes de esta solución azucarada (Figura 6). Durante la fase de extinción, ya sea que las crías hayan sido reforzadas con etanol o sacarosa, únicamente se observó un efecto de la condición de aprendizaje. Esto es, que los sujetos cuya conducta había sido asociada a uno u otro reforzador, desplegaron mayores niveles de respuesta con relación a sus controles no acoplados. Los resultados de estos estudios indican que las propiedades reforzantes etílicas pueden ser observadas en crías de dos semanas que no tienen ningún tipo de experiencia previa con la droga. Sumado a este resultado y de mayor importancia a los fines de la hipótesis de trabajo que guía a esta línea de investigación, el sistema opiáceo estaría modulando aspectos reforzantes etílicos en estos esquemas de condicionamiento instrumental infantil.

Este conjunto de evidencias indican entonces que, tanto durante la gestación tardía como durante la infancia temprana de la rata, el etanol es capaz de actuar como un potente reforzador positivo en esquemas de autoadministración de concentraciones bajas de la droga. A partir de este grupo de resultados se menciona, muy brevemente, a continuación el plan de trabajos propuesto.

Como *objetivo general* de trabajo se propone analizar los mecanismos responsables de la adquisición, expresión y persistencia de experiencias tempranas con el etanol. A partir de ello, indagar acerca de los efectos sobre comportamientos de búsqueda y autoadministración etílica en neonatos e infantes de rata. En relación a esto, se pretende analizar la participación del sistema opiáceo en los mecanismos de adquisición y/o consolidación de estas memorias, generadas como consecuencia de la intoxicación etílica.

Como *objetivos específicos* se prevé analizar de qué manera el sistema opiáceo endógeno está implicado en la generación y/o expresión de memorias etílicas generadas por la exposición durante la gestación tardía, o bien, durante las primeras semanas de vida postnatal de la rata. En el *primer bloque experimental* propuesto se generará una experiencia etílica fetal y luego se evaluarán las crías al DP 0, en un esquema de pezón artificial, o bien, durante la infancia (días postnatales -DPs- 14 al 18), a través de procedimientos de condicionamiento instrumental. El *segundo bloque experimental*, implica estudios inherentes a experiencias del infante con el etanol y el análisis de la participación del sistema opiáceo, en la modulación de las mismas. Particularmente, en este bloque de experimentos se intentará establecer la participación del sistema opiáceo en el patrón infantil de autoadministración etílica. Analizaremos si este sistema participa tanto en los mecanismos consumatorios (fase de adquisición: el infante es reforzado al realizar la respuesta instrumental), como en los de búsqueda (fase de extinción: ausencia de refuerzo) de la droga.



*\*Tratamiento prenatal con etanol y antagonistas no selectivos del sistema opiáceo.* Se emplearán ratas nacidas y criadas en el bioterio del Instituto M. M. Ferreyra. Durante los DGs 17-20 ratas preñadas recibirán una inyección subcutánea de naloxona (Sigma-Aldrich) equivalente a una dosis de 10 mg/kg, o un volumen equivalente de solución salina. Trascurridos 20 minutos, las hembras recibirán una administración intragástrica (i.g.) de 0.015 ml/g de peso corporal de una solución etílica al 16.8 % v/v (2.0 g de etanol por kg de peso corporal), o agua. En aquellos casos en los que se analice la participación del sistema opiáceo durante etapas infantiles, la exposición al antagonista se realizará mediante la administración subcutánea de la droga, directamente a la rata infante.

*\*Condicionamiento instrumental en infantes.* Los sujetos serán evaluados en este esquema de condicionamiento, durante los DPs 14 al 18. Previo a la evaluación correspondiente, se implantará a los sujetos una cánula intraoral, lo que posibilitará la liberación de diferentes fluidos, directamente en el interior de la cavidad bucal de los sujetos. Los infantes serán entrenados bajo un esquema de conducta instrumental (programa de reforzamiento continuo; razón fija igual a uno -RF=1-). Durante los DPs 14 al 17, los sujetos recibirán quince minutos diarios de condicionamiento. Cada vez que los sujetos introduzcan sus cabezas en un orificio ubicado en la pared de la caja de evaluación (nose-poke), serán recompensados con la administración de solución reforzadora durante 1,5 segundos. Como reforzadores podrán emplearse soluciones tales como etanol o sacarosa. La variable dependiente bajo análisis será la frecuencia absoluta de veces que la cría introduce la cabeza dentro del orificio. Durante el DP 18, los animales serán colocados en condiciones similares a las previamente mencionadas, pero no recibirán el reforzador al momento de ejecutar la conducta instrumental. Se trabajará con dos grupos de sujetos: el grupo apareado recibirá el reforzador de manera contingente a la ejecución de la conducta instrumental. Paralelamente, otro sujeto recibirá una infusión intraoral del reforzador, en función de la conducta desplegada por el sujeto experimental e independientemente de su patrón conductual (grupo acoplado). La inclusión a este grupo responde a la necesidad de controlar potenciales efectos farmacológicos inespecíficos como así también la expresión de actividad espontánea inespecífica.

