

Consumo de alcohol en ratas adolescentes tratadas con reserpina y fluoxetina



Paul Ruiz^{a,*}, Aldo Calliari^a y Ricardo Pautassi^b

^a Área de Biofísica, Departamento de Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^b Instituto de Investigación Médica M. y M. Ferreyra (INIMEC-CONICET), Córdoba, Argentina

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 17 de mayo de 2016

Aceptado el 20 de diciembre de 2016

On-line el 27 de enero de 2017

Palabras clave:

Depresión

Alcohol

Hipertiroidismo

Dopamina

R E S U M E N

Si bien se ha estudiado el vínculo entre los trastornos de estado de ánimo y el consumo de alcohol, tanto en humanos como en animales, todavía no es del todo claro cómo se da esta relación, y menos aún durante la adolescencia. La administración de reserpina, un depletor de monoaminas, es un modelo ampliamente utilizado en roedores adultos para inducir comportamientos asociados a depresión, pero se desconoce su utilidad en otras etapas del desarrollo. En este trabajo validamos este modelo en ratas adolescentes y posteriormente estudiamos el consumo de alcohol en estos animales, así como su modulación por antidepresivos. En el experimento 1 se administró reserpina (0.0 o 1.0 mg/kg, durante 4 días, IP) a ratas Wistar machos de 30 días. El consumo de alcohol fue evaluado luego de observar comportamientos asociados a depresión e indagar indicadores neuroendocrinos de esta patología. En el experimento 2 los animales recibieron reserpina, seguida por el antidepresivo fluoxetina (0.0 o 10.0 mg/kg, durante 4 días, IG), y luego se evaluó el consumo de alcohol. Los resultados mostraron que la reserpina aumentó significativamente los comportamientos asociados a depresión y alteró los niveles de dopamina en la corteza insular y de hormonas tiroideas en sangre. En la prueba de consumo de alcohol los animales deprimidos, pero no los controles, mostraron un incremento en el consumo a través de los días. El segundo experimento replicó parcialmente este perfil, y no se observó un efecto significativo del antidepresivo en el consumo de alcohol. Los resultados indican que la reserpina es útil para modelar en ratas adolescentes comportamientos asociados a depresión. Se encontró una relación entre este estado y el consumo de alcohol, que no se pudo revertir con antidepresivos.

© 2016 Fundación Universitaria Konrad Lorenz. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Alcohol consumption in adolescent rats treated with reserpine and fluoxetine

A B S T R A C T

The relationship between mood disorders and alcohol consumption has been studied in humans and animals, although it is still not fully clear how this relationship unfolds, much

Keywords:

Depression

Alcohol

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: paulruiz@fvet.edu.uy (P. Ruiz).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.sumpsi.2016.12.002>

0121-4381/© 2016 Fundación Universitaria Konrad Lorenz. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Hyperthyroidism Dopamine

less during adolescence. The administration of reserpine — a monoamine depletor — is an approach traditionally used in adult rodents to induce depression-associated behaviours, but its usefulness in other developmental stages is still unknown. In this study, this model was evaluated in adolescent rats in order to study alcohol consumption, as well as its modulation by antidepressants in these animals. In Experiment 1, 30 day-old male Wistar rats were treated with reserpine (0.0 or 1.0 mg/kg, for 4 days, IP). Alcohol consumption was tested after observing depression-associated behaviours and assessing neuroendocrine indicators of this pathology. In Experiment 2, the rats were administered reserpine followed by an antidepressant (fluoxetine, 0.0 or 10.0 mg/kg, for 4 days, IG). Alcohol consumption was then tested. The results showed that reserpine significantly increased depression-associated behaviours and altered insular dopamine and thyroid hormone levels. Alcohol consumption tests showed that reserpine-treated animals — but not control animals — increased their consumption throughout the days. The second experiment partially replicated this profile, and no significant effect of antidepressants was observed in alcohol consumption. The results show that reserpine is instrumental in modelling depression-associated behaviours in adolescent rats. A relationship was found between this condition and alcohol intake, which could not be reversed by antidepressants.

© 2016 Fundación Universitaria Konrad Lorenz. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

La depresión es un trastorno del estado de ánimo de elevada prevalencia que acarrea consecuencias negativas para el bienestar y el desarrollo de los individuos. La mitad de las causas de discapacidad en humanos están dadas por trastornos psiquiátricos, donde la depresión unipolar es responsable del 35% de los casos (Suarez-Escudero, 2014). Los adolescentes están entre los grupos etarios más afectados por la enfermedad: un reciente trabajo realizado en Estados Unidos arrojó que el 11.4% de la población entre 12 a 17 años había padecido al menos un episodio depresivo mayor en los últimos 12 meses (Center for Behavioral Health Statistics and Quality, 2015).

La adolescencia es una etapa de la vida caracterizada por marcados cambios psicosociales y neurobiológicos. Es también durante esta etapa que se inicia y, en algunos casos, escala el consumo de alcohol (Balogun, Koyanagi, Stickley, Gilmour y Shibuya, 2014; Huang, Ho, Wang, Lo y Lam, 2016; Sanchez-Queija, Moreno, Rivera y Ramos, 2015). Este consumo tiene consecuencias adversas inmediatas (e.g., problemas académicos, accidentes, involucramiento en relaciones sexuales no deseadas; Isorna, Fariña, Sierra y Vallejo-Medina, 2015; Pilatti, Read, Vera, Caneto, Garimaldi y Kahler, 2014), y otras que solo se observan a mediano plazo. Se ha observado una relación inversa entre la edad de inicio de consumo de alcohol y el desarrollo de problemas con la droga en la edad adulta: aquellos adolescentes con un inicio temprano al consumo de alcohol tienen, en la adultez, más posibilidades de exhibir abuso y dependencia al alcohol que aquellos que exhiben un inicio más demorado (Guttmanova et al., 2011). En otras palabras, la iniciación adolescente con alcohol es un factor de vulnerabilidad para la ingesta posterior de esta droga; este efecto se conoce como iniciación o debut temprano (Fabio, Nizhniko, Spear y Pautassi, 2014; Pautassi, 2013).

Es muy importante, por lo tanto, estudiar los factores que facilitan el contacto de los adolescentes con el alcohol. Interesantemente, el trastorno depresivo exhibe comorbilidad, entre otros, con alteraciones cognitivas, de relacionamiento social y con los trastornos por consumo de alcohol (Casas

y Guardia, 2002; Chamberlain y Sahakian, 2004, 2006; Fouls, Adamson, Boden, Williman y Mulder, 2015; Gómez-Restrepo et al., 2004; Mustaca y Kamenetzky, 2006; Sher, 2004). Una hipótesis de larga data, tradicionalmente conocida como hipótesis de reducción de tensión (Conger, 1956), sugiere que la ingesta de alcohol mitiga estados psicológicos adversos y que este efecto promueve la ingesta de alcohol en el futuro (Huot, Thirivikraman, Meaney y Plotsky, 2001). Bajo este marco, es posible hipotetizar que la depresión adolescente podría predisponer —por mecanismos de reforzamiento negativo— el inicio o la escalada en el consumo de alcohol durante esta etapa del desarrollo (González-Forteza, Hermosillo de la Torre, Vacio-Muro, Peralta y Wagner, 2015). Sin embargo, los datos epidemiológicos son poco concluyentes y es aún incierto cómo estos factores (depresión y consumo de alcohol) interactúan en la población general y en la subpoblación adolescente.

Los modelos animales se presentan como alternativas para el estudio de esta psicopatología (Cassano y Argibay, 2009; Czéh, Fuchs, Wiborg y Simon, 2016; Deussing, 2006; Frey et al., 2006; Kato, Kasahara, Kubota-Sakashita, Kato y Nakajima, 2016; Machado-Vieira, Kapczinski y Soares, 2004; Nestler y Hyman, 2010). Es cuestionable si se puede hablar de depresión en modelos animales, por lo que resulta más prudente referirnos a comportamientos asociados a depresión. Estos comportamientos pueden ser modelados mediante la administración de la droga reserpina, un depletor de monoaminas (e.g., serotonina y dopamina) en el sistema nervioso central. La administración, tanto aguda como crónica, de esta droga produce en roedores sintomatología análoga a la que experimentan humanos con depresión (Escorihuela y Fernández-Teruel, 1998; Li et al., 2016; Minor y Hanff, 2015; Mohamed, 2016; Ozerov, Bagmetova, Chernysheva y Tyurenkov, 2016; Socała et al., 2016). Si bien el modelo tiene algunos cuestionamientos, es uno de los modelos de depresión (inducida farmacológicamente) más usado y tiene varias ventajas con relación a otros modelos (para una descripción de las mismas, véase Czéh et al., 2016). Sin embargo, no se han

estudiado los comportamientos asociados a depresión inducidos por la reserpina en ratas adolescentes —período que en las ratas va desde los 28 a los 42 días de vida (Spear, 2000)—, ni cómo este estado predispone al consumo de alcohol en esta etapa del desarrollo, preguntas que este trabajo se dedicará a analizar.

Los neurotransmisores monoaminérgicos están implicados en la depresión y la manía. Particularmente la dopamina se ve disminuida en la primera y aumentada en la segunda (Diehl y Gershon, 1992), particularmente en áreas del sistema nervioso central implicadas en el procesamiento emocional, como la ínsula (Salgado-Pineda, Delaveau, Olivier y Nieoullon, 2005; Simmons et al., 2012). Esto ha motivado el uso terapéutico de drogas que aumentan los niveles de monoaminas, como la fluoxetina (Torrens, 2001; Ponce, Jiménez-Arriero y Rubio, 2003). Si bien la depresión no se puede diagnosticar en base a alteraciones biológicas, en este trastorno se observan alteraciones a nivel endocrino y se encontraron tanto hipo como hipertiroidismo (Radanović-Grgurić et al., 2003).

El objetivo principal de este trabajo fue describir el consumo de alcohol en ratas adolescentes tratadas con reserpina. En el experimento 1 se hizo un tratamiento crónico de reserpina durante 4 días y su efecto se confirmó a través de pruebas comportamentales y mediante la medición de niveles de dopamina y de hormonas tiroideas. Esperábamos observar mayor consumo y preferencia de alcohol luego de este tratamiento. En un segundo experimento se intentó revertir el efecto de reserpina sobre el consumo de alcohol a través de la administración de un fármaco que aumenta los niveles de dichos neurotransmisores, como es la fluoxetina.

Materiales y métodos

Diseño experimental

La figura 1 presenta un esquema del diseño experimental empleado en cada uno de los experimentos. En el experimento 1 se administró reserpina (RES, 1.0 mg/kg, IP, de Freitas et al., 2016) o vehículo (VEH) a dos grupos de 25 ratas Wistar macho adolescentes, durante los días posnatales (DP) 30 a 33. Luego del tratamiento los animales fueron evaluados en las pruebas de campo abierto y de consumo de sacarosa. Posteriormente, 10 animales de cada grupo fueron sacrificados. Se extrajo la región insular para medir los niveles de dopamina allí presentes. Paralelamente, se obtuvo sangre para medir hormonas tiroideas. El resto de los animales fueron sometidos a una prueba de consumo de alcohol de doble botella de 3 días de duración.

Un segundo experimento intentó revertir los comportamientos asociados a la depresión, inducidos por reserpina. El mismo empleó un diseño factorial 2 (tratamiento diario con RES [1.0 g/kg] o VEH durante los DP 30-33) \times 2 (tratamiento con fluoxetina [FLUOX, 10.0 mg/kg, IG, Dulawa, Holick, Gundersen y Hen, 2004] o VEH durante los DP 34 a 37). Cada uno de los grupos derivados del diseño (RES-VEH, RES-FLUOX, VEH-FLUOX, VEH-VEH) estuvo compuesto por 12 animales y se evaluó en una prueba de luz/oscuridad antes y después de la administración del antidepressivo. El propósito de esta evaluación fue confirmar el efecto facilitador de la reserpina sobre los

comportamientos asociados a la depresión, y analizar si este efecto se podía revertir con fluoxetina. Luego todos los animales fueron sometidos a una prueba de consumo de alcohol de doble botella.

Los tratamientos y las pruebas fueron realizados en el período 30-40 DP porque este representa (Spear, 2000) la ventana temporal de la adolescencia en la rata. Algunos autores extienden este período hasta los 50-60 días, pero en general las posturas más conservadoras señalan que la adolescencia en la rata empieza una semana luego del destete (esto es, al día 28 de vida) y se extiende hasta el día 42 de vida aproximadamente (Spear, 2000).

Animales y tratamiento farmacológico

Se empleó un total de 98 ratas macho Wistar adolescentes derivadas de 22 camadas criadas en los bioterios del Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC-CONICET, Córdoba, Argentina). La reserpina (Sigma-Aldrich, EE. UU.) se vehiculizó en solución fisiológica y se administró de manera intraperitoneal a un volumen de 0.01 ml por gramo de peso corporal (0.01 ml/g), en tanto que la fluoxetina (Fluoxet, Eurofarma, Uruguay) se disolvió en agua corriente y se administró intragástricamente a un volumen de 0.05 ml/g.

El protocolo experimental fue aprobado por la Comisión de Ética en Uso de Animales de la Facultad de Veterinaria de Universidad de la República (CEUA-FVet-UdelaR, Exp n.º 111130-001565-13 y 111130-000658-13).

Pruebas de comportamiento

El efecto de RES y su posible reversión por FLUOX se evaluó a través de tres pruebas de comportamiento:

Campo abierto (experimento 1)

Se aplicó el DP 34. El aparato (ITTCOMM, Córdoba, Argentina) consta de una caja de acrílico de 80 \times 80 cm con sensores fotoeléctricos que permiten registrar la distancia recorrida por el animal en centímetros. Los animales permanecieron 10 min en la caja. Se consideró como indicador de estado de ánimo depresivo que los dosificados con reserpina recorrieran menos distancia que los controles (Angrini, Leslie y Shephard, 1998).

Prueba de consumo de sacarosa (experimento 1)

Se aplicó el DP 35. La prueba se aplicó en cajas independientes, los animales permanecieron 22 h sin líquidos para luego ofrecerles dos botellas con agua y una solución azucarada (sacarosa 5%). Se registraron los mililitros consumidos de ambas soluciones y se calculó el porcentaje de preferencia por la sacarosa. El menor consumo de líquidos totales y de solución azucarada es usualmente considerado un comportamiento asociado a la depresión (Brenes, Rodríguez, Villagra y Fornaguera, 2006).

Caja de luz/oscuridad (experimento 2)

Los comportamientos asociados a la depresión se analizaron, en el experimento 2, mediante una prueba alternativa al campo abierto. El propósito fue proveer información convergente de diversas pruebas que den cuenta del estado inducido por reserpina. La prueba de luz/oscuridad se aplicó