*\*Diseños Experimentales y análisis estadístico de los datos.* Los experimentos propuestos son concebidos utilizando diseños factoriales. Este tipo de diseños, en conjunto con la naturaleza de las escalas de medida utilizadas normalmente, permiten el empleo de ANOVAs simples y/o mixtos, para el análisis inferencial de los datos. Los efectos principales, así como las interacciones que resulten significativas serán analizados con pruebas post-hoc pertinentes (test LSD de Fisher, Newman-Keuls, Tukey, etc.).

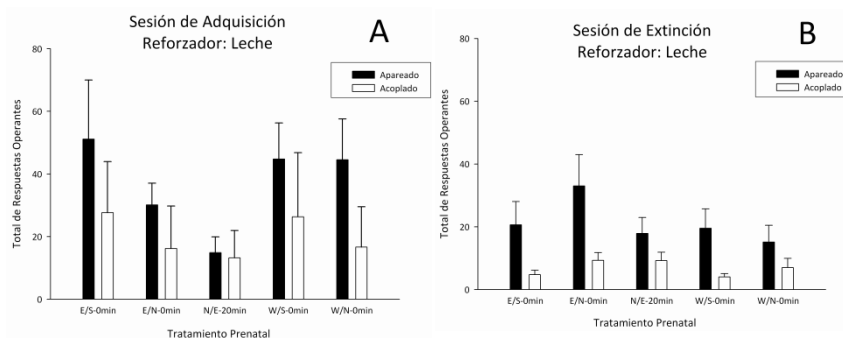
*\*Diseño de experimentos específicos: **Bloque experimental A, Experimento 1:*** Se realizarán los tratamientos prenatales mencionados y crías representativas de cada una de las condiciones prenatales, serán evaluadas durante los DPs 14-18, en un esquema de condicionamiento instrumental infantil. Este esquema consiste en una etapa de entrenamiento durante los días 14, 15, 16 y 17. Al DP

18, los sujetos son evaluados en una sesión de extinción (ausencia del reforzador). Durante la fase de entrenamiento se empleará como refuerzo la liberación intraoral de una de las siguientes soluciones: etanol (3.75% v/v) sacarosa (5% p/v), o agua. En resumen, este experimento tiene como propósitos: i) establecer el poder reforzante del etanol durante la temprana ontogenia, cuando los infantes son desafiados en un modelo de autoadministración etílica; ii) analizar la posibilidad que experiencias fetales con la droga interactúen con el procesamiento infantil del alcohol, promoviendo o inhibiendo, el perfil de autoadministración etílico; iii) determinar si el sistema opiáceo modula la experiencia etílica generada prenatalmente y si esto es observable, incluso, durante la segunda semana de vida postnatal, tal como se observa en el neonato (Miranda Morales et al, enviado a publicación).