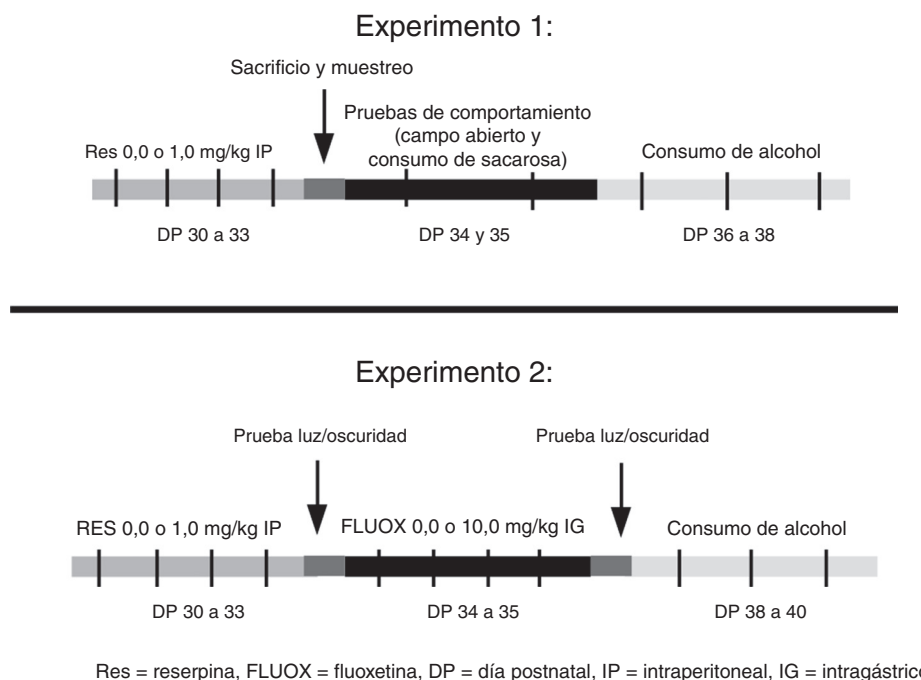


Figura 1 – Esquema del diseño experimental empleado en los experimentos 1 y 2.

dos veces, para analizar los comportamientos asociados a la administración de reserpina (DP 34) y para evaluar el efecto de la fluoxetina (DP 38). Los animales permanecieron 5 min en una caja con un espacio blanco y otro negro (24.5 × 25 × 25 cm) comunicados entre sí por una hendidura, donde la porción blanca estaba iluminada con una luz de intensidad 400 lux. Esta prueba se aprovecha de la aversión innata que muestran los roedores por los espacios abiertos y blancos (Fernández et al., 2016). Se midió la cantidad de veces que pasaron de un espacio al otro y el tiempo (segundos) en la caja blanca. Con estas medidas se generó un cociente dividiendo el tiempo en blanco sobre transferencias + 1 que demuestra el tiempo que estuvo activo (cuanto más alto el cociente, menos movilidad). El cociente brinda un valor de la principal variable dependiente (tiempo pasado en la zona ansiógena) pero penalizado por la cantidad de actividad, ya que es probable que parte del tiempo pasado en el espacio blanco obedezca simplemente a un alto nivel de actividad (el + 1 es por la eventualidad de que algún animal no haya realizado transferencias).

Medición de dopamina en la ínsula

El DP 34, 24h luego de la última administración de reserpina, un subgrupo de animales de cada grupo experimental se sacrificaron por decapitación. Inmediatamente se obtuvo el encéfalo y se disecó la ínsula por la técnica descrita en Aleksandrov y Fedorova (2003) para el análisis de dopamina por HPLC. La ínsula fue congelada y mantenida en frízer a -80°C . El día de la extracción y medición del contenido de dopamina, los tejidos fueron descongelados, pesados e inmediatamente sonicados en 1 ml de ácido perclórico 0.1 M. Posteriormente fueron centrifugados a 15000 g max, por 15 min, el sobrenadante rico en dopamina se conservó. Las

muestras fueron inyectadas en un sistema de HPLC (PM-80 BAS, West Lafayette, IN, EE. UU.) con una columna C18 con un detector electroquímico (LC-4C BAS) a un flujo de 1.0 ml/min y una fase móvil compuesta de ácido acético 0.15 M, octil sulfato de sodio 0.6 M, acetonitrilo al 4% y tetrahydrofurano al 1.6%, a pH 3 (Abin-Carriquiry et al., 2008). La medición se llevó a cabo en el Laboratorio de Neuroquímica del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.

Medición de hormonas tiroideas

En el mismo proceso de extracción de las ínsulas se obtuvo sangre (1.5 ml/animal) para medir los niveles de hormonas tiroideas (t3 y t4). El suero se obtuvo por centrifugación de la sangre durante 20 min a 2000 rpm. Este fue incubado con las hormonas marcadas para luego ser cuantificadas en un contador gamma. Para esto, se utilizaron kits comerciales (laboratorio Siemens) de fase sólida para RIA y se obtuvieron los niveles de hormona en nanogramos por decilitro (Damian y Ungerfeld, 2011). Las mediciones se realizaron en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria (UdeLaR), Montevideo, Uruguay.

Prueba de consumo de alcohol

Los animales se evaluaron en una prueba de consumo de alcohol (3%) de 3 días. En el experimento 1 la misma se aplicó del DP 36 al 38, mientras que en el experimento 2 se aplicó entre los DP 38 y 40. Los animales permanecieron en sus cajas 22 h con comida pero sin líquidos, luego fueron pesados y puestos en cajas individuales sin comida donde durante 2 h se les ofrecía agua y alcohol (3%) en tubos que cada día eran cambiados de orden y se registraba el volumen (ml) consumido de cada

solución. Se usó una baja concentración de alcohol para que no hubiera evitación del sabor. Posteriormente se calcularon los gramos por kilo de alcohol, el porcentaje de preferencia entre alcohol y agua y los mililitros totales de líquido consumido por cada 100 g de peso corporal (ml/100 g). Este protocolo ha sido utilizado en numerosas oportunidades en nuestro laboratorio (e.g., Acevedo, Molina, Nizhnikov, Spear y Pautassi, 2010).

Análisis estadístico

Las variables registradas se analizaron de forma independiente mediante ANOVA factorial (variables registradas durante las pruebas de comportamiento y variables neuroendocrinas) o de medidas repetidas (variables registradas durante las pruebas de consumo de alcohol de ambos experimentos, sobre las pruebas de campo abierto y sobre las medidas de luz y oscuridad del experimento 2). Los efectos significativos principales y las interacciones significativas se analizaron mediante la prueba *post hoc* de Fisher, en el caso de efectos principales o de interacciones entre factores «entre» grupos. En tanto, se usaron comparaciones planeadas ortogonales para analizar los efectos principales o interacciones significativas que involucraran medidas repetidas. Este procedimiento se realizó ya que se reconoce que no hay una prueba *post hoc* que maneje adecuadamente el error tipo I en interacciones entre factores y dentro de los grupos (Winer, 1991). Cuando la intención fue comparar grupos se utilizó test de t para grupos independientes. Los valores de $p < .05$ se consideraron estadísticamente significativos. El alfa fue de 0.05 y los resultados se expresan como media \pm SEM.

Resultados

Experimento 1

Prueba de campo abierto y prueba de consumo de sacarosa

El ANOVA de medidas repetidas para la prueba de campo abierto (factor de medidas repetidas: minutos 1 a 10 de evaluación) indicó efectos principales de reserpina [$F(1.27) = 14.71$, $p < .001$] y de minuto [$F(9.243) = 11.39$, $p < .001$], así como una interacción significativa intervalo por minuto [$F(9.243) = 3.20$, $p < .005$]. Como se observa en la figura 2, los animales dosificados con reserpina exhibieron significativamente menos distancia recorrida (medida en centímetros) que el grupo control, un efecto que fue significativamente más importante durante la primera mitad de la evaluación. Los animales dosificados con reserpina consumieron menos de la solución azucarada ($t(14) = -8.87$, $p < .05$), si bien este efecto no fue específico, ya que los mismos también consumieron menos agua ($t(14) = -3.6$, $p < .05$) y menos líquido total ($t(14) = -10.37$, $p < .05$). Estos resultados se presentan en la tabla 1.

Niveles de hormonas tiroideas y de dopamina en la ínsula

Los niveles de dopamina en la ínsula (véase tabla 1) fueron significativamente menores [$t(11) = -7.9$, $p < .05$] en los animales deprimidos que en los controles. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en las pruebas de comportamiento y acompañan el efecto de la reserpina como droga depresora, y a su vez depleto de dopamina.

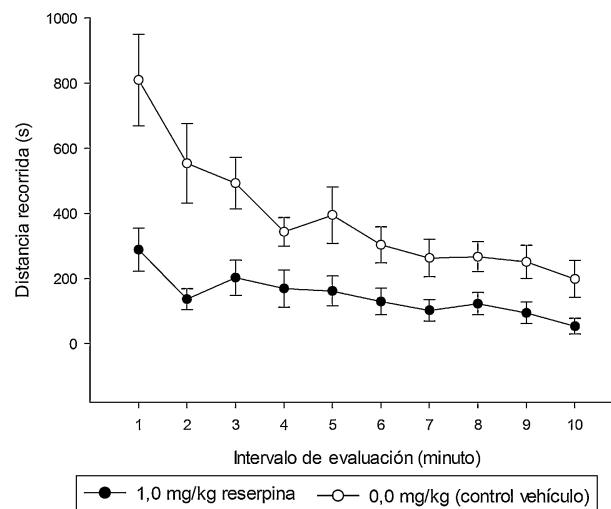


Figura 2 – Distancia recorrida (centímetros) en cada uno de los 10 min de la prueba de campo abierto, en animales tratados con reserpina (1.0 mg/kg, puntos negros) y en controles tratados con vehículo (puntos vacíos). Los animales dosificados con reserpina exhibieron significativamente menos distancia recorrida que el grupo control, particularmente durante la parte inicial de la evaluación. Los puntos muestran las medias y las barras los errores estándar para cada minuto de la prueba.

Los resultados de radioinmunoanálisis arrojaron que los niveles de hormona t3 no se vieron afectados por el tratamiento con reserpina, mientras que los niveles de la hormona t4 fueron significativamente mayores en el grupo RES [$t(30) = 5.8$, $p < .05$; véase tabla 1 por medias y EE].

Tabla 1 – Variables medidas en el modelo de depresión

	Reserpina 1 mg/kg/4 días	Control
Campo abierto (s)	1461.1 \pm 911.5	3880.6 \pm 2.188
Prueba sacarosa (ml de sacarosa)	2.03 \pm 0.47	7.9 \pm 0.46
Prueba sacarosa (ml de agua)	0.87 \pm 0.3	2.85 \pm 0.4
Prueba sacarosa (ml totales)	2.9 \pm 0.65	10.7 \pm 1.5
Luz/oscuridad (transferencias)	0.58 \pm 0.1	2.3 \pm 1.4
Luz/oscuridad (tiempo en luz en s)	153.7 \pm 28	16.3 \pm 3.4
Luz/oscuridad (tiempo pasado en el espacio en blanco/ transferencias +1)	139.4 \pm 141.5	
Niveles de dopamina en la ínsula (ng/g tejido)	165.6 \pm 170.5	1.003.3 \pm 327.2
Niveles de hormona tiroidea (t4) (ng/dl)	1.5 \pm 0.2	1.1 \pm 0.1

Medias y errores para variables comportamentales y neuroendocrinas estudiadas en animales tratados con reserpina y controles. Para todas las variables se encontraron diferencias significativas ($p < .05$) entre grupos.

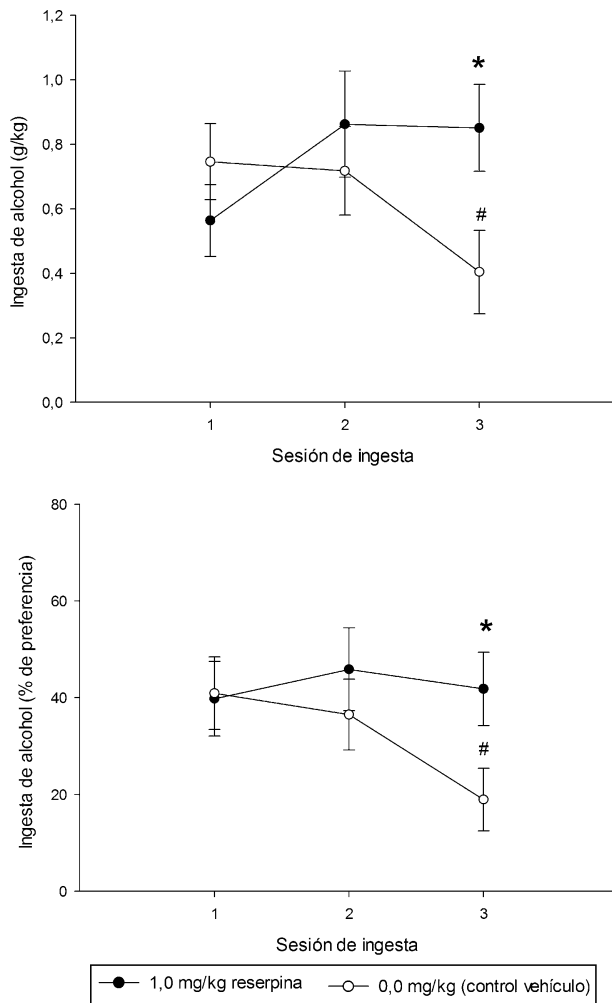


Figura 3 – Consumo de alcohol (g/kg y % de preferencia) registrado en los grupos tratados crónicamente con reserpina (1.0 mg/kg, RES, puntos negros) y en grupos control tratados con vehículo (VEH, puntos vacíos), en función del día de evaluación del Experimento 1. Los puntos muestran las medias y las barras los errores estándar.

Prueba de consumo de alcohol

Los pesos corporales, medidos luego del tratamiento con reserpina, difirieron significativamente entre los grupos (RES = 105.1 ± 6.1 vs VEH = 137.1 ± 3.0 , $p < .05$). La figura 3 ilustra el consumo de alcohol registrado en los grupos RES y VEH. El ANOVA para g/kg de alcohol consumido indicó una interacción significativa entre grupo (i.e. RES o VEH) y medida, $F(2.54) = 3.64$, $p < .05$. Las pruebas *a posteriori* indicaron que los grupos RES y VEH consumieron niveles de etanol (g/kg) similares en las sesiones 1 y 2. En la sesión 3, en tanto, el grupo RES exhibió significativamente más consumo de alcohol que su control. Asimismo, el consumo de alcohol en el día 3 en el grupo control fue significativamente menor que el consumo exhibido por dicho grupo el día 1 ($p < .05$). Esto sugiere una caída significativa en el consumo (g/kg) a lo largo de los días en el grupo control, pero no en el experimental. El perfil para el porcentaje de preferencia fue similar al

observado para g/kg (véase fig. 2, panel inferior). Sin embargo el ANOVA para el porcentaje de preferencia no indicó efectos principales significativos ni interacciones significativas. Guiados por nuestras hipótesis *a priori*, sin embargo, realizamos comparaciones planeadas y estas indicaron un porcentaje de preferencia significativamente mayor en animales RES que en VEH en la sesión 3, así como una caída significativa en el nivel de preferencia por la droga en el grupo VEH, entre las sesiones 1 a 3. El ANOVA para volumen total de líquido consumido (ml/100) indicó que los animales deprimidos tomaron significativamente menos líquido que sus pares controles ($F(1.27) = 12.5$, $p = .001$).

Experimento 2

Pruebas de comportamiento

Para confirmar el efecto de la reserpina sobre los comportamientos asociados con depresión, se aplicó a todos los animales la prueba de luz/oscuridad, antes y después de la administración del antidepresivo (DP 34 y 38). El análisis de varianza de medidas repetidas mostró un efecto significativo, depresor, de la reserpina [$F(1.41) = 22.23$, $p < .05$] sobre la variable tiempo pasado en el espacio en blanco/transferencias + 1 (ver tabla 1). Específicamente, los animales a los que se administró reserpina exhibieron valores significativamente más elevados de este índice que los tratados con vehículo. Este efecto se mantuvo estable durante ambas mediciones y no fue revertido por la administración de fluoxetina.