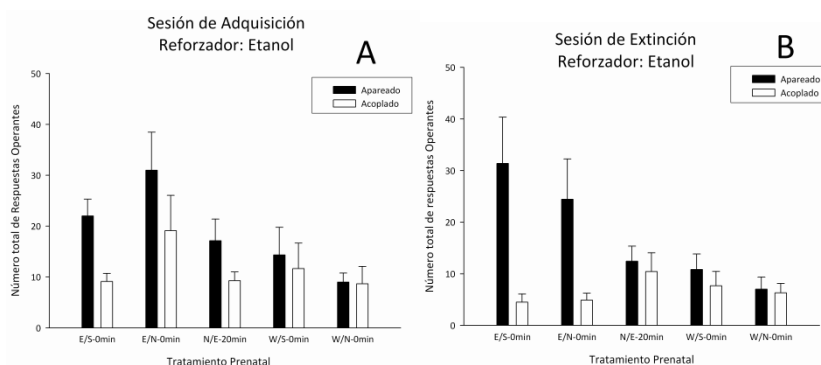
**Experimento 2:** este experimento está propuesto con el objeto de comenzar a estudiar con mayor nivel de especificidad, la modulación opioidérgica de estas memorias etílicas prenatales. Se propone presentar, directamente a nivel de sistema nervioso central, el etanol y un antagonista opiáceo in útero. Para ello, las manipulaciones prenatales se realizarán durante el DG 20. Previamente, ha sido observado que una única administración prenatal etílica, es suficiente para promover posteriores cambios en la respuesta hacia la droga, durante la etapa neonatal (Abate et al., 2008). Mediante procedimientos de cesárea se expondrán ambos cuernos uterinos conteniendo los fetos. En este experimento, la unidad de análisis es cada uno de los sujetos. Por lo tanto, los fetos ubicados en uno de los cuernos maternos, serán inyectados con etanol (100 mg%) y el antagonista opiáceo (vehiculizado en buffer PB 0.1M), directamente vía intracerebral. Los sujetos ubicados en el cuerno uterino adyacente (controles), recibirán la inyección de etanol y vehículo. Se empleará otro grupo de hembras en las cuales, los fetos serán inyectados con agua y, los ubicados en uno de los cuernos recibirán también el antagonista opiáceo, mientras que los fetos del otro cuerno recibirán sólo PB 0.1M. Luego de este procedimiento (20 minutos), los fetos serán reubicados en su posición original y se suturará el vientre materno. Transcurridas 24 horas, los fetos serán extraídos vía cesárea y evaluados mediante la técnica de pezón artificial (Nizhnikov et al., 2006a; 2006b; 2007; Petrov et al., 2003). Esta evaluación consiste en generar un condicionamiento positivo entre la presentación de un pezón artificial que libera agua (este dispositivo no resulta reforzante por sí mismo por lo que es utilizado en este esquema de condicionamiento como estímulo condicionado) y la administración de una dosis mínima de etanol (0.25 g/kg, como estímulo incondicionado). Se espera observar la expresión de una posible respuesta exacerbada hacia el pezón artificial, como consecuencia de la asociación de este dispositivo y los efectos reforzantes etílicos, en función de la experiencia prenatal con la droga. Asimismo, esperamos que dicha respuesta no se observe en aquellos sujetos tratados, prenatalmente, con el antagonista opiáceo.

**Bloque experimental B:** Para este bloque, se plantean estudios tendientes a continuar analizando la participación del sistema opiáceo en la adquisición, y/o expresión de aprendizajes infantiles mediados por las propiedades reforzantes del etanol. El **Experimento 3**, tiene como

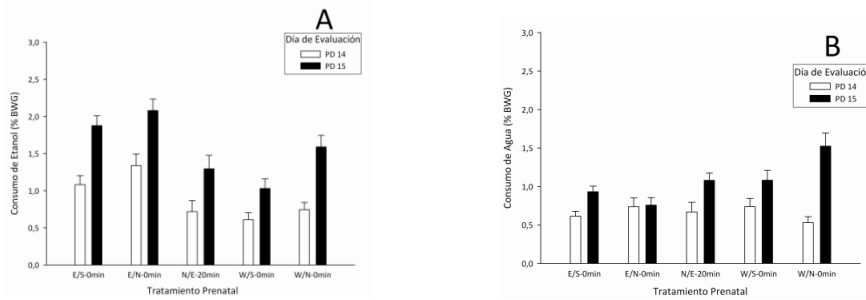
propósito determinar si el sistema opiáceo participa en los mecanismos consumatorios y/o en los de búsqueda las propiedades reforzantes del etanol. Hay estudios que sugieren que los mecanismos que conducen a las respuestas de búsqueda y de consumo –o autoadministración- de sustancias, son diferentes (Berridge 2000; 2003). En este experimento entonces, las crías serán entrenadas para autoadministrarse etanol (DPs 14-17). Al DP 18, previo al ensayo de evaluación –o extinción-, los sujetos serán re-expuestos a mínimas cantidades de etanol, bajo los efectos del antagonista opiáceo, naloxona. En este bloque experimental, se espera determinar la participación del sistema opioide, en los mecanismos que intervienen en el procesamiento de las propiedades reforzantes étlicas, durante la infancia de la rata. De esta manera, aportar información acerca de los procesos que subyacen a este patrón de respuesta infantil hacia la droga, que promueve la preferencia étlica en etapas posteriores del desarrollo ontogénico.



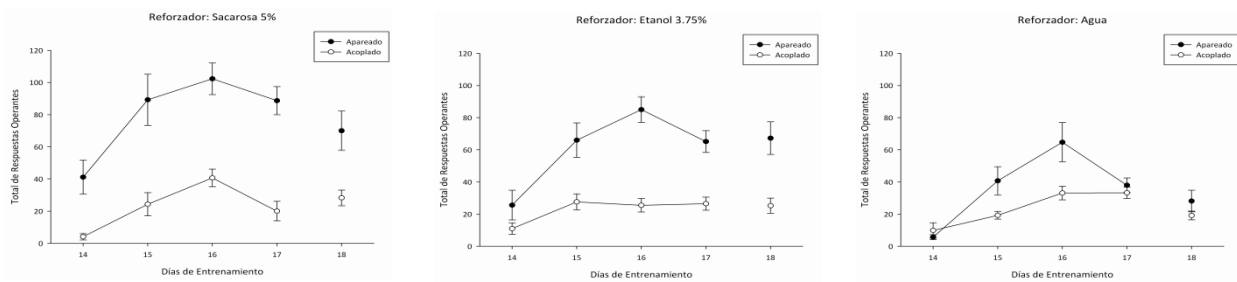
**Figura 1.** Total de respuestas operantes (contactos con el sensor) durante la sesión de Adquisición (panel A) y Extinción (panel B) cuando leche fue utilizado como reforzador, en función del tratamiento prenatal (Etanol–Salina [E/S-0 min], Etanol–Naloxona [E/N-0 min], Agua–Salina [W/S-0 min], Agua–Naloxona [W/N-0 min] y Naloxona–Etanol [N/E-20 min] y condición de aprendizaje (Apareado y Acoplado). Las líneas verticales representan el error de la media.



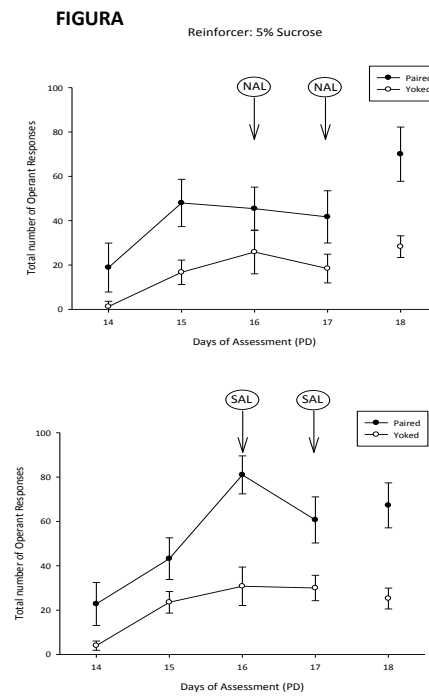
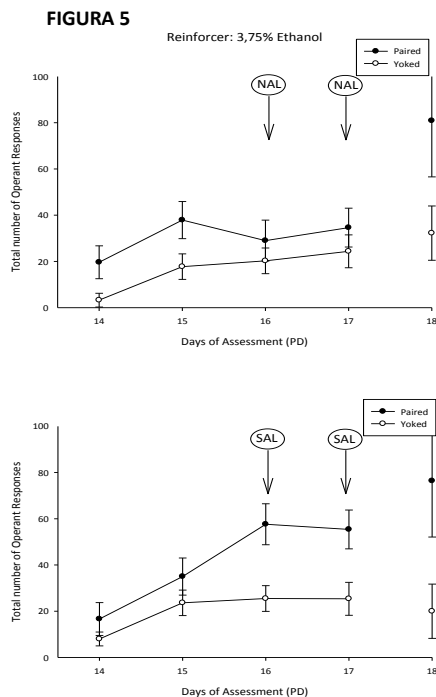
**FIGURA 2.** Total de respuestas operantes (contactos con el sensor) durante la sesión de Adquisición (panel A) y Extinción (panel B) cuando etanol 3% fue utilizado como reforzador, en función del tratamiento prenatal (Etanol–Salina [E/S-0 min], Etanol–Naloxona [E/N-0 min], Agua–Salina [W/S-0 min], Agua–Naloxona [W/N-0 min] y Naloxona–Etanol [N/E-20 min] y condición de aprendizaje (Apareado y Acoplado). Las líneas verticales representan el error de la media.