Prueba de consumo de alcohol

En este experimento también hubo diferencias significativas entre los pesos de los grupos luego del tratamiento con reserpina (RES = 78.1 ± 3.7 vs VEH = 110.7 ± 3.6 , $p < .05$). Como puede observarse en la figura 4, los resultados replican sustancialmente lo observado en el experimento 1. Al inicio de la evaluación los grupos exhibieron similar predilección por el alcohol, pero a medida que la misma progresó aquellos tratados con reserpina —pero no los tratados con vehículo— incrementaron dicha predilección. El ANOVA confirmó estas impresiones e indicó un efecto principal de reserpina, $F(1.41) = 4.54$, $p < .05$ y una interacción significativa reserpina \times día, $F(2.82) = 5.44$, $p < .05$. De acuerdo con las comparaciones *a posteriori* realizadas, los animales tratados con reserpina exhibieron significativamente más preferencia por etanol durante las sesiones 2 y 3, en comparación con los sujetos tratados con vehículo. Este efecto no fue alterado por la administración de fluoxetina.

El análisis para g/kg de alcohol consumido indicó un efecto principal de días de evaluación, $F(2.82) = 3.34$, $p < .05$, así como interacciones significativas RES \times días de evaluación y RES \times FLUOX [$F(2.82) = 3.19$, $p < .05$ y $F(1.41) = 4.35$, $p < .001$]. Los análisis *a posteriori* indicaron que los grupos RES exhibieron un aumento progresivo en consumo de alcohol a lo largo de los días, en tanto que los grupos VEH permanecieron estables a lo largo del tiempo, si bien los animales VEH exhibieron mayor consumo absoluto de alcohol (g/kg) que los RES en el primer día de evaluación. La exploración de la interacción significativa FLUOX \times RES indicó que, en el promedio general de los tres días de evaluación, la administración de FLUOX no alteró los

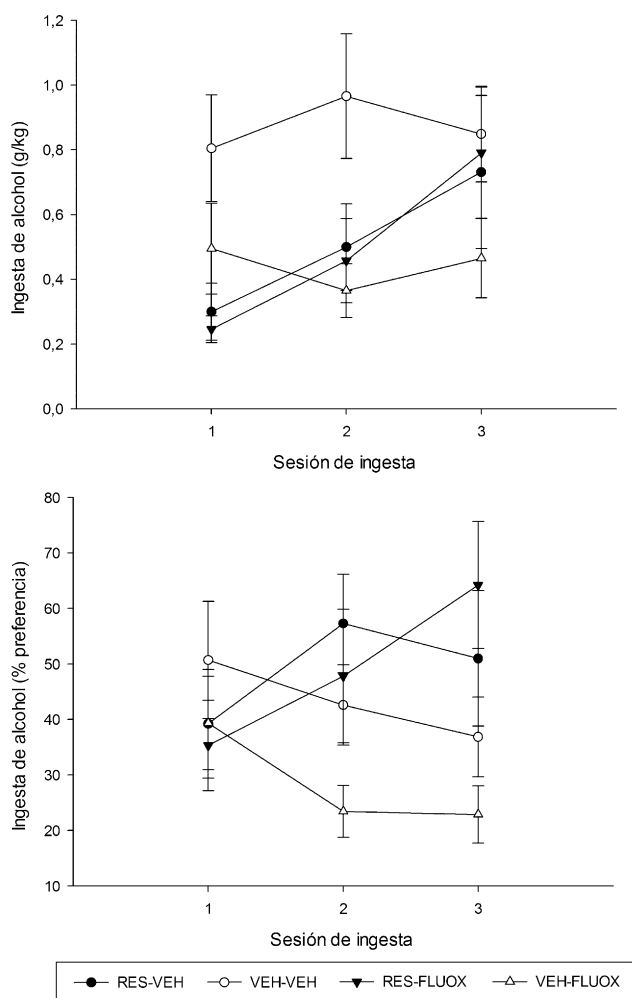


Figura 4 – Consumo de alcohol registrado en los grupos tratados crónicamente con reserpina (1.0 mg/kg, RES) o vehículo (VEH), y con fluoxetina (10 mg/kg, FLUOX) o su vehículo (VEH). Se grafican los g/kg consumidos y el % de preferencia por el alcohol registrado en los grupos RES-VEH (puntos negros), VEH-VEH (puntos vacíos), RES-FLUOX (triángulos negros) y VEH-FLUOX (triángulos vacíos), en función del día de evaluación del experimento 2. Los puntos muestran las medias; las barras, los errores estándar.

niveles de consumo absoluto en los animales RES pero indujo una significativa y drástica caída del consumo en el grupo VEH.

Discusión

Se ha observado una relación entre la depresión y el consumo de alcohol en humanos (Horwitz y Raskin, 1991; Gómez-Restrepo et al., 2004; Suarez-Escudero, 2014) y se han encontrado algunas particularidades, como que esta relación es más notoria en las mujeres o que en cuadros depresivos no se consume alcohol más frecuentemente sino en mayor volumen (Graham, Massak, Demers y Rehm, 2007). En este contexto han surgido varios intentos explicativos para esta relación, y la teoría de la automedicación es una de las más conocidas (Horwitz y Raskin, 1991), también aplicada para el

estudio del consumo de alcohol en adolescentes deprimidos (Deykin, Levy y Wells, 1987; Windle y Davies, 1999).

En este trabajo pudimos acceder, a través de un modelo animal, a novedosa información. En primer lugar confirmamos que la reserpina induce comportamientos asociados a depresión y generalizamos este hallazgo a animales adolescentes. De esta manera —y en conjunto con trabajos previos— el trabajo sugiere que, luego de un tratamiento con reserpina, adultos (Minor y Hanff, 2015; Ozerov et al., 2016; Socała et al., 2016) y adolescentes son igualmente sensibles a la inducción de comportamientos asociados a la depresión. Pudimos reproducir a nivel comportamental (menos movilidad en la prueba de campo abierto y menor respuesta ansiosa en la caja de luz/oscuridad) y neuroendocrinos (hipertiroidismo y bajos niveles de dopamina en la ínsula) las variaciones observadas en humanos; así, este resulta ser el primer modelo de inducción de comportamientos depresivos por administración de reserpina en ratas adolescentes, en nuestro conocimiento. Esto sienta las bases para evaluar, por ejemplo, cómo otros eventos (e.g., estresores ambientales) exacerbaban estos cuadros depresivos en los adolescentes. Se ha sugerido que los adolescentes serían más sensibles que los adultos a los efectos del estrés y a las interacciones alcohol-estrés (Fernández et al., 2016).

Por otro lado, vimos una asociación positiva entre el estado de ánimo y el consumo de alcohol, dado que los animales que exhibieron comportamientos asociados a depresión tomaron más alcohol a lo largo de las sesiones, a diferencia de los controles, que disminuyeron su consumo a lo largo de los días de evaluación. También se pudo ver que el mayor consumo de alcohol estuvo relacionado con signos de hipertiroidismo y con bajos niveles dopaminérgicos en la ínsula. Los animales tratados con reserpina exhibieron un decremento en el consumo de sacarosa, pero también en el consumo de agua. Es probable que esta baja generalizada indique un estadio de anhedonia. Esto es, por supuesto, solo una hipótesis. Más allá de esta limitación, los resultados indican que la depresión es un factor que puede ayudar a iniciar o escalar el consumo de alcohol en adolescentes. El inicio temprano al consumo de alcohol, a su vez, es un factor de riesgo para la aparición de abuso y dependencia a esta droga (Fabio et al., 2014) y para la manifestación de una diversidad de síntomas psicopatológicos (Carbia, Corral, García-Moreno, Cadaveira y Caamaño-Isorna, 2016).

Numerosos trabajos han asociado los niveles de dopamina en el encéfalo, particularmente la vía mesolímbica, con el consumo de drogas. Los niveles de dicho neurotransmisor monoaminérgico estarían asociados con el consumo de drogas de abuso, dada su función activadora en el sistema de recompensa (Rezvani et al., 1997; Volkow, Wang, Fowler, Tomasi y Telang, 2011). Sin embargo, hay hallazgos controversiales acerca de la relación entre los niveles del neurotransmisor y el consumo de alcohol (Rezvani et al., 1997; Dyr, McBridea, Lumenga, Lia y Murphy, 1993). Algunos trabajos sostienen que no existe relación significativa entre ambos fenómenos (Linseman, 1990), otros dicen lo contrario (Volkow et al., 2011), y otros, que los niveles de dopamina y sus receptores forman parte de una triada de vulnerabilidad al consumo de esta droga (Bowirrat y Oscar-Berman, 2005; Leamy, Connora, Voiseyc, Young y Gullo, 2016). Nosotros pudimos ver que los niveles

de dopamina en la ínsula están asociados con el consumo de alcohol, donde los bajos niveles del neurotransmisor se asociaron a mayor consumo de esta droga. Esto es algo novedoso en el trabajo con modelos animales de trastornos de estado de ánimo y suma a la discusión sobre el rol de la dopamina en el consumo de alcohol.