**FIGURA 3.** Porcentaje de peso ganado (% BWG) durante el test de consumo infantil, utilizando etanol 5% (panel A) o Agua (panel B) durante los DP14 y 15 y en función del tratamiento prenatal (Etanol-Salina [E/S-0 min], Etanol-Naloxona [E/N-0 min], Agua-Salina [W/S-0 min], Agua-Naloxona [W/N-0 min] y Naloxona-Etanol [N/E-20 min]). Las líneas verticales representan el error de la media.



**FIGURA 4.** Total de respuestas operantes (contactos con el sensor) ejecutadas por los sujetos (Apareados o Acoplados) durante las sesiones de entrenamiento (DP14, 15, 16 y 17) y extinción (DP18) cuando sacarosa (panel A), etanol 3.75% (panel B) o agua (panel C) fueron utilizados como reforzadores. Las líneas verticales representan el error de la media.



**FIGURAS 5 y 6.** Total de respuestas operantes (contactos con el sensor) ejecutadas por los sujetos (Apareados o Acoplados) durante las sesiones de entrenamiento (DP14, 15, 16 y 17) y extinción (DP18) cuando sacarosa (fig. 5) o etanol 3.75% (fig. 6) fueron utilizados como reforzadores. Durante los DPs 16 y 17 las crías eran re-expuestas al reforzador, bajo los efectos de naloxona o salina como control. Las líneas verticales representan el error de la media.

## Referencias

- Abate, P., Pepino, M. Y., Domínguez, H. D., Spear, N. E. & Molina, J.C. (2000). Fetal associative learning mediated through maternal alcohol intoxication. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 24 (1), 39-47.
- Abate, P., Pueta, M., Spear, N. E. & Molina, J.C. (2008). Fetal learning about ethanol and later ethanol responsiveness: evidence against "safe" amounts of prenatal exposure. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 233 (2), 139-54.
- Arias, C. & Chotro, M. G. (2005). Increased palatability of ethanol after prenatal ethanol exposure is mediated by the opioid system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 82 (3), 434-442.
- Arias, C. & Chotro, M. G. (2006). Ethanol-induced preferences or aversions as a function of age in preweanling rats. *Behavioral Neuroscience*, 120 (3), 710-718.
- Arnold, H. M., Robinson, S. R., Spear, N. E. & Smotherman, W.P. (1993). Conditioned opioid activity in the rat fetus. *Behavioral Neuroscience*, 107 (6), 963-969.
- Baer, J. S., Barr, H. M., Bookstein, F. L., Sampson, P. D. & Streissguth, A. P. (1998). Prenatal alcohol exposure and family history of alcoholism in the etiology of adolescent alcohol problems. *Journal of Studies on Alcohol*, 59 (5), 533-543.
- Baer, J. S., Sampson, P. D., Barr, H. M., Connor, P. D. & Streissguth, A. P. (2003). A 21-year longitudinal analysis of the effects of prenatal alcohol exposure on young adult drinking. *Archives of Genetical Psychiatry*, 60 (4), 377-385.
- Berridge, K. C. (2000). Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 24 (2), 173-198.
- Berridge, K. C. (2003). Pleasures of the brain. *Brain Cognition*, 52 (1), 106-128.
- Bordner, K. A., Molina, J.C. & Spear, N.E. (2008). Analysis of ethanol reinforcement in 1-day-old rats: assessment through a brief and novel operant procedure. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 32 (4), 580-592.
- Cheslock, S. J., Varlinskaya, E. I., Petrov, E. S., Silveri, M. M., Spear, L. P. & Spear, N. E. (2001). Ethanol as a reinforcer in the newborn's first suckling experience. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 25 (3), 391-402.
- Chotro, M.G. & Arias, C. (2003). Prenatal exposure to ethanol increases ethanol consumption: a conditioned response? *Alcohol*, 30 (1), 19-28.
- Chotro, M. G., Arias, C. & Laviola, G. (2007). Increased ethanol intake after prenatal ethanol exposure: studies with animals. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 31 (2), 181-191.
- Culleré, M. E., Pautassi, R. M., Ponce, L. F., Spear, N. E., Abate, P. & Molina, J. C. (2009). Low- and high-ethanol doses shifts the appetitive hedonic value of a natural reinforcer in infant rats: inflation and deflation effects. et al., (2009) Scientific Meeting of the RSA, EEUU, 2009. Publicado en *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 33 (6s) P#821, page 216A.
- Dominguez, H.D., Lopez, M.F., Chotro, M.G. & Molina, J.C. (1996). Perinatal responsiveness to alcohol's chemosensory cues as a function of prenatal alcohol administration during gestational days 17-20 in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65 (2), 103-112.
- Gianoulakis, C. (2009). Endogenous opioids and addiction to alcohol and other drugs of abuse. *Current Topics on Medicine and Chemistry*, 9 (11), 999-1015.
- Goodman & Gilman et al., (1996) Las bases farmacológicas de la terapéutica. vol I. Novena ed. McGraw Hill Interamericana Editores, Mexico, D.F.
- Miranda Morales RS. (2007) Tesina de grado. Título: Implicancias del sistema opiáceo en la modulación de aprendizajes prenatales mediados por el etanol, en un modelo animal. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Junio de 2007.
- Miranda Morales, R. S., Molina, J. C., Spear, N. E. & Abate, P. Participation of the Endogenous Opioid System in the Acquisition of a Prenatal Ethanol-Related Memory: Effects on Neonatal and Preweanling Responsiveness to Ethanol. Enviado a publicación
- Molina, J. C., Spear, N.E., Spear, L. P., Mennella, J. A. & Lewis, M. J. (2007). The International society for developmental psychobiology 39th annual meeting symposium: Alcohol and development: beyond fetal alcohol syndrome. *Developmental Psychobiology*, 49 (3), 227-242.
- Nizhnikov, M. E., Varlinskaya, E. I., Petrov, E. S. & Spear, N. E. (2006). Reinforcing properties of ethanol in neonatal rats: involvement of the opioid system. *Behavioral Neuroscience*, 120 (2), 267-280.
- Nizhnikov, M. E., Varlinskaya, E. I. & Spear, N. E. (2006). Reinforcing effects of central ethanol injections in newborn rat pups. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 30 (12), 2089-2096.
- Nizhnikov, M. E., Molina, J. C. & Spear, N. E. (2007). Central reinforcing effects of ethanol are blocked by catalase inhibition. *Alcohol*, 41 (7), 525-534.