Otro aspecto relevante y novedoso fue la relación entre el hipertiroidismo y el consumo de alcohol. Existen pocas publicaciones que indaguen sobre el tema, y más que nada estudian cómo el consumo de alcohol impacta a nivel glandular (Roosing, Cushing, Voigt, Wicklund y Daling, 2000), aunque existen algunos reportes experimentales que muestran como disminuye el consumo de alcohol en animales a los que se les administra tiroides desecado por vía intragástrica (Niubó, Rodríguez, Gorguet y Cardona, 1999) o que observan un aumento en el consumo de alcohol en ratas a las que se les indujo hipotiroidismo (Hillbom, 1971). Estos trabajos hipotizan que los bajos niveles de hormonas tiroideas se asocian a menor consumo de alcohol, llamativamente lo opuesto a lo que nosotros encontramos experimentalmente. En nuestro trabajo, los animales hipertiroides tendieron a aumentar el consumo de alcohol. Si bien la depresión está más asociada con el hipotiroidismo, también existen depresiones simultáneas al hipertiroidismo (Radanović-Grgurić et al., 2003), lo que en tal caso coincide con nuestros resultados. Este hallazgo es novedoso y suma a la discusión sobre las posibles relaciones endocrinas con el consumo de alcohol.

Nuestra expectativa era que fluoxetina disminuyera el consumo de alcohol en los animales deprimidos. Esta expectativa no se cumplió. Este resultado va en contra de otros hallazgos en humanos con adolescentes deprimidos, los cuales describieron efectos terapéuticos de este antidepressivo sobre la depresión y el consumo de alcohol comórbido (Cornelius et al., 2001, 2005; Raymond, Schacht y Book, 2014). Existen al menos dos posibilidades por las que no hayamos visto el efecto de la fluoxetina. Es posible que las dosis administradas, o las repeticiones realizadas, no fueran las efectivas terapéuticamente a estas edades. Es también posible que el tiempo entre el tratamiento y la evaluación de sus efectos no haya sido suficiente. Usualmente esta medicación exhibe una latencia de efecto de varias semanas (Dulawa et al., 2004).

Los resultados obtenidos son útiles para profundizar en los factores de vulnerabilidad biológica asociados al consumo de alcohol. Existen varios elementos biológicos que promueven el desarrollo del alcoholismo, como los niveles de respuesta inicial al etanol, alteraciones en la expresión o funcionamiento de receptores de dopamina o genes asociados, entre otros (Bowirrat y Oscar-Berman, 2005; Pautassi, Camarini, Quadros, Miczek y Israel, 2010; Schuckit, 1987). En este sentido, los niveles de dopamina insular reportados suman a la teoría que los bajos niveles de este neurotransmisor son un factor de vulnerabilidad para el consumo de alcohol. Queda como un aporte a seguir profundizando si los niveles de hormonas tiroideas se suman a la lista de factores de vulnerabilidad biológica.

Una limitación de este trabajo es que los perfiles de consumo de alcohol variaron entre el experimento 1 y el 2. Si bien ambos experimentos muestran que los animales deprimidos aumentan la preferencia por el alcohol, la dinámica temporal de este efecto varió entre experimentos. Este hecho puede

ser explicado por numerosas variables; por ejemplo, las diferencias en los pesos de los animales, particularmente de los que recibieron reserpina, observadas entre los experimentos. Otra limitación es que las pruebas que empleamos para determinar el estado depresivo en modelos animales no son las más comunes en la literatura. Es importante mencionar que numerosos trabajos emplearon el campo abierto para confirmar estados depresivos (e.g., Angrini et al., 1998) y otros tantos trabajos emplearon pruebas que miden ansiedad para confirmar estados ansiosos-depresivos, particularmente debido a que estas patologías exhiben comorbilidad (Ben-Hamo, Tal, Paz-Cohen, Kronfeld-Schor y Einat, 2016; Scheinert, Haeri, Lehmann y Herkenham, 2016; Tucker, Burke, Fu y McCabe, 2016). También puede pensarse que los resultados observados se deban a alteraciones en el desarrollo, inducidas por la reserpina. Entendemos que esto es poco probable, particularmente debido a la poca extensión del tratamiento. Asimismo, estudios preliminares de nuestro laboratorio indican similar rendimiento motor en el test de la barra (Deacon, 2013) en ratas adolescentes tratadas o no con reserpina, con las dosis empleadas en el presente estudio.

Otra limitación del presente trabajo es la falta de una comparación ontogenética (e.g., adultos vs. adolescentes) en los efectos facilitadores de la reserpina sobre el consumo de alcohol. Ciertamente es una limitación importante; aun así, son muchos los trabajos que —como el que nos ocupa— indagan sobre factores moduladores del consumo de alcohol en adolescentes sin evaluar si dicho factor ejerce iguales o diferentes efectos en adultos (Acevedo et al., 2016; Miranda-Morales et al., 2016; Pautassi, Godoy y Molina, 2015). La adolescencia es la etapa del desarrollo donde usualmente comienza y escala el consumo de alcohol, y el conocer factores que ayuden (o mitiguen) esta progresión es, de por sí, valioso.

Más allá de estas limitaciones, este trabajo aporta nueva información para entender los mecanismos que promueven el consumo de alcohol, particularmente en ratas deprimidas durante la adolescencia, época en la que se inician y probablemente determinan los patrones de consumo de alcohol en la vida adulta.

Financiación

La investigación que da origen a los resultados presentados en esta publicación recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII-Uruguay) bajo el código POS.EXT.2014.1.105 877, de la Comisión Sectorial de Investigación Científica de la Universidad de la República (CSIC-UdelaR) (PR), del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) (RMP) y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPyCT) (RMP).

REFERENCIAS

- Abin-Carriquiry, J. A., Costa, G., Urbanavicius, J., Cassels, B. K., Rebolledo-Fuentes, M., Wonnacott, S. & Dajas, F. (2008). In vivo modulation of dopaminergic nigrostriatal pathways by cytosine derivatives: Implications for Parkinson's Disease. *European Journal of Pharmacology*, 589(1-3), 80-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.05.013>