- Pautassi, R. M., Truxell, E., Molina, J.C. & Spear, N. E. (2008). Motivational effects of intraorally-infused ethanol in rat pups in an operant self-administration task. *Physiology and Behavior*, 93 (1-2), 118-129.
- Pautassi, R. M., Nizhnikov, M. E. & Spear, N. E. (2009). Assessing appetitive, aversive, and negative ethanol-mediated reinforcement through an immature rat model. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33 (6), 953-974.
- Petrov, E. S., Varlinskaya, E. I. & Spear, N. E. (2001). Self-administration of ethanol and saccharin in newborn rats: effects on suckling plasticity. *Behavioral Neuroscience*, 115 (6), 1318-1331.
- Petrov, E. S., Varlinskaya, E.I. & Spear, N. E. (2003). Reinforcement from pharmacological effects of ethanol in newborn rats. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 27 (10), 1583-1591.
- Ponce, L. F., Pautassi, R. M., Spear, N. E. & Molina, J. C. (2008). Ethanol-mediated operant learning in the infant rat leads to increased ethanol intake during adolescence. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 90 (4), 640-650.
- Rescorla, R. A. (1988). Behavioral studies of Pavlovian conditioning. *Annual Reviews on Neuroscience*, 11, 329-352.
- Robinson, S. R., Arnold, H. M., Spear, N. E. & Smotherman, W. P. (1993). Experience with milk and an artificial nipple promotes conditioned opioid activity in the rat fetus. *Developmental Psychobiology*, 26 (7), 375-387.
- Roth, T. L. & Sullivan, R. M. (2003). Consolidation and expression of a shock-induced odor preference in rat pups is facilitated by opioids. *Physiology and Behavior*, 8 (1), 135-1342.
- Smotherman, W. P., Arnold, H. M. & Robinson, S. R. (1993). Responses to ecologically relevant stimuli in the rat fetus: interactive effects of milk and an artificial nipple. *Developmental Psychobiology*, 26 (6), 359-374.
- Spear, N. E. & Molina, J. C. (2005). Fetal or infantile exposure to ethanol promotes ethanol ingestion in adolescence and adulthood: a theoretical review. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 29 (6), 909-929.
- Varlinskaya, E. I., Petrov, E. S., Cheslock, S. J. & Spear, N. E. (1999). A new model of ethanol self-administration in newborn rats: gender effects on ethanol ingestion through a surrogate nipple. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 23 (8), 1368-1376.
- Yates, W. R., Cadoret, R. J., Troughton, E. P., Stewart, M. & Giunta, T. S. (1998). Effect of fetal alcohol exposure on adult symptoms of nicotine, alcohol, and drug dependence. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 22 (4), 914-920.