- Acevedo, M. B., Molina, J. C., Nizhnikov, M. E., Spear, N. E. & Pautassi, R. M. (2010). High ethanol dose during early adolescence induces locomotor activation and increases subsequent ethanol intake during late adolescence. *Developmental Psychobiology*, 52(5), 424-440. <http://dx.doi.org/10.1002/dev.20444>
- Acevedo, M. B., Fabio, M. C., Fernández, M. S. & Pautassi, R. M. (2016). Anxiety response and restraint-induced stress differentially affect ethanol intake in female adolescent rats. *Neuroscience*, 12(334), 259-274. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.08.011>
- Aleksandrov, V. & Fedorova, K. (2003). Structure of the insular region of the rat neocortex. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 33(3), 199-202.
- Angrini, M., Leslie, J. & Shephard, R. (1998). Effects of propranolol, buspirone, pCPA, reserpine, and chlordiazepoxide on open-field behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59(2), 387-397.
- Balogun, O., Koyanagi, A., Stickley, A., Gilmour, S. & Shibuya, K. (2014). Alcohol consumption and psychological distress in adolescents: A multi-country study. *Journal of Adolescent Health*, 54(2), 228-234. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jadohealth.2013.07.034>
- BenHamo, M., Tal, K., PazCohen, R., KronfeldSchor, N. & Einat, H. (2016). Differential effects of photoperiod length on depression and anxiety like behavior in female and male diurnal spiny mice. *Physiology & Behavior*, 165(16) <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.06.030>
- Bowirrat, A. & Oscar-Berman, M. (2005). Relationship between dopaminergic neurotransmission, alcoholism, and reward deficiency syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)*, 132B, 29-37. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.b.30080>
- Brenes, J., Rodríguez, O., Villagra, O. & Fornaguera, J. (2006). Factor analysis of forced swimming test, sucrose preference test and open field test on enriched, social and isolated reared rats. *Behavioural Brain Research*, 169(1), 57-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2005.12.001>
- Carbia, C., Corral, M., García-Moreno, L. M., Cadaveira, F. & Caamaño-Isorna, F. (2016). Early alcohol use and psychopathological symptoms in university students. *Psicothema*, 28(3), 247-252. <http://dx.doi.org/10.7334/psicothema2015.251>
- Casas, M. & Guardia, J. (2002). Patología psiquiátrica asociada al alcoholismo. *Adicciones*, 14(1), 195-220. <http://dx.doi.org/10.20882/adicciones.524>
- Cassano, P. & Argibay, P. (2009). La enfermedad depresiva y sus modelos animales. *Revista del Hospital Italiano de Buenos Aires*, 29(2), 117-120.
- Center for Behavioral Health Statistics and Quality (2015). *Behavioral health trends in the United States: results from the 2014 National Survey on drug use and health* (HHS publication SMA 15-4927, NSDUH series H-50) [consultado 18 Sep 2016]. Disponible en: <https://www.samhsa.gov/data/sites/default/files/NSDUHFRR12014/NSDUHFRR12014.pdf>.
- Chamberlain, S. & Sahakian, B. (2004). The neuropsychology of mood disorders. *Current Psychiatry Reports*, 6, 451-458.
- Chamberlain, S. & Sahakian, B. (2006). The neuropsychology of mood disorders. *Current Psychiatry Reports*, 8(6), 458-463.
- Conger, J. J. (1956). Alcoholism: Theory, problem and challenge. II. Reinforcement theory and the dynamics of alcoholism. *Quarterly Journal of Studies on Alcohol*, 17, 296-305.
- Cornelius, J., Bukstein, O., Birmaher, B., Salloum, I., Lynch, K., Pollock, N., ... & Clark, D. (2001). Fluoxetine in adolescents with major depression and an alcohol use disorder: An open-label trial. *Addictive Behaviors*, 26, 735-739.
- Cornelius, J., Clark, D., Bukstein, O., Kelly, T., Salloum, I. & Wood, D. (2005). Fluoxetine in adolescents with comorbid major depression and an alcohol use disorder: A 3-year follow-up study. *Addictive Behaviors*, 30, 807-814. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addbeh.2004.08.025>
- Czéh, B., Fuchs, E., Wiborg, O. & Simon, M. (2016). Animal models of major depression and their clinical implications. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 64(4), 293-310. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.04.004>
- Damian, J. P. & Ungerfeld, R. (2011). The stress response of frequently electroejaculated rams to electroejaculation: Hormonal, physiological, biochemical, hematological and behavioural parameters. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 646-650. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01722.x>
- De Freitas, C. M., Busanello, A., Schaffer, L. F., Peroza, L. R., Krum, B. N., Leal, C. Q., ... & Fachineto, R. (2016). Behavioral and neurochemical effects induced by reserpine in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 233(3), 457-467. <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-015-4118-4>
- Deacon, R. M. (2013). Measuring motor coordination in mice. *Journal of Visualized Experiments*, 29(75), e2609. <http://dx.doi.org/10.3791/2609>
- Deussing, J. (2006). Animal models of depression. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 3(4), 375-383. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddmod.2006.11.003>
- Deykin, E., Levy, J. & Wells, V. (1987). Adolescent depression, alcohol and drug abuse. *American Journal of Public Health*, 77(2), 178-182.
- Diehl, D. & Gershon, S. (1992). The role of dopamine in mood disorders. *Comprehensive Psychiatry*, 33(2), 115-120.
- Dulawa, S. C., Holick, K. A., Gundersen, B. & Hen, R. (2004). Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology*, 29(7), 1321-1330. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.npp.1300433>
- Dyr, W., McBride, W., Lumenga, L., Lia, T. & Murphy, J. (1993). Effects of D1 and D2 dopamine receptor agents on ethanol consumption in the high-alcohol-drinking (HAD) line of rats. *Alcohol*, 10(3), 207-212.
- Escorihuela, R. & Fernández-Teruel, A. (1998). Modelos animales en psicopatología y psicofarmacología: del análisis experimental de la conducta a la neurogenética. *Psicología Conductual*, 6(1), 165-191.
- Fabio, M. C., Nizhniko, M., Spear, N. & Pautassi, R. (2014). Binge ethanol intoxication heightens subsequent ethanol intake in adolescent, but not adult, rats. *Developmental Psychobiology*, 56(3), 574-583. <http://dx.doi.org/10.1002/dev.21101>
- Fernández, M., Fabio, M. C., Miranda-Morales, R., Virgolini, M., de Giovanni, L., Hansen, C., ... & Pautassi, R. M. (2016). Age-related effects of chronic restraint stress on ethanol drinking, ethanol-induced sedation, and on basal and stress-induced anxiety response. *Alcohol*, 51, 89-100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.alcohol.2015.11.009>
- Fouls, J., Adamson, S., Boden, J., Williman, J. & Mulder, J. (2015). Depression in patients with alcohol use disorders: Systematic review and meta-analysis of outcomes for independent and substance-induced disorders. *Journal of Affective Disorders*, 185, 47-59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2015.06.024>
- Frey, B., Andreatza, A., Cereser, K., Martins, M., Valvassori, S., Reus, G., ... & Kapezinski, F. (2006). Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sciences*, 79, 281-286. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2006.01.002>
- Gómez-Restrepo, C., Bohórquez, A., Pinto Masis, D., Gil Laverde, J. F. A., Rondón Sepúlveda, M. & Díaz Granados, N. (2004). Prevalencia de depresión y factores asociados con ella en la población colombiana. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 16(6), 378-386. <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892004001200003>
- González-Forteza, C., Hermsillo de la Torre, A., Vacio-Muro, M. A., Peralta, R. & Wagner, F. (2015). Depresión en adolescentes.

- Un problema oculto para la salud pública y la práctica clínica. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 72(2), 149-155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmhix.2015.05.006>
- Graham, K., Massak, A., Demers, A. & Rehm, J. (2007). Does the association between alcohol consumption and depression depend on how they are measured? *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 31(1), 78-88. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00274.x>
- Guttmanova, K., Bailey, J., Hill, K., Lee, J., Hawkins, J., Woods, M. & Catalano, R. (2011). Sensitive periods for adolescent alcohol use initiation: Predicting the lifetime occurrence and chronicity of alcohol problems in adulthood. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs*, 72(2), 221-231.
- Hillbom, H. (1971). Thyroid state and voluntary alcohol consumption of albino rats. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 29(1), 95-105.
- Horwitz, A. & Raskin, H. (1991). Becoming married, depression, and alcohol problems among young adults. *Journal of Health and Social Behavior*, 32(3), 221-237.
- Huang, R., Ho, S., Wang, M., Lo, W. & Lam, T. (2016). Reported alcohol drinking and mental health problems in Hong Kong Chinese adolescents. *Drug and Alcohol Dependence*, 164, 47-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2016.04.028>
- Huot, R., Thirvikraman, K., Meaney, M. & Plotsky, P. (2001). Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology*, 158, 366-373. <http://dx.doi.org/10.1007/s002130100701>
- Isorna, M., Fariña, F., Sierra, J. C. & Vallejo-Medina, P. (2015). Binge drinking: conductas sexuales de riesgo y drogas facilitadoras del asalto sexual en jóvenes españoles. *Suma Psicológica*, 22(1), 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sumpsi.2015.05.001>
- Kato, T., Kasahara, T., Kubota-Sakashita, M., Kato, T. & Nakajima, K. (2016). Animal models of recurrent or bipolar depression. *Neuroscience*, 321(3), 189-196. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.08.016>
- Leamy, T., Connors, J., Voisey, J., Young, R. & Gullo, M. (2016). Alcohol misuse in emerging adulthood: Association of dopamine and serotonin receptor genes with impulsivity-related cognition. *Addictive Behaviors*, 63, 29-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addbeh.2016.05.008>
- Li, S., Han, J., Wang, D. S., Feng, B., Deng, Y. T., Wang, X. S., ... & Zhao, M. G. (2016). Echinocystic acid reduces reserpine-induced pain/depression dyad in mice. *Metabolic Brain Disease*, 31(2), 455-463. <http://dx.doi.org/10.1007/s11011-015-9786-6>
- Linseman, M. (1990). Effects of dopaminergic agents on alcohol consumption by rats in a limited access paradigm. *Psychopharmacology*, 100, 195-200.
- Machado-Vieira, R., Kapczinski, F. & Soares, J. (2004). Perspectives for the development of animal models of bipolar disorders. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 28, 209-224. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpb.2003.10.015>
- Minor, T. & Hanff, T. (2015). Adenosine signaling in reserpine-induced depression in rats. *Behavioural Brain Research*, 286(1), 184-191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.032>
- Miranda-Morales, R. S., Haymal, B. & Pautassi, R. M. (2016). Effects of ethanol exposure in a familiar or isolated context during infancy on ethanol intake during adolescence. *Developmental Psychobiology*, 10 <http://dx.doi.org/10.1002/dev.21427>
- Mohamed, H. S. (2016). Transcranial low-level infrared laser irradiation ameliorates depression induced by reserpine in rats. *Lasers in Medical Science*, 31(8), 1651-1656. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-2033-5>
- Mustaca, A. & Kamenetzky, V. (2006). Alcoholismo y ansiedad: modelos animales. *International Journal of Psychology and Psychocological Therapy*, 6(3), 343-364.
- Nestler, E. & Hyman, S. (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 13(10), 1161-1169. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2647>
- Niubó, M., Rodríguez, O., Gorguet, C. & Cardona, D. (1999). Efecto del tiroides desecado sobre la ingestión de alcohol en ratas wistar alcohólicas crónicas. *Medisan*, 3(3), 48-53.
- Ozerov, A., Bagmetova, V., Chernysheva, V. & Tyurenkov, I. (2016). Comparison of the efficiency of adeprophen and antidepressants of various groups on the model of reserpine-induced depression in rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 160(5), 649-652. <http://dx.doi.org/10.1007/s10517-016-3240-6>
- Pautassi, R., Camarini, R., Quadros, I., Miczek, K. & Israel, Y. (2010). Genetic and environmental influences on ethanol consumption: Perspectives from preclinical research. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 34(6), 976-987. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.21.1.1>
- Pautassi, R. (2013). Consumo de alcohol durante la adolescencia y el desarrollo temprano, causas y consecuencias. *Ciencia e Investigación*, 63(4), 25-38.
- Pautassi, R. M., Godoy, J. C. & Molina, J. C. (2015). Adolescent rats are resistant to the development of ethanol-induced chronic tolerance and ethanol-induced conditioned aversion. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 138, 58-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2015.09.012>
- Pilatti, A., Read, J., Vera, B., Caneto, F., Garimaldi, J. & Kahler, C. (2014). The Spanish version of the Brief Young Adult Alcohol Consequences Questionnaire (B-YAACQ): A Rasch Model Analysis. *Addictive Behaviors*, 39(5), 842-847. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addbeh.2014.01.026>
- Ponce, G., Jiménez-Arriero, M. Á. & Rubio, G. (2003). Tratamiento farmacológico de la dependencia alcohólica. *Trastornos Adictivos*, 5(1), 27-32.
- Radanović-Grgurić, L., Filaković, P., Barkić, J., Mandić, N., Karner, I. & Smoje, J. (2003). Depresión en pacientes con alteraciones del tiroides. *European Journal of Psychiatry*, 17(3), 123-134.
- Raymond, A., Schacht, J. & Book, S. (2014). Pharmacologic treatment of alcoholism. *Handbook of Clinical Neurology*, 125, 527-542. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-62619-6.00030-6>
- Rezvani, A., Overstreet, D., Yanga, Y., Maisonneuve, I., Bandaragec, U., Kuehnc, M. & Glickb, S. (1997). Attenuation of alcohol consumption by a novel nontoxic ibogaine analogue (18-methoxycoronaridine) in alcohol-preferring rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 58(2), 615-619.
- Rossing, M., Cushing, K., Voigt, L., Wicklund, K. & Daling, J. (2000). Risk of papillary thyroid cancer in women in relation to smoking and alcohol consumption. *Epidemiology*, 11(1), 4954.
- Salgado-Pineda, P., Delaveau, P., Olivier, B. & Nieoullon, A. (2005). Dopaminergic contribution to the regulation of emotional perception. *Clinical Neuropharmacology*, 28(5), 228-237.
- Sanchez-Queija, I., Moreno, C., Rivera, F. & Ramos, P. (2015). Tendencias en el consumo de alcohol en los adolescentes escolarizados españoles a lo largo de la primera década del siglo XXI. *Gaceta Sanitaria*, 29(3), 184-189. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gaceta.2015.01.004>
- Scheinert, R. B., Haeri, M. H., Lehmann, M. L. & Herkenham, M. (2016). Therapeutic effects of stress programmed lymphocytes transferred to chronically stressed mice. *Progress in NeuroPsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 70(17) <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpb.2016.04.010>
- Schuckit, M. (1987). Biological vulnerability to alcoholism. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 55(3), 301-309.
- Sher, L. (2004). Depression and alcohol. *QJM: An International Journal of Medicine*, 97, 237-240. <http://dx.doi.org/10.1093/qjmed/hch045>

- Simmons, W., Avery, A., Barcalow, J., Bodurka, J., Drevets, W. & Bellgowan, P. (2012). Keeping the body in mind: Insula functional organization and functional connectivity integrate interoceptive, exteroceptive, and emotional awareness. *Human Brain Mapping*, 34(11), 2944-2958. <http://dx.doi.org/10.1002/hbm.22113>.
- Socala, K., Nieoczym, D., Pieróg, M., Szuster-Ciesielska, A., Wyska, E. & Wlaź, P. (2016). Antidepressant-like activity of sildenafil following acute and subchronic treatment in the forced swim test: Effects of restraint stress and monoamine depletion. *Metabolic Brain Disease*, 31, 1095-1104. <http://dx.doi.org/10.1007/s11011-016-9852-8>
- Spear, L. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24(4), 417-463.
- Suarez-Escudero, J. (2014). Discapacidad y neurociencias: la magnitud del déficit neurológico y neuropsiquiátrico. *Acta Neurológica Colombiana*, 30(4), 290-299.
- Torrens, M. (2001). El papel de la farmacoterapia: nuevas perspectivas en el tratamiento de las drogodependencias y alcoholismo. *Cuadernos de Psiquiatría Comunitaria*, 1(1), 57-63.
- Tucker, L. B., Burke, J. F., Fu, A. H. & McCabe, J. T. (2016). Neuropsychiatric symptom modeling in male and female c57bl/6j mice after experimental traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma* [Epub ahead of print]. <http://dx.doi.org/10.1089/neu.2016.4508>
- Volkow, N., Wang, G., Fowler, J., Tomasi, D. & Telang, F. (2011). Addiction: Beyond dopamine reward circuitry. *PNAS*, 108(37), 15037-15042. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1010654108>
- Windle, M. & Davies, P. (1999). Depression and heavy alcohol use among adolescents: Concurrent and prospective relations. *Development and Psychopathology*, 11, 823-844.
- Winer, B. J. (1991). *Statistical principles in experimental design* (2nd ed.). New York, NY: McGraw-Hill.